

# NOTA APPLICATIVA

**LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL)**  
**Test per la determinazione di Endotossine**  
**(Lipopolisaccaridi) da Batteri Gram-negativi**

LAL  
**N. 1039**  
**MARZO 2007**

## "LAL" METODO GEL-CLOT TEST SINGOLI

### □ Introduzione

Il *Limulus Amebocyte Lysate Test* (LAL), se impiegato seguendo le linee guida della Food and Drug Administration USA (1), può sostituire il Test del coniglio per pirogeni riportato nella Pharmacopea USA (USP XXIV) sui prodotti finiti (iniezzabili nell'uomo e presidi medico-chirurgici). Il LAL Test è raccomandato per la determinazione qualitativa e quantitativa di endotossine in materie prime impiegate nella produzione, acqua inclusa, e per il monitoraggio "in-process" dei livelli di endotossina. Il USP Bacterial Endotoxin Test (2) è il test ufficiale riportato nelle specifiche monografie della USP XXIV.

### □ Storia e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885. Negli anni '50 Bang presso il Marine Biological Laboratory di Wood Hole nel MA scoprì (3) che i batteri Gram negativi causavano la coagulazione del sangue del *Limulus* (4). Levin e Bang scoprirono successivamente che la reazione era enzimatica e che l'enzima si trovava nei granuli degli amebociti (5). Dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un componente della parete cellulare dei batteri chiamata endotossina o lipopolisaccaride (6). Dalle conoscenze odierne si sa che la reazione che porta alla formazione del gel è una reazione enzimatica a cascata. Mentre la reazione completa non è ancora chiara, è stata ben descritta l'ultima fase. La proteina coagulabile (coagulogeno) è scissa mediante un enzima coagulante attivato; i prodotti insolubili della scissione si uniscono per interazione ionica formando il gel. Informazioni più dettagliate sulla reazione del LAL e relative applicazioni si trovano in letteratura (7, 8, 9).

## PROCEDURA OPERATIVA STANDARD

### - Oggetto

Determinazione qualitativa e semi-quantitativa delle endotossine, prodotte da batteri Gram negativi, in farmaci parenterali umani e veterinari, prodotti biologici e dispositivi medico-chirurgici.

### - Obiettivo

Rispettare i "limiti" di presenza delle endotossine stabiliti dalle varie Farmacopee, a seconda delle tipologie di prodotti, allo scopo di evitare che risultino pericolose per l'uomo e per gli animali.

### - Terminologia

Apirogeno = esente da sostanze pirogeniche.  
Attivazione = proprietà del campione di causare la gelificazione anche in assenza di endotossine.  
CSE = Control Standard Endotoxin (Endotossina Standard di Controllo).  
Depirogenazione = Procedura di eliminazione delle sostanze pirogeniche da un campione o da un materiale mediante trattamenti diversi.  
Endotossina = Lipopolisaccaride (LPS) presente sulla parete dei batteri Gram negativi.  
EU = Unità di endotossina  
Gel-clot = Metodo di gelificazione del lisato.  
Gelificazione (coagulo) = processo che avviene nel lisato del *Limulus* in presenza di Endotossine prodotte da batteri Gram negativi.  
Inibizione = proprietà del campione di impedire la gelificazione anche in presenza di endotossine.  
Interferenza = proprietà di un campione di interferire con il processo di gelificazione del lisato, causando Inibizione e/o Attivazione.  
IU = Unità Internazionali (di endotossine).  
LAL = *Limulus Amebocyte Lysate* (Lisato degli Amebociti del *Limulus*).  
Limite endotossinico = Valore massimo di concentrazione endotossinica che può essere presente in un prodotto, secondo Farmacopea.  
Lisato = Estratto liofilizzato degli amebociti del *Limulus*. (Costituisce il reagente di base del LAL test).  
Pirogeno = sostanza che provoca innalzamento della temperatura.  
Endotoxin Potency = concentrazione (attività dell'endotossina) espressa in UE/IU / ml.  
RSE = Reference Standard Endotoxin (Endotossina Standard di Riferimento internazionale).  
Sensibilità = capacità di un lisato (LAL) di reagire in presenza di una determinata quantità di endotossine.

