

# LAL TEST RICOMBINANTE

## INTRODUZIONE

Il LAL test ricombinante rappresenta la nuova frontiera nell'analisi delle endotossine ed è stato ufficialmente riconosciuto anche dalla Farmacopea (European Pharmacopoeia 11.0, 2.6.32), in aggiunta ai metodi standard, segnando un passo importante verso metodi più sostenibili ed etici.

Può essere utilizzato per testare farmaci iniettabili per uso umano (inclusi prodotti biologici), farmaci iniettabili per uso veterinario e dispositivi medici, assicurando una sensibilità massima di:

- 0,005 EU/mL, se utilizzato con un lettore di micropiastre,
- 0,001 EU/mL, se utilizzato con un lettore di provette.

## Vantaggi

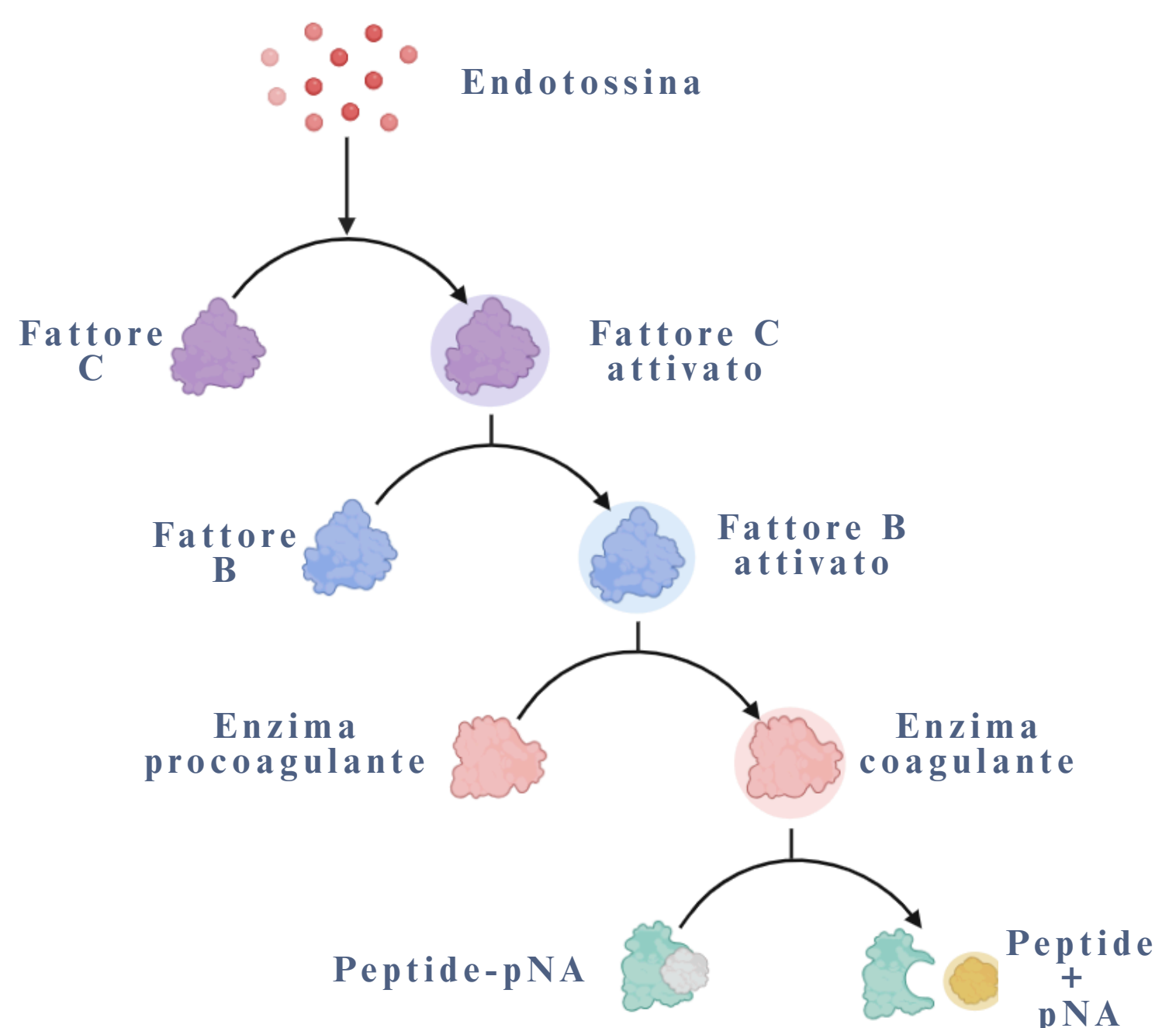
L'utilizzo del LAL test ricombinante permette di ottenere gli stessi risultati dei LAL test convenzionali con l'aggiunta di alcuni vantaggi:

