

Reactivo recombinante de LAL

PyroSmart NextGen®

Instrucciones de uso



Teléfono: (508) 540-3444
 Línea gratuita: (888) 395-2221
 Fax: (508) 540-8680
 Asistencia técnica: (800) 848-3248
 Servicio al cliente: (800) 525-8378

PN002641-esLA rev4

Junio de 2024

PyroSmart NextGen®

Reactivo cromogénico cinético recombinante para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas Gram negativas (lipopolisacáridos)

INDICACIONES

El ensayo recombinante PyroSmart NextGen® puede utilizarse como método analítico alternativo a las pruebas farmacopeicas para el análisis de los productos finales de medicamentos inyectables para humanos (incluidos productos biológicos), medicamentos inyectables para animales y productos sanitarios (1,2,3). La guía para la validación de los métodos analíticos alternativos puede encontrarse en USP <1223> y <1225> (4,5), y debe demostrarse que dichos métodos son equivalentes o superiores a los farmacopeicos. Este ensayo también puede utilizarse para la cuantificación de endotoxinas en artículos no farmacopeicos (p. ej., materias primas, como agua, y para la monitorización intraproceso) sin validación del método.

El ensayo recombinante PyroSmart NextGen® no debe ser usado para la detección de endotoxinas en muestras clínicas para el diagnóstico de enfermedades como la endotoxemia en humanos.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El reactivo PyroSmart NextGen® consta de tres proteínas recombinantes: Factor C, factor B y enzima procoagulante. En presencia de endotoxina, el factor C recombinante se convierte en un fragmento molecular activado que, a su vez, activa el factor B recombinante y la enzima procoagulante recombinante, lo que finalmente provoca la escisión proteolítica de un sustrato cromogénico incoloro formulado con PyroSmart NextGen®. La escisión del sustrato libera para-nitroanilina (pNA), que es amarilla y absorbe a 405 nm (figura 1). El cambio en absorbancia se mide de manera continua a intervalos periódicos a 37 ± 1 °C durante un tiempo de ejecución adecuado. Cuanto mayor es la concentración de endotoxinas, más rápido se libera la pNA, lo que a su vez produce un cambio más rápido en absorbancia.

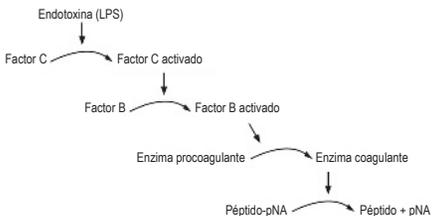


Figura 1: Mecanismo de cascada que comienza con la activación por endotoxinas del factor C y produce un aumento de absorbancia debido a la liberación de pNA

Tabla 1: Materiales suministrados con el PyroSmart NextGen®
 NOTA: El envasado a granel está disponible.

Componente	N.º de frascos	Notas
Reactivo PyroSmart NextGen®	2	Reconstituya cada frasco con 2,8 ml de tampón de reconstitución
Tampón de reconstitución PyroSmart NextGen®	2	

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

La toxicidad del PyroSmart NextGen® no se ha determinado, por lo que debe tenerse precaución al manipularlo.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad se indica en el frasco y en el envase externo.

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento de PyroSmart NextGen®

Reactivo liofilizado	Almacenar a 2 - 8 °C. Antes del uso, permitir que se establezca a temperatura ambiente durante al menos 30 min
Tampón de reconstitución	Almacenar a 2 - 8 °C. Antes del uso, permitir que se establezca a temperatura ambiente durante al menos 30 min
Reactivo reconstituido	Temperatura ambiente. Debe usarse en los 3 a 20 minutos tras la reconstitución

1. REALIZACIÓN DEL PYROSMART NEXTGEN® EN UN LECTOR DE MICROPLACAS PARA ABSORBANCIA

CONDICIONES DEL ENSAYO

PyroSmart NextGen® puede utilizarse para cuantificar la concentración de endotoxinas de dos formas:

