

Lisato degli amebociti del *Limulus*

PYROCHROME®			
<p>Prodotto da:</p>  <p>ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED</p> <p><small>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</small></p> <p>PN000856-it rev4</p>	<p>Tel.:</p> <p>Numero verde:</p> <p>Fax:</p> <p>Assistenza tecnica:</p> <p>Assistenza clienti:</p>	<p>+1 (508) 540-3444</p> <p>+1 (888) 395-2221</p> <p>+1 (508) 540-8680</p> <p>+1 (800) 848-3248</p> <p>+1 (800) 525-8378</p>	<p>Ott 2019</p>

PYROCHROME® per il rilevamento e la determinazione quantitativa delle endotossine batteriche Gram-negative (lipopolisaccaridi)

Il test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL), quando usato in ottemperanza alle linee guida della FDA (ente statunitense preposto al controllo di alimenti e farmaci) (1), può essere utilizzato (1) per i test degli endpoint di “farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), farmaci iniettabili per uso veterinario e dispositivi medici.” Il test LAL è indicato per la determinazione quantitativa di endotossina in materie prime (acqua inclusa) impiegate nella produzione e per il monitoraggio di processo dei livelli di endotossina. Il Bacterial Endotoxins Test (2) della farmacoepa statunitense è il test LAL ufficiale a cui si fa riferimento in specifiche monografie USP ed è armonizzato ai capitoli equivalenti della farmacoepa europea (EP) (3) e giapponese (JP) (4).

Breve descrizione del test

Il lisato degli amebociti del *Limulus* è un estratto acquoso di cellule ematiche (amebociti) del *Limulus polyphemus* o “granchio a ferro di cavallo”. In presenza dell’endotossina, i fattori del LAL sono attivati in una cascata proteolitica che determina la scissione di un substrato peptidico artificiale e incolore presente nel LAL Pyrochrome®. La scissione proteolitica del substrato libera para-nitroanilina (pNA), di colore giallo, che assorbe la luce a 405 nm. Il test viene eseguito aggiungendo un volume di Pyrochrome® a un volume di campione e incubando la miscela di reazione a 37 °C. Quanto maggiore è la concentrazione di endotossine nel campione, tanto più rapida sarà la produzione di pNA. Ai fini della determinazione quantitativa della concentrazione di endotossine, Pyrochrome® può essere usato in due modi diversi (5). Nel metodo cinetico, viene determinato il tempo necessario per ottenere una particolare assorbanza a 405 nm (il tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di endotossine determinano tempi di inizio più brevi. Il dosaggio richiede una strumentazione specializzata per l’incubazione di più campioni a una temperatura controllata (di solito 37 °C) e per l’esecuzione a intervalli regolari delle letture di densità ottica. Le curve standard, costruite tracciando il logaritmo del tempo di inizio in funzione della concentrazione di endotossina standard, vengono usate per calcolare le concentrazioni di endotossine nei campioni. In alternativa, nel metodo endpoint cromogenico, la quantità di pNA liberata può essere misurata al termine di un periodo di incubazione predeterminedato. Per determinare le concentrazioni nei campioni viene usata una curva standard, costituita dalla densità ottica misurata tracciata in funzione delle concentrazioni note di endotossina standard.

I metodi di analisi Pyrochrome® sono rapidi, specifici, semplici da eseguire e altamente sensibili. Il limite di rilevamento dipende dal metodo e dalla strumentazione usati e può raggiungere una sensibilità di 0,001 unità endotossiniche (EU) per mL. Se la curva standard di regressione lineare supera tutti i criteri di accettazione, è anche possibile generare le curve standard usando la regressione polinomiale.

Antecedenti e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885 (6). Negli anni ‘50, presso il Marine Biological Laboratory di Woods Hole, nel Massachusetts, USA, Bang scoprì che i batteri Gram-negativi provocavano la coagulazione del sangue del *Limulus* (7). Levin e Bang determinarono successivamente che la reazione era enzimatica e che gli enzimi si trovavano nei granuli degli amebociti (8, 9). Essi dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un unico componente strutturale della parete cellulare dei batteri, chiamato endotossina o lipopolisaccaride (10). In base alle conoscenze attuali si ritiene che la reazione consista in una cascata di passaggi di attivazione enzimatica che termina con la scissione della proteina, il coagulogeno. Il prodotto insolubile della scissione del coagulogeno (coagulina) si salda mediante interazione ionica. Se si forma una quantità sufficiente di coagulina, il prodotto diventa dapprima torbido, quindi gelifica con formazione di coagulo. Questa interazione crea le basi del dosaggio dell’endotossina chiamato test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL). Nel 1977, ricercatori

