

I FATTORI DI INTERFERENZA NEL LAL TEST

Il LAL test permette di rilevare la presenza di endotossina batterica in prodotti farmaceutici, acqua per dialisi, medical devices ecc. Il test si basa su una reazione a cascata enzimatica che viene attivata dall'endotossina batterica presente nella parete cellulare dei batteri gram- ma per garantirne il buon esito è fondamentale evitare la contaminazione e le interferenze, per questo si utilizzano consumabili privi di endotossina (apirogeni) e non interferenti certificati.

Le più comuni fonti di interferenza nel LAL test sono:

- **Consumabili non adeguati**
- **Acqua non adeguata**
- **Caratteristiche del prodotto da analizzare**

Consumabili per LAL test - [clicca link interattivo](#)

Si tratta per lo più di:

- Provette di vetro o plastica
- Pipette di vetro o plastica
- Puntali di plastica
- Contenitori di vetro o plastica

Provette di vetro

Sono molto importanti in quanto usate in tutte le fasi del test: il campionamento, le diluizioni e infine il test vero e proprio.

Le provette per campionamento e diluizione sono di borosilicato.

Le provette per il test sono di borosilicato oppure di soda vetro e per la scelta occorre seguire le indicazioni del produttore del reagente LAL.

Il borosilicato è un vetro neutro che, a differenza della soda vetro, non rilascia ioni. Le provette possono essere usate più volte, dopo averle depirogenate con calore secco.

Prima della depirogenazione le provette devono essere lavate e sciacquate con acqua apirogena, in modo da evitare la persistenza di detergenti o altre sostanze che interferiscono con il LAL test.

Le provette certificate hanno contenuto endotossinico inferiore a 0,001 EU/ml.

Pipette di vetro

Le pipette apirogene di solito sono di borosilicato, certificate con contenuto endotossinico inferiore a 0,001 EU/ml.

Accessori di plastica

Parliamo di contenitori, provette, pipette, puntali e micropiastre.

E' necessario usare accessori certificati oppure verificare che la plastica sia priva di endotossina e non interferente per poterla utilizzare nel LAL test.

Esiste in commercio plastiche apirogena certificata con contenuto endotossinico inferiore a 0,001 EU/ml, ma più spesso con contenuto inferiore a 0,005 EU/ml o 0,5 EU/device.

I fattori che possono avere un ruolo nelle interferenze sono:

- Tipo di plastica
- Trattamento
- Microstruttura

Tipo di plastica

Il polipropilene e il polietilene possono inibire il LAL test.

Il polistirene, il PET e il PETG sono adatti ad eseguire il LAL

Trattamento

La presenza di additivi quali stabilizzanti, coloranti e antiossidanti può influire sul LAL test così come il tipo di sterilizzazione: tracce di ossido di etilene possono inibire il LAL test.

Vi può essere contaminazione successiva alla produzione, ad esempio durante la fase di imballaggio.

Microstruttura

La porosità influisce trattenendo le particelle di endotossina e inibendo il LAL test.

Controlli sui materiali

Il tempo di contatto col prodotto sotto esame è importante.

Per verificare che il materiale non sia interferente si può analizzare con il LAL test dell'acqua LAL tenuta per 60 minuti a 37°C nel contenitore da analizzare. L'esecuzione dei controlli positivi è fondamentale per verificare se c'è inibizione.

Particolarmente importante per:

- Contenitori per raccolta e conservazione di acqua e campioni.
- Provette per diluizioni di endotossina standard.
- Micropiastre per test cinetico.

Per pipette e puntali di plastica eventuali interferenze sono limitate dal brevissimo tempo di contatto tra plastica e campione.

Acqua per LAL test - [clicca link interattivo](#)

Si tratta di un elemento fondamentale per la buona riuscita del test.

Anche l'acqua per LAL test deve essere apirogena e priva di fattori interferenti.