- Ensayo de tiempo de activación:** donde se determina el tiempo que se tarda en alcanzar una densidad óptica (DO) umbral (denominado «tiempo de activación»). Mayores concentraciones de endotoxinas generan tiempos de activación más cortos. La curva estándar se construye representando gráficamente el logaritmo del tiempo de activación (eje Y) en función del logaritmo de la concentración estándar (eje X), y se utiliza para calcular las concentraciones de endotoxinas de las muestras.
- Ensayo de tasa:** donde la tasa media (Vmedia: mAbs/min) se calcula durante el curso de la prueba. Mayores concentraciones de endotoxinas generan mayores valores de Vmedia. La curva estándar se construye representando gráficamente la Vmedia (eje Y) en función de la concentración estándar (eje X), y se utiliza para determinar las concentraciones de endotoxinas de las muestras.

La tabla 3 muestra la configuración del software para ambos tipos de ensayo.

Tabla 3: Configuración del software para los ensayos PyroSmart NextGen® en un lector de microplacas

	Ensayo de tiempo de activación	Ensayo de tasa
Agitación	10 s	10 s
Lectura	Cinético, absorbancia	Cinético, absorbancia
Longitud de onda	405 nm	405/490 nm*
Intervalo de lectura	30 s**	30 s**
Tiempo de ejecución	60 min	30 min
Reducción de datos	DO de activación = 0,03 o mDO umbral = 30	Pyros® eXpress: V media Gen5®: V media, SoftMax® Pro: Vmáx

*O 405/492 nm, dependiendo de la capacidad del lector de microplacas

**El intervalo puede variar según el lector de microplacas

MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales que se suministran con el PyroSmart NextGen® se indican en la tabla 1. Los materiales y los equipos adicionales necesarios, pero NO suministrados con el PyroSmart NextGen® se indican en la tabla 4.

Tabla 4: Materiales y equipos necesarios, pero NO suministrados con el PyroSmart NextGen® para ensayos de lector de microplacas

Tipo de equipo	Especificación	Descripción/n.º de catálogo
Lector de microplacas para absorbancia con incubado	Capaz de mantener una temperatura de 37 °C mientras se realizan lecturas de absorbancia	p. ej., BioTek® ELx808™, lectores Molecular Devices o equivalente
Software de lector de microplacas	Permite la reducción de los datos por tiempo de activación o por tasa	p. ej., Pyros® eXpress o Gen5™ para ELx808™, Softmax® Pro para lectores Molecular Devices; o equivalente
Endotoxina estándar de control (EEC)++	10 ng/frasco calibrado frente a endotoxina estándar de referencia (EER) con PyroSmart NextGen®	p. ej., ACC EC010-5 o equivalente

Agua con reactivo LAL (Reagent Water, LRW)	Libre de endotoxinas interferentes	p. ej., ACC WP050C o equivalente
Microplacas de 96 pocillos	Microplacas cubiertas, sin recubrimiento y sin tratar, libres de endotoxina interferente	p. ej., ACC CA961-10 o equivalente
Tubos de dilución de vidrio despirogenados	Libre de endotoxinas interferentes	p. ej., ACC TB240-5, TB013-5, TB16C o equivalente
Un conjunto de micropipetas ajustables de un solo canal	Capaces de administrar volúmenes de 5-20 µL, 20-100 µL y 100-1000 µL	Las pipetas Gilson, Rainin tradicional o del modelo Eppendorf pueden utilizarse con las puntas indicadas a continuación o con sus equivalentes
Puntas de pipeta	Libres de endotoxinas interferentes. Capaces de administrar volúmenes de: 5-20 µL, 20-100 µL y 100-1000 µL	p. ej., ACC PPT25, PPT10 o equivalente
Pipeta de repetición con cilindros de jeringa compatibles	Administración automática de alícuotas	p. ej., repetidor Eppendorf Xstream® con BioPur® combitip de 2,5 ml o equivalente
Mezclador tipo vórtex	Cualquiera	Cualquiera
Reloj	Cualquiera	Cualquiera
Parafilm M®	El lado que entra en contacto con el protector de papel suele estar libre de endotoxinas detectables.	American National Can™
Gradilla de tubos	Cualquiera	Cualquiera
Soporte de microplacas inclinado	Cualquiera	Cualquiera

+Nota: No todos los productos están disponibles en cada país. Consulte a su proveedor local.

