

Reagente LAL ricombinante

PyroSmart NextGen™

Prodotto da:



ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED

124 Howard E. Saff, Jani Drive • E. Fairhead, MA 02336 USA

PN002641-IT rev2 17 Feb 2021

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

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). Le indicazioni sulla convalida dei metodi analitici alternativi sono reperibili nei documenti <1223> e <1225> (3,4) 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 al 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, il fattore C ricombinante diventa un componente attivato che a sua volta attiva il fattore B ricombinante e l'enzima procoagulante ricombinante. Il processo si conclude con la scissione proteolitica di un substrato cromogenico incolore formulato con PyroSmart NextGen™. La scissione del substrato libera *para*-nitroanilina (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.

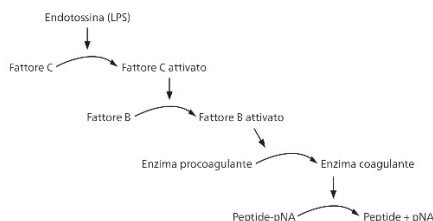


Figura 1 - Meccanismo a cascata che inizia con l'attivazione del fattore C indotta dall'endotossina, che a sua volta determina un aumento dell'assorbanza in seguito al rilascio di pNA

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 1 - Condizioni di conservazione per PyroSmart NextGen™

Reagente liofilizzato	Conservare a 2-8 °C
Tampone di ricostituzione	Conservare a 2-8 °C. Mantenere a temperatura ambiente per almeno 30 min prima dell'analisi
Reagente ricostituito	Utilizzare immediatamente dopo la ricostituzione (entro 20 min)

Condizioni del saggio

PyroSmart NextGen™ può essere utilizzato per quantificare la concentrazione di endotossina in due modalità.

- 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 saggi sono riportate nella tabella 2.

Tabella 2 - Impostazioni del software per i saggi PyroSmart NextGen™

	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 di inizio = 0,03 OD	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 3. I materiali e le apparecchiature necessari ma non forniti con PyroSmart NextGen™ sono elencati nella tabella 4.

Tabella 3 - Materiali forniti con PyroSmart NextGen™

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	-

Tabella 4 - Materiali e apparecchiature necessari ma NON forniti con PyroSmart NextGen™

Tipo di apparecchiatura	Specifica	Descrizione/N. di catalogo*
Letture di assorbanza per piastre da 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 ariogene	Senza endotossina interferente; non devono interferire con il test	Ad es., ACC TB240-5, TB013-5, TB016C o equivalente
Un set di micropipette monocolore regolabili	In grado di erogare volumi di 5-20 µL, 20-100 µL e 100-1000 µL	Modelli Gilson, Rainin tradizionale o Eppendorf adatti ai puntali indicati di seguito o modelli equivalenti
Puntali per pipette	Senza endotossina interferente; in grado di erogare volumi di: 5-20 µL, 20-100 µL e 100-1000 µL	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
Reggiplastrina 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™. Allo stesso modo, 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: serie geometrica di concentrazioni 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) 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 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

1. Accendere il lettore di piastre per equilibrarlo a 37 °C.
2. Configurare il software con le apposite impostazioni (vedere la tabella 2).
3. Preparare i controlli appropriati.
4. Preparare la micropiasta come mostrato nella figura 2. L'impostazione della micropiasta è descritta qui di seguito in maniera dettagliata.
5. Leggere il test.

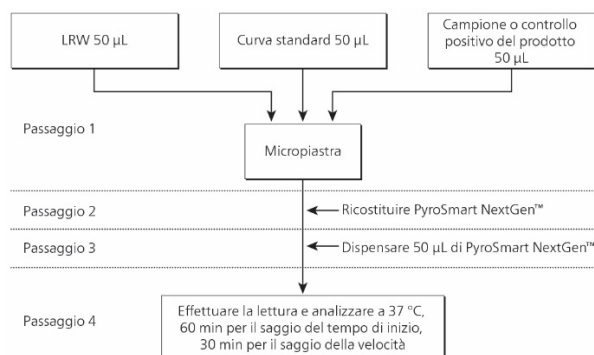


Figura 2 - Preparazione della micropiasta

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 dal software nel layout della piastra.

PASSAGGIO 2 - Ricostituire il reagente LAL ricombinante PyroSmart NextGen™

Picchiettare leggermente la fiala 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. Prima dell'uso attendere almeno 3 minuti per far sì che il pellet si dissolva completamente. Subito prima dell'uso, agitare la fiala per garantire omogeneità ma evitare di agitare energicamente perché si potrebbe formare schiuma in eccesso con conseguente perdita di sensibilità. Utilizzare immediatamente entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

PASSAGGIO 3 - Dispensare PyroSmart NextGen™ nella micropiasta

Rimuovere il coperchio della piastra. Utilizzare la pipetta a ripetizione impostata per dispensare aliquote da 50 µL, una alla volta. Evitare la contaminazione crociata utilizzando la pipetta con un'angolazione di 45° per dispensare il reagente sul lato del pozzetto. 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.

Criteri di validità per l'esecuzione del saggio

Per garantire la validità della sessione analitica, devono essere soddisfatte le condizioni riportate nella tabella 6.

Tabella 6 - Esempi di intervalli per curve standard e impostazioni per entrambi i saggi

Criteri	Validità
Controllo negativo	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: 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.
Curva standard	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 compreso tra il 50% e il 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

Interpolare le concentrazioni di endotossina di tutti i campioni di analisi (inclusi gli standard e i controlli) utilizzando l'equazione per una linea retta $Y = \text{pendenza} * X + \text{intercetta di } Y$ (per il saggio del tempo di inizio: $Y = \log$ tempo di inizio e $X = \log$ concentrazione di endotossina, per il saggio della velocità: $Y = V_{\text{mean}}$ e $X = \text{concentrazione di endotossina}$) riformulata nel modo seguente:

- **Saggio del tempo di inizio:** $\text{Log concentrazione di endotossina} = (\log \text{ tempo di inizio} - \text{intercetta di } Y) / \text{pendenza}$
- **Saggio della velocità:** $\text{Concentrazione di endotossina} = (V_{\text{mean}} - \text{intercetta di } Y) / \text{pendenza}$

Recupero di PPC per i campioni addizionati

$\% \text{ di recupero del PPC} = (\text{Concentrazione media nel campione addizionato} - \text{Concentrazione media nel campione non addizionato}) / \text{Concentrazione nominale dell'aggiunta} \times 100\%$

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 della procedura

La procedura è limitata 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 alla USP (5) o alla USP (8).

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) a una diluizione del campione che non superi la massima diluizione valida, il test ricombinante non può essere utilizzato come test alternativo.

Bibliografia

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, Luglio 2012.
2. Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
4. Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
5. Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
6. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (revisione corrente), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.
7. Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopeia (revisione corrente), Tokyo, Japan.
8. Medical Devices – Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (revisione corrente), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Bibliografia aggiuntiva:

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.

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