

# Reactivo recombinante de LAL

## PyroSmart NextGen™

Fabricado por:



124 Bernard E. Salt, Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA  
PN002641-ES rev2 17 de febrero de 2021

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

### 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). La guía para la validación de los métodos analíticos alternativos puede encontrarse en USP <1223> y <1225> (3,4), 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 la 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  $37 \pm 1$  °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.

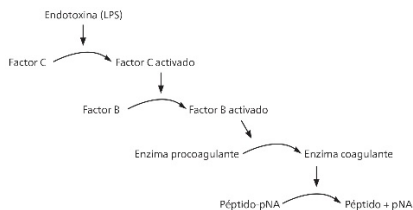


Figura 1 Mecanismo de cascada que comienza con la activación por endotoxinas del factor C y produce un aumento de absorbancia debido a la liberación de pNA

#### Precauciones de seguridad

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

#### Condiciones de almacenamiento

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

Tabla 1: Condiciones de almacenamiento de PyroSmart NextGen™

<b>Reactivo liofilizado</b>	Almacenar a 2-8 °C.
<b>Tampón de reconstitución</b>	Almacenar a 2-8 °C. Mantener a temperatura ambiente al menos 30 minutos antes de la prueba.
<b>Reactivo reconstituido</b>	Debe utilizarse inmediatamente después de la reconstitución (durante los 20 minutos siguientes).

#### 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 2 muestra la configuración del software para ambos ensayos.

Tabla 2: Configuración del software para los ensayos PyroSmart NextGen™

	Ensayo de tiempo de activación	Ensayo de tasa
<b>Agitación</b>	10 s	10 s
<b>Lectura</b>	Cinético, absorbancia	Cinético, absorbancia
<b>Longitud de onda</b>	405 nm	405/490 nm*

<b>Intervalo de lectura</b>	30 s**	30 s**
<b>Tiempo de ejecución</b>	60 min	30 min
<b>Reducción de datos</b>	DO de activación = 0,03 DO	Pyros® eXpress: Vmedia Gen5™: Vmedia 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 3. Los materiales y los equipos necesarios, pero no suministrados con el PyroSmart NextGen™ se indican en la tabla 4.

Tabla 3: Material suministrado con el PyroSmart NextGen™

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	-

Tabla 4: Materiales y equipos necesarios, pero NO suministrados con el PyroSmart NextGen™

Tipo de equipo	Especificación	Descripción/n.º de catálogo*
<b>Lector de microplacas de absorbancia con función de incubación</b>	Capaz de mantener una temperatura de 37 °C mientras se realizan lecturas de absorbancia	p. ej., BioTek® ELx808™, lectores Molecular Devices o equivalente
<b>Software de lector de microplacas</b>	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
<b>Endotoxina estándar de control (EEC)++</b>	10 ng/frasco calibrado frente a endotoxina estándar de referencia (EER) con PyroSmart NextGen™	p. ej., ACC EC010-5 o equivalente
<b>Agua de reactivo de LAL (ARL)</b>	Libre de endotoxinas interferentes	p. ej., ACC WP050C o equivalente
<b>Microplacas de 96 pocillos</b>	Microplacas cubiertas, sin recubrimiento y sin tratar, libres de endotoxina interferente	p. ej., ACC CA961-10 o equivalente
<b>Tubos de dilución de vidrio despirogenados</b>	Libres de endotoxina interferente, no debe interferir en la prueba	p. ej., ACC TB240-5, TB013-5, TB016C o equivalente
<b>Un conjunto de micropipetas ajustables de un solo canal</b>	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
<b>Puntas de pipeta</b>	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
<b>Pipeta de repetición con cilindros de jeringa compatibles</b>	Administración automática de alícuotas	p. ej., repetidor Eppendorf Xstream® con BioPur® combi-tip de 2,5 mL o equivalente
<b>Mezclador tipo vórtex</b>	Cualquiera	Cualquiera
<b>Temporizador</b>	Cualquiera	Cualquiera
<b>Parafilm M®</b>	El lado que entra en contacto con el protector de papel suele estar libre de endotoxinas detectables.	American National Can™
<b>Gradilla de tubos</b>	Cualquiera	Cualquiera
<b>Soporte de microplacas inclinado</b>	Cualquiera	Cualquiera