I metodi usati per la depirogenazione dell'acqua sono la distillazione (almeno tripla) e l'osmosi inversa. L'acqua LAL di solito è certificata con un contenuto endotossinico inferiore a 0,001 EU/ml e può essere in bottiglia di vetro o plastica.

Le possibili sostanze interferenti presenti nell'acqua sono:

Sostanze inibenti

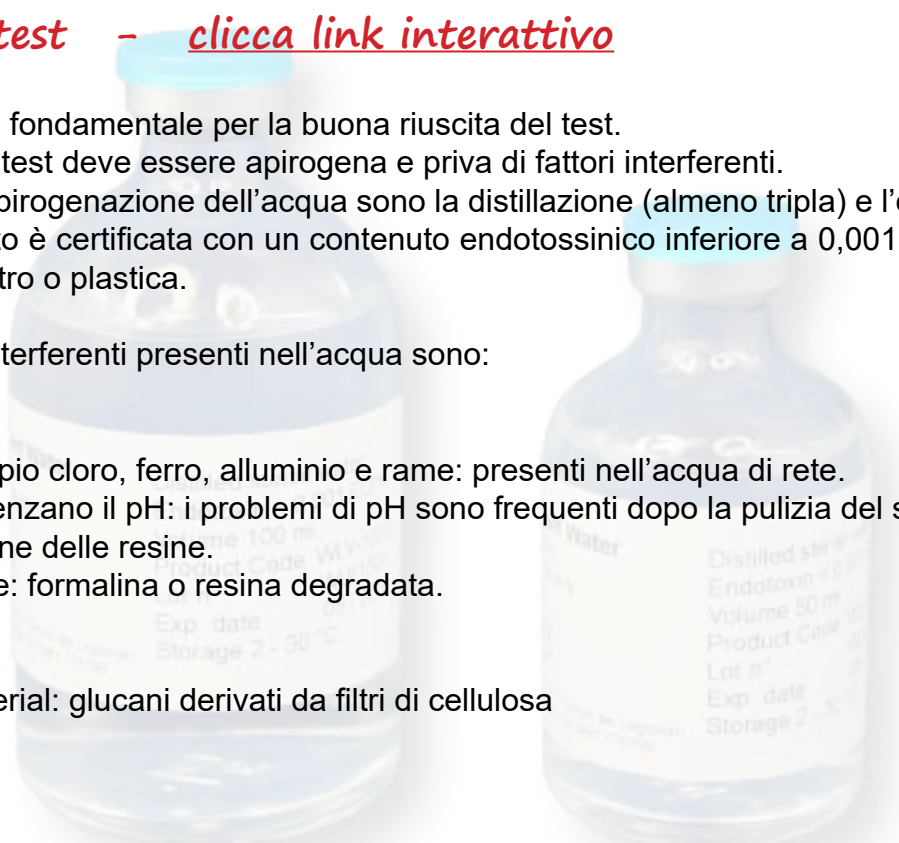
I.1) Ioni come ad esempio cloro, ferro, alluminio e rame: presenti nell'acqua di rete.

I.2) Sostanze che influenzano il pH: i problemi di pH sono frequenti dopo la pulizia del sistema e dopo la rigenerazione delle resine.

I.3) Sostanze organiche: formalina o resina degradata.

Sostanze stimolanti

S.1) LAL Reactive Material: glucani derivati da filtri di cellulosa



Caratteristiche del prodotto - [clicca link interattivo](#)

Molteplici sono i fattori che influiscono sul LAL test e che possono essere superati applicando determinate strategie o utilizzando reagenti appositi. Per molti prodotti, ad esempio farmaceutici o biotecnologici, la caratterizzazione è la fase in cui si definisce la strategia migliore per eseguire il LAL test, risolvendo eventuali interferenze, e che porta alla stesura della SOP per le analisi di routine.

