

DEPIROGENAZIONE E CONVALIDA DEI FORNI

Le **endotossine batteriche** sono **lipopolisaccaridi (LPS)** rilasciati dalla membrana dei batteri Gram negativi, e rappresentano le sostanze pirogene più comuni e **rischiose in ambito farmaceutico**.

I prodotti iniettabili ed i dispositivi medici che entrano in contatto con il circolo sanguigno devono essere controllati per garantire bassi livelli di pirogenicità, sia in fase di produzione sia nel prodotto finito, che deve rientrare nei limiti di accettabilità. Inoltre, tutti i consumabili utilizzati nel test delle endotossine batteriche, il LAL test, devono essere prive di endotossine.

Non è semplice rimuovere le endotossine una volta presenti, per cui è preferibile cercare di mantenerne i prodotti esenti per quanto possibile.

Metodi di depirogenazione

La **depirogenazione** è il processo di **eliminazione delle sostanze pirogene** e, considerando le caratteristiche del prodotto, può essere ottenuta tramite **rimozione o inattivazione**.

La rimozione dei pirogeni si effettua con cromatografia a scambio ionico (ad esempio per albumine), ultrafiltrazione (per soluzioni) e distillazione o osmosi inversa (per l'acqua iniettabile e solventi a basso peso molecolare).

L'inattivazione si ottiene con idrolisi (per prodotti non proteici) oppure, per le componenti fisiche, con lavaggi e trattamento ad alte temperature, metodo sul quale ci soffermiamo di seguito.

Invece, la sterilizzazione non si dimostra sufficiente a distruggere i pirogeni, che anzi possono derivare proprio dalla lisi della cellula batterica, facendo aumentare il contenuto endotossinico.

Depirogenazione con calore secco

Il passaggio in forni o tunnel ad alte temperature è ideale per depirogenare la vetreria. Seguendo la Farmacopea, occorre applicare un ciclo di **almeno 250°C per 30 minuti**, validato per il proprio utilizzo specifico.

La **convalida** prevede la verifica di parametri fisici, quali la temperatura, e di parametri biologici, cioè la capacità di provocare un **abbattimento del contenuto endotossinico di almeno 3 logaritmi** (es. abbattimento da 10.000 a 10 EU). Per dimostrare l'abbattimento, si usano appositi indicatori endotossinici (o endotossine da forno), che vengono sottoposti alla depirogenazione e successivamente al LAL test per ricavarne il contenuto endotossinico residuo.

CONVALIDA DEL PROCESSO DI DEPIROGENAZIONE

Indicatori endotossinici / Endotossine da forno - [clicca link interattivo](#)

La **convalida** dei processi di depirogenazione serve a determinarne l'efficacia e si esegue con l'ausilio di **endotossine da forno**, ovvero quantità note di LPS ottenute da *Escherichia coli* O55:B5 o O113:H10:K.

Sono disponibili due tipologie di indicatori:

- **Flaconcini pronti con quantità ridotte di endotossina (es. 1.000 o 10.000 EU)**

Da aprire e usare direttamente come oggetti test da sottoporre al processo.

- **Flaconcini con elevata quantità di endotossina (es. 10 milioni EU)**

Da reidratare e aliquotare in provettine o sugli oggetti test in modo che la contaminazione sia di 10.000 EU. Questa scelta, un po' più laboriosa, consente di verificare l'effetto depirogenante direttamente sul prodotto in esame ed è preferibile per oggetti con struttura complessa o per validazioni corpose.

Una volta scelto l'indicatore, se ne prepara un numero adeguato: in genere si utilizzano **10 oggetti test per ciclo**, di cui uno rimane non trattato (controllo positivo).

Gli indicatori devono essere posizionati nei **punti critici del forno o del tunnel**, per simulare la condizione peggiore, e sottoposti al ciclo di depirogenazione. In seguito, gli oggetti test vengono analizzati con il **LAL test**: l'oggetto test non depirogenato funge da riferimento per determinare se è avvenuto l'abbattimento endotossinico atteso.

Verifica dell'abbattimento con LAL test gel-clot - [clicca link interattivo](#)

La procedura descritta di seguito si riferisce al LAL test eseguito utilizzando un lisato con sensibilità 0,125 EU/ml (λ) su due flaconcini pronti all'uso da 10.000 EU, di cui uno depirogenato e uno no, che funge da controllo positivo. Il risultato atteso è una differenza di almeno 3 logaritmi, cioè il flaconcino depirogenato deve avere un contenuto endotossinico residuo minore a 10 EU/ml.

Ricostituzione

I due flaconcini vengono ricostituiti con 1 ml di acqua LAL apirogena ciascuno e sottoposti ad agitazione su vortex per 30 minuti a intermittenza. Questa fase è particolarmente critica, in quanto un mescolamento inadeguato può comportare un recupero solo parziale dell'endotossina, alterando il risultato finale della convalida.

