

# Rekombinantes LAL-Reagenz

## PyroSmart NextGen™

Hersteller:



124 Bernard E. Starbuck Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA  
PN002641-DE Rev2 17. Feb. 2021

Telefon: (508) 540-3444  
Gebührenfrei: (888) 395-2221  
Fax: (508) 540-8680  
Technischer Kundendienst: (800) 848-3248  
Kundendienst: (800) 525-8378

### PyroSmart NextGen™

Rekombinantes kinetisches chromogenes Reagenz zum Nachweis und zur Quantifizierung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden)

#### Verwendungszweck

Der PyroSmart NextGen™ rekombinante Assay kann als alternativer Test zur arzneibuchkonformen Endproduktprüfung von injizierbaren Humanarzneimitteln (einschließlich biologischer Produkte), injizierbaren Tierarzneimitteln und Medizinprodukten eingesetzt werden (1,2). Leitlinien zur Validierung von alternativen Testmethoden sind in USP <1223> und <1225> (3,4) zu finden. Für derartige Methoden muss die Gleichwertigkeit bzw. Überlegenheit gegenüber Arzneibuchmethoden nachgewiesen werden. Dieser Assay kann darüber hinaus für die Quantifizierung von Endotoxinen in Substanzen, die nicht durch das Arzneibuch reguliert sind (z. B. Rohstoffe einschließlich Wasser sowie für in-process monitoring) ohne Methodenvalidierung verwendet werden.

Der PyroSmart NextGen™ rekombinante Assay ist nicht für den Nachweis von Endotoxinen in klinischen Proben zur Diagnose von Humanerkrankungen wie z. B. Endotoxämie beim Menschen bestimmt.

#### Testprinzip

Das PyroSmart NextGen™ Reagenz besteht aus drei rekombinanten Proteinen: Faktor C, Faktor B und Proclotting Enzyme. Bei Anwesenheit von Endotoxinen wird der rekombinante Faktor C aktiviert. Diese aktivierte Form führt wiederum zur Aktivierung des rekombinanten Faktors B und des rekombinanten Proclotting Enzyme. Dies führt letztlich zur proteolytischen Abspaltung eines im PyroSmart NextGen™ enthaltenen farblosen chromogenen Substrats. Die Spaltung des Substrats setzt Para-Nitroanilin (pNA) frei, das gelb ist und bei 405 nm absorbiert (Abbildung 1). Die Änderung der Absorption wird über eine geeignete Laufzeit kontinuierlich in regelmäßigen Abständen bei 37 ± 1 °C gemessen. Je größer die Endotoxinkonzentration ist, desto schneller wird pNA freigesetzt, was zu einer schnelleren Änderung der Absorption führt.

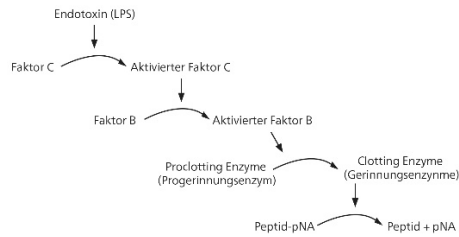


Abbildung 1. Mechanismus der Enzymkaskade ausgehend von dem durch Endotoxin aktivierten Faktor C bis hin zur Freisetzung von pNA und der damit verbundenen Absorptionssteigerung

#### Sicherheitsvorkehrungen

Die Toxizität von PyroSmart NextGen™ wurde bislang nicht ermittelt. Beim Umgang mit PyroSmart NextGen™ ist daher Vorsicht geboten.

#### Aufbewahrungsbedingungen

Das Verfallsdatum ist auf dem Fläschchen und auf der Außenverpackung angegeben.

Tabelle 1: Aufbewahrungsbedingungen für PyroSmart NextGen™

<b>Lyophilisiertes Reagenz</b>	Bei 2 °C bis 8 °C lagern.
<b>Rekonstitutionspuffer</b>	Bei 2 °C bis 8 °C lagern. Vor dem Test mindestens 30 min lang bei Raumtemperatur aufbewahren.
<b>Rekonstituiertes Reagenz</b>	Unmittelbar nach der Rekonstitution (innerhalb von 20 min) zu verwenden.