- no origine animale (non deriva da *Limulus polyphemus*);
- no interferenza con i glucani;
- stessa cascata di reazioni dei reagenti tradizionali;
- stessi strumenti e step di preparazione dei LAL test convenzionali;
- più sostenibile.

## PyroSmart NextGen®

PyroSmart NextGen®, prodotto da Associates of Cape Cod Incorporated (ACC), è un reagente cinetico-cromogenico ricombinante per il rilevamento e la determinazione quantitativa delle endotossine batteriche gram-negative.

Tale reagente è costituito da tre proteine ricombinanti: Fattore C, Fattore B e un enzima procoagulante. In presenza di endotossine, queste proteine si attivano a cascata portando alla liberazione di para-nitroanilina (pNA), un composto di colore giallo, che assorbe a 405nm. La variazione di assorbanza consente di ricavare il contenuto di endotossina nel campione.



# TEST RICOMBINANTE IN UN LETTORE DI MICROPIASTRE AD ASSORBANZA

La concentrazione di endotossina può essere rilevata in due modi:

1. **Onset Time Assay:** si determina il tempo impiegato per raggiungere la soglia di reazione. Concentrazioni di endotossina più elevate determinano tempi più brevi. La curva standard viene costruita con il logaritmo dell'onset time in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina standard.
2. **Rate Assay:** viene calcolata la velocità media (mAbs/min) nel corso del test. Maggiori sono le concentrazioni di endotossina, maggiore è la velocità media. La curva standard viene costruita con la velocità media in funzione della concentrazione di endotossina standard.

## Materiali: reagenti ed apparecchiature

- **PyroSmart NextGen®:** nella confezione è presente sia il reagente liofilizzato che il tampone necessario per la sua ricostituzione.
- **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, tamponi, micropiastre a 96 pozzetti con coperchio (non trattate e non rivestite), provette in vetro, puntali in plastica, Parafilm®.
- **Apparecchiature:** lettore di micropiastre ad assorbanza e relativo software, micropipette, vortex, cronometro.

## Allestimento del test

Per rilevare e quantificare il contenuto di endotossina in un campione, è necessario procedere con i seguenti step:

1. Preparazione del lettore di piastre e del software;
2. Ricostituzione dei reagenti;
3. Esecuzione del test e lettura dei risultati.

### 1. Preparazione del lettore di piastre e del software

Prima di procedere con l'allestimento dei campioni e del test vero e proprio è necessario accendere il lettore di piastre per lasciarlo equilibrare a 37°C e configurare il software con le apposite impostazioni previste dal fornitore.

## 2. Ricostituzione dei reagenti

### 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.

### PyroSmart NextGen®

Trasferire 2,8ml di tampone di ricostituzione nella fiala del reagente e coprire con Parafilm®. Agitare leggermente la fiala per il primo minuto quindi lasciar riposare per i 2 minuti successivi. Il reagente deve essere utilizzato entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

## 3. Esecuzione del test e lettura dei risultati

Il test sul campione viene sempre eseguito in due repliche, parallelamente ai controlli positivi e negativi in acqua LAL e alle diluizioni di CSE, necessarie per la creazione della curva standard. Il protocollo da seguire resta il medesimo tra l'Onset Time Assay e il Rate Assay, variano solo i parametri di analisi da inserire nel software.

### 1 Diluizioni seriali di CSE



Viene preparata una serie geometrica di curve standard che deve riprodurre l'intervallo di concentrazioni di endotossina richiesto. Ad esempio:

- Onset Time Assay: 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/ml;
- Rate Assay: 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 EU/ml.