giapponesi scoprirono che il LAL attivato da endotossine era in grado di scindere anche piccoli peptidi cromogenici che contenevano un sito di scissione degli aminoacidi simile al coagulogeno e al cromoforo, il p-nitroamilide (11). La scissione comporta la liberazione di pNA, di colore giallo, che assorbe la luce a 405 nm. In questo adattamento cromogenico del dosaggio LAL, la concentrazione del coagulogeno viene ridotta mediante diluizione per ridurre al minimo l’interferenza quando il substrato cromogenico viene aggiunto al LAL. Pertanto, quando l’endotossina viene aggiunta al reagente LAL cromogenico, si sviluppa colore invece che torbidità o gelificazione con formazione di coagulo. In tutte le versioni del dosaggio LAL (metodo gel-clot, turbidimetrico, cromogenico), quanto maggiore è la quantità di endotossine presenti, tanto più rapidamente si raggiunge l’endpoint (gelificazione con formazione di coagulo, torbidità o colorazione). Ulteriori informazioni sui tipi di dosaggio LAL, reazione chimica e applicazioni sono reperibili nella letteratura pertinente (12, 13, 14).

Reagente

Pyrochrome® viene confezionato in forma liofilizzata in fiale da 3,2 mL. Contiene un estratto acquoso di amebociti di *Limulus polyphemus*, stabilizzatore, sali, tampone e substrato cromogenico.

Pyrochrome® non viene etichettato con una sensibilità specifica. La sensibilità in un dato test (indicata con λ) è la concentrazione più bassa di endotossina utilizzata per costruire la curva standard. La sensibilità maggiore (λ) di Pyrochrome® è pari a 0,001 EU/mL in un dosaggio con il metodo cinetico e 0,005 EU/mL in un dosaggio con il metodo endpoint. Pyrochrome® è esclusivamente per uso diagnostico in vitro e non è indicato per la diagnosi di endotossiemia nell’uomo. La tossicità di Pyrochrome® non è stata stabilita. Tuttavia, il contatto prolungato o ripetuto del LAL con la cute ha provocato reazione allergica di Tipo I in alcuni individui (15). Pertanto, usare prudenza nella manipolazione di Pyrochrome® .

Procedura di ricostituzione

1. Picchiettare leggermente la fiala di Pyrochrome® per far cadere sul fondo i residui di materiale. Eliminare il vuoto sollevando il tappo grigio. Non contaminare l’imboccatura della fiala. Togliere il tappo e gettarlo; non iniettare attraverso il tappo e non riutilzarlo. Una piccola quantità di polvere di LAL sul tappo non influisce sull’esito del test.

2. Ricostituire Pyrochrome® con 3,2 mL di tampone Pyrochrome® o Glucashield® (disponibile separatamente presso Associates of Cape Cod, Inc.). Per ottenere una sensibilità pari a 0,001 EU/mL in un lettore di micropiastre, è necessario ricostituire Pyrochrome® con Glucashield®. In un lettore di provette è possibile raggiungere questa sensibilità sia con il tampone di ricostituzione Pyrochrome® che con il tampone Glucashield®. Dato che sono necessari alcuni minuti perché il granulo si sciolga, reidratarlo almeno 5 minuti prima dell’uso. Agitare la fiala per ottenere un prodotto omogeneo, evitando tuttavia di miscelarlo vigorosamente per non creare una quantità eccessiva di schiuma e causare perdita di sensibilità. Coprire la fiala con Parafilm M® e conservarla al freddo (a 2-8 °C) quando non viene utilizzata. Pyrochrome® deve essere usato entro 8 ore dalla ricostituzione.

Condizioni di conservazione

Il Pyrochrome® liofilizzato è relativamente stabile e, se conservato correttamente, mantiene la completa attività fino alla data di scadenza indicata sull’etichetta. Conservare il prodotto a 2-8 °C. Temperature superiori a 37 °C possono provocare un rapido deterioramento di Pyrochrome® liofilizzato, evidenziato da una perdita di sensibilità e da un marcato ingiallimento del prodotto. Pyrochrome® è spedito in contenitori isolati che lo proteggono dalle temperature elevate. Prima della ricostituzione, Pyrochrome® è sensibile alla luce e va quindi conservato al buio.