++Nota: El certificado de análisis y la potencia indicada en él son específicos de una combinación de lote de PyroSmart NextGen® y lote de EEC. Un lote determinado de EEC puede mostrar diferentes potencias (UE/ng) cuando se analiza con lotes distintos del PyroSmart NextGen®. Del mismo modo, lotes distintos de EEC pueden tener diferentes potencias cuando se analizan con el mismo lote del PyroSmart NextGen®.

CONTROLES

Control negativo: El agua de reactivo de LAL (ARL) sirve como control negativo.

Curva estándar: Una serie de curva estándar con una serie geométrica deberá ofrecer el intervalo de concentraciones de endotoxina requerido. Para obtener ejemplos, consulte la tabla 5.

Tabla 5: Ejemplos de intervalos y configuraciones de curva estándar para ambos ensayos

Ensayo de tiempo de activación		
Concentración de EEC (o EER) en UE/ml	Volumen de ARL	Solución de EEC (o EER) en UE/ml
50	-	-
5	900 µL	100 µL de 50 UE/ml
0,5	900 µL	100 µL de 5 UE/ml
0,05	900 µL	100 µL de 0,5 UE/ml
0,005	900 µL	100 µL de 0,05 UE/ml
Ensayo de tasa		
Concentración de EEC (o EER) en UE/ml	Volumen de ARL	Solución de EEC (o EER) en UE/ml
0,1	1960 µL	40 µL de 5 UE/ml
0,05	500 µL	500 µL de 0,1 UE/ml
0,025	500 µL	500 µL de 0,05 UE/ml
0,0125	500 µL	500 µL de 0,025 UE/ml
0,00625	500 µL	500 µL de 0,0125 UE/ml

Controles positivos del producto (CPP): Los CPP son controles de adecuación (inhibición o potenciación) y consisten en una muestra (o la dilución de una muestra) a la que se añade la endotoxina estándar. La endotoxina añadida debe dar una concentración que quede en el medio de la curva estándar. Por ejemplo, si la curva estándar es de

50 a 0,005 UE/ml, añada 5 µL de 5 UE/ml a los 50 µL de la muestra para obtener una concentración final de 0,5 UE/ml. Si la curva estándar es de 0,1 a 0,00625 UE/ml, añada 5 µL de 0,5 UE/ml a los 50 µL de la muestra para obtener una concentración final de 0,05 UE/ml.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

- Encienda el lector de microplacas para permitir que se equilibre a 37 °C.
- Configure el software con los parámetros adecuados (consulte la tabla 3).
- Prepare los controles y muestras adecuados.
- Prepare la ejecución del análisis como se indica en la figura 2. La configuración del análisis se describe con más detalle a continuación.
- Lea el análisis.

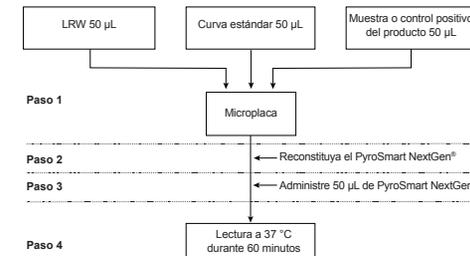


Figura 2: Esquema del procedimiento de análisis para ensayos de lector de microplacas

PASO 1: Transfiera la muestra analítica

Transfiera 50 µL de la muestra que se vaya a analizar (control negativo x2, serie estándar de endotoxina x2, diluciones de la muestra x2 y CPP para cada dilución de la muestra x2) a los pocillos adecuados de la microplaca como se define en la disposición de la microplaca del software.

