

LAL TEST: METODO GEL CLOT

Analisi sull'acqua

INTRODUZIONE

La Farmacopea Europea, armonizzata con la Farmacopea Americana, definisce i parametri che caratterizzano i tipi di acqua utilizzati in ambito farmaceutico. La caratteristica principale dell'acqua "per preparazioni iniettabili" è l'**apirogenicità**: oltre ad essere sterile, non deve contenere più di 0,25 EU/ml di endotossine batteriche. Il LAL test per la verifica delle endotossine batteriche nell'acqua è quindi un test previsto dalla Farmacopea e per molti prodotti rappresenta l'unica metodica ufficiale.

Principi del LAL test

Base del test è la capacità degli amebociti estratti dal sangue di *Limulus polyphemus* di gelificare in presenza di endotossine batteriche provenienti da batteri Gram-, responsabili dell'effetto pirogeno. Il lisato degli amebociti (*Limulus Amebocyte Lysate*) è il reagente base del LAL test.

LAL test "Gel Clot"

Il Gel Clot è un metodo semiquantitativo che stabilisce il contenuto endotossinico del campione al di sotto di una certa soglia. Il reagente LAL viene mescolato in provetta al campione in esame e lasciato fermo a 37°C per 60 min. Al termine, la provetta viene tolta dall'incubatore e capovolta di 180°.

- **Test positivo:** sul fondo della provetta si è formato un gel che resta stabile dopo l'inversione.
- **Test negativo:** il gel non si è formato o si rompe durante l'inversione.

INTERFERENZE

Per garantire il buon esito del test è fondamentale evitare la contaminazione e le interferenze, per questo si utilizzano consumabili certificati privi di endotossina (apirogeni) e non interferenti. Le principali fonti di interferenza sono le seguenti.

Consumabili:

- provette in vetro;
- pipette di vetro;
- accessori in plastica (preferibilmente PS, PET, PETG).

Devono avere tutti un contenuto endotossinico < 0,001 EU/ml e i materiali devono essere non interferenti.

Acqua per LAL test:

deve essere apirogena e priva di fattori interferenti come sostanze inibenti (ioni, sostanze organiche o che influenzano il pH) o sostanze stimolanti (glucani).

Caratteristiche del prodotto:

- fattori inibenti: pH fuori range 6-8, agenti chelanti (ioni bivalenti), proteine;
- fattori stimolanti: glucani e aggregati proteici.

Esistono buffer e soluzioni acide o basiche per la risoluzione di questo tipo di interferenze.

Materiali: reagenti ed accessori

- **Lisato:** caratterizzato da una sensibilità (λ : concentrazione minima di endotossina rilevabile), espressa in Unità Endotossiniche EU/ml. ACC Associates Of Cape Cod Inc propone il PYROTELL®, polvere liofilizzata con sensibilità di 0,03 EU/ml, 0,06 EU/ml, 0,125 EU/ml oppure 0,25 EU/ml. Il lisato selezionato è in grado di rilevare nei campioni concentrazioni endotossiniche pari o superiori alla sua sensibilità. Il lisato è disponibile sia nel formato “test multipli” (flaconcini da 50 test) che in quello “test singoli” (pre-aliquotato in provette per singoli test).
- **Endotossina Standard:** polvere liofilizzata, utilizzata come riferimento per la standardizzazione del test. Può essere RSE (ES di Riferimento) o CSE (ES di Controllo), entrambe utilizzate per realizzare “curve standard” tramite diluizioni seriali della soluzione madre o come controllo positivo.
- **Consumabili:** materiali apirogeni e certificati con contenuto endotossinico $< 0,001$ EU/ml. In questa sezione rientrano acqua LAL (necessaria per ricostruire lisato e CSE oltre che per eventuali diluizioni), tamponi, provette in soda vetro o borosilicato (a seconda del marchio di reagente utilizzato), pipette in borosilicato, puntali in plastica, flaconi e provettoni per il campionamento.
- **Accessori:** un vortex per il mescolamento omogeneo delle soluzioni e un incubatore a secco per l’incubazione del campioni.

Parametri essenziali

- Limite ufficiale del prodotto in esame: 0,25 EU/ml (per l’acqua).
- Sensibilità del lisato utilizzato (λ)
- Massima diluizione del campione (MVD), dipende dal limite endotossinico (EL) e dalla sensibilità del lisato utilizzato:
 $MVD = EL / \lambda$. Per i test su acqua il campione non viene diluito.

