

Reagente LAL ricombinante

PyroSmart NextGen®

Istruzioni per l'uso



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

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Giugno 2024

PyroSmart NextGen®

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

USO PREVISTO

Il saggio ricombinante PyroSmart NextGen® può essere utilizzato come analisi alternativa alle analisi compendiali per i test su prodotto finito di farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), farmaci iniettabili per uso veterinario e dispositivi medici (1,2,3). Le indicazioni sulla convalida dei metodi analitici alternativi sono reperibili nei documenti <1223> e <1225> (4,5) della USP e tali metodi devono risultare equivalenti o superiori ai metodi compendiali. Questo saggio può essere utilizzato anche per la determinazione quantitativa dell'endotossina nei prodotti non compendiali (ad es., materie prime, inclusa l'acqua, e per il monitoraggio di processo) senza convalida del metodo.

L'uso del saggio ricombinante PyroSmart NextGen® non è destinato all'utilizzo nel rilevamento dell'endotossina in campioni clinici per la diagnosi delle malattie dell'uomo come, ad esempio, l'endotossinemia umana.

PRINCIPIO ANALITICO

Il reagente PyroSmart NextGen® è costituito da tre proteine ricombinanti: fattore C, fattore B ed enzima procoagulante. In presenza di endotossina, si attiva il fattore C ricombinante che a sua volta attiva il fattore B ricombinante che attiva l'enzima procoagulante ricombinante, con conseguente scissione proteolitica di un substrato cromogenico incolore formulato con PyroSmart NextGen®. La scissione del substrato libera para-nitroamilina (pNA), un composto giallo che assorbe a 405 nm (Figura 1). La variazione dell'assorbanza viene misurata di continuo a intervalli regolari a 37 ± 1 °C in un tempo di esecuzione appropriato. Maggiore è la concentrazione di endotossina, maggiore è la velocità con cui la pNA viene rilasciata e di conseguenza la variazione di assorbanza risulta più rapida.

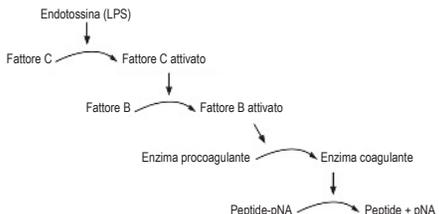


Figura 1: meccanismo a cascata che inizia con l'attivazione del fattore C indotta dall'endotossina, che a sua volta determina un aumento dell'assorbanza in seguito al rilascio di pNA

Tabella 1: Materiali forniti con PyroSmart NextGen®
 NOTA: è disponibile una confezione in grande quantità.

Componente	N. di fiale	Note
Reagente PyroSmart NextGen®	2	Ricostituire ciascuna fiala con 2,8 ml di tampone di ricostituzione
Tampone di ricostituzione PyroSmart NextGen®	2	

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

La tossicità di PyroSmart NextGen® non è stata determinata. Pertanto, è necessario prestare attenzione durante la manipolazione di PyroSmart NextGen®.

CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sulla fiala e sull'imballaggio esterno.

Tabella 2: condizioni di conservazione per PyroSmart NextGen®

Reagente biofiliato	Conservare a 2-8 °C. Prima dell'uso, lasciar equilibrare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti
Tampone di ricostituzione	Conservare a 2-8 °C. Prima dell'uso, lasciar equilibrare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti
Reagente ricostituito	Temp. ambiente Utilizzare entro 3-20 minuti dopo la ricostituzione

1. ESECUZIONE DI UN TEST PYROSMART NEXTGEN® IN UN LETTORE DI MICROPIASTRE AD ASSORBANZA

CONDIZIONI DEL SAGGIO

PyroSmart NextGen® può essere utilizzato per quantificare la concentrazione di endotossina in due modi.

- Saggio del tempo di inizio:** in cui si determina il tempo impiegato per raggiungere la soglia di OD (denominata tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di endotossina determinano tempi di inizio più brevi. La curva standard viene costruita tracciando il logaritmo del tempo di inizio (asse Y) in funzione del logaritmo della concentrazione standard (asse X) e serve a calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni.
- Saggio della velocità:** in cui viene calcolata la velocità media (Vmean: mAbs/min) nel corso del test. Maggiori sono le concentrazioni di endotossina, più alti sono i valori di Vmean. La curva standard viene costruita tracciando la Vmean (asse Y) in funzione della concentrazione standard (asse X) e serve a determinare le concentrazioni di endotossina nei campioni.