PASO 2: Reconstituya el reactivo de LAL recombinante PyroSmart NextGen®

Deje que tanto el reactivo como el tampón de reconstitución se equilibren a temperatura ambiente. Golpee suavemente el frasco de reactivo para hacer que el material suelto se vaya al fondo del frasco. Rompa el vacío levantando asepticamente el tapón. Deseche el tapón. Transfiera 2,8 ml de tampón de reconstitución PyroSmart NextGen® al frasco de reactivo y cubra este con Parafilm. Dé vueltas suavemente al frasco durante el primer minuto, y a continuación déjelo reposar los 2 minutos siguientes (un total de 3 minutos de reconstitución antes del uso). No vuelva a mezclar antes del uso para evitar un exceso de espuma y pérdida de sensibilidad. Si se mezcla excesivamente, déjelo reposar durante 10 minutos o use una pipeta manual para evitar burbujas de aire al dispensarlo. El reactivo debe usarse en los 20 minutos tras la reconstitución.

PASO 3: Añada PyroSmart NextGen® a la microplaca

Retire la cubierta de la microplaca. Llene una combitip estéril con el reactivo reconstituido y dispóngase a administrar alícuotas de 50 µL, una cada vez. Evite la contaminación cruzada utilizando la pipeta a un ángulo de 45 grados para dispensar el reactivo al lado del pocillo. Con pipeta electrónica, se recomienda una velocidad de dispensación de 5 o más baja para evitar burbujas. Empezee añadiendo los controles negativos, seguidos de la concentración estándar más baja hasta la más alta y, finalmente, todas las muestras. Proceda lo más rápido posible (no tarde más de 30 segundos). Vuelva a poner la cubierta de la placa.

PASO 4: Lea la prueba

Transfiera la microplaca a un lector de microplacas. Retire la cubierta de la microplaca y cierre el lector. Inicie la prueba.

2. REALIZACIÓN DEL PYROSMART NEXTGEN® EN EL LECTOR DE TUBOS PYROS® KINETIX FLEX

CONDICIONES DEL ENSAYO

El PyroSmart NextGen® se puede usar para cuantificar la concentración de endotoxina como un *ensayo de tiempo de activación*, donde se determina el tiempo transcurrido hasta alcanzar una DO umbral (denominado tiempo de activación). Mayores concentraciones de endotoxinas generan tiempos de activación más

cortos. La curva estándar se construye representando gráficamente el logaritmo del tiempo de activación (eje Y) en función del logaritmo de la concentración estándar (eje X), y se utiliza para calcular las concentraciones de endotoxinas de las muestras.

Las configuraciones de software para lector de tubos se describen en la tabla 6 o en la figura 3 en función del tipo de software utilizado.

Tabla 6: Configuración del software Pyros® EQS para los ensayos PyroSmart NextGen®

	Configuraciones generales
Lectura	Cinético, absorbancia
Longitud de onda	405 nm
Intervalo de lectura	10 s
Tiempo de ejecución	80 min
Reducción de datos	mDO umbral = 20
Lectura	Cinético, absorbancia
Ajuste inicial	Encendido, 125– 325 segundos

Configuraciones específicas para Pyros® eXpress:

Figura 3: Configuración del software Pyros® eXpress para los ensayos PyroSmart NextGen®

MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales que se suministran con el PyroSmart NextGen® se indican en la tabla 1. Los materiales y los equipos adicionales necesarios, pero NO suministrados con el PyroSmart NextGen® se indican en la tabla 7.

Tabla 7: Materiales y equipos necesarios, pero NO suministrados con el PyroSmart NextGen® para ensayos de lector de tubos