Allestimento del test

Per verificare se il campione di acqua in esame ha un contenuto endotossinico inferiore a un valore prestabilito (pari alla sensibilità del lisato selezionato) è necessario procedere con i seguenti step:

1. Ricostituzione dei reagenti;
2. Convalida del lisato;
3. Esecuzione del LAL test sul campione.

PROTOCOLLO - TEST MULTIPLI

1. Ricostituzione dei reagenti

Lisato

Il flacone di lisato da 50 test viene ricostituito con 5ml di acqua LAL. Il flacone va lasciato fermo e, una volta dissolta la polvere, va mantenuto in frigorifero e utilizzato a temperatura ambiente (T_{amb}).

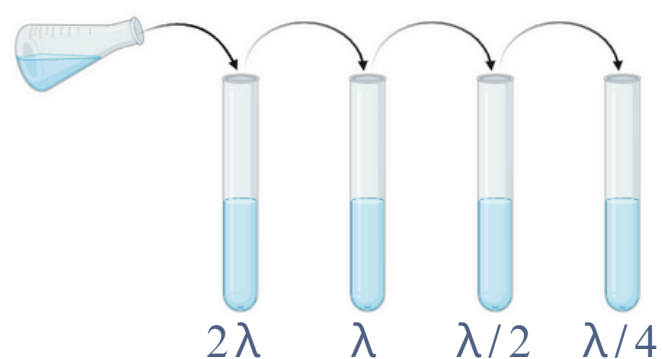
CSE

Il flacone di CSE va ricostituito con acqua LAL secondo i volumi indicati sul certificato di analisi e quindi vortexato secondo le indicazioni del produttore. La soluzione madre così ottenuta va conservata in frigorifero e vortexata per 5 min prima di ogni utilizzo.

2. Convalida del lisato

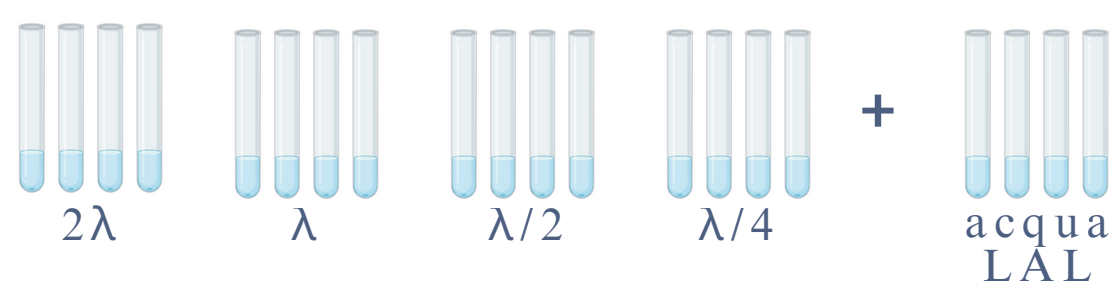
Prima di procedere con il test sul campione, è necessario controllare la sensibilità del lisato effettuando la convalida del lisato, che consiste nel testare una curva standard con precise concentrazioni di CSE. Questa operazione va ripetuta ogni volta che si cambia il lotto di lisato o quando variano le condizioni sperimentali.

① Diluizioni di CSE



Le diluizioni vengono preparate partendo dalla soluzione madre di CSE fino ad arrivare alle concentrazioni 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$ (costituiscono la "curva standard"). Le diluizioni vengono preparate in provette 13x100mm e tra una diluizione e l'altra la soluzione va vortexata per 30-60 sec.