Il Pyrochrome® ricostituito è normalmente trasparente e leggermente opalescente. Qualche lotto potrebbe presentare una leggera e uniforme torbidità. La presenza di piccole fibre o filamenti non indica contaminazione né compromette l’attività del prodotto; tuttavia, un precipitato a fiocchi o un colore marcatamente giallo indicano deterioramento e in tal caso non si deve usare il reagente. Il Pyrochrome® ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le fiale possono essere conservate per non più di 8 ore a 2-8 °C. Tenere presente che, per raggiungere la massima sensibilità, potrebbe essere necessario l’uso di reagente appena ricostituito. Il Pyrochrome® ricostituito non può essere congelato.

Raccolta e preparazione dei campioni

I campioni devono essere raccolti astaticamente in contenitori esenti da endotossina rilevabile. Si consiglia l’utilizzo di vetreria riutilizzabile deprogenata o di contenitori in plastica, sterili e monouso, in polistirene o polietilene tereftalato (PET) per ridurre al minimo l’adsorbimento dell’endotossina alle superfici dei contenitori. Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile. Inoltre, le sostanze estraibili da alcune materie plastiche possono interferire con il test. Per determinare l’idoneità della vetreria, selezionare a caso alcuni contenitori di un lotto, risciacquarli con un piccolo volume di reagente acqua per LAL (LRW), lasciarli riposare a temperatura ambiente per un’ora e analizzare la soluzione di risciacquo come se si trattasse di un campione. La soluzione di risciacquo deve contenere una concentrazione di endotossina considerevolmente inferiore alla più bassa concentrazione standard da utilizzare. Inoltre, la soluzione di risciacquo non deve né imbibire né attivare il test; ciò va determinato mediante

recupero di una quantità nota di endotossina aggiunta al campione. Il pH della miscela di reazione (un volume di campione o diluizione di campione miscelato con un ugual volume di Pyrochrome®) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il pH del campione con HCl, NaOH o tampone (esente da endotossina rilevabile). Diluire il componente HCl o NaOH concentrato con LRW fino a una concentrazione adeguata e usarne un volume che non comporti una significativa diluizione del campione in esame. Se al momento della correzione del pH nel campione si forma del precipitato, diluire il campione (senza tuttavia superare la massima diluizione valida (MVD) - vedere “Limiti della procedura”) prima di correggere il pH. Non correggere il pH di soluzioni fisiologiche non tamponate o acqua. A volte la semplice diluizione può risolvere i problemi di pH.

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 mediante il recupero di endotossina, maggiore o minore del previsto, da una quantità nota di endotossina standard aggiunta al campione (vedere “Limiti della procedura”). Nella maggioranza dei casi, la diluizione del campione riduce la concentrazione e l’attività delle sostanze interferenti, consentendo comunque di ottenere risultati validi. Controlli e schemi di diluizione appropriati sono trattati nella sezione “Procedura di analisi”. I campioni vanno analizzati appena possibile dopo la raccolta. Può essere utile congelare i campioni non sterili da conservare o spedire prima del test. I campioni con presunte basse concentrazioni di endotossina devono essere testati per valutare l’eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

Procedura di analisi

Reagenti del test forniti con Pyrochrome®

1. Pyrochrome® (vedere la descrizione riportata nelle precedenti sezioni “Reagente” e “Procedura di ricostituzione”).

2. Tampone di ricostituzione Pyrochrome® (solo numero di catalogo C1500). Usare il tampone per la ricostituzione del Pyrochrome® come descritto in precedenza.

3. Tampone di ricostituzione Glucashield® (solo numero di catalogo CG1500). Usare il tampone per la ricostituzione del Pyrochrome® come descritto in precedenza.

Reagenti di test non forniti con Pyrochrome®

1. Endotossina standard di controllo (CSE). (Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo EC010). Ricostituire la CSE con il volume specificato nel Certificato di analisi (che riporta la potenza della CSE), e secondo quanto indicato nel foglio illustrativo che accompagna la confezione. Per l’uso e la conservazione dell’endotossina standard seguire le istruzioni riportate nel foglio illustrativo. La potenza della CSE è stata determinata in relazione all’endotossina standard di riferimento (RSE) statunitense ed è specificata nel Certificato di analisi. L’endotossina standard di riferimento USP (identica alla RSE) può essere richiesta alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Nota - Il Certificato di analisi e la potenza ivi riportata si riferiscono a una combinazione specifica di lotti di Pyrochrome® e di CSE. Un dato lotto di CSE potrebbe esibire potenze differenti (EU/ng) se analizzato con lotti differenti di Pyrochrome®. Pyrotell o altre marche di reagenti LAL (1). Analogamente, è probabile che lotti differenti di CSE, testati con lo stesso lotto di Pyrochrome®, esibiscano potenze diverse. Accertarsi di usare il Certificato di analisi e la potenza corretti.