Tipo de equipo	Especificación	Descripción/n.º de catálogo
Lector de tubos con incubado	Capaz de mantener una temperatura de 37 °C mientras se realizan lecturas de absorbancia	Pyros® Kinetix Flex
Software de lector de tubos	Permite la reducción de los datos por tiempo de activación	Pyros® eXpress o Pyros® EQS
Endotoxina estándar de control (EEC)++	10 ng/frasco calibrado frente a endotoxina estándar de referencia (EER) con PyroSmart NextGen®	p. ej., ACC EC010-5 o equivalente
Agua con reactivo LAL (Reagent Water, LRW)	Libre de endotoxinas interferentes	p. ej., ACC WP050C o equivalente
Tubos de reacción despirogenados 8x75 mm	Borosilicato, libre de endotoxinas interferentes	p. ej., ACC TK100-10 o equivalente
Tubos de dilución de vidrio despirogenados	Libre de endotoxinas interferentes	p. ej., ACC TB240-5, TB013-5, TB16C o equivalente
Un conjunto de micropipetas ajustables de un solo canal	Capaces de administrar volúmenes de 5-20 µL, 20 µL-100 µL y 100-1000 µL	Las pipetas Gilson, Rainin tradicional o del modelo Eppendorf pueden utilizarse con las puntas indicadas a continuación o con sus equivalentes
Puntas de pipeta	Libres de endotoxina interferente. Capaces de administrar volúmenes de: 5-20 µL, 20-100 µL y 100-1000 µL	p. ej., ACC PPT25, PPT10 o equivalente
Pipeta de repetición con cilindros de jeringa compatibles	Administración automática de alícuotas	p. ej., repetidor Eppendorf Xstream® con BioPur® combitip de 2,5 ml o equivalente

Mezclador tipo vortex	Cualquiera	Cualquiera
Rejox	Cualquiera	Cualquiera
Parafilm M®	El lado que entra en contacto con el protector de papel suele estar libre de endotoxinas detectables.	American National Can™
Gradilla de tubos	Cualquiera	Cualquiera
Gradillas de tubos para tubos de reacción	Suministradas con el PK Flex	

+Nota: No todos los productos están disponibles en cada país. Consulte a su proveedor local.

+Nota: El certificado de análisis y la potencia indicada en él son específicos de una combinación de lote de PyroSmart NextGen® y lote de EEC. Un lote determinado de EEC puede mostrar diferentes potencias (UE/ng) cuando se analiza con lotes distintos del PyroSmart NextGen®. Del mismo modo, lotes distintos de EEC pueden tener diferentes potencias cuando se analizan con el mismo lote del PyroSmart NextGen®.

CONTROLES

Control negativo: El agua de reactivo de LAL (ARL) sirve como control negativo.

Curva estándar: Una serie de curva estándar como una serie geométrica deberá ofrecer el intervalo de concentraciones de endotoxina requerido. Para obtener un ejemplo, consulte la tabla 8.

Tabla 8: Ejemplos de intervalos y configuraciones de curva estándar

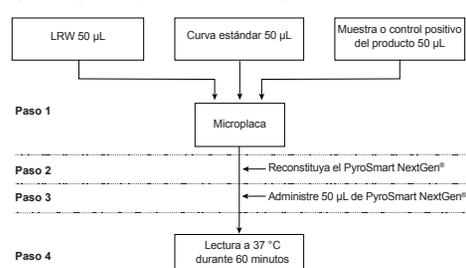
Concentración de EEC (o EER) en UE/ml	Volumen de ARL	Solución de EEC (o EER) en UE/ml
50	-	-
1	4900 µL	100 µL de 50 UE/ml
0,1	900 µL	100 µL de 1 UE/ml
0,01	900 µL	100 µL de 0,1 UE/ml
0,001	900 µL	100 µL de 0,01 UE/ml

Controles positivos del producto (CPP): Los CPP son controles de adecuación (inhibición o potenciación) y consisten en una muestra (o una dilución de la muestra) a la que se añade la endotoxina estándar. La endotoxina añadida debe dar una concentración que quede en el medio de la curva estándar. Por ejemplo, si la curva estándar es de 1 a 0,001 UE/ml, añada 20 µL de 1 UE/ml a los 200 µL de la muestra para obtener una concentración final de 0,1 UE/ml.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

1. Encienda el lector de tubos para permitir que se equilibre a 37 °C.
2. Configure el software con los ajustes adecuados (consulte la tabla 6 para Pyros® EQS o la figura 3 para Pyros® eXpress) para el software concreto que se está usando.
3. Prepare los controles y muestras adecuados.
4. Prepare la ejecución del análisis como se indica en la figura 4. La configuración del análisis se describe con más detalle a continuación.
5. Lea el análisis.