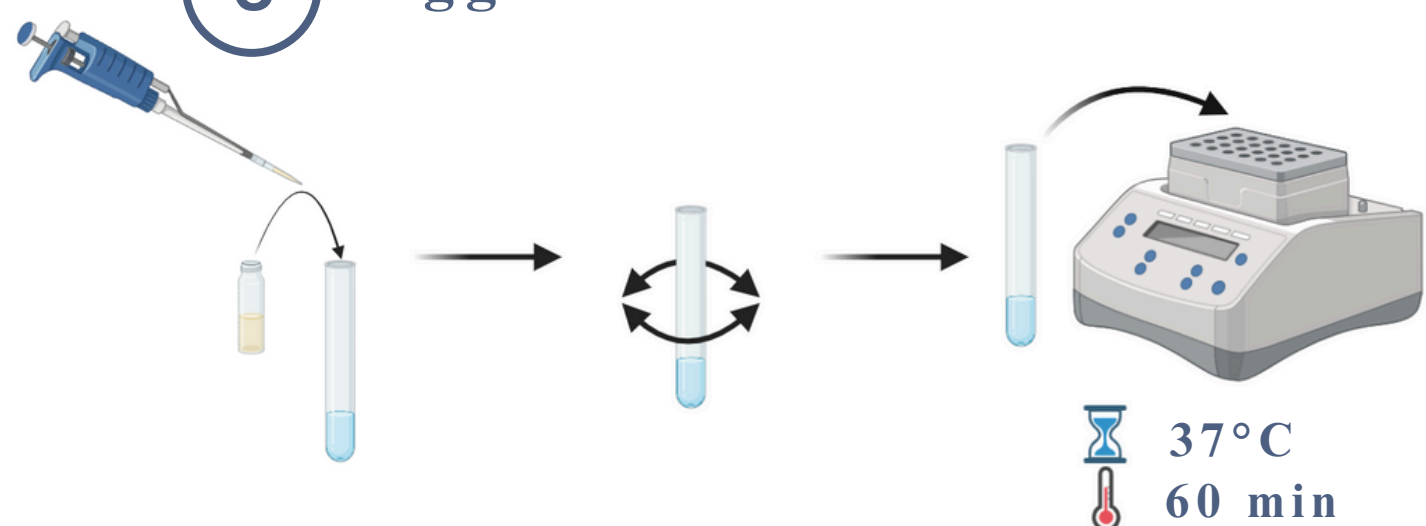
② Preparazione provette



Si realizzano 4 repliche per ciascuna delle seguenti condizioni in provette 10x75mm:

- 0,1 ml di acqua LAL (controllo negativo);
- 0,1 ml della soluzione di CSE per ciascuna diluizione della curva standard.

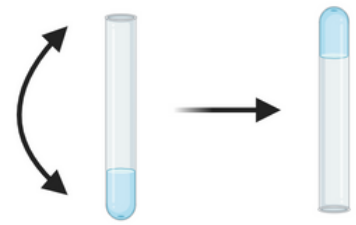
③ Aggiunta lisato e incubazione



Ad ognuna delle provette si aggiungono 0,1 ml di lisato ricostituito a T_{amb} .

Le provette vanno leggermente scosse e immediatamente messe ad incubare.

④ Risultati



Le provette vengono tolte dall'incubatore e capovolte di 180°.

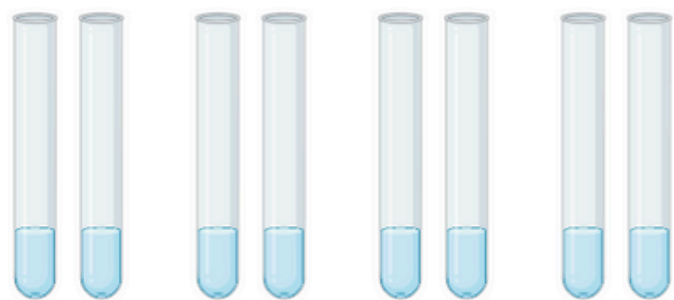
- Test positivo: il gel rimane stabile sul fondo.
- Test negativo: il gel non si forma o si rompe durante la rotazione

Per verificare se il test è accettabile si deve calcolare la media geometrica degli endpoint (le prime concentrazioni che danno reazione positiva), espressi come logaritmi decimali. Si ottiene così il valore λ' (sensibilità calcolata). Solo se λ' cade nell'intervallo di accettabilità $\lambda/2 \leq \lambda' \leq \lambda 2$ il lisato è convalidato.

3. Esecuzione del test sul campione di acqua

Il test sul campione viene sempre eseguito in due repliche, parallelamente ai controlli positivi e negativi in acqua LAL, oppure alla convalida del lisato se cambiano il lotto di lisato e/o le condizioni sperimentali.

