

Lisato degli amebociti del *Limulus*

CHROMO-LAL

Prodotto da:  **ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED**
 124 Bennett E. Saint Jean Drive - E. Falmouth, MA 02536 USA

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

Licenza USA n. 700 PN001087-it rev5 Ott 2019

LISATO DEGLI AMEBOCITI DEL *LIMULUS* CHROMO-LAL

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

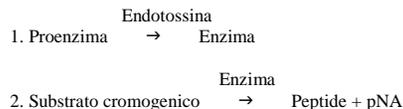
SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Negli anni '50, Frederik Bang osservò che l'infezione da batteri gram-negativi provocava la coagulazione intravascolare del granchio a ferro di cavallo, il *Limulus polyphemus* (1). Levin e Bang dimostrarono che la coagulazione era causata dall'attivazione di un numero di enzimi che si trovano nelle cellule ematiche (amebociti) del *Limulus polyphemus* e che l'attivazione aveva inizio con l'endotossina (lipopolisaccaride) nelle pareti cellulari dei batteri gram-negativi (2, 3, 4). Il test cromogenico, introdotto nel 1977 (5, 6), è una modifica che consente di misurare la concentrazione di endotossina in funzione dell'intensità di colore anziché mediante torbidità o gelificazione nella miscela di reazione. I risultati ottenuti con questo metodo modificato sono generalmente confrontabili con quelli ottenuti con il metodo di gelificazione o il metodo turbidimetrico entro i limiti di errore dei test.

Nel test Chromo-LAL, il LAL co-liofilizzato e il reagente substrato vengono miscelati in rapporto 1:1 con il campione di analisi in una micropiastrella o equivalente e incubati in un lettore a 37 ± 1 °C. Le misurazioni dell'assorbanza vengono raccolte in funzione del tempo dopo l'aggiunta di Chromo-LAL e analizzate con un software adeguato. Viene calcolato il tempo (tempo di inizio) che un campione impiega per raggiungere una specifica assorbanza (densità ottica di inizio); e viene generata una curva standard, che mostra la correlazione lineare tra il logaritmo del tempo di inizio e il logaritmo della concentrazione di endotossina standard. Il range massimo delle concentrazioni di endotossina per la curva standard è 0,005 EU/mL - 50 EU/mL. Per sensibilità (λ) del dosaggio si intende la concentrazione più bassa utilizzata nella curva standard. La massima sensibilità di questo test è di 0,005 EU/mL.

PRINCIPIO BIOLOGICO

Il lisato degli amebociti di *Limulus* (LAL) contiene enzimi che, in presenza di endotossina, vengono attivati con una serie di reazioni. L'ultimo enzima attivato nella cascata divide il cromoforo, la paranitro anilina (pNA), dal substrato cromogenico, producendo un colore giallo.



La quantità di pNA rilasciata e misurata fotometricamente a 405 nm è proporzionale alla quantità di endotossina presente nel sistema. Maggiore è la concentrazione di endotossina, più rapida è la reazione.

REAGENTI

I reagenti non aperti sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del contenitore. Prima della ricostituzione, portare i reagenti a temperatura ambiente e picchiettare su una superficie dura le fiale contenenti materiale liofilizzato in modo che materiale sciolto precipiti sul fondo della fiala.

1. Chromo-LAL, lisato degli amebociti del *Limulus* coliofilizzato con il substrato cromogenico

Questo reagente è un estratto acquoso di amebociti di *L. polyphemus*, tamponato a pH 7, e coliofilizzato con il substrato cromogenico. Ricostituire il Chromo-LAL immediatamente prima dell'uso con 3,2 mL di reagente acqua per LAL (LRW). Questa soluzione è stabile per 24 ore a 2-8 °C o per due settimane a -20 °C o a una temperatura inferiore se congelata subito dopo la ricostituzione e non contaminata. Il Chromo-LAL può essere congelato e scongelato una volta. La contaminazione può essere indicata da un colore giallo scuro che si sviluppa rapidamente dopo la ricostituzione. In normali condizioni d'uso il reagente diventa giallo lentamente.