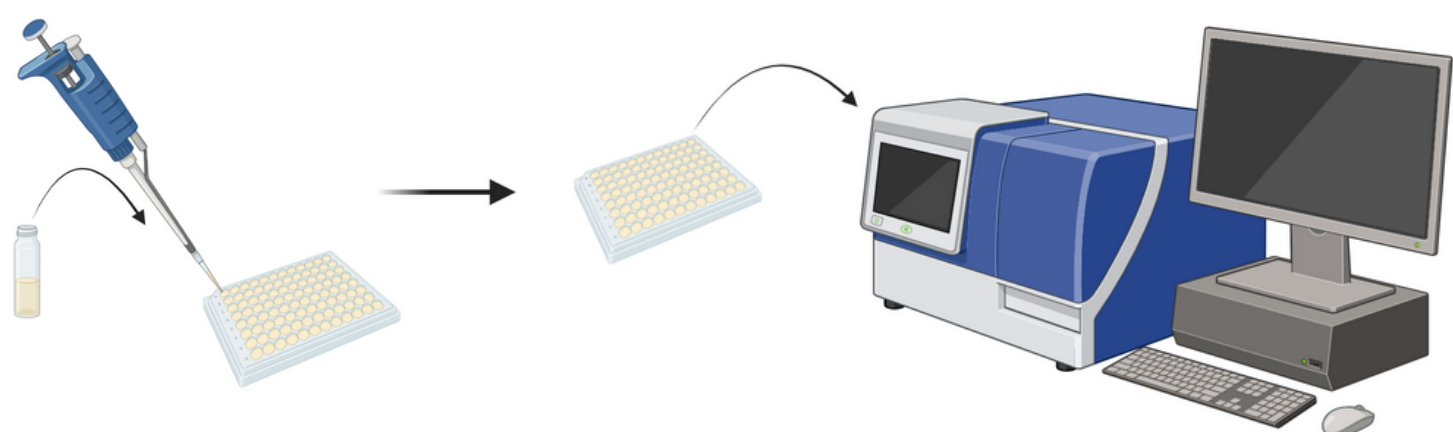
### 2 Preparazione della micropiastra



Si trasferiscono due repliche per ciascuna delle seguenti condizioni negli appositi pozzi della micropiastra da 96:

- 50µl di acqua LAL (controllo negativo);
- 50µl di campione con CSE (controllo positivo), con concentrazione nell'intervallo della curva standard;
- 50µl di ciascuna diluizione di CSE (curva standard);
- 50µl di campione.

### 3 Aggiunta di PyroSmart NextGen® e lettura dei risultati



In ciascun pozzetto, vengono erogate aliquote da 50µl di reagente una alla volta. Procedere il più velocemente possibile.

La micropiastra viene trasferita in un lettore per micropiastra e si avvia il test.

## Accorgimenti

Come per le metodiche standard, anche in questo caso vanno tenute sotto controllo le possibili fonti di interferenza utilizzando consumabili certificati apirogeni e non interferenti. Inoltre, alcune sostanze presenti nel campione potrebbero interferire con il risultato del test:

- **Proteasi serine** (come tripsina e fattori sanguigni attivati) che generano un risultato falso positivo devono essere denaturate prima di eseguire il test;
- **Materiali coloranti** (come albumina, siero animale e plasma) ed eccessiva torbidità vanno limitati eventualmente diluendo il campione.

Per i criteri di accettabilità del test e l'interpretazione dei risultati si riporta al termine del test ricombinante in un lettore di provette (pag. 6).

## TEST RICOMBINANTE IN UN LETTORE DI PROVETTE

In questo caso, la concentrazione di endotossina può essere rilevata solo tramite **Onset Time Assay**, durante il quale si determina il tempo impiegato per raggiungere la soglia di reazione. Concentrazioni di endotossina più elevate determinano tempi più brevi. La curva standard viene costruita con il logaritmo dell'onset time in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina standard.

## Materiali: reagenti ed apparecchiature

- **PyroSmart NextGen®**: nella confezione è presente sia il reagente liofilizzato che il tampone necessario per la sua ricostituzione.
- **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, tamponi, provette in soda vetro o borosilicato, puntali in plastica, Parafilm®.
- **Apparecchiature**: lettore di provette per incubazione e relativo software, micropipette, vortex, cronometro.

# Allestimento del test

Per rilevare e quantificare il contenuto di endotossina in un campione, è necessario procedere con i seguenti step:

1. Preparazione del lettore di provette e del software;
2. Ricostituzione dei reagenti;
3. Esecuzione del test e lettura dei risultati.

## 1. Preparazione del lettore di provette e del software

Prima di procedere con l'allestimento dei campioni e del test vero e proprio è necessario accendere il lettore di provette per lasciarlo equilibrare a 37°C e configurare il software con le apposite impostazioni previste dal fornitore.