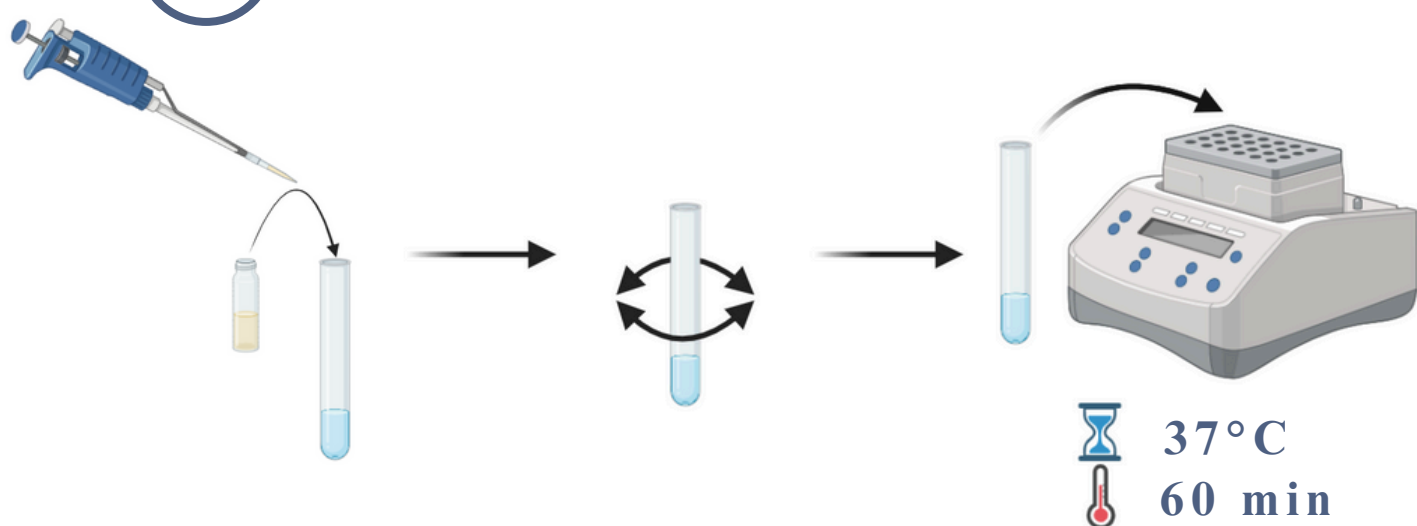
① Preparazione provette



Si realizzano 2 repliche per ciascuna delle seguenti condizioni in provette 10x75mm:

- 0,1 ml di acqua campione;
- 0,1 ml di acqua campione con 2 λ di CSE (controllo positivo);
- 0,1 ml di acqua LAL (controllo negativo);
- 0,1 ml di acqua LAL con 2 λ di CSE (controllo positivo).

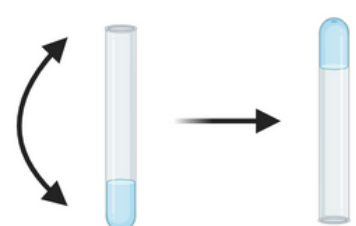
② Aggiunta lisato e incubazione



Ad ognuna delle provette si aggiungono 0,1 ml di lisato ricostruito a Tamb.

Le provette vanno leggermente scosse e immediatamente messe ad incubare.

③ Risultati



Le provette vengono tolte dall'incubatore e capovolte di 180°.

- Test positivo: il gel rimane stabile sul fondo.
- Test negativo: il gel non si forma o si rompe durante la rotazione

Per i criteri di accettabilità del test e l'interpretazione dei risultati si riporta al termine del protocollo per "test singoli" (pag. 6).

PROTOCOLLO - TEST SINGOLI

1. Ricostituzione dei reagenti

Lisato

Il lisato nel formato “test singoli” viene fornito già pre-aliquotato in provette test. Va mantenuto in frigorifero e utilizzato a temperatura ambiente (T_{amb}), aggiungendo al momento del test direttamente 0,2ml di soluzione campione.

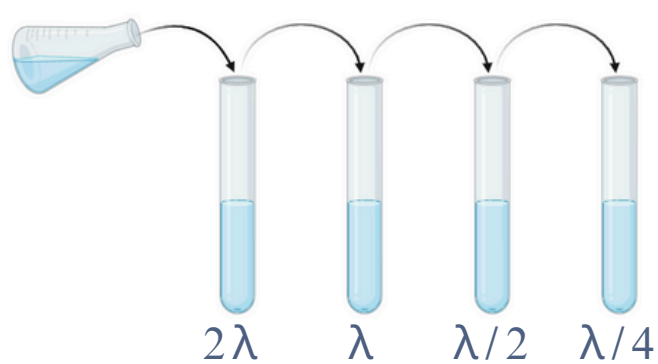
CSE

Il flacone di CSE va ricostituito con acqua LAL secondo i volumi indicati sul certificato di analisi e quindi vortexato secondo le indicazioni del produttore. La soluzione madre così ottenuta va conservata in frigorifero e vortexata per 5 min prima di ogni utilizzo.