2. Endotossina standard

L'endotossina standard di controllo (CSE) non viene fornita con il Chromo-LAL e deve pertanto essere ordinata separatamente. La CSE reperibile presso Associates of Cape Cod, Inc. è usata per costruire curve standard, convalidare il prodotto e preparare i controlli di inibizione. Ciascuna fiala contiene una quantità di peso misurata di endotossina. In alternativa, è possibile utilizzare l'endotossina standard di riferimento USP. Seguire le istruzioni del produttore relative alla ricostituzione e alla conservazione delle endotossine standard. I lotti di CSE possono esibire concentrazioni differenti (EU/ng) se analizzati con lotti differenti di Chromo-LAL. Se si utilizza la CSE, le concentrazioni di endotossina possono essere espresse in EU/mL se la concentrazione di un dato lotto di CSE è stata determinata con il lotto di Chromo-LAL in questione. (10,11).

3. Reagente acqua per LAL (LRW)

Il LRW è acqua sterile preparata mediante distillazione o osmosi inversa che non mostra nessuna endotossina rilevabile quando testata con Chromo-LAL. È possibile ottenere fiale addizionali di LRW presso Associates of Cape Cod, Inc.

Precauzioni e avvertenze: Il Chromo-LAL è esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*. Non utilizzare questi reagenti per il rilevamento di endotossinemia. Manipolare con cautela il reagente Chromo-LAL perché la sua tossicità non è stata

determinata e sono state segnalate allergie al LAL (7). È necessario utilizzare una tecnica asettica. Tutti i materiali che vengono a contatto con i campioni di analisi e i reagenti devono essere privi di endotossina rilevabile. I materiali resistenti al calore, compresa la vetreria pulita, possono essere privati dall'endotossina rilevabile mediante esposizione al calore secco a una temperatura minima di 250 °C per almeno 30 minuti (8).

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI ANALISI

Prelevare i campioni in modo da evitare la contaminazione microbica. Durante la manipolazione di campioni di analisi e reagenti utilizzare una tecnica asettica. Testare i campioni il più presto possibile dopo aver eseguito il prelievo, altrimenti conservarli a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Se si prevede l'insorgenza di crescita batterica, è possibile congelare i campioni. Confermare che la conservazione non riduce il livello di endotossina rilevabile nel campione (l'endotossina può adsorbirsi sulla superficie del contenitore). Molte sostanze interferiscono con il test Chromo-LAL. L'interferenza è indicata dall'inibizione, il recupero di una quantità minore di endotossina rispetto alla quantità nota presente in un campione; o mediante attivazione, il recupero di una quantità maggiore di endotossina rispetto alla quantità nota presente (vedere "Procedura" per il rilevamento di interferenze). L'interferenza viene, in genere, superata tramite diluizione del campione con reagente acqua per LAL. Non eseguire una diluizione superiore alla massima diluizione valida (MVD; 9, 10, 11, 12).

$$\text{MVD} = \frac{\text{limite endotossinico} \times \text{concentrazione del prodotto}}{\lambda}$$

Per alcuni composti, oltre alla diluizione, può essere necessario un trattamento speciale per eliminare l'interferenza. Ad esempio, gli emoderivati contenenti enzimi attivati possono causare risultati falso-positivi. Questi tipi di campioni possono essere diluiti con reagente acqua per LAL e riscaldati a una temperatura minima di 75 °C per un periodo di tempo indicato per eliminare l'interferenza senza perdita dell'attività endotossinica. È possibile che campioni con forte assorbimento a 405 nm interferiscano con il test ed è pertanto necessario eseguire precedentemente una diluizione.

