

Lisato degli amebociti del *Limulus*

PYROTELL®-T

Prodotto da:

ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED
134 Bennett C. Street, Suite 100 • P.O. Box 100 • Westport, MA 01085 USA

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

PN000845-It rev6 Aprile 2017

Per il rilevamento e la determinazione quantitativa delle endotossine batteriche gram-negative (lipopolisaccaridi)

Il reagente per lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL) Pyrotell®-T è previsto per il rilevamento e la determinazione quantitativa *in vitro* dell'endotossina nei test a prodotto finito dei farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), i farmaci iniettabili per uso veterinario e i dispositivi medici. Può essere utilizzato anche per i test di materie prime (inclusa l'acqua) e di componenti impiegati nella produzione e per il monitoraggio di processo dei livelli di endotossina. Il Bacterial Endotoxins Test (1) della farmacopea statunitense (USP) è il test ufficiale a cui si fa riferimento in specifiche monografie USP. Utilizzare Pyrotell®-T esclusivamente per fini diagnostici *in vitro*. Pyrotell®-T non è previsto per il rilevamento dell'endotossina nei campioni clinici né per la diagnosi di malattie nell'uomo o negli animali.

Breve descrizione del test

Il lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL) è un estratto acquoso di cellule ematiche (amebociti) del granchio a ferro di cavallo (*Limulus polyphemus*). In presenza di endotossina, il LAL si intorbida e, in condizioni idonee, forma un coagulo di gel solido. Per eseguire il test LAL turbidimetrico si aggiunge un dato volume di Pyrotell®-T a un dato volume di campione di analisi e poi si incuba la miscela di reazione a 37 °C. Quanto maggiore è la concentrazione di endotossina nel campione di analisi, tanto più rapidamente il campione si intorbida. La torbidità del campione può essere utilizzata per quantificare la concentrazione di endotossina in due modi.

Nel metodo LAL turbidimetrico cinetico, viene determinato il tasso di aumento della torbidità oppure il tempo necessario per raggiungere un particolare livello di torbidità (tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di endotossina determinano tempi di inizio più brevi. Il dosaggio richiede una strumentazione specializzata per incubare più campioni a una temperatura controllata (solitamente 37 °C) e per la misurazione a intervalli regolari della densità ottica. Le curve standard, costruite tracciando il logaritmo del tempo di inizio in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina standard, vengono usate per calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni di analisi.

Il metodo LAL turbidimetrico è rapido, specifico, semplice da eseguire e altamente sensibile. Il limite di rilevamento dipende dal metodo e dalla strumentazione usati e può raggiungere una sensibilità di 0,001 unità endotossiniche (EU) per ml.

Antecedenti e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885 (2). Intorno al 1950, presso il Marine Biological Laboratory di Woods Hole, nello stato del Massachusetts, Bang scoprì che i batteri gram-negativi provocavano la coagulazione del sangue del *Limulus* (3). Levin e Bang determinarono successivamente che la reazione era enzimatica e che gli enzimi si trovavano nei granuli degli amebociti (4). Dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un unico componente strutturale della parete cellulare dei batteri chiamato endotossina o lipopolisaccaride (5). In base alle conoscenze attuali si ritiene che la reazione consista in una cascata di passaggi di attivazione enzimatica. Sebbene la reazione completa non sia chiara, l'ultimo passaggio è ben descritto. La proteina coagulabile (coagulogeno) è scissa mediante un enzima coagulante attivato, i prodotti insolubili della scissione si uniscono per interazione ionica e la torbidità della miscela di reazione aumenta. Quanto maggiore è la quantità di endotossina presente, tanto più rapidamente il campione si intorbida. Maggiori informazioni sulla reazione chimica LAL e sulle applicazioni sono reperibili nella letteratura (6, 7).

Reagente

Pyrotell®-T viene confezionato in forma liofilizzata. Pyrotell®-T contiene un estratto acquoso di amebociti di *L. polyphemus*, albumina di siero umano (stabilizzatore), NaCl e altri ioni appropriati. Non contiene né conservanti né tamponi.