2. Convalida del lisato

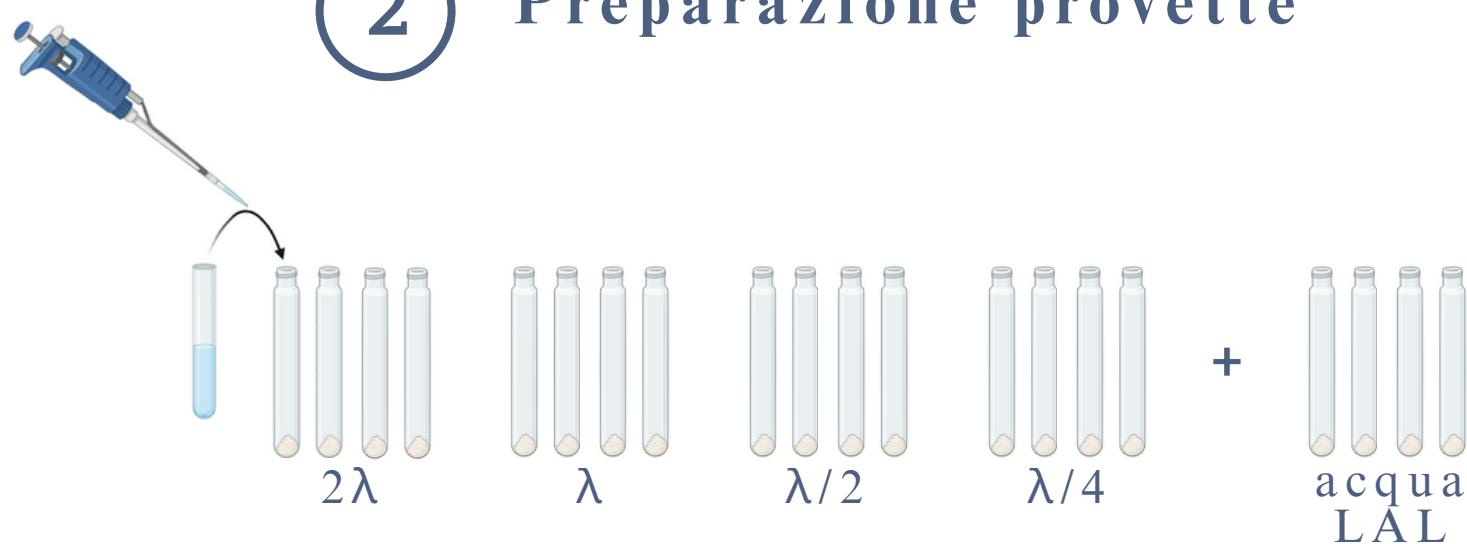
Anche in questo caso è necessario procedere con la convalida del lisato per controllarne la sensibilità. Questa operazione va ripetuta ogni volta che si cambia il lotto di lisato o quando variano le condizioni sperimentali.

1 Diluizioni di CSE



Le diluizioni vengono preparate partendo dalla soluzione madre di CSE fino ad arrivare alle concentrazioni 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$ (costituiscono la “curva standard”). Le diluizioni vengono preparate in provette 13x100mm e tra una diluizione e l'altra la soluzione va vortexata per 30-60 sec.

