



## Lisato degli amebociti del Limulus (LAL) Kinetic-QCL™

# Contenuto

Paragrafo		Pagina n.
1	Uso designato	2
1	Avvertenza	2
1	Spiegazione del test	3
2	Principio	4
2	Reagenti forniti e condizioni di conservazione	5
3	Materiali ed attrezzatura non forniti	6
4	Raccolta e preparazione del campione	8
4	Tipi di analisi Kinetic-QCL™	9
5	Preparazione del reagente	11
6	Procedura del test	14

Paragrafo		Pagina n.
7	Caratteristiche di prestazione	16
7	Calcolo di concentrazione di endotossina	17
8	POWERCURVE™	20
9	Inibizione del prodotto	22
9	Limitazioni e indicazioni	25
9	Campioni colorati	25
10	Curva standard archiviata	26
10	Correlazione con altri metodi	27
10	Nota per i clienti internazionali	27
11	Bibliografia	28

**Importante: leggere l'intera brochure prima di effettuare il test**

## Uso designato

Questo prodotto è designato come test per endotossine *in vitro* sul prodotto finito per farmaci iniettabili per uso umano e veterinario, per i prodotti biologici, e per i dispositivi medici. Questo prodotto non è idoneo per il rilevamento di endotossine in campioni clinici o come aiuto per la diagnosi di malattie dell'uomo. Questo test utilizza una preparazione di lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL), in combinazione con un lettore per micropiastra completo di sistema d'incubazione e di un software dedicato, per rilevare l'endotossina in maniera fotometrica.

La Farmacopea delinea le procedure considerate necessarie per:

1. Stabilire i limiti di endotossine per i dispositivi farmaceutici e medici
2. Validare l'uso del LAL come un test per endotossine sul prodotto finito
3. Sviluppare un protocollo di test di routine<sup>8</sup>

Le procedure qui descritte sono basate sulle linee guida della farmacopea.

## Avvertenza

Solo per uso diagnostico *In Vitro*. Il test Kinetic-QCL™ non è idoneo per rilevare l'endotossemia nell'uomo. Il test LAL può sostituire il test dei pirogeni del coniglio USP quando usato secondo le linee guida della farmacopea per test sul prodotto finito per farmaci iniettabili per uso umano e veterinario, per i prodotti biologici, e per i dispositivi medici<sup>8</sup>.

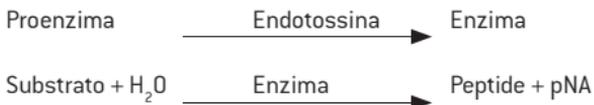
## Spiegazione del test

Kinetic-QCL™ è un test quantitativo, cinetico, per il rilevamento di endotossine batteriche Gram-negative. Un campione viene mescolato con il LAL/substrato reagente, posto in un lettore di micropiastra per incubazione, e monitorato automaticamente nel tempo per la comparsa di colore giallo. Il tempo necessario per la comparsa di colore giallo (tempo di reazione) è inversamente proporzionale alla quantità di endotossina presente. Questo significa che in presenza di una grande quantità di endotossina la reazione avviene rapidamente; in presenza di una quantità di endotossina inferiore, il tempo di reazione aumenta. La concentrazione di endotossina in campioni sconosciuti può essere calcolata da una curva standard.

L'uso del LAL per il rilevamento dell'endotossina è venuto dall'osservazione di Bang<sup>1</sup> che un'infezione Gram-negativa del *Limulus polyphemus*, il granchio a ferro di cavallo, aveva come effetto una coagulazione intravascolare fatale. Levin e Bang<sup>2,3</sup> hanno in seguito dimostrato che questa coagulazione era il risultato di una reazione tra l'endotossina e una proteina coagulabile negli amebociti circolanti del *Limulus*. In seguito allo sviluppo di un anticoagulante adatto per il sangue di *Limulus*, Levin e Bang<sup>4</sup> hanno preparato un lisato da amebociti lavati, che era un indicatore estremamente sensibile della presenza di endotossine. Solum<sup>5,6</sup> e Young, Levin, e Prendergast<sup>7</sup> hanno purificato e caratterizzato la proteina coagulabile del LAL e hanno mostrato che la reazione con l'endotossina è enzimatica.