Diluizioni scalari

Partendo dal flaconcino ricostituito, si procede alla diluizione scalare in acqua LAL, fino ad arrivare alla concentrazione endotossinica corrispondente a $\lambda/4$ ($0,125/4=0,03$):

EU/ml	10.000	1.000	100	10	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
diluizione	1:1	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000	1:20.000	1:40.000	1:80.000	1:160.000	1:320.000

LAL Test

Il LAL test si esegue su ogni diluizione del campione depirogenato (D) e del controllo positivo non depirogenato (ND).

Vengono rispettate le condizioni operative standard:

- controlli negativi costituiti da acqua LAL
- miscela di reazione costituita da 0,1 ml di campione + 0,1 ml di lisato
- due repliche per campione
- incubazione a 37°C per 60 min
- risultato positivo (+): gel fermo dopo capovolgimento della provetta a 180°
- risultato negativo (-): gel non si forma o si rompe dopo capovolgimento della provetta a 180°.

La tabella seguente mostra un esempio di risultati del test:

EU/ml	Diluizione	Risultati ND	Risultati D
10.000	1:1		
1.000	1:10	++	++
100	1:100	++	--
10	1:1.000	++	--
1	1:10.000	++	--
0,5	1:20.000	++	--
0,25	1:40.000	++	--
0,125	1:80.000	++	--
0,06	1:160.000	--	--
0,03	1:320.000	--	--

Calcolo dell'abbattimento

La prima diluizione positiva corrisponde al cosiddetto "endpoint" e la quantità di endotossina presente nei flaconcini si ottiene moltiplicando il fattore di diluizione dell'endpoint per la sensibilità del lisato:

Contenuto endotossinico ND > 80.000 x 0,125 EU/ml > 10.000 EU/ml

Contenuto endotossinico D > 10 x 0,125 > 1,25

Formula per calcolare l'abbattimento endotossinico

Abbattimento = $\log ND - \log D = \log 10.000 - \log 1,25 = 4 - 0,0969 = 3,9$

Risultato

Poiché l'abbattimento endotossinico supera i 3 logaritmi, il ciclo di depirogenazione è convalidato.

Bollini per depirogenazione - [clicca link interattivo](#)

Per identificare gli oggetti sottoposti a depirogenazione si possono usare appositi bollini a viraggio di colore.



ENDOTOSSINE DA FORNO

Flaconcini da ricostituire

Codice	Descrizione
1230320 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 2 mg (ca. 20 milioni EU)
1230315 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 1 mg (ca. 10 milioni EU)

Flaconcini pronti all'uso

Codice	Descrizione
1230365 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 10 µg (ca. 100.000 EU)
1230360 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 5 µg (ca. 50.000 EU)
1230355 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 1 µg (ca. 10.000 EU)
1230336 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 0,2 µg (ca. 2000 EU)
1230335 *	Endotossina da forno (E. coli 055:B5), 0,1 µg (ca. 1000 EU)

REAGENTI LAL TEST

Reagenti per eseguire il LAL test con:

- Metodo gel-clot: sensibilità 0,03 - 0,06 - 0,125 - 0,25 EU/ml.
Provette da test singoli o flaconcini multipli da 50 test.
- Metodo cinetico turbidimetrico o colorimetrico.

ACQUA LAL

1715004	Acqua LAL sterile apirogena in flacone di vetro con tappo a ghiera, 30 ml
WL-50G	Acqua LAL sterile apirogena in flacone PET con tappo a vite, 50 ml
WL-100G	Acqua LAL sterile apirogena in flacone PET con tappo a vite, 100 ml
WLV-50G	Acqua LAL sterile apirogena in flacone vetro con tappo a ghiera flip-off, 50 ml
WLV-100G	Acqua LAL sterile apirogena in flacone vetro con tappo a ghiera flip-off, 100 ml

PROVETTE APIROGENE

1959000	Provette LAL in vetro borosilicato 7,75 x 75 mm per Ati-320, Pyr-032, Pyros Kinetix, sterili apirogene
TBS-1075	Provette LAL in vetro borosilicato 10 x 75 mm per Gel-clot, sterili apirogene
1958360	Provette LAL in vetro borosilicato 10 x 75 mm con tappo a vite per Gel-clot, sterili apirogene
TSC-1075	Provette LAL in soda vetro 10 x 75 mm per Gel-clot, sterili apirogene
TBS-13100-50	Provette LAL in vetro borosilicato 13 x 100 mm, sterili apirogene
TBS-16100	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 100 mm, sterili apirogene

BOLLINI INDICATORI

CPI-DP1	Bollino adesivo semplice 12 mm - Viraggio da rosa a viola/bruno in seguito alla depirogenazione
---------	---

SERVIZIO LAL TEST

Esecuzione del LAL test con metodo cinetico su prodotti e dispositivi per la determinazione del contenuto endotossinico

BIBLIOGRAFIA

European Pharmacopoeia 9 edizione