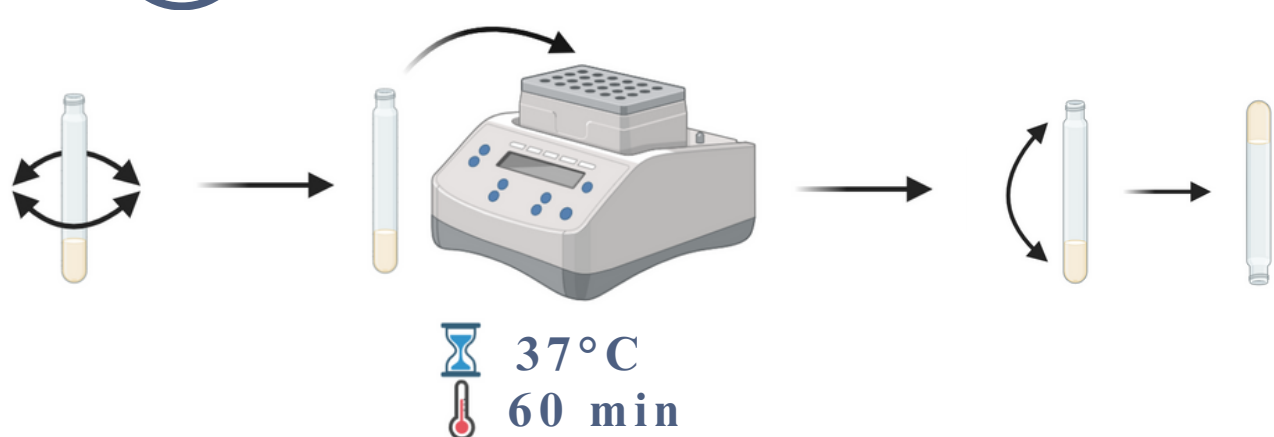
2 Preparazione provette



Si realizzano 4 repliche per ciascuna delle seguenti condizioni nelle provette di lisato per test singoli:

- 0,2 ml di acqua LAL (controllo negativo);
- 0,2 ml della soluzione di CSE per ciascuna diluizione della curva standard.

3 Incubazione e risultati



Le provette vanno leggermente scosse e immediatamente messe ad incubare. Una volta tolte dall'incubatore, le provette vanno capovolte di 180° .

- Test positivo: il gel rimane stabile sul fondo.
- Test negativo: il gel non si forma o si rompe durante la rotazione

Per verificare se il test è accettabile si deve calcolare la media geometrica degli endpoint (le prime concentrazioni che danno reazione positiva), espressi come logaritmi decimali. Si ottiene così il valore λ' (sensibilità calcolata). Solo se λ' cade nell'intervallo di accettabilità $\lambda/2 \leq \lambda' \leq \lambda 2$ il lisato è convalidato.

3. Esecuzione del test sul campione

Il test sul campione viene sempre eseguito in due repliche, parallelamente ai controlli positivi e negativi in acqua LAL, oppure alla convalida del lisato se cambiano il lotto di lisato e/o le condizioni sperimentali.

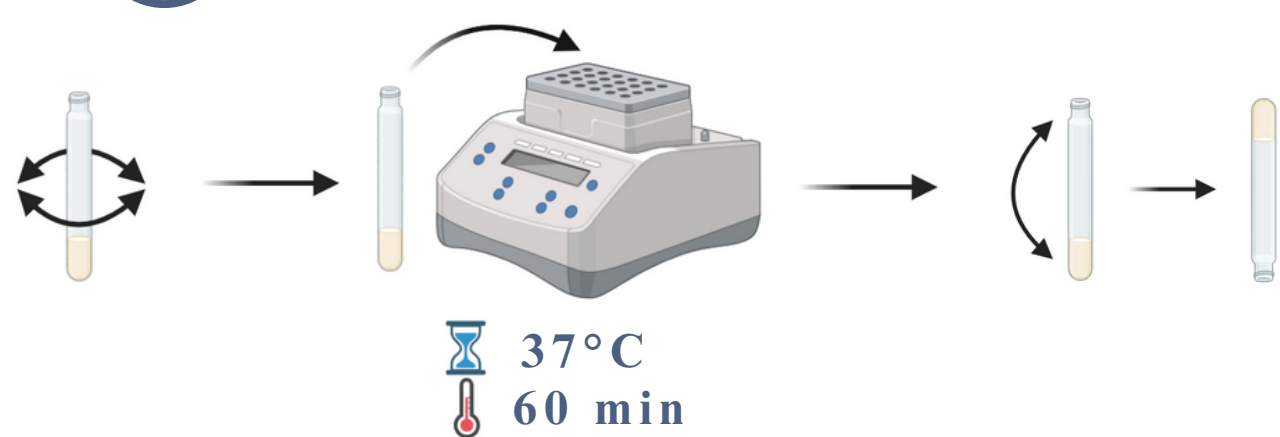
1 Preparazione provette



Si realizzano 2 repliche per ciascuna delle seguenti condizioni nelle provette di lisato:

- 0,2 ml di acqua campione;
- 0,2 ml di acqua campione con 2λ di CSE (controllo positivo);
- 0,2 ml di acqua LAL (controllo negativo);
- 0,2 ml di acqua LAL con 2λ di CSE (controllo positivo).