Usare la CSE per la preparazione delle diluizioni di endotossina standard da cui costruire le curve standard, per i controlli positivi e per i controlli positivi del prodotto (controlli di interferenza).

2. Reagente acqua per LAL (LRW). Le fonti consigliate includono Associates of Cape Cod, Inc. (sono disponibili varie misure e configurazioni di confezionamento). È consentito usare acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI sterile) approvata dalla USP senza agenti batteriostatici o acqua per irrigazione approvata dalla USP, entrambe comunemente reperibili in commercio, purché ne sia stata dimostrata l’idoneità per l’uso come LRW. Il limite di endotossina per la WFI sterile USP è di 0,25 EU/mL; pertanto la WFI sterile potrebbe contenere livelli rilevabili di endotossina e non essere idonea all’uso.

Per certificare che l’acqua sia idonea all’uso come LRW, analizzarla come un campione con un controllo positivo del prodotto (vedere il punto 1.c. della sezione “Controlli”). Usare LRW certificata per eseguire le diluizioni degli standard e per preparare i controlli positivi (vedere i punti 1.a. e 1.b. della sezione “Controlli”). Costruire una curva standard basandosi sui tempi di inizio o sui dosaggi del metodo endpoint per gli standard. Il coefficiente di correlazione deve essere almeno 0,980 (valore assoluto). La concentrazione di endotossina dell’acqua in esame può essere stimata estrapolando la curva standard al di sotto della concentrazione più bassa di endotossina e deve essere considerevolmente inferiore a quella dello standard più basso. Inoltre, la concentrazione di endotossina del controllo positivo del prodotto deve essere compresa tra ±25% di quella di un controllo positivo.

3. Acido acetico al 50% (per il metodo endpoint). Prepararlo aggiungendo un volume di acido acetico glaciale ad un volume equivalente di acqua distillata o trattata mediante osmosi inversa. Volendo, si può anche utilizzare LRW (vedere il punto 2. qui sopra), ma l’analisi non lo richiede.

Materiali e apparecchiature

1. Micropiastre. Micropiastre coperte, a 96 pozzetti (disponibili su richiesta presso la Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo CA961). Le piastre devono essere certificate o analizzate per escludere la contaminazione da endotossine e/o glucani e non devono causare né inibizione né attivazione. Controllare le micropiastre prima dell’uso e gettarle se presentano graffi o altre interferenze ottiche sulla superficie o sul fondo dei pozzetti.

2. Provette di reazione. I dosaggi cinetici possono essere eseguiti in un lettore di provette per incubazione, come il Pyros Kinetix® Flex, usando provette di coltura da 8 x 75 mm in vetro borosilicato deprogenato (Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo TK100). Anche i dosaggi del metodo endpoint possono essere analizzati in provette di coltura in vetro borosilicato deprogenate, da 8 x 75 mm o 10 x 75 mm (Associates of Cape Cod, Inc., numeri di catalogo TK100 e TB050, rispettivamente).

3. Lettore ottico in grado di eseguire letture a 405 nm, o a 540-550 nm per il metodo di diazocopolazione. Per il metodo cinetico, usare un lettore di micropiastre con capacità di incubazione, come i modelli BioTek® ELx808™ o Molecular Devices VersaMax™, oppure un lettore di provette, come il Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc., numeri di catalogo PKF32, PKF64 e PKF96). Per il metodo endpoint, usare un apposito lettore per leggere le micropiastre, oppure, se si esegue il test in provette, uno spettrofotometro con cuvette idonee.

4. Incubatore in grado di mantenere la temperatura a 37±1 °C (necessario solo per i metodi endpoint). Si consiglia l’uso di un incubatore con blocco a secco per le microspialite (o le provette, a seconda del caso). (Per il metodo endpoint con provette per analisi si può utilizzare un bagnomaria.) L’incubatore deve garantire una distribuzione uniforme del calore.

5. Rastrelliere portaprovette per l’inserimento e/o l’incubazione delle provette di diluizione e di reazione.

6. Pipette, micropipette con puntali (i pipettatori multicanale sono utili quando si usano le micropiastre) o pipettatori a ripetizione con cilindri delle siringhe in plastica. Si consiglia di usare pipette e puntali monouso esenti da endotossine e glucani, che interferiscono con l’analisi. Associates of Cape Cod, Inc. offre la linea di prodotti Pyroclear®, certificati esenti da endotossine e glucani interferenti.