Fattori con effetto inibente

- I.1) pH fuori del range 6.0 - 8.0
- I.2) Presenza di agenti chelanti
- I.3) Eccesso di ioni
- I.4) Presenza di proteine

I.1) pH fuori dal range 6.0 - 8.0

Tipo di interferenza: inibizione.

Risoluzione: correzione con tamponi specifici, NaOH o HCl.

La correzione del pH va fatta seguendo le raccomandazioni del produttore del reagente LAL.

I.2) Presenza di agenti chelanti

Tipo di interferenza: inibizione. Sostanze come ad eparina e citrato sequestrano gli ioni bivalenti Ca^{++} e Mg^{++} , essenziali per la reazione LAL-endotossina.

Risoluzione: correzione con tampone Tris 1.0 M con MgSO_4 .

I.3) Eccesso di ioni

Tipo di interferenza: inibizione.

Risoluzione: diluizione del prodotto con acqua LAL.

I.4) Presenza di proteine

Tipo di interferenza: inibizione dovuta all'affinità tra le proteine nel prodotto e il lipopolisaccaride purificato usato per i controlli. Ad esempio il siero

Risoluzione: diluizione del prodotto con un agente surfattante che disperde le proteine o trattamento termico che denatura le proteine.

Fattori con effetto stimolante

- S.1) Presenza di componenti di origine polisaccaridica
- S.2) Presenza di aggregati di proteine

S.1) Componenti di origine polisaccaridica

Tipo di interferenza: stimolazione, attivazione della reazione tramite la via alternativa del fattore G. I glucani agiscono in sinergia con l'endotossina batterica. Poiché sono potenti attivatori del LAL, sono stati chiamati LAL Reactive Material.

Risoluzione: diluizione del reagente LAL con un tampone che blocca la via alternativa.

Il lisato è così sensibile solo alla presenza di endotossina batterica.

La struttura dei glucani

I glucani sono omopolimeri di glucosio. Sono stati trovati in funghi, lieviti, alghe e batteri, ma anche in cotone, filtri e membrane di natura cellulosica. Antibiotici e farmaci entrati in contatto con filtri e membrane di cellulosa possono contenere glucani. Anche mannani, destrani e peptidoglicani possono stimolare il LAL test.

S.2) Presenza di aggregati di proteine

Tipo di interferenza: stimolazione dovuta all'attivazione della reazione da parte di aggregati di proteine ad alto peso molecolare. Ad es. antibiotici.

Risoluzione: diluizione del prodotto con un agente surfattante che disperde le proteine.

LAL test su Medical Devices

Gli oggetti di materiale plastico possono mostrare le stesse interferenze viste nelle sezioni precedenti. Il LAL test viene eseguito sull'acqua utilizzata per il risciacquo dei medical devices e di solito i grandi volumi utilizzati diluiscono le eventuali interferenze.

La preparazione dell'eluato o estratto varia da device a device. Alcuni device possono essere risciacquati, altri immersi mentre altri necessitano il disassemblamento. Norme specifiche, come la USP 27, 2011, Capitolo 161 danno indicazioni sui volumi per il risciacquo. Ad esempio si prende un campione costituito da 10 unità ognuna delle quali va sciacquata con 40 ml di acqua LAL oppure, per device particolarmente piccole o grandi, la superficie che va a contatto col paziente può essere usata per aggiustare il volume di risciacquo o estrazione. La procedura non deve portare a una diluizione maggiore a quella raccomandata nel capitolo USP 85. Per il test delle interferenze vanno testati sia la soluzione usata per il risciacquo/estrazione sia l'eluato/estratto dalla device.