### **- Norme di Riferimento**

Le normative che regolano l'uso del LAL test sono contenute nelle varie Farmacopee, nei rispettivi capitoli relativi alle "Endotossine batteriche" : Europea (E Ph); Americana (USP XXIV) e Guideline della Food and Drug Administration (FDA U.S.A.) ; Giapponese ; che sono le più importanti a livello mondiale.

A livello nazionale : Farmacopea Italiana X edizione 1998 (F.U. X) 2.6.14  
"Endotossine batteriche" Pag 113.

### **- Responsabilità**

Il test viene effettuato nel Laboratorio di Controllo Qualità (C.Q.) delle Aziende , per cui la responsabilità dell'analisi e del conseguente responso ricade sul Responsabile C.Q.

Nel caso di utilizzazione per ricerca delle endotossine in altri tipi di prodotti che non siano "iniettabili" o "presidi medici" , detta responsabilità ricadrà sul relativo Responsabile di Laboratorio in cui il saggio viene effettuato.

### **- Materiali**

Reagenti:

#### **Lisato:**

LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) per metodica gel-clot ; sensibilità a scelta fra:

0.03 EU/ml (Art [17178](#)); 0.06 EU/ml (Art [17176](#)); 0.125 EU/ml (Art [17070](#)); 0.250 EU/ml (Art [17281](#)) a seconda dei "limiti" del prodotto da saggiare. E' confezionato in vials già dosato per test singoli. In alternativa anche in vials per test multipli (20 test o 50 test).

#### **Endotossine:**

1 - Control Standard Endotoxin (CSE) = endotossina di lavoro (Art [17078](#)).

Serve per la preparazione dei controlli positivi del test, degli standard per la validazione del lisato, dei controlli positivi del prodotto.

2 - Reference Standard Endotoxin (RSE) = Endotossina Standard di Riferimento (EC-6 = E. coli 0113 - Art [17152](#) RSE USA) (Art [18174](#) BRP4 Europea) (Farmacopea Giapponese). E' la stessa per le 3 Farmacopee sopra citate e per la Organizzazione Mondiale della Sanità (OSM).

#### **Acqua per LAL (LRW = LAL Reagent Water) :**

acqua sterile apirogena ( da 20 ml - 50 ml - 100 ml - da 500 ml - 1.000 ml). Serve per la ricostituzione del lisato e delle endotossine CSE e RSE, oppure per effettuare le diluizioni delle endotossine stesse o dei campioni da saggiare.

#### **Altri reagenti apirogeni :**

soluzione tampone (Art [17098](#)) per la ricostituzione del lisato nel caso in cui i campioni da saggiare abbiano il pH con valori esterni al range ottimale per il test (pH 6.00 – pH 8.00) ; in alternativa : acido cloridrico (HCl) (Art [17555](#)) - soda (NaOH) (Art [17556](#)) – tampone fosfato pH 6,8 (Art [24858](#)) - per l'aggiustamento del pH del campione entro il range ottimale.

#### **Prodotti di consumo apirogeni**

- Flaconi per la raccolta dei campioni
- Provette da saggio
- Provette per diluizioni
- Pipette graduate ( da 1 ml – 2 ml – 5 ml – 10 ml)
- Puntali per micropipette (da 200 e 1.000 µl )
- Siringhe per dosaggi ripetitivi

#### **Apparecchiature**

- Termostato a secco (37 °C +/- 0,5 °C.) per incubazione provette da saggio(Art [16489](#)).
- Vortex per agitazione delle endotossine (Art [15824](#)).
- Micro pipette per puntali da 200 µl e 1.000 µl

#### **Conservazione e durata**

I reagenti nella confezione originale possono essere conservati alla temperatura e sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta (non inferiore ai 12 mesi) :  
Lisato - 3 anni dalla data di produzione a 2-8 °C. se liofilizzato. 3 mesi a –20 °C se ricostituito.