Le impostazioni del software per entrambi i tipi di saggio sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3: impostazioni del software per i saggi PyroSmart NextGen® in un lettore di micropiastre

	Saggio del tempo di inizio	Saggio della velocità
Agitazione	10 s	10 s
Letture	Cinetico, assorbanza	Cinetico, assorbanza
Lunghezza d'onda	405 nm	405/490 nm*
Intervallo di lettura	30 s**	30 s**
Tempo di esecuzione	60 min	30 min
Riduzione dei dati	OD inizio = 0,03 o MOD soglia = 30	Pyros® eXpress: Vmean Gen5®: Mean V, SoftMax® Pro: Vmax

*Oppure 405/492 nm in base alla capacità del lettore di piastre
 **L'intervallo può variare in base al lettore di piastre

MATERIALI E APPARECCHIATURE

I materiali forniti con PyroSmart NextGen® sono elencati nella tabella 1. I materiali e le apparecchiature aggiuntivi necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen® sono elencati nella tabella 4.

Tabella 4: materiali e apparecchiature necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen® per i saggi nel lettore di micropiastre

Tipo di apparecchiatura	Specifiche	Descrizione/Cat. N.
Letture di micropiastre ad assorbanza di incubazione	In grado di mantenere una temperatura di 37 °C mentre raccoglie le letture dell'assorbanza	Ad es., BioTek® ELx808™, lettori di Molecular Devices o apparecchiature equivalenti
Software del lettore di piastre	Consente di ridurre i dati per tempo di inizio o velocità	Ad es., Pyros® eXpress o Gen5™ per ELx808™, Softmax® Pro per lettori di Molecular Devices o apparecchiature equivalenti
Endotossina standard di controllo (CSE)++	10 ng/fiala calibrati rispetto a RSE con PyroSmart NextGen®	Ad es., ACC EC010-5 o equivalente

Acqua per reagente LAL (LRW)	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC WP050C o equivalente
Micropiastre a 96 pozzetti	Micropiastre con coperchio, non rivestite, non trattate, senza endotossina interferente	Ad es., ACC CA961-10 o equivalente
Provette per diluizione in vetro apirogene	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC TB240-5, TB013-5, TB16C o equivalente
Un set di micropipette monocanale regolabili	In grado di erogare volumi di 5-20µL, 20-100µL e 100-1000µL	Modelli Gilson, Rainin tradizionale o Eppendorf adatti ai puntali indicati di seguito o modelli equivalenti
Puntali per pipette	Senza endotossine interferenti; in grado di erogare volumi di: 5-20µL, 20-100µL e 100-1000µL	Ad es., ACC PPT25, PPT10 o equivalenti
Pipetta a ripetizione con siringhe a volumi compatibili	Erogazione automatica delle aliquote	Ad es., pipetta a ripetizione Eppendorf Xstream® con puntale combinato BioPur® da 2,5 ml o equivalente
Agitatore vortex	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Cronometro	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Parafilm M®	Il lato a contatto con la carta protettiva è generalmente privo di endotossina rilevabile.	American National Can™
Rastrelliera portaprovette	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Reggipiastra inclinato	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo

+Nota: non tutti i prodotti sono disponibili globalmente. Fare riferimento al fornitore di zona.

++Nota: il certificato di analisi e la concentrazione dichiarata su di esso sono specifici per una combinazione di PyroSmart NextGen® e lotto di CSE. Un determinato lotto di CSE può mostrare concentrazioni diverse (EU/ng) se testato con lotti diversi di PyroSmart NextGen®. Analogamente, lotti diversi di CSE avranno probabilmente concentrazioni diverse se testati con lo stesso lotto di PyroSmart NextGen®.

CONTROLLI

Controllo negativo: acqua per reagente LAL (LRW) da utilizzare come controllo negativo.

Curva standard: una serie geometrica di curve standard che deve produrre l'intervallo di concentrazioni di endotossina richiesto. Alcuni esempi sono riportati nella tabella 5.