Pyrotell®-T 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. Nel Pyros Kinetix Flex® (Associates of Cape Cod, Inc.) il limite di rilevamento, e di conseguenza il valore più basso possibile di λ , è 0,001 EU/ml.

Dato che la tossicità di questo reagente non è stata determinata, si dovrà esercitare cautela quando si maneggia Pyrotell®-T.

Ricostituire Pyrotell®-T come indicato di seguito:

1. Picchiare leggermente la fiala di Pyrotell®-T per far cadere sul fondo il LAL sciolto. 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 riutilizzarlo. Una piccola quantità di LAL sul tappo non influirà sull'esito del test.
2. Ricostituire Pyrotell®-T con reagente acqua per LAL (LRW) – vedere sotto – o con tampone compatibile (disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc.). Aggiungere 5 ml come indicato sull'etichetta della fiala. Quando il reagente si è sciolto, agitare leggermente la fiala per ottenere un prodotto omogeneo. Una miscelazione troppo vigorosa può creare una quantità eccessiva di schiuma e causare perdita di sensibilità. Coprire la fiala con Parafilm M® (Bemis Company Inc. TM) quando non viene utilizzata.

Condizioni di conservazione

Il Pyrotell®-T liofilizzato è relativamente stabile al calore e, se conservato refrigerato, manterrà la completa attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Conservare il prodotto a temperature comprese fra -20 °C e +8 °C. A temperature inferiori a -20 °C il tappo potrebbe contrarsi, provocando una possibile perdita del vuoto e contaminazione del Pyrotell®-T. Temperature superiori a 37 °C possono provocare un rapido deterioramento del Pyrotell®-T liofilizzato, evidenziato da una perdita di sensibilità e da un marcato ingiallimento del prodotto. Pyrotell®-T è spedito in contenitori isolati insieme a buste contenenti ghiaccio che lo proteggono dalle temperature elevate.

Il Pyrotell®-T 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.

Il Pyrotell®-T ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le fiale possono essere conservate per non più di 24 ore a 2-8 °C. Il Pyrotell®-T ricostituito può essere congelato una sola volta. Manterrà la sua attività per tre mesi se congelato immediatamente dopo la ricostituzione e mantenuto a -20 °C o a temperature inferiori. Una volta scongelato, si applicano gli stessi criteri visivi per la determinazione della qualità indicati per la ricostituzione iniziale.

Raccolta e preparazione dei campioni

I campioni di analisi devono essere raccolti asepticamente in contenitori apirogeni. Si consiglia l'utilizzo di vetreria riutilizzabile deprogenata o di contenitori in plastica, sterili e monouso, in polistirene per ridurre al minimo l'adsorbimento dell'endotossina alle superfici dei contenitori. Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile; le sostanze estraibili da alcune materie plastiche possono interferire con il test LAL. In molti casi, l'utilizzo del tampone Pyrosol® permette di superare la variazione provocata dall'interferenza da parte di materiali consumabili. Per determinare l'idoneità della vetreria, selezionare a caso alcuni contenitori di un lotto, risciacquarli con un piccolo volume di LRW, lasciarli riposare a temperatura ambiente per un'ora e analizzare la soluzione di risciacquo come 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 inibire né attivare il test; ciò va determinato mediante recupero di una quantità nota di endotossina aggiunta al campione.