#### **Endotossine**

- 3 anni dalla data di produzione a 2-8 °C. se liofilizzate. 4 settimane se ricostituite.

#### **Altri Reagenti**

- Vedere indicazioni sulle relative etichette.

#### **Materiali di consumo**

- esclusi i puntali conici per micropipette e le siringhe, tutti gli altri articoli di consumo indicati sono in vetro borosilicato riutilizzabili previa depirogenazione in stufa a secco. Scadenze di 24-36 mesi dalla data di produzione.

#### **Certificati**

Tutti i reagenti ed i materiali di consumo sono accompagnati da relativo Certificato di Analisi attestante le caratteristiche specifiche per uso LAL test.

## Decontaminazione

Tutti i reagenti sono dotati di Schede di Sicurezza attestante le relative caratteristiche chimico-fisiche, grado di pericolosità e modalità per la loro eliminazione dopo l'uso.

(Vedi Schede di Sicurezza allegate: "Lisato Pyrotell" Pag 1 e 2; "Control Standard Endotoxin CSE" Pag 1 e 2).

## - Protocollo

### Prelievo del campione e preparazione

I campioni devono essere prelevati asetticamente e trasferiti in contenitori apirogeni. Si raccomanda l'impiego di vetreria riutilizzabile depiogenata, per ridurre l'adsorbimento dell'endotossina alle superfici del contenitore. Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile ed alcune sostanze estraibili possono interferire con il LAL test. Per determinare se il lotto di contenitori è idoneo, si devono prelevare a caso alcuni contenitori dal lotto, risciacquarli con un piccolo volume di acqua per LAL sterile apirogena "Acila", lasciare riposare a temperatura ambiente per una ora ed eseguire il test del LAL sulla soluzione come se si trattasse di un campione. Il pH della soluzione lisato/campione (campione addizionato al Pyroquant 1) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il PH, se necessario, con HCl, NaOH o tampone (esenti da endotossina). Diluire HCl o NaOH concentrati con acqua per LAL apirogena "Acila" portando ad una normalità che non modifichi significativamente la diluizione del campione in esame dopo correzione. Non correggere il pH di soluzioni saline non tamponate, od acqua. Sostanze che denaturano le proteine, chelano i cationi, legano le endotossine, alterano lo stato idrofobico delle endotossine, possono causare interferenza nel test. L'interferenza si può evidenziare mediante il recupero di endotossina, più o meno significativo di quanto ci si attende, da un quantitativo noto di endotossina standard aggiunta al campione (vedi Capitolo "Limitazioni del metodo"). In molti casi, la diluizione del campione riduce la concentrazione e l'attività delle sostanze interferenti consentendo di ottenere risultati validi. Idonei controlli e schemi di diluizione si trovano al Capitolo "Metodo di esecuzione". I campioni devono essere esaminati al più presto possibile dopo il loro prelievo. Può essere utile congelare un campione non sterile che sarà conservato o spedito prima del test.

Campioni con presunte basse concentrazioni di endotossina (inferiori a 1 UE/ml) devono essere testati per valutare la eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

### Ricostituzione del lisato in vial per test singolo

1. Il Lisato contenuto nel vial (STV) è reidratato con 0,2 ml del campione in esame (vedi Capitolo "Esecuzione del test").
2. Picchiare leggermente il vial (STV) in modo che il lisato Pyrotell si trovi sul fondo del vial. Rimuovere il sigillo di chiusura ed eliminare il vuoto sollevando di poco il tappo di colore grigio. Fare attenzione a non contaminare l'imboccatura del vial. Togliere ed eliminare il tappo; non iniettare attraverso il tappo e non riutilizzarlo. Un piccolo quantitativo di LAL eventualmente rimasto adeso al tappo non influirà sul test.
3. I pellet di LAL liofilizzato solubilizzano entro un minuto dal momento dell'aggiunta del campione in esame. Dopo reidratazione, agitare delicatamente il contenuto del vial per assicurare l'omogeneità.