Tabella 5: esempi di intervalli per curve standard e impostazioni per entrambi i saggi

Saggio del tempo di inizio		
Concentrazione di CSE (o RSE) in EU/ml	Volume di LRW	Soluzione di CSE (o RSE) in EU/ml
50	-	-
5	900 µL	100 µL di 50 EU/ml
0,5	900 µL	100 µL di 5 EU/ml
0,05	900 µL	100 µL di 0,5 EU/ml
0,005	900 µL	100 µL di 0,05 EU/ml
Saggio della velocità		
Concentrazione di CSE (o RSE) in EU/ml	Volume di LRW	Soluzione di CSE (o RSE) in EU/ml
0,1	1960 µL	40 µL di 5 EU/ml
0,05	500 µL	500 µL di 0,1 EU/ml
0,025	500 µL	500 µL di 0,05 EU/ml
0,0125	500 µL	500 µL di 0,025 EU/ml
0,00625	500 µL	500 µL di 0,0125 EU/ml

Controlli positivi del prodotto (PPC): i PPC sono controlli di idoneità (inibizione/attivazione) e sono costituiti da un campione (o diluizione di un campione) a cui viene aggiunta l'endotossina standard. L'endotossina aggiunta deve produrre una concentrazione che ricade nella porzione centrale della curva standard. Ad esempio, se la curva standard è compresa nell'intervallo 50-0,005 EU/ml, aggiungere 50 µL di campione con 5 µL

di soluzione 5 EU/ml per ottenere una concentrazione finale di 0,5 EU/ml. Se la curva standard è compresa nell'intervallo 0,1-0,00625 EU/ml, aggiungere 50 µL di campione con 5 µL di soluzione 0,5 EU/ml per ottenere una concentrazione finale di 0,05 EU/ml.

PROCEDURA DI ANALISI

- Accendere il lettore di piastre per lasciarlo equilibrare a 37 °C.
- Configurare il software con le apposite impostazioni (vedere la tabella 3).
- Preparare i controlli e i campioni appropriati.
- Preparare la sessione del test come mostrato nella figura 2. L'impostazione del test è descritta di seguito in maniera più dettagliata.
- Leggere il test.

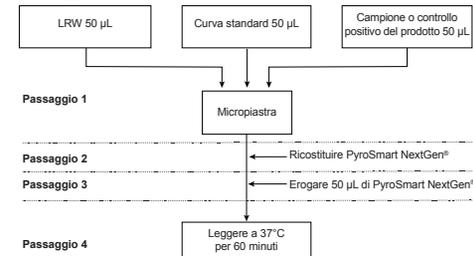


Figura 2: uno schema della procedura di analisi per i saggi nel lettore di micropiastre

PASSAGGIO 1: trasferire il campione di analisi.

Trasferire 50 µL di campione di analisi (2 controlli negativi, 2 serie standard di endotossina, 2 diluizioni del campione e 2 PPC per ciascuna diluizione del campione) negli appositi pozzetti della micropiasta come impostato nel software nel layout della piastra.

PASSAGGIO 2: ricostituire il reagente LAL ricombinante PyroSmart NextGen®.

Lasciar equilibrare il reagente e il tampone di ricostituzione a temperatura ambiente. Picchiettare leggermente la fiala di reagente in modo da far cadere sul fondo il materiale sciolto. Eliminare il vuoto in maniera asettica sollevando il tappo. Gettare il tappo. Trasferire 2,8 ml di tampone di ricostituzione PyroSmart NextGen® nella fiala di reagente e coprire con Parafilm. Agitare leggermente la fiala per il primo minuto, quindi lasciar riposare per i 2 minuti successivi (per un totale di 3 minuti di ricostituzione prima dell'uso). Non miscelare di nuovo prima dell'uso per evitare una quantità eccessiva di schiuma e una perdita di sensibilità. Se si ricorre a una miscelazione eccessiva, lasciar riposare per 10 minuti o utilizzare una pipetta manuale per erogare, in modo da evitare la formazione di bolle. Il reagente deve essere utilizzato entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

PASSAGGIO 3: dispensare PyroSmart NextGen® alla micropiasta
 Rimuovere il coperchio della piastra. Riempire un puntale combinato sterile con il reagente ricostituito e impostare per erogare aliquote da 50 µL, un'aliquote alla volta. Evitare la contaminazione crociata utilizzando la pipetta con un'angolazione di 45° per erogare il reagente sul lato del pozzetto. Con una pipetta elettronica si consiglia una velocità di erogazione pari o inferiore a 5 per evitare la formazione di bolle. Iniziare ad aggiungere ai controlli negativi e a seguire agli standard, partendo da quelli a minore concentrazione per poi arrivare a quelli con concentrazione massima; aggiungere infine a tutti i campioni. Procedere il più rapidamente possibile (l'operazione deve durare non più di 30 secondi). Riposizionare il coperchio sulla piastra.