2 Incubazione e risultati



Le provette vanno leggermente scosse e immediatamente messe ad incubare. Una volta tolte dall'incubatore, le provette vanno capovolte di 180°.

- Test positivo: il gel rimane stabile sul fondo.
- Test negativo: il gel non si forma o si rompe durante la rotazione

Interpretazione dei risultati

Condizioni di accettabilità:

- I **controlli positivi** (provette con 2λ di CSE) DEVONO essere **positivi**.
- I **controlli negativi** (provette con solo acqua LAL) DEVONO essere **negativi**.

Risultati sul campione:

- Se il **campione** ha risultato **negativo** allora il suo Contenuto Endotossinico è inferiore a λ .
- Se il **campione** ha risultato **positivo** allora il suo Contenuto Endotossinico è superiore a λ . Se tale valore era inferiore a quello del limite ufficiale (0,25 EU/ml) il test può essere ripetuto impostando un fattore di diluizione tale da avere: $\lambda \times$ fattore di diluizione = 0,25 EU/ml.

PRODOTTI PER LAL TEST NEL CATALOGO KAIROSAFE

Reagenti ed Endotossine

- Lisato per test multipli in flaconi 50 test (ACC)
- Lisato per test singoli (ACC)
- Endotossina Standard di Controllo, CSE (ACC)
- Endotossina Standard di Riferimento, RSE (USP o BRP)

Strumentazione dedicata

- Incubatori a secco con blocchi riscaldanti
- Pipette automatiche
- Propipette
- Vortex
- Termometri digitali

REAGENTI LAL E CSE PER GEL CLOT

E0005-1	Control Standard Endotoxin (CSE) - E. coli O113:H10 - 500 ng. 1 flaconcino (Necessaria per allestire controlli positivi e curva standard)
G5003-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 5 ml sens. 0,03 EU/ml. 5 flaconcini (ca 50 test cad)
G5006-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 5 ml sens. 0,06 EU/ml. 5 flaconcini (ca 50 test cad)
G5125-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 5 ml sens. 0,125 EU/ml. 5 flaconcini (ca 50 test cad)
G5250-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 5 ml sens. 0,25 EU/ml. 5 flaconcini (ca 50 test cad)
GS003-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 0,2 ml sens. 0,03 EU/ml. 50 test singoli
GS006-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 0,2 ml sens. 0,06 EU/ml. 50 test singoli
GS125-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 0,2 ml sens. 0,125 EU/ml. 50 test singoli
GS250-5	PYROTELL® Lisato per LAL test Gel-clot (Method A and B, EP), 0,2 ml sens. 0,25 EU/ml. 50 test singoli

STRUMENTI PER LAL TEST GEL CLOT

179310-22	Sahara 310. Incubatore a secco digitale. Impostazione della temperatura da RT +5°C a 150°C. Da utilizzare con 1 blocco riscaldanti serie 179300. Fornibili con protocollo di IQOQ.
179320-22	Sahara 320. Incubatore a secco digitale. Impostazione della temperatura da RT +5°C a 150°C. Da utilizzare con 2 blocchi riscaldanti serie 179300. Fornibili con protocollo di IQOQ.
179300-05	Blocco riscaldante per 20 provette da 12 o 13 mm. Da alloggiare in incubatore a secco serie Sahara
22008013	Mix Vortex (0-2500 rpm). Molto compatto. Velocità regolabile, modalità di funzionamento a tocco o in continuo
50111012	XS TEMP 7 Pt 100 Vio. Termometro digitale portatile per sonde PT 100, senza sonda. Range -200 ... +999 °C
51000202	Sonda PT100 - PT56. Sonda di temperatura a PT100. Connessione DIN 3 pin. Con manico in materiale antiscivolo, resistente e piacevole al tatto. Facile da pulire. Stelo resistente in acciaio inossidabile. Puntale semisferico per misure in aria e liquidi
4780200	Ratiopetta® Pipetta automatica 20-200 µl
4781000	Ratiopetta® Pipetta automatica 100-1000 µl
3200300	Ratiolab® Accupetta Propipetta

Consumabili apirogeni

- Provette, pipette e puntali;
- Acqua LAL;
- Plastica e vetreria per LAL test;
- Soluzioni tampone, soluzioni acide e basiche.