### Metodo di esecuzione del test

#### Reagenti:

1. Vial singolo (STV) di lisato Pyrotell (vedi Capitolo Descrizione e metodo di ricostituzione).
2. Acqua per LAL sterile apirogena "Acila" da ordinare specificatamente. Poiché il limite di endotossina per l'acqua per iniettabili è di 0,25 UE/ml, questa ed i prodotti iniettabili finiti possono avere reazione positiva con alcuni lotti di Pyrotell. Per certificare un nuovo lotto di acqua per LAL con un dato lotto di Pyrotell, allestire diluizioni di endotossina standard con il nuovo lotto di acqua per confermare la sensibilità del Pyrotell.  
Se la sensibilità del lotto è confermata ed il controllo negativo non dimostra aumento di viscosità e precipitazione di flocculi, l'acqua è idonea per essere impiegata nel test. Usare acqua sterile apirogena "Acila" per la ricostituzione degli standard di endotossina, per la diluizione degli standard di endotossina e per i campioni in esame.
3. Endotossina standard. Deve essere ordinata separatamente. La Endotossina Standard di Controllo (CSE) si utilizza per confermare la sensibilità del Pyrotell, validare il prodotto, approntare i controlli di inibizione. Ogni vial contiene un peso noto di endotossina. Nella preparazione dell'Endotossina Standard di Riferimento USP (EC-6) si devono seguire alla lettera le istruzioni per la ricostituzione e la conservazione riportate nella apposita Nota Applicativa. Differenti lotti di CSE possono avere differenti attività (UE/ng) se analizzati con differenti lotti di Pyrotell. Richiedere il Certificato di Analisi per l'attività della CSE con uno specifico lotto di Pyrotell.

## Controlli

I controlli si rendono necessari per assicurare la validità del test. Le metodiche da seguire sono dettagliate nei documenti della FDA (1) e USP (2).

### 1. Controlli di endotossina

A. Serie di standard di endotossina. Approntare una serie di diluizioni preparate al momento partendo dalla soluzione di endotossina base ogni giorno. Le diluizioni dovranno portare ad una serie finale di diluizioni al raddoppio per includere la sensibilità ( $\lambda$ ) del Pyrotell. Si raccomandano concentrazioni di  $2\lambda$ ,  $1\lambda$ ,  $0,5\lambda$  e  $0,25\lambda$  per confermare la sensibilità del Pyrotell. Utilizzare meno diluizioni possibili con gli appropriati volumi per massimizzare l'accuratezza. In talune circostanze si possono usare controlli positivi invece di una serie di concentrazioni standard. Fare riferimento alle Linee Guida della FDA (1) al Capitolo "Routine Testing of Drugs by the LAL Test". La concentrazione del controllo positivo dovrebbe essere di  $2\lambda$ .

I controlli positivi del prodotto sono controlli di inibizione e consistono nel campione o diluizione del campione ai quali si aggiunge l'endotossina standard. La concentrazione finale dell'endotossina aggiunta al campione in esame dovrebbe essere di  $2\lambda$ .

### 2. Controlli negativi

Un controllo negativo di acqua per LAL apirogena sterile "Acila" dovrebbe essere incluso in ogni serie di campioni esaminati. Durante la validazione del prodotto od il test di inibizione/attivazione (1, 2), il campione utilizzato per diluire l'endotossina standard deve essere trattato come un Controllo negativo.

## Preparazione dei campioni

Diluire i campioni alla richiesta concentrazione per eseguire un test con valore soglia ("pass/fail") oppure eseguire un test saggiando una serie di concentrazioni differenti (esempi dei due tipi di test sono riportati nel Capitolo "Risultati ed Interpretazione"). Le diluizioni devono essere eseguite in provette depirogenate ed il volume trasferito nel vial STV. La diluizione analizzata per il test "pass/fail" e' determinata dalla sensibilità del Pyrotell ed il limite di endotossina per il campione. Fare riferimento a " Limitation of Procedure" od alle Linee Guida della FDA (1) per comprendere e calcolare la Minima Concentrazione Valida (MVC) e la Massima Diluizione Valida (MVD).

## Esecuzione del test

Per ottenere risultati soddisfacenti è indispensabile applicare una metodologia accurata e ripetitiva.