#### Assaybedingungen

Die Endotoxinkonzentration lässt sich in zwei verschiedenen Verfahren mit PyroSmart NextGen™ quantifizieren:

- Onset Time Assay:** Hierbei wird die Zeit bis zum Erreichen einer Schwellenwert-OD (die sogenannte Onset Time) ermittelt. Eine höhere Endotoxinkonzentration bewirkt eine kürzere Onset Time. Die Standardkurve wird erstellt, indem die logarithmische Onset Time (Y-Achse) gegen die logarithmische Standardkonzentration (X-Achse) aufgetragen wird. Sie dient zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben.
- Raten-Assay:** Hierbei wird die mittlere Rate (Vmean: mAbs/min) über den Verlauf des Tests berechnet. Eine höhere Endotoxinkonzentration bewirkt einen höheren Vmean-Wert. Die Standardkurve wird erstellt, indem Vmean (Y-Achse) gegen die Standardkonzentration (X-Achse) aufgetragen wird. Sie dient zur Ermittlung der Endotoxinkonzentration in den Proben.

Die Softwareeinstellungen für beide Assays sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Softwareeinstellungen für PyroSmart NextGen™ Assays

	Onset Time-Assay	Raten-Assay
<b>Schütteln</b>	10 sec	10 sec
<b>Ablesen</b>	Kinetisch, Absorption	Kinetisch, Absorption

<b>Wellenlänge</b>	405 nm	405/490 nm*
<b>Ableseintervall</b>	30 sec**	30 sec**
<b>Laufzeit</b>	60 min	30 min
<b>Datentransformation</b>	Onset-OD = 0,03 OD	Pyros® eXpress: Vmean Gen5™: Mean V SoftMax® Pro: Vmax

\*Oder 405/492 nm, je nach Ausstattung des Platereaders

\*\*Je nach Platerader kann das Intervall variieren

#### Materialien und Geräte

Die mit PyroSmart NextGen™ gelieferten Materialien sind in Tabelle 3 aufgeführt. Erforderliche, jedoch nicht mit PyroSmart NextGen™ gelieferte Materialien und Geräte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Mit PyroSmart NextGen™ gelieferte Materialien

Komponente	Anzahl der Fläschchen	Hinweise
PyroSmart NextGen™ Reagenz	2	Jedes Fläschchen mit 2,8 ml Rekonstitutionspuffer rekonstituieren.
PyroSmart NextGen™ Rekonstitutionspuffer	2	-

Tabelle 4: Erforderliche, jedoch NICHT mit PyroSmart NextGen™ gelieferte Materialien und Geräte

Gerätetyp	Spezifikation	Beschreibung/ Katalog-Nr.†
<b>Platerader mit Inkubatorfunktion</b>	Fähigkeit zur Einhaltung einer Temperatur von 37 °C während der Erfassung der Absorptionsmesswerte	z. B. BioTek® ELx808™, Platerader von Molecular Devices oder gleichwertig
<b>Platerader-Software</b>	Möglichkeit der Datentransformation nach Onset Time oder Rate	z. B. Pyros® eXpress oder Gen5™ für ELx808™, Softmax® Pro für Molecular Devices Geräte oder gleichwertig
<b>Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE)++</b>	10 ng/Fläschchen, kalibriert gegen RSE mit PyroSmart NextGen™	z. B. ACC EC010-5 oder gleichwertig
<b>LAL-Reagenzwasser (LRW)</b>	Frei von Störfaktoren	z. B. ACC WP050C oder gleichwertig
<b>Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten</b>	Unbeschichtete, unbehandelte Mikroplatten mit Abdeckungen, frei von Störendotoxinen	z. B. ACC CA961-10 oder gleichwertig
<b>Entpyrogenisierte Verdünnungsröhrchen aus Glas</b>	Frei von Störfaktoren	z. B. ACC TB240-5, TB013-5, TB016C oder gleichwertig
<b>Ein Satz einstellbarer Einkanal-Mikropipetten</b>	Abgabevolumina von 5–20 µl, 20–100 µl und 100–1000 µl	Traditionelle Modelle von Gilson, Rainin oder Eppendorf, passend zu den nachstehenden Spitzen, oder gleichwertig
<b>Pipettenspitzen</b>	Frei von Störfaktoren. Abgabevolumina von: 5–20 µl, 20–100 µl und 100–1000 µl	z. B. ACC PPT25, PPT10 oder gleichwertig
<b>Repetierpipette mit kompatiblen Spritzenzylindern</b>	Automatische Abgabe von Aliquots	z. B. Eppendorf Xstream® Repetierpipette mit BioPur® Kombispitze 2,5 ml oder gleichwertig
<b>Vortex-Mixer</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Stoppuhr</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Parafilm M®</b>	Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist typischerweise frei von nachweisbaren Endotoxinen.	American National Can™
<b>Röhrchenständer</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Geneigter Plattenständer</b>	Beliebig	Beliebig