Il pH della miscela di reazione deve essere compreso fra 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 e usare 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 superare la massima diluizione valida [MVD] – vedere "Limiti della procedura") prima di correggere il pH. In alternativa, ricostituire il Pyrotell®-T con un tampone compatibile (disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc.) e controllare il pH della miscela di reazione. 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, notevolmente 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 (meno di 1 EU/ml) devono essere testati per valutare l'eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

Procedura di analisi

Reagenti del test

1. Pyrotell®-T (vedere la descrizione e il metodo di ricostituzione qui sopra).
2. **Reagente acqua per LAL (LRW)**, non fornito con Pyrotell®-T; ordinare separatamente. Il Pyrotell®-T liofilizzato deve essere ricostituito con acqua (o con un tampone compatibile disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc.; vedere il punto 3 qui sotto) che non mostri livelli rilevabili di endotossina nel test LAL. Le fonti d'acqua consigliate includono Associates of Cape Cod, Inc. o qualsiasi acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI sterile) approvata dalla USP senza agenti batteriostatici o acqua per irrigazione approvata dalla USP, entrambe 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 ricostituire Pyrotell®-T, 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 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 inferiore a quella dello standard più basso. Inoltre, la concentrazione di endotossina del controllo positivo del prodotto deve essere compresa fra il 50% e il 200% della concentrazione nominale dell'endotossina aggiunta (denominata "spike").

3. **Tampone**, non fornito insieme a Pyrotell®-T; ordinare separatamente se necessario. Tampone Pyrosol (n. di catalogo BC051 o BC554) o tampone Glucashield™ (n. di catalogo GB051); può essere usato al posto dell'LRW per ricostituire Pyrotell®-T e risolvere un problema di pH del campione, eliminare l'interferenza ad opera degli artocoli consumabili o l'interferenza ad opera dei glucani.
4. **Endotossina standard**, non fornita insieme a Pyrotell®-T; ordinare separatamente. Endotossina standard di controllo (CSE), reperibile presso Associates of Cape Cod, Inc., usata per costruire curve standard, convalidare il prodotto e preparare i controlli di inibizione. Ciascuna fiale contiene una quantità di peso misurata di endotossina. L'endotossina standard di riferimento USP può essere richiesta alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Seguire le istruzioni del produttore relative alla ricostituzione e alla conservazione delle endotossine standard. I lotti di CSE possono esibire potenze differenti (EU/ng) se analizzati con lotti differenti di Pyrotell®-T. Se si utilizza la CSE, le concentrazioni di endotossina possono essere espresse in EU/ml se la potenza di un dato lotto di CSE è stata determinata con il lotto di Pyrotell®-T in questione (1, 2).

Materiali e apparecchiature (non forniti)

1. **Recipienti di reazione**. La scelta del tipo dipende dalla strumentazione utilizzata per misurare la torbidità. Le provette di reazione per il sistema Pyros Kinetix Flex sono provette in vetro borosilicato deprogenate da 8 x 75 mm (TK100).
2. **Letto ottico**. Per il metodo turbidimetrico cinetico, si consiglia di utilizzare un lettore ottico con capacità di incubazione, come i modelli Pyros Kinetix Flex o BioTek ELx 808 IU, reperibili presso Associates of Cape Cod, Inc.

3. *Rastrelliere portaprovette* per l'inserimento e/o l'incubazione delle provette di reazione.
4. *Pipette*, pipettatori automatici con puntali o pipettatori a ripetizione con cilindri delle siringhe in plastica. Si consiglia l'uso di pipette e puntali monouso esenti da endotossine e glucani, che interferiscono con l'analisi. Associates of Cape Cod, Inc. offre la linea Pyroclear®, a cui è allegato un Certificato di compliance che certifica che i prodotti sono esenti da endotossine e glucani che interferiscono con l'analisi.
5. *Miscelatore di tipo vortex*.
6. *Parafilm M®*. In condizioni normali, il lato a contatto con il rivestimento in carta è apirogeno.
7. *Provette per analisi apirogene* di capacità adeguata per eseguire le diluizioni dello standard di endotossina o del campione da analizzare. Per informazioni sugli altri contenitori idonei per le diluizioni, vedere "Raccolta e preparazione dei campioni".
8. *Stufa ad aria calda* in grado di raggiungere una temperatura di 250 °C per la deiprogenazione della vetreria. I cicli di deiprogenazione adottati comunemente prevedono la permanenza di tutti gli articoli per almeno 30 minuti a una temperatura minima di 250 °C (1,8,9).