1. Erogare 0,2 ml del campione in esame o del controllo direttamente nella vial STV mediante una pipetta graduata con incrementi di 0,1 ml o pipettatore automatico. Approntare per primi i controlli negativi. Aggiungere le concentrazioni standard di endotossina ad ogni vial STV partendo dalla concentrazione più bassa per arrivare a quella più alta in ogni serie. Agitare con vigore il supporto con le provette per 20-30 secondi per assicurare una buona omogeneità. In caso di poche provette, ogni provetta può esser agitata su Vortex per 1-2 secondi. Una agitazione inadeguata è la prima causa di risultati insoddisfacenti.

2. Trasferire le provette di reazione in bagnomaria o termostato a secco a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per  $60 \pm 2$  minuti. La reazione inizia quando il campione e' aggiunto al LAL ma non raggiunge le condizioni ideali sino a quando si raggiungono i  $37^{\circ}\text{C}$ . Se si esaminano in parallelo più campioni, i test devono essere eseguiti per "batch" ed iniziati ad intervalli tali che permettano la lettura di ciascun campione entro il tempo limite.

Non disturbare i vials STV durante il periodo di incubazione.

La reazione di formazione del gel e' delicata e può irreversibilmente essere compromessa se i vial sono toccati, agitati o fatti vibrare. Non utilizzare un bagnomaria con agitazione od altro sistema che sia una possibile fonte di vibrazione. Immergere i vial, ma non così in profondità che ci sia il rischio che galleggino o si muovano nel supporto.

3. Rimuovere i vial uno alla volta dal supporto ed eseguire l'interpretazione del risultato di ciascuno. Non asciugarli od urtarli contro la parete del supporto. Capovolgerli con un movimento delicato; non fermarsi in questo movimento a mezza via, a meno che si sia constatata la chiara mancanza di formazione del gel.

Un test positivo è indicato dalla formazione di un gel che non collassa quando il vial è capovolto.

## Risultati ed interpretazione

### Serie di Standard di Endotossina - Esempio

Confermare la sensibilità del Pyrotell e qualificare il laboratorio od il tecnico eseguendo il test del LAL su una serie di standard a concentrazioni note di endotossina che includa la sensibilità riportata in etichetta (ad esempio 2/ 1/ 0,5/ 0,25λ ).

Nell' esempio qui di seguito riportato la sensibilità è 0,25 UE/ml:

Concentrazione Endotossina	Risultato del test
0,5 UE/ml (2 λ )	+
0,25 UE/ml (1 λ )	+
0,125 UE/ ml (0,5 λ )	-
0,06 UE/ml (0,25 λ )	-
Acqua "Acila" (controllo negativo)	-

L' "endpoint" di questo test è definito come l'ultimo valore di diluizione che ha dato un risultato positivo. La sensibilità riportata in etichetta del Pyrotell è confermata se l'"endpoint" e' più o meno una diluizione al raddoppio. Nell' esempio riportato, la concentrazione di endotossina nel vial positiva della serie eseguita è 0,25 UE/ml e pertanto la sensibilità è confermata. Il test sarebbe stato valido (sensibilità confermata) anche nel caso in cui l' "endpoint" fosse stato 0,125 UE/ml oppure 0,5 UE/ml (errore del metodo). Per dimostrare un "endpoint" di 0,125 UE/ml , il livello 0,06 UE/ml deve essere presente in una serie ed essere negativo. Quando il test per la determinazione delle endotossine viene ripetuto più volte sullo stesso campione , la sensibilità è espressa come media geometrica (GM) delle sensibilità individuali:

( εe)

GM= antilogaritmo -----

f

dove:

εe = somma dei logaritmi "endpoint"

f = numero di "endpoint" ripetuti.