L'attuale metodo LAL utilizza la parte iniziale della reazione dell'endotossina del LAL per attivare un enzima, che a sua volta rilascia p-nitroanilina (pNA) da un substrato sintetico, producendo un colore giallo.

## Principio



L'endotossina batterica Gram-negativa catalizza l'attivazione di un proenzima nel LAL<sup>7</sup>. La velocità iniziale dell'attivazione è determinata dalla concentrazione di endotossina presente. L'enzima attivato catalizza il rilascio di pNA dal substrato incolore Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. Il pNA libero viene misurato in maniera fotometrica a 405 nm con letture ripetute nel tempo per tutto il periodo di incubazione. La concentrazione di endotossina in un campione viene calcolato dal suo tempo di reazione per confronto con una curva standard.

## Reagenti forniti e condizioni di conservazione

### Reagente Kinetic-QCL™ (K50-643) fiala con etichetta gialla

Ogni fiala contiene una miscela liofilizzata di lisato preparato dagli amebociti circolanti del granchio a ferro di cavallo, *Limulus polyphemus*, e substrato cromogenico.

Ricostituire immediatamente prima dell'uso la fiala di lisato con 2,6 ml di acqua LAL. Se è necessario il contenuto di più di una fiala, raggruppare due o più fiale prima dell'uso e ruotare delicatamente il contenuto per evitare la formazione di schiuma. Capovolgere delicatamente per evitare la formazione di schiuma. Il reagente liofilizzato Kinetic-QCL™ deve essere conservato a 2–8°C. Proteggere dall'esposizione alla luce a lungo termine.

Il reagente Kinetic-QCL™ ricostituito deve essere usato immediatamente. Il reagente Kinetic-QCL™ ricostituito è stabile per 8 ore a 2–8°C o può essere conservato a -10°C o a una temperatura inferiore fino a due settimane. Congelare e scongelare solo una volta.

### *E. coli* endotossina 055:B5 (E50-643) fiala con etichetta rossa

Il volume di ricostituzione della fiala è indicato sul Certificato d'Analisi (CoA) ed è calcolato per ottenere una soluzione finale a 50 EU (o UI)/ml. Ricostituire l'endotossina con il volume di acqua LAL specificato sull'etichetta e lasciare che la fiala raggiunga la temperatura ambiente. Agitare vigorosamente per almeno 15 minuti ad alta velocità su vortex. Prima dell'uso una soluzione madre conservata deve essere riscaldata a temperatura ambiente e agitata vigorosamente sul vortex per 15 minuti. Questo passaggio è molto importante perchè l'endotossina tende ad attaccarsi al vetro. Il CoA è disponibile su [www.lonza.com/coa](http://www.lonza.com/coa) **www.lonza.com/coa**.

L'endotossina liofilizzata *E. coli* 055:B5 deve essere conservata a 2–8°C. L'endotossina madre ricostituita è stabile per quattro settimane a 2–8°C.  
**Nota:** l'endotossina non è inclusa ma è necessaria per i kit con solo lisato.

Questa endotossina viene fornita per comodità dell'utilizzatore. È possibile usare altre preparazioni di endotossina per preparare gli standard; tuttavia, la loro prestazione nel test cromogenico relativo alla endotossina standard di riferimento (RSE) deve essere determinata.

### Acqua per reagenti LAL (W50-640) **fiala con etichetta gialla**

Ogni fiala contiene 30 ml di acqua per reagenti LAL. Questa acqua deve essere usata per reidratare il reagente Kinetic-QCL™ Reagent e l'endotossina *E. coli* e per preparare diluizioni di endotossina e campione. L'acqua per reagenti LAL è equivalente all'acqua per il test delle endotossine batteriche (BET).

L'acqua per reagenti LAL deve essere conservata a 2–8°C.

**Nota:** l'acqua per reagenti LAL non è inclusa ma è necessaria per i kit con solo lisato.

### Materiali ed attrezzatura **NON** forniti

1. Provette di diluizione in vetro senza endotossine usa e getta [13 × 100 mm, #N207 o equivalente].
2. Pipette per sierologia confezionate singolarmente.
3. Pipette automatiche a mano con punte sterili, confezionate singolarmente o in rack.