Figura 4: Esquema del procedimiento de análisis para ensayos de lector de tubos



PASO 1: Transfiera la muestra analítica

Transfiera 200 µL de la muestra que se vaya a analizar (control negativo x2, serie estándar de endotoxina x2, diluciones de la muestra x2 y CPP para cada dilución de la muestra x2) a los tubos de reacción adecuados, como se define en la disposición del software.

PASO 2: Reconstituya el reactivo de LAL recombinante PyroSmart NextGen®

Deje que tanto el reactivo como el tampón de reconstitución se equilibren a temperatura ambiente. Golpee suavemente el frasco de reactivo para hacer que el material suelto se vaya al fondo del frasco. Rompa el vacío levantando asépticamente el tapón. Deseche el tapón. Transfiera 2,8 ml de tampón de reconstitución PyroSmart NextGen® al frasco de reactivo y cubra este con Parafilm. Dé vueltas suavemente al frasco durante el primer minuto, y a continuación déjelo reposar los 2 minutos siguientes (un total de 3 minutos de reconstitución antes del uso). No vuelva a mezclar antes del uso para evitar un exceso de espuma y pérdida de sensibilidad. Si se mezcla excesivamente, déjelo reposar durante 10 minutos o use una pipeta manual para evitar burbujas de aire al dispensarlo. El reactivo debe usarse en los 20 minutos tras la reconstitución.

PASO 3: Administre el PyroSmart NextGen® a los tubos de reacción
Llene una combitip estéril con el reactivo reconstituido y dispóngase a administrar alícuotas de 50 µL, una cada vez. Con la pipeta colocada con un ángulo de 45 grados respecto al tubo de reacción (sin tocar las paredes interiores del tubo), administre 50 µL de reactivo al primer replicado del control negativo. Mezcle en una agitadora vortical el tubo durante 1 segundo e insértelo inmediatamente en el pocillo número 1 del lector de tubos. Repita el proceso para el resto de tubos de controles negativos. Después, continúe con la curva estándar: desde la concentración más baja a la más alta, un tubo cada vez. A continuación, siga analizando las muestras.

PASO 4: Lea la prueba

El análisis comienza automáticamente al insertar cada tubo. Deje que se complete la ejecución del análisis.

CRITERIOS DE VALIDACIÓN DE LA EJECUCIÓN DEL ANÁLISIS PARA TODOS LOS ENSAYOS

Para que la ejecución sea válida, han de cumplirse las condiciones indicadas en la tabla 9.

Tabla 9: Ejemplos de intervalos y configuraciones de curva estándar para todos los ensayos

Criterios	Validez
Negative Control	Ensayo de tiempo de activación: El tiempo de activación de los controles negativos debe ser superior al de la concentración estándar más baja. Ensayo de tasa (solo aplicable al método de lector de microplacas): La Vmedia del control negativo debe ser inferior al de la concentración estándar más baja. Deberá ser inferior o igual a 1,0 mAbs/min
Standard Curve	La curva estándar debe tener un valor absoluto de un coeficiente de correlación $\geq 0,980$.
Controles positivos del producto	La recuperación del control positivo del producto debe estar entre el 50 y el 200 % de la concentración nominal de la endotoxina añadida.

RESULTADOS

Todos los cálculos descritos en este apartado son realizados automáticamente por software configurado adecuadamente. Para más ayuda, contactar al servicio técnico a techservice@acciusa.com.

Cálculo de las concentraciones de endotoxinas

Las concentraciones de endotoxinas de todas las muestras de análisis (incluidas las estándar y los controles) se calculan por la interpolación frente a la curva estándar usando la ecuación para una línea recta de la manera siguiente:

- **Ensayo de tiempo de activación:**
Logaritmo de la concentración de endotoxinas = (Logaritmo del tiempo de activación – Intersección de Y) / Pendiente
- **Ensayo de tasa (solo aplicable al método de lector de microplacas):**
Concentración de endotoxinas = (Vmedia – Intersección de Y) / Pendiente

También se puede usar una regresión polinomial para los ensayos de tiempo de activación.