## 2. Ricostituzione dei reagenti

### 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.

### PyroSmart NextGen®

Trasferire 2,8ml di tampone di ricostituzione nella fiala del reagente e coprire con Parafilm®. Agitare leggermente la fiala per il primo minuto quindi lasciar riposare per i 2 minuti successivi. Il reagente deve essere utilizzato entro 20 minuti dopo la ricostituzione.

## 3. Esecuzione del test e lettura dei risultati

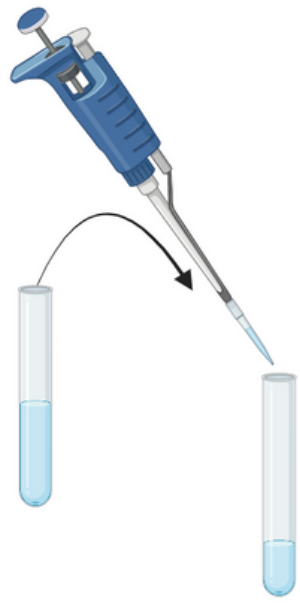
Il test sul campione viene sempre eseguito in due repliche, parallelamente ai controlli positivi e negativi in acqua LAL e alle diluizioni di CSE, necessarie per la creazione della curva standard. Il protocollo è molto simile al precedente, l'unica differenza risiede nell'utilizzo di provette, e quindi di diversi volumi di lavoro, e di un lettore di provette.

### ① Diluizioni seriali di CSE



Viene preparata una serie geometrica di curve standard che deve riprodurre l'intervallo di concentrazioni di endotossina richiesto. Ad esempio concentrazioni CSE pari a 5, 0.5, 0.05, 0.005 EU/ml.

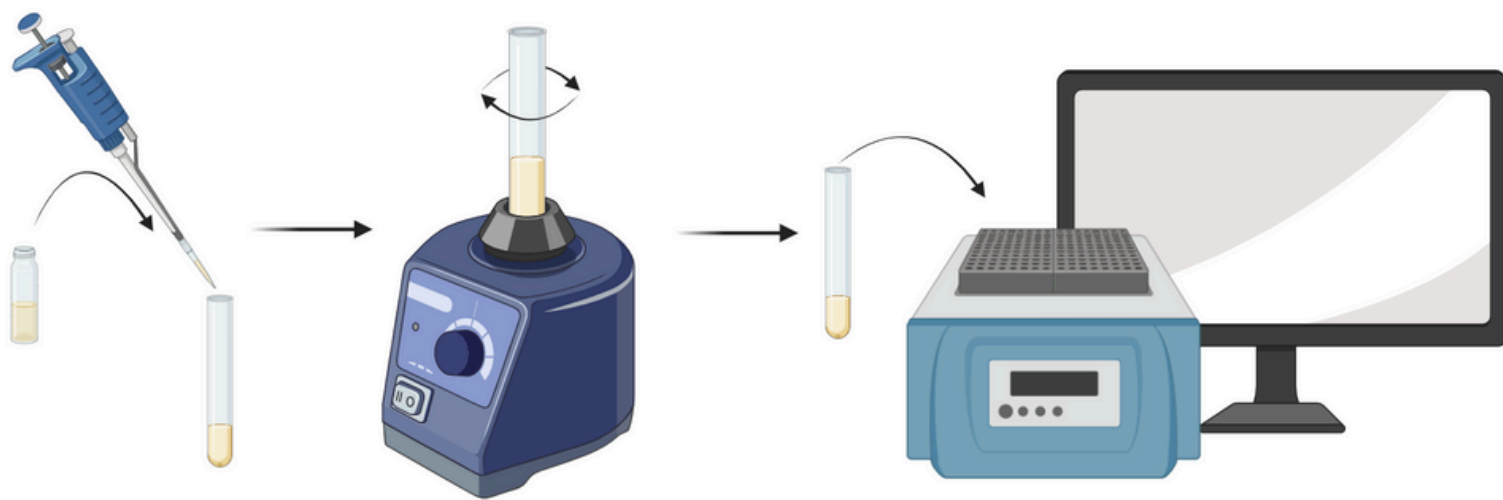
## 2 Preparazione delle provette



Si trasferiscono due repliche per ciascuna delle seguenti condizioni nelle provette di reazione 8 x 75 mm:

- 200µl di acqua LAL (controllo negativo);
- 200µl di campione con CSE (controllo positivo), con concentrazione nell'intervallo della curva standard;
- 200µl di ciascuna diluizione di CSE (curva standard);
- 200µl di campione.