†Hinweis: Nicht alle Produkte sind weltweit erhältlich. Wenden Sie sich an den lokalen Lieferanten.

++Hinweis: Analysezertifikat und die darin angegebene Aktivität sind spezifisch für eine Kombination einer PyroSmart NextGen™- und einer KSE-Charge. Dieselbe KSE-Charge ergibt in Tests mit verschiedenen Chargen von PyroSmart NextGen™ möglicherweise unterschiedliche Aktivitäten (EU/ng). Entsprechend ergeben verschiedene KSE-Chargen in Tests mit derselben Charge von PyroSmart NextGen™ wahrscheinlich unterschiedliche Aktivitäten.

#### Kontrollen

**Negativkontrolle:** LAL-Reagenzwasser (LRW) dient als Negativkontrolle.

**Standardkurve:** Eine Standardkurvenreihe als geometrische Reihe sollte den erforderlichen Bereich der Endotoxinkonzentrationen ergeben. Beispiele siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Beispiele für Standardkurvenbereiche und Einstellungen für beide Assays

Onset Time-Assay		
KSE- (bzw. RSE-) Konzentration in EU/ml	Volumen LRW	KSE- (bzw. RSE-) Lösung in EU/ml
50	-	-
5	900 µl	100 µl von 50 EU/ml
0,5	900 µl	100 µl von 5 EU/ml
0,05	900 µl	100 µl von 0,5 EU/ml
0,005	900 µl	100 µl von 0,05 EU/ml
Raten-Assay		
KSE- (bzw. RSE-) Konzentration in EU/ml	Volumen LRW	KSE- (bzw. RSE-) Lösung in EU/ml
0,1	500 µl	40 µl von 5 EU/ml
0,05	500 µl	500 µl von 0,1 EU/ml
0,025	500 µl	500 µl von 0,05 EU/ml
0,0125	500 µl	500 µl von 0,025 EU/ml
0,00625	1960 µl	500 µl von 0,0125 EU/ml

**Positive Produktkontrollen (PPKs):** PPKs sind Eignungskontrollen (Hemmung/Verstärkung) und bestehen aus einer Probe (bzw. einer Verdünnung der Probe) mit Zusatz von Standardendotoxin. Die zugegebene Endotoxinkonzentration sollte dem mittleren Bereich der Standardkurve entsprechen. Für einen Standardkurvenbereich von beispielsweise 50 bis 0,005 EU/ml ist eine Spikekonzentration von 0,5 EU/ml angemessen. Dazu werden 50 µl der Probe mit 5 µl einer Konzentration von 5 EU/ml versetzt. Für einen Standardkurvenbereich von 0,1 bis 0,00625 EU/ml werden 50 µl der Probe mit 5 µl von 0,5 EU/ml versetzt, um eine Endkonzentration von 0,05 EU/ml zu erreichen.

#### Testverfahren

- Den Platerader einschalten, um die Temperaturäquibrierung bei 37 °C zu ermöglichen.
- Die Software mit geeigneten Einstellungen einrichten (siehe Tabelle 2).
- Die geeigneten Kontrollen vorbereiten.
- Die Mikrotiterplatte gemäß Abbildung 2 vorbereiten. Die Belegung der Mikrotiterplatte wird weiter unten ausführlicher beschrieben.
- Den Test ablesen.