Recuperación de CPP en el caso de las muestras enriquecidas

% de recuperación de CPP = ((Concentración media de la muestra enriquecida) – Concentración media de la muestra no enriquecida) / concentración nominal de enriquecimiento) x 100 %

Concentración final de endotoxinas de las muestras no enriquecidas

Multiplica la concentración de endotoxinas encontrada en la muestra diluida por el factor de dilución para expresar la concentración de la muestra original antes de la dilución.

LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos están limitados por la magnitud de la capacidad de inhibición o potenciación de la muestra que se esté analizando. Las sustancias que desnaturalizan proteínas, quelan iones, se unen a endotoxinas o alteran el estado hidrófobo de las endotoxinas, pueden interferir con la prueba. La interferencia puede detectarse como un % de recuperación de CPP fuera del intervalo de 50-200 %. En la mayoría de los casos, la dilución de la muestra reducirá la concentración y la actividad de las sustancias interferentes. Las muestras deberán diluirse en ARL sin superar la dilución válida máxima que se calcula según los requisitos farmacopeicos (6, 7, 8 o 9).

Otras sustancias interferentes:

- **Algunas proteasas de serina (p. ej., la tripsina o los factores sanguíneos activados) que producen resultados positivos falsos antes de la prueba.**
- **Materiales coloreados, como suero animal, albúmina y plasma**
- **Turbidez excesiva**

Si el procedimiento no puede validarse (1, 2, 3) a una dilución de muestra que no supere la dilución válida máxima, la prueba recombinante no puede utilizarse como prueba alternativa.

REFERENCIAS

1. Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, July 2012.
2. Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Endotoxin Measurement Test Using Recombinant Proteins, Japanese Pharmacopeia, 18th Edition, Tokyo, Japan.
4. Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
5. Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
6. Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
7. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (current revision), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.
8. Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopeia (current revision), Tokyo, Japan.
9. Medical Devices – Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Bibliografía adicional:

1. Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J, Aizawa M, Kobayashi Y, Kawabata S, Oda T. Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Inmate Immun*, 23 (2), 136-146 (2017).
2. Muroi M, Ogura N, Mizumura H, Aketagawa J, Oda T, Tanamoto K. Application of a recombinant three-factor chromogenic reagents, PyroSmart, for bacterial endotoxins test filed in the Pharmacopeias. *Biol Pharm Bull*, 42 (12), 2024-2037 (2019).
3. Stevens I, Ogura N, Kelley M, D'Ordine RL, Mizumura H, Oda T, Akiyoshi J, Jahngen EG. Advanced recombinant cascade reagent PyroSmart NextGen® for bacterial endotoxins test as described in the pharmacopeias. *BPB Reports*, 5, 105-114 (2022).
4. Kelley M, Stevens I, Akiyoshi J, Jahngen EG. Evaluation of recombinant cascade reagent PyroSmart NextGen® and Limulus ameocyte lysate equivalency in a plate and tube reader for bacterial endotoxins testing. *BPB Reports*, 6, 11-15 (2023).
5. Kelly M, Stevens I, Oda T, Akiyoshi J, Jahngen EG. A demonstration of the validation process for alternative endotoxin methods using PyroSmart NextGen® recombinant cascade reagent. *BPB Reports*, 6, 68-75 (2023).
6. Kikuchi Y, Muroi M, Nakagawa Y, Ebisawa A, Hayashi M, Takeuchi H, Kiwamoto Y, Matsumura K, Yoshimoto R, Tsuzuki N, Oikawa N, Hashimoto M, Hiramatsu Y, Fukami M, Kobayashi K, Sanda M, Eto S, Mori M, Martinez O, Suzuki M, Sekiguchi S, Ouchi K, Fukuchi H, Kitagawa T, Kizawa M, Masuda T, Oda T, Mizumura H, Ogura N, Iida D, Sueoka K, Tanno Y, Tsuchiya M. Collaborative study of bacterial endotoxins test using recombinant Factor C-based procedure for detection of lipopolysaccharides (Part 3). *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 54 (4), 341-351 (2023).

Si tiene alguna pregunta sobre el uso de PyroSmart NextGen®, contactar al servicio técnico a techservice@acciusa.com.