PASSAGGIO 4: leggere il test.

Trasferire la micropiasta in un lettore di piastre. Togliere il coperchio della piastra e chiudere il lettore. Avviare il test.

2. ESECUZIONE DEL TEST PYROSMART NEXTGEN® NEL LETTORE DI PROVETTE PYROS® KINETIX FLEX

CONDIZIONI DEL SAGGIO

PyroSmart NextGen® può essere utilizzato per quantificare la concentrazione di endotossine in qualità di **saggio del tempo di inizio**, in cui si determina il tempo impiegato per raggiungere la soglia di OD (denominata tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di

endotossina determinano tempi di inizio più brevi. La curva standard viene costruita tracciando il logaritmo del tempo di inizio (asse Y) in funzione del logaritmo della concentrazione standard (asse X) e serve a calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni.

Le impostazioni per il software del lettore di provette sono descritte nella tabella 6 o nella figura 3 in base al tipo di software utilizzato.

Tabella 6: impostazioni del software Pyros® EQS per i saggi PyroSmart NextGen®

Impostazioni generali	
Lettura	Cinetico, assorbanza
Lunghezza d'onda	405 nm
Intervallo di lettura	10 s
Tempo di esecuzione	80 min
Riduzione dei dati	Soglia mOD = 20
Lettura	Cinetico, assorbanza
Regolazione del basale	Attiva, 125-325 secondi

Impostazioni specifiche per Pyros® eXpress:

Figura 3: impostazioni del software Pyros® eXpress per i saggi PyroSmart NextGen®

MATERIALI E APPARECCHIATURE

I materiali forniti con PyroSmart NextGen® sono elencati nella tabella 1. I materiali e le apparecchiature aggiuntivi necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen® sono elencati nella tabella 7.

Tabella 7: materiali e apparecchiature necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen® per i saggi nel lettore di provette

Tipo di apparecchiatura	Specifica	Descrizione/Cat. N.
Lettore di provette per incubazione	In grado di mantenere una temperatura di 37 °C mentre raccoglie le letture dell'assorbanza	Pyros® Kinetix Flex
Software del lettore di provette	Consente di ridurre i dati per tempo di inizio	Pyros® eXpress o Pyros® EQS
Endotossina standard di controllo (CSE)++	10 ng/fiala calibrati rispetto a RSE con PyroSmart NextGen®	ad es., ACC EC010-5 o equivalente
Acqua per reagente LAL (LRW)	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC WP050C o equivalente
Provette di reazione depirogenate da 8 x 75 mm	Vetro borosilicato, privo di endotossine interferenti	Ad es., ACC TK100-10 o equivalente
Provette per diluizione in vetro apirogene	Senza endotossine interferenti	Ad es., ACC TB240-5, TB013-5, TB16C o equivalente
Un set di micropipette monocalce regolabili	In grado di erogare volumi di 5-20µL, 20-100µL e 100-1000µL	Modelli Gilson, Raimin tradizionale o Eppendorf adattati ai puntali indicati di seguito o modelli equivalenti
Puntali per pipette	Senza endotossine interferenti; in grado di erogare volumi di: 5-20µL, 20-100µL e 100-1000µL	Ad es., ACC PPT25, PPT10 o equivalenti
Pipetta a ripetizione con siringhe a volumi compatibili	Erogazione automatica delle aliquote	Ad es., pipetta a ripetizione Eppendorf XStream® con puntale combinato BioPur® da 2,5 ml o equivalente
Agitatore vortex	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Cronometro	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo

Parafilm M®	Il lato a contatto con la carta protettiva è generalmente privo di endotossina rilevabile.	American National Can™
Rastrelliera portaprovette	Qualsiasi tipo	Qualsiasi tipo
Rastrelliere portaprovette per provette di reazione	Fornite con PK Flex.	

+Nota: non tutti i prodotti sono disponibili globalmente. Fare riferimento al fornitore di zona.

++Nota: il certificato di analisi e la concentrazione dichiarata su di esso sono specifici per una combinazione di PyroSmart NextGen® e lotto di CSE. Un determinato lotto di CSE può mostrare concentrazioni diverse (EU/ng) se testato con lotti diversi di PyroSmart NextGen®. Analogamente, lotti diversi di CSE avranno probabilmente concentrazioni diverse se testati con lo stesso lotto di PyroSmart NextGen®.