Controlli

I controlli sono necessari per garantire la validità del test. Le procedure consigliate sono definite in dettaglio dalla USP (1).

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, se non dopo avere confermato la stabilità di quel range di concentrazioni. Eseguire le diluizioni in una serie geometrica (es. diluizioni doppie, quadruple o decuple) per ottenere il range di concentrazioni di endotossina necessario. Si consigliano concentrazioni di 1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 e 0,03125 EU/ml per verificare il rendimento di Pyrotell®-T. 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 . Per ottenere il range di standard necessario ai fini dell'analisi, utilizzare quante meno diluizioni possibile con volumi pipette appropriati per massimizzare l'accuratezza.
- 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.). Una concentrazione di 4λ è appropriata per le curve standard costruite in base a 4, 5 o 6 diluizioni doppie di endotossina standard (es., $4\lambda = 0,125$ EU/ml nella serie di standard inclusa nella sezione a. qui sopra). Nelle situazioni in cui l'incremento della diluizione sia maggiore del doppio, la concentrazione del controllo positivo deve essere uguale a quella di uno standard al centro della curva standard. Ad esempio, un valore di 0,1 EU/ml è adeguato per i controlli positivi inclusi in una serie di standard che comprende concentrazioni di 0,001, 0,01, 0,1 e 1,0 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. Per informazioni dettagliate, fare riferimento alle linee guida della FDA (1) e a Interim Guidance (2), sotto "Routine Testing of Drugs (or Devices) by the LAL Test".

- 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" qui sotto. 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 (MVD) del prodotto. Per la spiegazione e il calcolo della MVD, fare riferimento alla sezione "Limiti della procedura" qui sotto o alle linee guida della USP (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 duplicato.

1. Preparare la strumentazione per il test come necessario. In un sistema automatizzato, questo comporta generalmente l'immissione dei descrittori dei campioni e l'impostazione dei parametri di analisi.
2. Aggiungere alla provetta di reazione o alla micropiastrella il volume adeguato di campione (controllo negativo, standard di endotossina, campione, controllo positivo o controllo positivo del prodotto). Per un rapporto 1:1, nel Pyros Kinetix Flex usare 0,1 ml; per un rapporto 1:4, nel Pyros Kinetix Flex usare un volume di 0,2 ml o 0,4 ml.
3. Aggiungere Pyrotell®-T come appropriato per la procedura. Per i metodi che si avvalgono di singole provette di reazione, la tempistica della reazione in ciascun provetta riveste un'importanza critica. Per ciascuna provetta di reazione a turno aggiungere Pyrotell®-T, miscelare per circa 2 secondi e collocare la provetta nel lettore ottico con capacità di incubazione. Il volume di Pyrotell®-T aggiunto è pari a 0,1 ml per il metodo con rapporto 1:1 nel Pyros Kinetix Flex e per la maggioranza degli altri metodi. Per il rapporto 1:4 nel Pyros Kinetix Flex, se il volume del campione è 0,4 ml, aggiungere 0,1 ml di LAL. Se si utilizza un volume del campione di 0,2 ml, è appropriato usare un volume di 0,05 ml di LAL. Una miscelazione non adeguata è spesso causa di risultati insoddisfacenti dell'analisi. Un pipettatore a ripetizione è il modo più pratico per aggiungere Pyrotell®-T. Si consiglia di utilizzare una pipetta o un puntale nuovi per ciascun prelievo dalla fiala di Pyrotell®-T. Altri protocolli di analisi potrebbero richiedere volumi di Pyrotell®-T differenti.
4. Una volta iniziata la fase di incubazione, non disturbare la provetta (o provette) di reazione. Il banco di laboratorio su cui è collocato l'incubatore/lettore ottico non deve vibrare eccessivamente.