PROCEDURA DI ANALISI

Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti:

1. Provette, micropiastre o prodotti equivalenti privi di endotossina rilevabile. Le provette e le micropiastre prive di endotossina interferente sono disponibili presso Associates of Cape Cod, Inc.
2. Pipette e puntali per pipette privi di endotossina rilevabile. Disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc.
3. Pipette automatiche a dosaggio ripetitivo con siringhe di erogazione prive di endotossina rilevabile.
4. Agitatore vortex.
5. Parafilm M®. In condizioni normali, il lato a contatto con il rivestimento in carta è apirogeno.
6. Lettore ottico dotato di apposito software e in grado di mantenere una temperatura uniforme di 37 ± 1 °C.

7. Software cinetico. È necessario un software che raccolga e archivi le letture della densità ottica (DO) a brevi intervalli. Il software deve anche calcolare "tempo di inizio" per il campione in ciascun pozzetto. Il tempo di inizio è il tempo necessario affinché la densità ottica (DO) di un determinato pozzetto raggiunga un valore DO specificato (densità ottica di inizio). Il valore selezionato per un test eseguito in una micropiastrella può essere compreso tra 0,03 e 0,2 unità DO; tuttavia, per i test di routine dovrebbe essere utilizzato lo stesso valore usato per la convalida del dosaggio di quel prodotto.

Il software deve generare i parametri della curva standard (pendenza, intercetta e coefficiente di correlazione) e calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni sconosciuti. Il software può eseguire calcoli aggiuntivi come il calcolo della concentrazione dell'endotossina recuperata nel controllo positivo del prodotto dopo la sottrazione dell'eventuale endotossina endogena presente nel campione.

Curva standard

Quando si prepara una curva standard, includere una curva standard costituita da almeno tre concentrazioni di endotossina, in duplicato, con ciascuna serie di campioni di analisi. È necessario aggiungere ulteriori concentrazioni in modo tale che vi sia almeno uno standard per ogni incremento logaritmico del range (10). Preparare le concentrazioni standard di endotossina per diluizione seriale a partire dalla concentrazione più alta o concentrazione base. Prima di eseguire il trasferimento iniziale, miscelare la concentrazione di base per circa 30 secondi utilizzando un agitatore vortex.

Per preparare le endotossine standard è possibile utilizzare qualsiasi schema di diluizione e le concentrazioni utilizzate per costruire la curva possono comprendere qualsiasi range entro i limiti da 0,005 a 50 EU/mL. La concentrazione più bassa presente nella curva è la sensibilità (λ) del dosaggio.

Un esempio di preparazione di serie ad ampio range con λ uguale a 0,005 EU/mL è indicato nella tabella seguente.

Concentrazioni standard EU/mL	Reagente acqua per LAL (μ L)	Soluzione standard di endotossina
50	950	50 μ L di soluzione base
5	900	100 μ L della soluzione da 50 EU/mL
0,5	900	100 μ L della soluzione da 5 EU/mL
0,05	900	100 μ L della soluzione da 0,5 EU/mL
0,005	900	100 μ L della soluzione da 0,05 EU/mL
Contr. neg.	1000	

Non si consiglia una curva standard archiviata (10). I parametri della curva varieranno in funzione del tempo dopo la ricostituzione del reagente. Pertanto, è necessario includere in ciascun test le concentrazioni standard di endotossina.

Controllo negativo

Con ciascuna serie di campioni devono essere inclusi controlli negativi in duplicato. Il controllo negativo è l'LRW utilizzato per diluire i campioni di analisi. Il tempo di inizio del controllo negativo deve essere almeno il 10% maggiore rispetto a quello dello standard meno concentrato. Una volta note le caratteristiche delle prestazioni del controllo negativo, l'operatore può interrompere il dosaggio prima che il tempo di esecuzione preimpostato sia completato (vedere "Tempo di esecuzione del dosaggio" sotto). Interrompere il dosaggio soltanto se si può concludere, dall'ispezione visiva della cinetica di reazione, che la concentrazione più bassa dello standard abbia raggiunto la densità ottica di inizio e che la densità ottica del controllo negativo sia tipicamente bassa.