CONTROLLI

Controllo negativo: acqua per reagente LAL (LRW) da utilizzare come controllo negativo.

Curva standard: una serie geometrica di curve standard che deve produrre l'intervallo di concentrazioni di endotossina richiesto. Per un esempio, fare riferimento alla tabella 8.

Tabella 8: esempi di intervalli e impostazione per curve standard

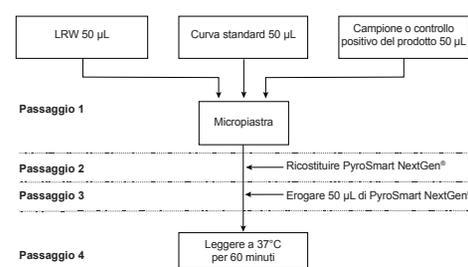
Concentrazione di CSE (o RSE) in EU/ml	Volume di LRW	Soluzione di CSE (o RSE) in EU/ml
50	-	-
1	4900 µL	100 µL di 50 EU/ml
0,1	900 µL	100 µL di 1 EU/ml
0,01	900 µL	100 µL di 0,1 EU/ml
0,001	900 µL	100 µL di 0,01 EU/ml

Controlli positivi del prodotto (PPC): i PPC sono controlli di idoneità (inibizione/attivazione) costituiti da un campione (o una diluizione del campione) a cui viene aggiunta l'endotossina standard. L'endotossina aggiunta deve produrre una concentrazione che ricade nella porzione centrale della curva standard. Ad esempio, se la curva standard è compresa nell'intervallo 1-0,001 EU/ml, aggiungere 200 µL di campione con 20 µL di soluzione 1 EU/ml per ottenere una concentrazione finale di 0,1 EU/ml.

PROCEDURA DI ANALISI

- Accendere il lettore di provette per lasciarlo equilibrare a 37 °C.
- Impostare il software utilizzando le impostazioni appropriate (vedere la tabella 6 per Pyros® EQS o la figura 3 per Pyros® eXpress) per il software specifico in uso.
- Preparare i controlli e i campioni appropriati.
- Preparare la sessione del test come mostrato nella figura 4. L'impostazione del test è descritta di seguito in maniera più dettagliata.
- Leggere il test.

Figura 4: uno schema della procedura di analisi per i saggi nel lettore di provette



PASSAGGIO 1: trasferire il campione di analisi

Trasferire 200 µL di campione di analisi (2 controlli negativi, 2 serie standard di endotossina, 2 diluizioni del campione e 2 PPC per ciascuna diluizione del campione) nelle apposite provette di reazione come impostato nel layout del software.

PASSAGGIO 2: ricostituire il reagente LAL ricombinante

PyroSmart NextGen®
Lasciarlo equilibrare il reagente e il tampone di ricostituzione a temperatura ambiente. Picchiare leggermente la fiala di reagente in modo da far cadere sul fondo il materiale sciolto. Eliminare il vuoto in maniera asettica sollevando il tappo. Gettare il tappo. Trasferire 2,8 ml di tampone di ricostituzione PyroSmart NextGen® nella fiala di reagente e coprire con Parafilm. Agitare leggermente la fiala per il primo minuto, quindi lasciar riposare per 2 minuti successivi (per un totale di 3 minuti di ricostituzione prima dell'uso). Non miscelare di nuovo prima dell'uso per evitare una quantità eccessiva di schiuma e una perdita di sensibilità. Se si ricorre a una miscelazione eccessiva, lasciar riposare per 10 minuti o utilizzare una pipetta manuale per erogare, in modo da evitare la formazione di bolle. Il reagente deve essere utilizzato entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

PASSAGGIO 3: dispensare PyroSmart NextGen® alle provette di reazione

Riempiere un puntale combinato sterile con il reagente ricostituito e impostare per erogare aliquote da 50 µL, un'aliquote alla volta. Con la pipetta posizionata a un angolo di 45 gradi rispetto alla provetta di reazione (evitando, al contempo, di toccare le pareti interne della provetta), erogare 50 µL del reagente al primo replicato del controllo negativo. Agitare la provetta nel Vortex per 1 secondo e inserirla immediatamente all'interno del portozetto n.1 nel lettore di provette. Ripetere questa procedura per le provette rimanenti dei controlli negativi, quindi continuare con la curva standard: dalla concentrazione più bassa a quella più alta, una provetta alla volta. In seguito continuare con la sessione dei campioni.