7. Miscelatore di tipo vortex.

8. Parafilm M® (American National Can™). In condizioni normali, il lato a contatto con il rivestimento in carta è esente da endotossina rilevabile.

9. Provette per analisi esenti da endotossina interferente, di capacità adeguata per eseguire le diluizioni dello standard di endotossina o del campione da analizzare. Per informazioni sui contenitori idonei per le diluizioni, vedere “Raccolta e preparazione dei campioni”.

10. Stufa ad aria calda in grado di raggiungere una temperatura di almeno 250 °C per la deprogenazione della vetreria. I cicli di deprogenazione adottati comunemente prevedono la permanenza di tutti gli articoli per almeno 30 minuti ad una temperatura minima di 250 °C (2, 16, 17).

Controlli

I controlli sono necessari per garantire la validità del test. Le procedure consigliate sono definite in dettaglio dalla FDA (1), USP (2), EP (3) e JP (4).

1. Controlli di endotossina.

a. Serie di standard di endotossina. Approntare per ciascun test una serie di diluizioni preparate al momento partendo dalla soluzione di endotossina base. Non usare diluizioni preparate in precedenza e conservate, se non dopo avere confermato la stabilità di quel range di concentrazioni. Eseguire le diluizioni in una serie geometrica per ottenere il range di concentrazioni di endotossina necessario. Per i metodi endpoint si consigliano diluizioni doppie; per il metodo cinetico si possono usare diluizioni maggiori. La concentrazione più bassa di endotossina in qualsiasi serie di standard costituisce il limite di rilevamento di quel particolare test ed è contrassegnata con il simbolo λ (Nota: Nei test con Pyrochrome® con i metodi endpoint e cinetico sono possibili limiti di rilevamento, rispettivamente, di 0,005 e 0,001 EU/mL). Per ottenere il range di standard necessario ai fini dell’analisi, utilizzare quante meno diluizioni possibile con volumi pipette appropriati per massimizzare l’accuratezza. Le diluizioni possono essere eseguite in provette in vetro o plastica idonea o direttamente in una micropiastra. Le concentrazioni massime rilevate con Pyrochrome® sono metodo-dipendenti. In caso di dubbi, fare riferimento ai tempi di incubazione consigliati e disponibili per Pyrochrome® .

b. È necessario includere un controllo positivo (una singola concentrazione di endotossina standard) se la serie di standard (vedere il punto a. qui sopra) non viene preparata allo stesso modo dei controlli positivi del prodotto (vedere il punto c. che segue). La concentrazione di endotossina del controllo positivo deve essere uguale a quella di uno standard al centro della curva standard. Un valore di 0,5 EU/mL è adeguato per i controlli positivi inclusi in una serie di standard che comprende concentrazioni di 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 50 EU/mL. Se in un test non è inclusa una serie di standard, è necessario

includere un controllo positivo per verificare che per il calcolo delle concentrazioni di endotossina sia corretto usare i parametri di una curva standard precedente (archiviata). Per informazioni dettagliate, fare riferimento alle linee guida della FDA (1), sotto “Routine Testing of Drugs by the LAL Test”. Il controllo positivo deve essere preparato in acqua allo stesso modo dei controlli positivi del prodotto.

c. I controlli positivi del prodotto sono controlli di inibizione/attivazione e consistono nel campione o diluizione del campione ai quali si aggiunge endotossina standard. La concentrazione dell’endotossina aggiunta nel campione in esame deve essere uguale a quella del controllo positivo. Fare riferimento al punto b, qui sopra per la selezione della concentrazione di endotossina appropriata per il controllo positivo del prodotto. L’endotossina aggiunta viene frequentemente denominata “spike”.

2. Controlli negativi.

I controlli negativi con LRW devono essere inclusi in ciascun test.

Preparazione dei campioni - Determinazione della diluizione del test

Se in precedenza è stato messo a punto un protocollo di analisi per il tipo di campione in esame, eseguire la diluizione necessaria per il dosaggio e continuare come indicato nella sezione “Esecuzione del test”. Se invece non esiste un protocollo già definito per il tipo di campione in esame, eseguire una serie di diluizioni decuple del campione. Non superare di un fattore maggiore di 10 la massima diluizione valida del prodotto. Per la spiegazione e il calcolo della massima diluizione valida (MVD) e della minima concentrazione valida (MVC), fare riferimento alla sezione “Limiti della procedura” qui sotto, o alle linee guida della FDA (1). Preparare le diluizioni appropriate di tutti i campioni con un controllo positivo del prodotto per ciascun campione.