L'acqua per LAL come controllo negativo deve dare un risultato negativo. Se il controllo negativo gelifica, l'acqua per LAL o la vetreria od il Pyrotell sono contaminati. Il prodotto gelificato dovrebbe essere trasparente, senza aumento di viscosità. La formazione di "fiocchi tipo neve" od una precipitazione a flocculi indica una concentrazione di endotossina inferiore alla sensibilità del Pyrotell. In assenza della serie di diluizioni di endotossina, si può includere nei test un controllo positivo. Il controllo positivo, nell'esempio riportato, a  $2 \lambda$  e' 0,5 UE/ml. Se il controllo positivo e' negativo, la sensibilità del Pyrotell è inferiore di una diluizione al raddoppio alla sensibilità riportata in etichetta ed il test non è valido. Perdita di sensibilità può significare deterioramento del Pyrotell, caduta di attività dell'endotossina (a seguito di adsorbimento alle pareti del contenitore), oppure l'esecuzione del test è avvenuta in modo non corretto.

**Esempio di test a valore soglia ( "pass/fail" = "passa/non passa" )**

E' possibile analizzare la concentrazione di endotossine presenti in un campione con una determinata sensibilità di Pyrotell ed ottenere un risultato che indichi se il campione ha un contenuto di endotossina inferiore o superiore al limite prefissato. Nell'esempio qui riportato, la concentrazione del campione è di 1 mg/ml ed il limite desiderato o predeterminato di endotossina è di 3 UE/mg (vedi "Limitazioni del metodo"). Il limite espresso in UE/ml, (3EU/mg) (1mg/ml) = 3EU/ml e' maggiore della sensibilità del Pyrotell, (0,25 UE/ml), e pertanto il campione deve essere diluito per poter eseguire un test "pass/fail". Per determinare la diluizione del campione in esame che indichi un "pass", < 3 UE/ml, od un "fail",  $\geq 3 \text{ UE/ml}$  si deve dividere il limite di endotossina espresso in UE/ml per la sensibilità del LAL:

$$\frac{3 \text{ UE/ml}}{0,25 \text{ UE/ml}} = 12$$

Approntare la diluizione 1:12 aggiungendo 11 parti di acqua per LAL "Acila" ad una parte di campione ed eseguire il test. Il risultato indicherà se il campione passa la prova ad un limite di 3 UE/ml. I controlli positivi del prodotto si includono nel test agli stessi valori di diluizione per accertare la presenza di falsi risultati negativi.

**Esempio di test quantitativo**

L'endotossina si quantifica ricercando l'"endpoint" in una serie di diluizioni del campione. Nell'esempio sotto riportato, il campione è diluito con acqua apirogena "Acila" e le diluizioni sono testate;  $\lambda$  è 0,25 UE/ml. I risultati sono classificati come positivi o negativi.

Diluizioni del campione	Risultati del test
Non diluito	+
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
Controllo negativo	-

Per calcolare la concentrazione di endotossina nel campione, moltiplicare la sensibilità ( $\lambda$ ) del Pyroquant 1 per il reciproco della diluizione all'"endpoint":

$$\text{Conc} = \lambda \left( \frac{4}{1} \right) = 0,25 \text{ UE/ml} (4) = 1 \text{ UE/ml}$$

La concentrazione di test ripetuti e' espressa come media geometrica. Un controllo positivo del prodotto (campione addizionato di  $2 \lambda$  di endotossina standard) deve essere presente e dare positività per evidenziare eventuali risultati falsi negativi. Se il controllo positivo del prodotto risulta negativo ed il controllo positivo risulta positivo, il campione interferisce: inibisce la reazione del LAL. Il campione deve essere riesaminato ad un valore di diluizione più elevato (senza superare la MVD, vedi Capitolo "Limiti del test").

**Limiti del test**

Il metodo può avere limitazioni a seguito della capacità del campione di inibire od attivare il LAL test. Se il procedimento non può essere validato (1, 2) ad una concentrazione del campione che è superiore alla Minima Concentrazione Valida (MVC), il test del LAL non può sostituire il test dei pirogeni in conformità alla USP.

La MVC si calcola nel modo seguente: \_\_\_\_\_ (  $\lambda$  ) dose campione

limite di tolleranza endotossinica

dove:

$\lambda$  è espressa in UE/ml

la dose del campione è espressa in unità/peso in kg del corpo  
il limite di tolleranza endotossinica è espresso in UE/kg.