+Nota: No todos los productos están disponibles en todo el mundo. 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 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 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 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 de la prueba

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

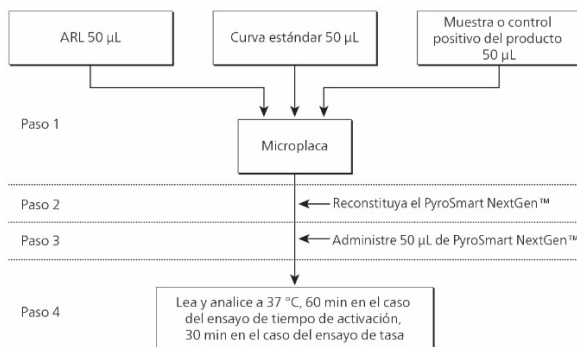


Figura 2: Preparación de la microplaca

#### 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™

Golpee suavemente el frasco 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. Deje que el reactivo liofilizado se mezcle por completo en la solución durante un mínimo de 3 minutos antes del uso. Inmediatamente antes del uso, agite el frasco para asegurar la homogeneidad, pero evite hacerlo con demasiada brusquedad, ya que podría producir exceso de espuma y pérdida de sensibilidad. Utilice el producto inmediatamente; en los 20 minutos siguientes a la reconstitución.

#### PASO 3: Añada PyroSmart NextGen™ a la microplaca

Retire la cubierta de la microplaca. Utilice el conjunto de pipeta de repetición para administrar una a una alícuotas de 50 µL. Evite la contaminación cruzada utilizando la pipeta a un ángulo de 45 grados para dispensar el reactivo al lado del pocillo. Empiece 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.

#### Criterios de validez de la ejecución de ensayos

Para que la ejecución sea válida, han de cumplirse las condiciones indicadas en la tabla 6.

Tabla 6: Ejemplos de intervalos y configuraciones de curva estándar para ambos ensayos

Criterios	Validez
Control negativo	<i>Ensayo de tiempo de activación:</i> El tiempo de activación de los controles negativos debe ser superior al de la concentración estándar más baja. <i>Ensayo de tasa:</i> La $V_{media}$ del control negativo debe ser inferior al de la concentración estándar más baja. Deberá ser inferior o igual a 1,0 mAbs/min.
Curva estándar	La curva estándar debe tener un valor absoluto de un coeficiente de correlación $\geq 0,980$ .
Controles positivos del producto	La recuperación del control de producto positivo debe comprenderse 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](mailto:techservice@acciusa.com).

#### Cálculo de las concentraciones de endotoxinas

Interpolar las concentraciones de endotoxinas de todas las muestras que se van a analizar (incluidos los estándares y los controles) utilizando la ecuación de una línea recta  $Y = Pendiente * X + intersección de Y$  (para el ensayo de tiempo de activación:  $Y =$  logaritmo del tiempo de activación y  $X =$  logaritmo de la concentración de endotoxinas, para el ensayo de tasa:  $Y = V_{media}$  y  $X =$  concentración de endotoxinas) reordenada como:

- *Ensayo de tiempo de activación:* Logaritmo de la concentración de endotoxinas = (Logaritmo del tiempo de activación - Intersección de  $Y$ ) / Pendiente

- *Ensayo de tasa:* Concentración de endotoxinas = ( $V_{media}$  - Intersección de  $Y$ ) / Pendiente

#### 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

Multiplique 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 del procedimiento

El procedimiento está limitado 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 USP (5) o USP (8).

Otras sustancias interferentes:

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

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

#### Bibliografía

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

#### Bibliografía adicional:

Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Innate Immunity*, 23, 136-146 (2017)

Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J *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.*

Si tiene alguna pregunta sobre el uso de PyroSmart NextGen™, contactar al servicio técnico a [techservice@acciusa.com](mailto:techservice@acciusa.com).