4. Micropiastre sterili usa e getta.  
**Nota:** prima dell'utilizzo di routine, le micropiastre devono essere pre-qualificate<sup>8</sup> (#25-340 o equivalente).
5. Contenitori per reagenti (#00190035 o equivalente).
6. Pipettatore a otto canali.
7. Idrossido di sodio, 0,1N, o acido cloridrico, 0,1N, disciolti in acqua per reagenti LAL, per la modifica del pH del campione se necessario.
8. Lettore per micropiastre (ELx808™ IU Reader, #25-315 o equivalente).
9. Software WinKQCL™ .
10. Timer.
11. Miscelatore vortex.
12. Per kit senza acqua: acqua per reagenti LAL (#W50-640, #W50-100, #W50-500, o equivalente).
13. Endotossina standard (Endotossina standard di controllo che è stata accoppiata con il LAL).

## Raccolta e preparazione del campione

È necessario usare una tecnica attenta per evitare contaminazione microbica o da endotossina. Tutti i materiali che vengono in contatto con il campione o con i reagenti del test devono essere liberi da endotossine. Oggetti in vetro e materiali puliti possono essere resi liberi da endotossine riscaldandoli a 250°C per 30 minuti. È necessario prendere le precauzioni necessarie per proteggere i materiali depirogenati da contaminazioni ambientali successive.

In base all'esperienza, la maggior parte delle pipette e delle punte di pipette di plastica sterili, confezionate singolarmente, sono libere da endotossine. Tuttavia, è necessario testare questi materiali prima dell'uso regolare.

Può essere necessario modificare il pH del campione per stare nel range 6,0–8,0 usando idrossido di sodio o acido cloridrico liberi da endotossine. Misurare sempre il pH di una quantità del campione globale per evitare la contaminazione da parte dell'elettrodo per il pH. Non modificare soluzioni non tamponate.

I campioni da testare devono essere conservati in un modo tale per cui tutta l'attività batteriologica venga fermata o il livello di endotossina potrebbe crescere nel tempo. Per esempio, conservare i campioni a 2–8°C per meno di 24 ore e oppure congelati per un periodo più lungo di 24 ore. È responsabilità dell'utilizzatore finale validare il contenitore e le condizioni di conservazione appropriate per i suoi campioni.

Se il contenitore del diluente usato per reidratare il reagente Kinetic-QCL™ è stato aperto in precedenza o non è stato fornito da Lonza, il diluente da solo deve essere testato per la contaminazione da endotossine.

## Tipi di analisi Kinetic-QCL™

Il lettore per completo di sistema d'incubazione e il software WinKQCL™ sono parte integrale del test Kinetic-QCL™. È importante prendere confidenza con il funzionamento del lettore e con le funzioni del software WinKQCL™. Fare riferimento ai manuali del lettore per micropiastra incubatrice e del software WinKQCL™ o al supporto per informazioni più dettagliate.

Ci sono quattro (4) tipi base di test Kinetic-QCL™, ognuno dei quali è pensato per effettuare un aspetto differente dell'esame LAL.

### 1. Routine

Un test di routine che calcola la concentrazione de endotossina in composti non noti confrontati con la reazione di una serie di standard di endotossine a concentrazione nota.

Come parte di un test di routine, l'utilizzatore ha l'opzione di includere un controllo positivo di prodotto (PPC) per monitorare eventuali fenomeni d'interferenza (paragrafo 2 sotto test di inibizione/aumento). Un PPC è un campione di prodotto al quale è stata aggiunta una quantità nota di endotossina. Il software WinKQCL™ calcola automaticamente la quantità di endotossina recuperata nel PPC, permettendo un confronto con la quantità nota di endotossina.

### 2. Inibizione/aumento

La reazione LAL è mediata da enzimi e, come tale, ha un range di pH ottimale e requisiti specifici di sale e di cationi bivalenti. Occasionalmente i campioni di test possono alterare queste condizioni ottimali al punto che il lisato sia reso insensibile all'endotossina. Risultati negativi con campioni che inibiscono il test LAL non indicano necessariamente l'assenza di endotossina.

Un test di inibizione/aumento è pensato per determinare quale livello di diluizione del prodotto supera l'inibizione o l'aumento. Ogni diluizione del prodotto deve essere accompagnata da un Controllo di prodotto positivo (PPC). Il software WinKQCL™ calcola automaticamente la quantità di endotossina riscontrata nel PPC per un confronto con la quantità nota di endotossina. In questa maniera si può determinare quali diluizioni di prodotto non interferiscono.