## 3 Aggiunta di PyroSmart NextGen® e lettura dei risultati



In ciascuna provetta, vengono erogate aliquote da 50µl di reagente una alla volta.

Agitare la provetta per 1sec con il vortex, quindi inserirla immediatamente nel lettore di provette. Il test si avvia automaticamente con l'inserimento di ogni provetta.

### Accorgimenti

Come per le metodiche standard, anche in questo caso vanno tenute sotto controllo le possibili fonti di interferenza utilizzando consumabili certificati apirogeni e non interferenti. Inoltre, alcune sostanze presenti nel campione potrebbero interferire con il risultato del test:

- Proteasi serine (come tripsina e fattori sanguigni attivati) che generano un risultato falso positivo devono essere denaturate prima di eseguire il test;
- Materiali coloranti (come albumina, siero animale e plasma) ed eccessiva torbidità vanno limitati eventualmente diluendo il campione.

## Interpretazione dei risultati

Condizioni di accettabilità:

- **Controlli positivi:** il recupero del controllo positivo del campione deve essere del 50%-200% della concentrazione nominale dell'endotossina aggiunta.
- **Controlli negativi:** Onset Time Assay: onset time dei controlli negativi deve essere maggiore rispetto a quello dello standard meno concentrato. Rate Assay: la velocità media del controllo negativo deve essere minore rispetto a quella dello standard meno concentrato.

Risultati sul campione:

Il software restituisce automaticamente alla fine del test il calcolo delle concentrazioni di endotossina di tutti i campioni testati (compresi standard e controlli) mediante interpolazione rispetto alla curva standard.

# PRODOTTI PER LAL TEST RICOMBINANTE NEL CATALOGO KAIROSAFE

## Reagenti ed Endotossine

- Reagente PyroSmart NextGen® (ACC)
- Endotossina Standard di Controllo, CSE (ACC)

## Strumentazione dedicata

- Lettore di micropiastre ad assorbanza
- Lettore di provette per incubazione
- Pipette automatiche
- Propipette
- Vortex

## Consumabili apirogeni

- Provette e micropiastre
- Pipette e puntali
- Acqua LAL
- Plasticheria e vetreria per LAL test

### REAGENTE RICOMBINANTE E CSE

PNG050-2	PyroSmart NextGen™ Recombinant LAL Kit. 2 flaconcini (100 test). Test cinetico
EC010-5	Control Standard Endotoxin (CSE) - E. coli O113:H10 - 10 ng. 5 flaconcini

### ACQUA PER LAL TEST

WP100C	LAL Reagent Water (LRW) flacone plastica 100 ml. 30 pz
WP050C	LAL Reagent Water (LRW) flacone plastica 50 ml. 30 pz

### PROVETTE E MICROPIASTRE PER LAL TEST

CA961-10	PYROPLATE Micropiastre apirogene per LAL test. 10 pz
TB160-10	PYROTUBE®-A Provette borosilicato 16x100 mm apirogene per LAL test (diluizione). 10 x 10 pz
TK100-10	PYROTUBE®-K Provette borosilicato 8x75 mm apirogene per LAL test cinetico. 10 x 50 pz

### STRUMENTI PER LAL TEST

EPOCH2NS-SN	Lettore di piastre Biotek Epoch 2 per LAL test cinetico.
PKFxx-PKG-I	PYROS KINETIX FLEX. Lettore di provette per LAL test cinetico.
22008013	Mix Vortex (0-2500 rpm). Molto compatto. Velocità regolabile, modalità di funzionamento a tocco o in continuo
4780200	Ratiopetta® Pipetta automatica 20-200 µl
4781000	Ratiopetta® Pipetta automatica 100-1000 µl
3200300	Ratiolab® Accupetta Propipetta

### 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)

**Per informazioni e richieste:**

**KAIROSafe S.r.l.**

**Sistiana, 41/D 34011 Duino Aurisina (TS)**

**Tel: 040 2907149 - 299502**

**e-mail: [info@kairosafe.it](mailto:info@kairosafe.it)**

**web: [www.kairosafe.it](http://www.kairosafe.it)**

