

Le Test de Limulus

Introduction

Les normes de la pharmacopée imposent l'absence de substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques qui entrent en contact avec la circulation sanguine ou le système nerveux central. Ces substances pyrogènes (→ susceptible de provoquer une augmentation de la température corporelle) sont notamment les endotoxines des bactéries gram -, constituées du LPS.

Rappel : Les effets généraux des endotoxines

- Pyrogénicité entraînant mal de tête, myalgie, nausées...
- Lecopéne
- Hypotension pouvant être létale (choc endotoxinique)

Ces bactéries sont fréquentes dans les circuits d'alimentation en eau. Une eau, même stérile, peut contenir ces endotoxines à l'état de traces car elles sont très difficiles à éliminer : les endotoxines résistent à la chaleur, aux irradiations.

La recherche des pyrogènes est effectuée sur différents types de produits

- Industrie pharmaceutique
 - Matières premières, in-process, produits finis
 - Matériel médico-chirurgical
 - Produits sanguins
- Centre hospitalier - clinique - centre de dialyse
 - Eaux et produits de dialyse
 - Poches de nutrition parentérale
 - Solutions pour conservation d'organes

Limite acceptable pour l'homme est de 5 UE /kg/heure.

UE : Unité endotoxine

Les méthodes de détection des pyrogènes

La méthode de référence de détection des endotoxines

Dans la pharmacopée américaine, la méthode de référence est le test des pyrogènes ou test du « lapin » : Il consiste à mesurer l'augmentation de la température de 3 lapins, après injection intraveineuse de la solution, à tester. L'élévation de la température doit être au maximum de $\Delta = 1,15$ °C

Le test de limulus

Principe

La limule (*Limulus polyphemus*) ou « crabe en fer à cheval » possède une hémolymph (sang) contenant des cellules nommées améboocytes.

Le test utilise un extrait noté LAL (Lysat d'Améboocytes de Limules), ce lysat a la propriété de coaguler en présence de quantité infimes d'endotoxines bactériennes.

Le mélange LAL-échantillon est réalisé dans un tube à 37°C; la gélification se produit avant 1h d'incubation dans le cas d'un résultat positif.

Précautions lors de la réalisation de ce test :

La présence de traces d'endotoxines conduit à de faux positifs; il est impératif d'utiliser de la verrerie, de l'eau, des réactifs totalement exempts d'endotoxines.

Les sensibilités des lots de LAL vont de 0,03 à 0,5UE

Utilisation

Lorsque l'essai sur lysat d'améboocytes de limule (LAL) est effectué conformément aux directives de la FDA, ce test peut remplacer le test de dépistage des pyrogènes (de lapin) de la pharmacopée américaine.