Esecuzione del test

Per ottenere risultati soddisfacenti, è necessario adottare una tecnica uniforme. Analizzare tutti i controlli e i campioni come minimo in triplicato. Prestare attenzione a evitare la contaminazione durante la preparazione del test. Le apparecchiature devono essere adeguatamente calibrate e qualificate per garantire temperature di incubazione uniformi.

1. Preparare la strumentazione per il test come necessario. In un sistema automatizzato, questo comporta generalmente l'immissione dei descrittori dei campioni, l'impostazione dei parametri di analisi e l'accensione dell'incubatore, che va impostato a 37 °C.

2. Aggiungere al contenitore di reazione il volume adeguato di campione (controllo negativo, standard di endotossina, campione o controllo positivo del prodotto) per ottenere un rapporto adeguato quando si aggiunge Pyrochrome® (vedere il punto 3. qui sotto).

Per i test effettuati in un lettore di micropiastre, usare un rapporto lisato-campione pari a 1:1. Per prestazioni ottimali, usare un volume di 0,05 mL per ciascun metodo (cinetico, endpoint o diazocopolazione). In alternativa, è possibile usare 0,1 mL per i metodi cinetico ed endpoint; tuttavia, per conseguire la massima sensibilità o una curva standard ad ampio range (maggiore di 3 logaritimi), si consigliano 0,05 mL.

Per i test effettuati in un lettore di provette Pyros Kinetix® Flex, è consentito usare un rapporto lisato-campione pari a 1:1 oppure 1:4. Per i test eseguiti con reagente LAL Pyrochrome® e campione in rapporto 1:1, è necessario un volume di campione di 0,1 mL. Per i test nel lettore di provette Pyros Kinetix® Flex con reagente LAL Pyrochrome® e campione in rapporto 1:4, il volume del campione deve essere di 0,2 mL.

3. Aggiungere Pyrochrome® a seconda del metodo adottato e miscelare. Una miscelazione non adeguata è spesso causa di risultati insoddisfacenti dell’analisi. La maggior parte dei lettori di piastre include una funzione di agitazione.

a. Per una micropiastra, usare un rapporto lisato-campione di 1:1 e aggiungere un volume di Pyrochrome® uguale al volume del campione (vedere il punto 2. qui sopra; generalmente si tratta di 0,05 mL). Aggiungere Pyrochrome® quanto più rapidamente possibile in tutti i campioni e miscelarlo per 5-30 secondi. Collocare la piastra su un supporto dell’incubatore (per un test endpoint) o in un lettore di micropiastre con capacità di incubazione (per un test cinetico). Effettuare la lettura della piastra a piastra scopertaa.

b. Per i metodi che si avvalgono di provette di reazione o cuvette, il volume di Pyrochrome® aggiunto può essere uguale al volume del campione (0,1 mL in un lettore di provette Pyros Kinetix® Flex) oppure un quarto di esso (0,05 mL in un lettore di provette Pyros Kinetix® Flex). Importante - Il tempo di reazione deve essere lo stesso per tutte le provette. Nel caso del lettore di provette Pyros Kinetix® Flex, lo strumento rileva la provetta di reazione all’inserimento e inizia la temporizzazione. In ogni contenitore di reazione in sequenza aggiungere Pyrochrome®, miscelare per circa 2 secondi e sistemare il contenitore nel dispositivo di incubazione (per i test endpoint) o nel lettore di provette (per i test cinetici).

Indipendentemente dal fatto che si usino micropiastre o provette di reazione, è utile aggiungere Pyrochrome® con un pipettatore a ripetizione.

Prestare attenzione a evitare la contaminazione della fiala di Pyrochrome® durante la manipolazione del reagente.