PASSAGGIO 4: leggere il test

Il test si avvia automaticamente con l'inserimento di ogni provetta. Consentire il completamento della sessione del test.

CRITERI DI VALIDITÀ PER L'ESECUZIONE DEI SAGGI PER TUTTI I SAGGI

Per garantire la validità della sessione, devono essere soddisfatte le condizioni riportate nella tabella 9.

Tabella 9: esempi di intervalli per curve standard e impostazioni per tutti i saggi

Criteri	Validità
Negative Control	Saggio del tempo di inizio: il tempo di inizio dei controlli negativi deve essere maggiore rispetto a quello dello standard meno concentrato. Saggio della velocità (si applica solo al metodo con lettore di piastra): la Vmean del controllo negativo deve essere minore rispetto a quella dello standard meno concentrato. Deve essere minore o uguale a 1,0 mAbs/min
Standard Curve	La curva standard deve avere un valore assoluto del coefficiente di correlazione $\geq 0,980$.
Controlli positivi del prodotto	Il recupero del controllo positivo del prodotto deve essere del 50%-200% della concentrazione nominale dell'endotossina aggiunta.

RISULTATI

Tutti i calcoli descritti in questa sezione vengono eseguiti automaticamente dal software opportunamente configurato. Per ulteriore assistenza contattare i servizi tecnici all'indirizzo techservice@acciusa.com.

Calcolo delle concentrazioni di endotossina

Le concentrazioni di endotossine di tutti i campioni dei test (compresi gli standard e i controlli) vengono calcolate tramite interpolazione rispetto alla curva standard utilizzando l'equazione per una linea dritta come segue:

- Saggio del tempo di inizio:**
Log concentrazione di endotossina = (log tempo di inizio - intercetta di Y) / Curva
- Saggio della velocità (si applica solo al metodo con lettore di piastra):**
Concentrazione di endotossina = (Vmean - intercetta di Y) / Curva

Per i saggi del tempo di inizio è possibile utilizzare anche la regressione polinomiale.

Recupero di PPC per i campioni addizionali

% di recupero del PPC = ((Concentrazione media nel campione addizionato - Concentrazione media nel campione non addizionato) / (Concentrazione nominale dell'aggiunta)) x 100%

Concentrazione finale di endotossina nei campioni non addizionati

Moltiplicare la concentrazione di endotossina rilevata nel campione diluito per il fattore di diluizione per esprimere la concentrazione nel campione originale prima della diluizione.

LIMITAZIONI DELLE PROCEDURE

Le procedure sono limitate dal grado di inibizione o di attivazione dimostrato dal campione in esame. Le sostanze che denaturano le proteine, chelano gli ioni, legano l'endotossina o alterano lo stato idrofobico dell'endotossina possono causare interferenza nel test. L'interferenza può essere rilevata come % di recupero del PPC che ricade fuori dall'intervallo del 50-200%. Nella maggioranza dei casi, la diluizione del campione riduce la concentrazione e l'attività delle sostanze interferenti. I campioni devono essere diluiti in LRW senza superare la massima diluizione valida che è calcolata in base ai requisiti di farmacopea (6, 7, 8 o 9).

Altre sostanze interferenti:

- Alcune proteasi serine (ad es., tripsina, fattori sanguigni attivati) che generano un risultato falso positivo devono essere denaturate (ad esempio, mediante trattamento termico) prima di effettuare il test.**
- Materiali colorati come, ad esempio, siero animale, albumina e plasma**
- Eccessiva torbidità**

Se non è possibile convalidare la procedura (1, 2, 3) a una diluizione del campione che non superi la massima diluizione valida, il test ricombinante non può essere utilizzato come test alternativo.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Endotoxin Measurement Test Using Recombinant Proteins, Japanese Pharmacopeia, 18th Edition, Tokyo, Japan.
- Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (current revision), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopeia (current revision), Tokyo, Japan.
- Medical Devices - Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Bibliografia aggiuntiva:

- 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. Innate Immun, 23(2), 136-146 (2017).
- 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).
- 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).
- Kelley M, Stevens I, Akiyoshi J, Jahngen EG. Evaluation of recombinant cascade reagent PyroSmart NextGen® and Limulus amoebocyte lysate equivalency in a plate and tube reader for bacterial endotoxins testing. BPB Reports, 6, 11-15 (2023).
- 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)
- 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).

Per qualsiasi domanda sull'utilizzo di PyroSmart NextGen®, contattare i servizi tecnici all'indirizzo techservice@acciusa.com.