GUIDA ALLA SCELTA (CATALOGO WWW.KAIROSAFE.IT)

REAGENTI LAL E CSE BRAND ACC, PER GEL-CLOT

Codice	Descrizione
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

PROVETTE PER LAL TEST GEL-CLOT E PER DILUIZIONE

Codice	Descrizione
PROVETTE DA TEST	
TBS-1075	Provette LAL in vetro borosilicato 10 x 75 mm apirogene. Per Gel-clot. 50 pz
1958600	Provette LAL in vetro borosilicato 9,75 x 75 mm apirogene. Per LAL 5000 e Gel-clot. 50 pz
1958360	Provette LAL in vetro borosilicato 10 x 75 mm con tappo a vite, apirogene. Per Gel-clot. 50 pz
TSC-1075	Provette LAL in soda vetro 10 x 75 mm apirogene. Per Gel-clot con lisato ACC. 50 pz
PROVETTE DA DILUIZIONE	
1987600	Provette LAL in vetro borosilicato 12 x 75 mm apirogene. Per diluizione. 50 pz
TBS-13100-50	Provette LAL in vetro borosilicato 13 x 100 mm, apirogene. Per diluizione. 50 pz
1958650	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 90 mm con tappo a vite, apirogene. Per diluizione. 70 pz
TBS-16100	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 100 mm, apirogene. Per diluizione. 10 pz
1958800	Provette LAL in vetro borosilicato 16 x 160 mm apirogene. Per diluizione. 10 pz

PIPETTE E PUNTALI PER LAL TEST

Codice	Descrizione
PIPETTE	
1720001	Pipette in vetro borosilicato 1 ml apirogene. 10 pz
1720002	Pipette in vetro borosilicato 2 ml apirogene. 10 pz
1720005	Pipette in vetro borosilicato 5 ml apirogene. 10 pz
1720010	Pipette in vetro borosilicato 10 ml apirogene. 10 pz
PUNTALI	
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)

FLACONI E PROVETTONI PER CAMPIONAMENTO PER LAL TEST

Codice	Descrizione
FLACONI	
FL-125S	Flaconi da campionamento LAL 125 ml PET, apirogeni certificati, conf singola film termoretraibile. 10 pz
FL-125B	Flaconi da campionamento LAL 125 ml PET, apirogeni certificati. 10 pz
PROVETTONI	
6254	Provettoni PS 50 ml, tappo a vite, graduati, sterili, apirogeni. 500 pz (25/bag)
6256	Provettoni PP 50 ml con base self standing, tappo a vite (HDPE), graduati, sterili, apirogeni. 500 pz (25/bag)
6274	Provettoni PS 15 ml, tappo a vite, graduati, sterili, apirogeni. 500 pz (50/rack)
FLACONCINI	
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

ACQUA PER LAL TEST

Codice	Descrizione
WLV-50G	Acqua LAL sterile apirogena in flacone di vetro con tappo a ghiera flip off, 50 ml. 10 flaconi
WLV-100G	Acqua LAL sterile apirogena in flacone di vetro con tappo a ghiera flip off, 100 ml. 10 flaconi
1715054	Acqua LAL sterile apirogena in flacone di vetro con tappo a ghiera, 500 ml. 6 flaconi
1715105	Acqua LAL sterile apirogena in flacone di vetro con tappo a ghiera, 1000 ml. 6 flaconi

SOLUZIONI TAMPONE PER LAL TEST

Codice	Descrizione
1715200 *	Soluzione Tris Buffer 0,05 M pH 7,4 sterile e apirogena, 50 ml. 1 flacone
1715215 *	Soluzione Tris Buffer 0,1 M pH 7,4 sterile e apirogena, 50 ml. 1 flacone
1715250 *	Soluzione Tris Buffer 0,2 M pH 7,4 sterile e apirogena, 5.5 ml. 10 flaconi
1715255 *	Soluzione Tris Buffer 0,2 M pH 7,4 sterile e apirogena, 50 ml. 1 flacone
1712300	Soluzione HCl 0,1 N apirogena. 100 ml
1712310	Soluzione HCl 1 N apirogena. 100 ml
1712200	Soluzione NaOH 0,1 N apirogena. 100 ml
1712210	Soluzione NaOH 1 N apirogena. 100 ml

STRUMENTI PER LAL TEST GEL-CLOT

Codice	Descrizione
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
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
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