4. Leggere il test.

a. Per il metodo cinetico, lasciare proseguire il test fino ad aver incubato tutti i campioni per un periodo di tempo considerevolmente più lungo di quello necessario affinché la concentrazione più bassa di endotossina standard raggiunga la densità ottica di inizio di 405 nm. I sistemi di analisi automatizzati normalmente concludono il test dopo un periodo predeterminato. In caso di dubbi, fare riferimento ai tempi di incubazione consigliati.

b. Per il metodo endpoint occorre rispettare rigorosamente i tempi di incubazione, estrarre la piastra o le provette di reazione dall’incubatore, arrestare la reazione aggiungendo acido acetico al 50% (un volume sufficiente a dare una concentrazione finale di acido acetico pari al 10%; usare 0,025 mL per volumi di campione/Pyrochrome di 0,05 mL) e misurare la densità ottica (OD) in uno spettrofotometro o un lettore di micropiastre (a seconda dei casi) a 405 nm. Il test deve essere predisposto e letto in modo che il tempo di incubazione di ciascun campione sia lo stesso (entro ±30 secondi). Il periodo di incubazione dipende dal range di concentrazioni di endotossina desiderato ed è probabile che presenti variazioni con lotti differenti di Pyrochrome®. Potrebbe essere necessario svolgere test preliminari per determinare il periodo di incubazione corretto. In caso di dubbi, fare riferimento ai tempi di incubazione consigliati.

Potrebbe essere necessario svolgere test preliminari per determinare il periodo di incubazione corretto.

Risultati

1. Calcoli preliminari.

Per il metodo cinetico, determinare il tempo necessario ai campioni per raggiungere una particolare soglia di densità ottica (in genere 0,03 unità OD), dopo avere effettuato eventuali correzioni dei dati. Le letture della densità ottica devono essere relative a una lettura iniziale pari a zero unità OD. Molti lettori di micropiastre sono dotati di pacchetti software in grado di eseguire questi calcoli. Il tempo necessario per raggiungere il valore OD viene definito tempo di inizio.

2. Costruzione di una curva standard.

a. Per il metodo cinetico, costruire una curva standard per regressione del loga- ritmo del tempo di inizio sul logaritmo della concentrazione di endotossina per gli standard. L’equazione della retta di regressione descrive la curva standard.

Considerato che il valore assoluto del coefficiente di correlazione per la curva standard è almeno 0,980 (vedere il punto 2. della sezione “Interpretazione”, più avanti), per calcolare le concentrazioni di endotossina è possibile usare un’equazione della retta di regressione polinomiale di secondo grado (ossia, quadratica).

b. Per il metodo endpoint, costruire una curva standard tracciando le letture della densità ottica in funzione delle concentrazioni di endotossina standard.

3. Calcolo delle concentrazioni di endotossina.

Calcolare le concentrazioni di endotossina di tutti i campioni (inclusi standard e controlli) basandosi sull’equazione di una linea retta

Y = aX + b riformulata come X = (Y – b) / a

dove:

Y = metodo cinetico: logaritmo del tempo di inizio; metodo endpoint: densità ottica
X: Metodo cinetico: X = logaritmo della concentrazione di endotossina (per ottenere la concentrazione di endotossina è necessario determinare l’antilogaritmo di X)
Metodo endpoint: X = concentrazione di endotossina
a = pendenza della linea
b = intercetta sull’asse Y

Per esprimere la concentrazione in termini di campione originale non diluito, moltiplicare la concentrazione di endotossina calcolata in base alla linea standard per la diluizione del campione.

Normalmente, questi calcoli sono effettuati da software di analisi delle endotossine.

Interpretazione

1. Perché un test sia considerato valido, la concentrazione di endotossina dei controlli negativi (stimata mediante estrapolazione della curva standard) deve essere considerevolmente inferiore a quella dello standard più basso.

2. Il coefficiente di correlazione per la curva standard incluso nel test deve avere un valore assoluto di almeno 0,980.

3. La concentrazione media di endotossina misurata riscontrata nei controlli positivi (per la verifica di una curva archiviata) deve rientrare nel 25% della concentrazione nominale. Ne consegue che, se il risultato del controllo positivo è 0,125 EU/mL, la concentrazione misurata deve essere compresa tra 0,09375 e 0,15625 EU/mL.

4. Le concentrazioni di endotossina possono essere refertate solo per il range di concentrazione di endotossina standard dalla più bassa alla più alta. I risultati dei

campioni che cadono all’esterno di questo range devono essere refertati come inferiori alla concentrazione standard più bassa (non rilevabile) o superiori alla concentrazione standard più alta.

Per il metodo endpoint, le concentrazioni valide di endotossina possono essere calcolate solo partendo dai valori OD che si trovano sulla porzione lineare della curva standard.