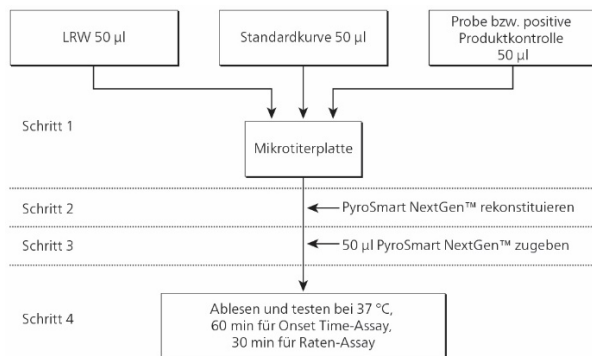


Abbildung 2: Vorbereitung der Mikrotiterplatte

#### SCHRITT 1: Testprobe überführen

50 µl Testprobe (Negativkontrolle x2, Endotoxin-Standardreihe x2, Probenverdünnungen x2 und PPK für jede Probenverdünnung x2) in die entsprechenden, wie im Software-Plattenlayout definierten Kavitäten der Mikrotiterplatte überführen.

#### SCHRITT 2: PyroSmart NextGen™ rekombinantes LAL-Reagenz rekonstituieren

Leicht gegen das Fläschchen klopfen, damit loses Material zum Boden fällt. Durch aseptisches Anheben des Stopfens das Vakuum brechen. Den Stopfen verwerfen. 2,8 ml PyroSmart NextGen™-Rekonstitutionspuffer in das Reagenzfläschchen überführen und mit Parafilm abdecken. Das Pellet vor Gebrauch mindestens 3 Minuten lang stehen lassen, bis es vollständig gelöst ist. Unmittelbar vor Gebrauch das Fläschchen schwenken, um Homogenität zu gewährleisten. Kräftiges Mischen ist jedoch zu vermeiden, da es zu übermäßiger Schaumbildung und herabgesetzter Sensitivität führen kann. Unmittelbar verwenden, d. h. innerhalb von 20 min nach der Rekonstitution.

#### SCHRITT 3: PyroSmart NextGen™ in die Mikrotiterplatte pipettieren

Die Plattenabdeckung abnehmen. Mit der auf 50 µl eingestellten Repetierpipette einzelne Aliquots abgeben. Kreuzkontamination vermeiden, indem die Pipette im Winkel von 45 Grad gehalten und das Reagenz an die Wand der Kavität dispensiert wird. Die Zugabe erfolgt zuerst zu den Negativkontrollen, anschließend zu den Standards von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration und zum Schluss zu allen Proben. Hierbei so rasch wie möglich vorgehen (maximal 30 Sekunden). Die Plattenabdeckung wieder aufsetzen.

#### SCHRITT 4: Den Test ablesen

Die Mikrotiterplatte in einen Platerader stellen. Die Plattenabdeckung abnehmen und den Platerader schließen. Den Test starten.

#### Kriterien für die Gültigkeit des Assaylaufs

Für einen gültigen Lauf müssen die in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen erfüllt sein.

Tabelle 6: Beispiele für Standardkurvenbereiche und Einstellungen für beide Assays

Kriterium	Gültigkeit
Negativkontrolle	Onset Time-Assay: Die Onset Time der Negativkontrollen muss länger sein als die des Standards mit der niedrigsten Konzentration. Raten-Assay: Das Vmean der Negativkontrolle muss kleiner sein als das des Standards mit der niedrigsten Konzentration. Es sollte kleiner oder gleich 1,0 mAbs/min sein.
Standardkurve	Die Standardkurve muss einen Absolutwert des Korrelationskoeffizienten von $\geq 0,980$ aufweisen.
Positive Produktkontrollen	Die Wiederfindung der positiven Produktkontrolle muss zwischen 50 und 200 % der nominalen, zugegebenen Endotoxinkonzentration liegen.