5. Leggere il test. Lasciare proseguire il test fino ad aver incubato tutti i campioni per un periodo di tempo più lungo di quello necessario affinché la concentrazione più bassa di endotossina standard raggiunga la densità ottica di inizio. I sistemi di analisi automatizzati normalmente concludono il test dopo un periodo predeterminato.

Risultati

1. Calcoli preliminari.

Determinare il tempo necessario ai campioni per raggiungere una particolare soglia di densità ottica (in genere 0,02 unità DO in un lettore di provette) dopo aver effettuato eventuali correzioni dei dati. Le letture della densità ottica devono essere relative a una lettura iniziale pari a 0 unità DO. Il software del sistema effettuerà questi calcoli. Il tempo necessario per raggiungere il valore DO viene definito **tempo di inizio**.

2. Costruzione di una curva standard.

Costruire una curva standard per regressione lineare del logaritmo del tempo di inizio in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina per gli standard. L'equazione della retta di regressione descrive la curva standard (a meno che non si scelga l'opzione di utilizzare la regressione polinomiale come descritto nel paragrafo che segue).

A condizione che il valore assoluto del coefficiente di correlazione per la curva standard sia almeno 0,980 (vedere il punto 2. della sezione "Interpretazione" qui sotto) per calcolare le concentrazioni di endotossina è possibile usare un'equazione della retta di regressione polinomiale (ossia quadratica).

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:

$$Y = aX + b$$

dove:

Y = logaritmo del tempo di inizio

X = logaritmo della concentrazione di endotossina

a = pendenza della linea

b = intercetta sull'asse Y.

Per il modello quadratico, l'equazione è:

$$Y = a_1X + a_2X^2 + b$$

Dove a_1 e a_2 sono le pendenze di X e X²

Normalmente, questi calcoli sono effettuati dal software dei sistemi 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 inferiore a quella dello standard più basso.
2. Quando nel test viene inclusa una curva standard, il valore assoluto del coefficiente di correlazione della curva standard deve essere maggiore o uguale a 0,980.
3. La concentrazione media di endotossina misurata riscontrata nei controlli positivi 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 fra 0,093(75) e 0,156(25) EU/ml.

4. Determinare il range medio dei tempi di inizio per la curva standard. Se ad esempio i tempi di inizio di due replicati della concentrazione più alta di endotossina standard sono pari a 1079 e 1087 secondi e quelli per la concentrazione più bassa sono di 1954 e 1968 secondi, il range medio dei tempi di inizio è compreso fra 1083 e 1961 secondi. Le concentrazioni valide di endotossina possono essere calcolate soltanto per i campioni con un tempo di inizio medio che ricada entro il range medio dei tempi di inizio della curva standard.

Ad esempio, un risultato valido può essere generato per un campione sconosciuto con tempi di inizio di 1949 e 1965 (media = 1957), nonostante uno dei replicati ricada all'esterno del range 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 fra 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 esenta 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 fra 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) a una concentrazione del campione superiore alla minima concentrazione valida (MVC), non è possibile usare il test LAL al posto del test dei pirogeni della USP. La MVC è calcolata come segue:

$$MVC = \frac{(\lambda) \text{ (dose del campione)}}{\text{(limite di tolleranza endotossinica)}}$$

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 per i farmaci somministrati per via parenterale è specificato nelle singole monografie (1). Il limite per i dispositivi medici è espresso per ml di un volume di estrazione o di risciacquo ottenuto nel modo descritto nella USP (10) 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.

La tripsina genererà un risultato falso positivo se prima dell'analisi non viene denaturata mediante trattamento termico. I materiali come il sangue, il siero, l'albume e il plasma possono interferire con i dosaggi turbidimetrici.

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. Bacterial Endotoxin Test, chapter <85> United States Pharmacopeia (current version), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
2. 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.
3. 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.
4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:710-714.
9. 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.
10. 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 Pyrotell®-T.

Per scaricare una copia delle Istruzioni per l'uso di Pyrotell®-T nelle varie lingue, visitare il sito www.acciusa.com