5. Per dimostrare che il campione non interferisce in maniera significativa con la reazione LAL/endotossina, la concentrazione misurata di endotossina del controllo positivo del prodotto deve rientrare tra il 50 e il 200% della concentrazione nominale dell’endotossina aggiunta (“spike”). Prima di determinare se il recupero dello spike rientra in questi limiti, sottrarre la concentrazione di endotossina misurata nel campione (non addizionato). Ad esempio, per essere considerata esente da interferenze significative, la concentrazione misurata di endotossina in un controllo positivo del prodotto di 0,125 EU/mL (dopo sottrazione dell’eventuale endotossina nel campione non addizionato) deve rientrare nel range compreso tra 0,0625 e 0,25 EU/mL (dal 50 al 200% di 0,125 EU/mL). Se la concentrazione misurata di endotossina nel campione non addizionato è di 0,028 EU/mL e quella nel controllo positivo del prodotto è di 0,163 EU/mL, l’endotossina attribuibile allo spike è 0,163 – 0,028 = 0,135 EU/mL. Tale valore rientra nel range e, a condizione che vengano soddisfatti gli altri requisiti del test, l’analisi del campione deve ritenersi valida.

Limiti della procedura

La procedura è limitata dal grado di inibizione o di attivazione dimostrato dal campione in esame. Se la procedura non può essere convalidata (1, 2) a una concentrazione di campione superiore alla minima concentrazione valida (MVC), non è possibile usare il test delle endotossine batteriche mediante reagente LAL al posto del test dei pirogeni della USP. La MVC è calcolata come segue:

MVC =

(
λ
)
(
dose
di
campione
)

(
limite
di
tolleranza
endotossinica
)

{\displaystyle \lambda (dose\ di\ campione) \over (limite\ di\ tolleranza\ endotossinica)}

dove λ è espresso in EU/mL, la dose del campione è espressa in unità per kg di peso corporeo e il limite di tolleranza endotossinica è espresso in EU/kg.

La massima diluizione valida (MVD) è la diluizione del campione contenente l’MVC (1). Viene calcolata dividendo la concentrazione iniziale del campione per l’MVC.

Il limite di tolleranza endotossinica è di 0,2 EU/kg per i farmaci somministrati per via intratecale e di 5 EU/kg per tutti quelli somministrati per via parenterale. Il limite per i dispositivi medici è espresso per mL di un volume di estrazione o di risciacquo ottenuto nel modo descritto nella USP (18) in base ai limiti relativi ai dispositivi. Per i dispositivi non a contatto con il liquido cerebrospinale, il limite è di 20 EU per dispositivo; per i dispositivi a contatto con questo liquido, il limite è di 2,15 EU per dispositivo. Il limite per i presidi liquidi è lo stesso che per i farmaci, come indicato nelle linee guida della FDA (1).

Alcune proteasi seriniche (es. tripsina, fattori ematici attivati) generano un risultato falso positivo se prima dell’analisi non vengono denaturate (es. mediante trattamento termico). I materiali di colore giallo come il siero animale, l’albumina e il plasma possono interferire con il dosaggio cromogenico pNA. Per questi prodotti, usare il dosaggio di diazocopolazione (Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo CD060). Anche la presenza di torbidità eccessiva in un campione può interferire con il test.

Valori previsti

L’endotossina presente nei campioni può essere calcolata entro il range delle concentrazioni di endotossina standard usate per costruire la curva standard. Se si rende necessario diluire il campione per superare qualsiasi eventuale inibizione o attivazione, la più piccola quantità di endotossina rilevabile verrà incrementata di conseguenza. I materiali di origine biologica possono contenere livelli misurabili di endotossina anche dopo essere stati sottoposti a purificazione biochimica. L’acqua ottenuta mediante distillazione, osmosi inversa o ultrafiltrazione può contenere una quantità di endotossina inferiore a quella rilevabile, a condizione che il processo di purificazione funzioni correttamente e che l’acqua non venga contaminata dopo la produzione.

Bibliografia

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

2. Bacterial Endotoxins Test, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia (current revision), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.

4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.

5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.

6. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus* polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.

7. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.

8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.

9. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.

10. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.

11. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. 81:1567-1569.

12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.

13. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.

14. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125- 136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.

16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.

17. Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.

18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Il nostro personale specializzato sarà lieto di spiegare gli aspetti pratici e teorici del test LAL.

Non esitate a contattarci per qualsiasi quesito sull’uso di Pyrochrome®. Sostituiremo tutti i prodotti con rendimento non conforme alle specifiche; prima di restituire i prodotti difettosi, vi preghiamo di chiamare il Servizio assistenza clienti.