Rilevamento di interferenze

Il controllo positivo del prodotto è un campione a cui viene aggiunta una quantità nota di endotossina standard (campione addizionato); questo controllo per il rilevamento dell'inibizione o dell'attivazione è incluso in un protocollo di analisi di routine. Confrontando il recupero della concentrazione di endotossina nel controllo positivo del prodotto con la concentrazione aggiunta nota, è possibile determinare se il campione inibisce (meno endotossina viene rilevata rispetto a quella presente) o attiva (viene rilevata più endotossina di quella presente) il dosaggio.

La concentrazione media calcolata di endotossina aggiunta (concentrazione del campione addizionato meno la concentrazione del campione) deve essere compresa tra il 50% e il 200% della concentrazione prevista dell'aggiunta per dimostrare che il prodotto non inibisce né attiva il dosaggio.

La concentrazione scelta per l'aggiunta dipenderà dal range della curva standard e dal limite endotossinico per la diluizione o la concentrazione del campione in esame (cutoff superato/respinto, 10).

La concentrazione dell'aggiunta deve essere una delle concentrazioni utilizzate nella curva standard e deve trovarsi vicino al centro del range standard. Per l'ampia curva del range sopra illustrata e con campioni con cutoff superato/respinto inferiore o uguale a 1 EU/mL, è possibile scegliere una concentrazione di endotossina di 0,5. Per lo stesso range di standard e con campioni con cutoff superato/respinto superiore a 1 EU/mL, è possibile scegliere fino a 5,0 EU/mL. Per intervalli più ristretti di concentrazioni standard, ad esempio da 0,005 a 1,6 EU/mL, sarebbe più adeguata una concentrazione di 4 λ o 0,02 EU/mL in particolar modo se il cutoff superato/respinto è decisamente inferiore a 1 EU/mL.

Dosaggio - Esempio di micropiastre da 96 pozzetti

1. Portare i campioni e i controlli a temperatura ambiente. Miscelare vigorosamente con un agitatore vortex immediatamente prima di trasferirli nei pozzetti della micropiastre.
2. Trasferire sulla micropiastre 100 μL di campione o controllo.
3. Preincubare la micropiastre a 37 ± 1 °C per almeno 10 minuti.
4. Ricostituire il reagente Chromo-LAL con 3,2 mL di reagente acqua per LAL o tampone Glucashield®.

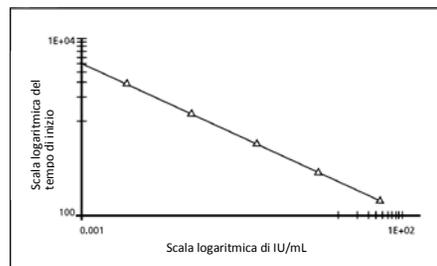
5. Trasferire 100 μL di reagente Chromo-LAL ricostituito in ciascun pozzetto il più rapidamente possibile utilizzando una pipetta automatica a dosaggio ripetitivo. Il rapporto tra campione e lisato deve essere 1:1
6. Coprire la micropiastre con Parafilm e miscelare accuratamente senza schizzare la miscela di reazione; questa è un'opzione presente in alcuni lettori.
7. Togliere la copertura in Parafilm e collocare immediatamente la micropiastre non coperta nell'incubatore/lettore di micropiastre impostato per la lettura a 405 nm e incubare a 37 ± 1 °C. Avviare il software cinetico.

Tempo di esecuzione del dosaggio

Il tempo necessario per il completamento della reazione dipende dal range di concentrazioni di endotossina scelto per la curva standard e dalle caratteristiche specifiche del lotto. Il "tempo di esecuzione", utilizzando una densità ottica (DO) di inizio di 0,05, viene in genere impostato per 60 minuti per una sensibilità del dosaggio di 0,05 EU/mL o per 100 minuti per una sensibilità di 0,005 EU/mL.