PROVETTE PER LAL TEST

TBS-1075	Provette LAL in vetro borosilicato 10 x 75 mm per Gel Clot, sterili apirogene
1958600	Provette LAL in vetro borosilicato 9,75 x 75 mm per LAL 5000 e 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, apirogene

1987600	Provette LAL in vetro borosilicato 12 x 75 mm, sterili apirogene
TBS-13100-50	Provette LAL in vetro borosilicato 13 x 100 mm, sterili apirogene
1958650	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 90 mm con tappo a vite, sterili apirogene
TBS-16100	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 100 mm, sterili apirogene
1958800	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 160 mm, sterili apirogene

PIPETTE PER LAL TEST

1720001	Pipette in vetro borosilicato 1ml sterili apirogene, 10pz
1720002	Pipette in vetro borosilicato 2ml sterili apirogene, 10pz
1720005	Pipette in vetro borosilicato 5ml sterili apirogene, 10pz
1720010	Pipette in vetro borosilicato 10ml sterili apirogene, 10pz

PLASTICHERIA E VETRERIA PER LAL TEST

FL-125S	Flaconi da campionamento LAL 125ml PET, apirogeni certificati, conf. singola film termoretraibile, 10pz
FL-125B	Flaconi da campionamento LAL 125ml PET, apirogeni certificati, 10pz
6254	Provettoni PS 50ml, tappo a vite, graduati, sterili, apirogeni, 500pz (25/bag)
6256	Provettoni PP 50ml con base self standing, tappo a vite (HDPE), graduati, sterili, apirogeni, 500pz (25/bag)
6274	Provette PS 15ml, tappo a vite, graduati, sterili, apirogeni, 500pz (50/rack)
FLV-10B	Flaconi da campionamento LAL 10 ml in vetro bianco Classe III con tappo in gomma e ghiera, sterili, apirogeni certificati con limite <0.001 EU/ml. 10 pz
FLV-30B	Flaconi da campionamento LAL 10 ml in vetro bianco Classe III con tappo in gomma e ghiera, sterili, apirogeni certificati con limite <0.001 EU/ml. 10 pz
FLV-50B	Flaconi da campionamento LAL 10 ml in vetro bianco Classe III con tappo in gomma e ghiera, sterili, apirogeni certificati con limite <0.001 EU/ml. 10 pz
FLV-100B	Flaconi da campionamento LAL 10 ml in vetro bianco Classe III con tappo in gomma e ghiera, sterili, apirogeni certificati con limite <0.001 EU/ml. 10 pz

PUNTALI PER LAL TEST

1441610-0030075234	Puntali volume 2-200 µl giallo, in rack da 96 pz, sterili apirogeni. Eppendorf Biopur. 480 pz (5 rack)
1441620-0030075250	Puntali volume 50-1000 µl blu, in rack da 96 pz, sterili apirogeni. Eppendorf Biopur. 480 pz (5 rack)
1441630-0030075285	Puntali volume 500-2500 µl rosso, in rack da 48 pz, sterili apirogeni. Eppendorf Biopur. 240 pz (5 rack)

SOLUZIONI TAMPONE PER LAL TEST

1715200	Soluzione Tris Buffer 0.05M sterile apirogena, 50ml
1715215	Soluzione Tris Buffer 0.1M sterile apirogena, 50ml
1715250	Soluzione Tris Buffer 0.2M pH 7.4 sterile apirogena, 5.5ml
1715255	Soluzione Tris Buffer 0.2M pH7.4 sterile apirogena, 55ml

1712300	Soluzione HCl 0.1N sterile apirogena, 100ml
1712310	Soluzione HCl 1N sterile apirogena, 100ml
1712200	Soluzione NaOH 0.1N sterile apirogena, 100ml
1712210	Soluzione NaOH 1N sterile apirogena, 100ml

ACQUA PER LAL TEST

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
1715054	Acqua LAL sterile apirogena in flacone vetro con tappo a ghiera flip-off, 500 ml
1715105	Acqua LAL sterile apirogena in flacone vetro con tappo a ghiera flip-off, 1000 ml

Per informazioni e richieste:

KAIROSafe S.r.l.

Sistiana, 41/D 34011 Duino Aurisina (TS)

Tel: 040 2907149 - 299502

e-mail: info@kairosafe.it

web: www.kairosafe.it