La Massima Diluizione Valida (MVD) è la diluizione del campione in esame contenente la MVC. E' la concentrazione iniziale del campione divisa per la MVC.

Il limite di tolleranza endotossinica (1) è 0,2 UE/kg per i medicinali a somministrazione per via intratecale e 5 UE/kg per tutti gli altri prodotti parenterali.

Il limite per i presidi medico chirurgici è espresso per ml su estrazione o volume di risciacquo ottenuti come descritto nelle linee guida della FDA (1).

**Per sistemi che vengono a contatto con fluidi cerebrospinali , il limite è 0,06 UE/ml; per quelli che non lo sono è di 0,5 UE/ml.**

Il limite per i presidi liquidi è lo stesso di quello dei medicinali.

La tripsina causa risultati falsi positivi a meno che non sia denaturata con trattamento al calore prima del test.

Prodotti quali sangue, siero, plasma devono essere trattati prima della esecuzione del test per inattivare gli inibitori (12).

### Previsione di risultati

La endotossina può essere quantificata se la concentrazione è superiore od uguale alla sensibilità del Pyrotell.

Materiali derivati da fonti biologiche, anche dopo purificazione biochimica, possono contenere livelli misurabili di endotossina.

L' acqua ottenuta per distillazione, osmosi inversa, ultrafiltrazione può contenere livelli di endotossina inferiori al rilevabile se il processo produttivo di purificazione e' eseguito correttamente e se l' acqua non e' contaminata dopo la produzione.

### Caratteristiche specifiche

L'errore del metodo LAL di gelificazione è più o meno una diluizione al raddoppio rispetto all' "endpoint" del test.

### Precauzioni

- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare un lotto di lisato con un lotto qualunque di endotossina CSE.  
Entrambi devono essere stati testati insieme nei confronti della endotossina di Riferimento (RSE). Sul Certificato di Analisi devono comparire sia il lotto del lisato che il lotto della CSE.
- Non utilizzare un lotto di lisato prima di averne verificato, mediante il test di "validazione", la sensibilità dichiarata dal produttore.
- Tutti i reagenti che vengono mantenuti a temperatura di frigorifero (2-8 °C.) o di freezer (- 20 °C.) devono essere riportati a temperatura ambiente prima di venire utilizzati.
- Evitare di tenere a temperatura ambiente, per tempi prolungati, tutti i reagenti la cui conservazione va effettuata a temperature controllate di refrigerazione (2-8°C.) o congelamento (- 20 °C.).
- L'impiego di temperature e/o tempi di incubazione diversi da quelli indicati dai protocolli operativi, portano ad ottenere risultati non affidabili.  
Non utilizzare termostati ad aria che non garantiscano il mantenimento della temperatura a 37 °C. +/- 0.5 °C. o che subiscano vibrazioni durante il periodo di incubazione del test, perché i risultati ottenuti non sono affidabili.
- Non utilizzare per l'incubazione dei bagni-maria a circolazione d'acqua, perché a causa delle vibrazioni che provocano, impediscono la formazione di un gel compatto anche in campioni che abbiano un alto contenuto di endotossine, dando origine a possibili falsi negativi.

### - 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, p. 1696 (85) United States Pharmacopeia, 23rd Revision 1995. U.S. Pharmacopeial Convention, INC-Rockville, MD.
3. Howell, W.H. 1885. Observation upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cueumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43: 4-5.
4. Bang, F.B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol.Bull. (Woods Hole,M.A.) 105:361-362
5. Levin, J. and F.B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. JohnsHopkins Hosp. 115:337-345.
6. Levin, J. and F.B. Ban. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 265-274.
7. Levin, J. and F.B.Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186197.
8. Novitsky, T.J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab.Oceanus 27:13-18.
9. Progress in Clinical and Biological Research Vol.231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte LysateTest. 1987. Watson, S.W., J.Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R.Liss, Inc., N.Y.
10. Tsujii, K. and S.J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.

11. 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. P.A.
12. Gould, M.C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell cultures. In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, NW.