RISULTATI

La concentrazione di endotossina per il corrispondente tempo di inizio del campione sconosciuto viene letta dalla curva standard che è un grafico bilogarithmico dei tempi di inizio in funzione delle concentrazioni standard, o un grafico aritmetico dei logaritmi dei tempi di inizio in funzione dei logaritmi delle concentrazioni standard. Una tipica curva standard è illustrata di seguito.



L'equazione della retta nel grafico bilogarithmico generato per la curva standard illustrata è $Y = -0,2X + 3,14$, in cui Y = logaritmo del tempo di inizio e X = logaritmo della concentrazione di endotossina. La concentrazione di endotossina in un campione sconosciuto con un tempo medio di inizio di 1630 secondi verrebbe ottenuta calcolando il logaritmo del tempo di inizio, 3,212, risolvendo l'equazione per X e calcolando l'antilogaritmo di X per ottenere la concentrazione:

$$\begin{aligned} X &= (Y - 3,14) / -0,2 \\ X &= (3,212 - 3,14) / -0,2 \\ X &= -0,36 \\ \text{Antilog}(-0,36) &= 0,44 \text{ EU/mL} \end{aligned}$$

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La procedura è limitata dal grado di inibizione o di attivazione dimostrato dal campione di analisi. Se l'interferenza non può essere superata mediante diluizione o altri mezzi alla massima diluizione valida (MVD), il

dosaggio Chromo-LAL non può essere usato per misurare l'endotossina presente in quel campione.

VALORI ATTESI

L'endotossina presente nel campione di analisi può essere calcolata entro il range delle concentrazioni di endotossina usate per costruire la curva standard. Per riportare i risultati delle unità endotossiniche (EU) o delle unità internazionali (IU) di endotossina, è necessario utilizzare l'endotossina di riferimento standard (USP, 2° standard internazionale) o uno standard di controllo con concentrazione calibrata rispetto al riferimento.

Se è necessario diluire il campione di analisi per superare l'inibizione o l'attivazione, la più piccola quantità di endotossina rilevabile verrà incrementata di conseguenza.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

La linearità della curva standard, entro il range di concentrazione utilizzato per determinare i livelli di endotossina, deve essere verificata eseguendo il test sul numero adeguato di concentrazioni standard (vedere la curva sopra) in triplicato (10). Calcolare i parametri della curva standard senza calcolare la media dei tempi di inizio dei replicati. Il valore assoluto del coefficiente di correlazione, r , deve essere maggiore o uguale a 0,980. Lo stesso criterio di linearità viene applicato alle curve standard incluse nei test di routine (vedere la curva standard sopra riportata).

Nota - Se il coefficiente di correlazione delle caratteristiche prestazionali dell'analisi di regressione lineare soddisfa i criteri di accettazione (ovvero è maggiore o uguale a 0,980), è possibile utilizzare un'analisi di regressione polinomiale per generare i risultati dei controlli e dei campioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Bang, F.B. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362 (1953).
2. Levin, J., and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345 (1964).
3. Levin, J., and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274 (1964).
4. 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.
5. 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.
6. Iwanaga, Morita, Harada, Nakamura, Niwa, Takada, Kimura, and Sakakibara. 1978. Chromogenic Substrates for Horseshoe Crab Clotting Enzymes Its application for the assay of Bacterial Endotoxins. Haemostasis 7: 183-188.
7. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. Type I allergy induced by Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419 (1992).
8. Tsuji, K. and S.J. Harrison. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714 (1978).
9. USP, Bacterial endotoxins test. Current edition.
10. Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. July 15 (1991).
11. FDA 2012 Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers
12. European Pharmacopoeia, third edition publ. Section 2.6.14. Bacterial Endotoxins. European Pharmacopoeia Secretariat, Strasbourg, June (1996).