#### Ergebnisse

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Berechnungen werden von der entsprechend konfigurierten Software automatisch ausgeführt. Wenden Sie sich für weitere Unterstützung an den technischen Kundendienst unter [techservice@acciusa.com](mailto:techservice@acciusa.com).

#### Berechnung der Endotoxinkonzentrationen

Die Endotoxinkonzentrationen für alle Proben (einschließlich Standards und Kontrollen) anhand der Gleichung für eine Gerade interpolieren:  $Y = \text{Steigung} * X + Y\text{-Achsenabschnitt}$  (für den Onset Time-Assay;  $Y = \text{logarithmische Onset Time}$  und  $X = \text{logarithmische Endotoxinkonzentration}$ , für den Raten-Assay:  $Y = \text{Vmean}$  und  $X = \text{Endotoxinkonzentration}$ ), umgestellt zu:

- **Onset Time-Assay:**  $\text{Logarithmische Endotoxinkonzentration} = (\text{logarithmische Onset Time} - Y\text{-Achsenabschnitt}) / \text{Steigung}$
- **Raten-Assay:**  $\text{Endotoxinkonzentration} = (\text{Vmean} - Y\text{-Achsenabschnitt}) / \text{Steigung}$

#### PPK-Wiederfindung für Spike-Proben

PPK-Wiederfindung in % =  $(\text{mittlere Konzentration in der Spike-Probe} - \text{mittlere Konzentration in der ungespiketen Probe}) / \text{ nominale Spikekonzentration} * 100 \%$

#### Endgültige Endotoxinkonzentration in Spike-Proben

Die für die verdünnte Probe ermittelte Endotoxinkonzentration mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren, um die Konzentration in der ursprünglichen Probe vor der Verdünnung zu erhalten.

#### Einschränkungen des Verfahrens

Das Verfahren wird durch die Hemmungs- bzw. Verstärkungseigenschaften der getesteten Probe eingeschränkt. Substanzen, die Proteine denaturieren, Ionen chelatisieren, Endotoxine binden oder den hydrophoben Status von Endotoxinen ändern, können den Test stören. Eine Störung lässt sich daran erkennen, dass die PPK-Wiederfindung in % außerhalb des Bereichs von 50 bis 200 % liegt. In den meisten Fällen reduziert eine Verdünnung der Probe die Konzentration und Aktivität der Störsubstanzen. Die Proben sollten in LRW verdünnt werden, wobei die gemäß USP (5) oder USP (8) berechnete maximale gültige Verdünnung nicht überschritten werden darf.

#### Sonstige Störsubstanzen:

- Manche Serumproteasen (z. B. Trypsin, aktivierte Blutfaktoren), die ein falsches positives Ergebnis verursachen, müssen vor dem Test (zum Beispiel durch eine Hitzebehandlung) denaturiert werden.
- Farbige Materialien wie z. B. Tierserum, Albumin und Plasma
- Übermäßige Trübung

Wenn das Verfahren nicht bei einer Probenverdünnung validiert werden kann (1, 2), die innerhalb der maximalen gültigen Verdünnung liegt, kann der rekombinante Test nicht als alternativer Test verwendet werden.

#### Referenzen

- 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, Juli 2012.
- Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (aktuelle Revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (aktuelle Revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (aktuelle Revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (aktuelle Revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia 2.4.16 (aktuelle Revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopoeia (aktuelle Revision), Tokyo, Japan.
- Medical Devices – Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (aktuelle Revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

#### Zusätzliche Bibliographie:

- Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Innate Immunity*, 23, 136-146 (2017)
- Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J and et. al.
- Application of a Recombinant Three-Factor Chromogenic Reagent for BET filed in the Pharmacopeias. *Biol Pharm Bull*(2019)42(12)2024-2037
- Muroi M, Ogura N et. al.

Bitte wenden Sie sich mit Fragen zur Verwendung von PyroSmart NextGen™ an den technischen Kundendienst unter [techservice@acciusa.com](mailto:techservice@acciusa.com).