### 3. RSE/CSE

Un test RSE/CSE è pensato per determinare la potenza di una endotossina standard di controllo (CSE) paragonata ad una endotossina standard di riferimento (RSE).

Il test richiede una singola serie di diluizioni RSE e uno o più set di diluizioni del CSE. A seconda delle unità di concentrazione del CSE, il software WinKQCL™ calcola automaticamente i valori di potenza media in termini di EU/ng o EU/ml. L'utente ha anche l'opzione di immettere unità diverse da EU o ng.

#### 4. Qualificazione iniziale

Un test di qualificazione iniziale è pensato secondo i requisiti descritti nella Farmacopea<sup>8</sup>. **Questo test è necessario come parte della validazione del test LAL e deve anche essere effettuato con ogni nuovo lotto di Kinetic-QCL™.**

Il test di qualificazione iniziale effettua una correlazione lineare log/log dei valori di tempo di reazione singoli per ogni replicato di ogni endotossina standard. Gli altri test usano il tempo di reazione medio di tutti i replicati di ogni standard.

Il test di qualificazione iniziale non richiede l'utilizzo di alcun campione.

#### Preparazione del reagente

Permettere ai reagenti di raggiungere la temperatura ambiente prima dell'uso.

Per calcolare le concentrazioni di endotossine in campioni non noti ogni test Kinetic-QCL™ deve essere riferito a una curva standard valida.

A causa dell'ampio range di concentrazione sul quale possono essere determinati i valori dell'endotossina, è possibile modificare il range quantitativo modificando la concentrazione delle endotossine standard usate per generare la curva standard. È necessario un minimo di tre standard.

Il test Kinetic-QCL™ è stato ottimizzato per essere lineare da 0,005 EU/ml a 50,0 EU/ml. Tuttavia il singolo utente può scegliere di troncare la curva standard a seconda di requisiti specifici del prodotto. I dati indicano che troncare una curva standard di un LAL cinetico cromogenico può migliorare l'accuratezza dei valori di endotossina predetta per i campioni del test. Si raccomanda che l'utilizzatore abbia confidenza con i requisiti della Farmacopea per le tecniche di LAL cinetico prima di stabilire un range di curva standard per LAL cinetico cromogenico da usare per test di routine di campioni di prodotto<sup>8</sup>.

La tabella seguente suggerisce uno schema di diluizione per costruire una serie di diluizioni di endotossine fornita nel kit. Non tutte le diluizioni devono essere usate per generare una curva standard. È possibile usare schemi alternativi di diluizione e anche altre endotossine non fornite nel kit. Se l'endotossina non è fornita nel kit, può essere necessario un test RSE/CSE per determinare la potenza CSE.

**Nota:** le provette di plastica non sono raccomandate per effettuare diluizioni di endotossina.

Concentrazione di Endotossina (EU/ml)	Volume d'acqua per reagenti LAL	Volume di Soluzione di Endotossina aggiunta all'acqua per reagenti LAL
5,0	0,9 ml	0,1 ml di 50,0 EU/ml soluzione
0,5	0,9 ml	0,1 ml di 5,0 EU/ml soluzione
0,05	0,9 ml	0,1 ml di 0,5 EU/ml soluzione
0,005	0,9 ml	0,1 ml di 0,05 EU/ml soluzione

1. Preparare una soluzione contenente 0,5 EU/ml di endotossina aggiungendo 0,1 ml dei 50,0 EU/ml di endotossina madre in 0,9 ml di acqua per reagenti LAL in un contenitore adatto e etichettare 5,0 EU/ml. La soluzione deve essere agitata al vortex vigorosamente per almeno 1 minuto prima di procedere.
2. Trasferire 0,1 ml dei 5,0 EU/ml di soluzione di endotossina in 0,9 ml di acqua per reagenti LAL in un contenitore adatto e etichettare 0,5 EU/ml. La soluzione deve essere agitata al vortex vigorosamente per almeno 1 minuto prima di procedere.
3. Trasferire 0,1 ml degli 0,5 EU/ml di soluzione di endotossina in 0,9 ml di acqua per reagenti LAL in un contenitore adatto e etichettare 0,05 EU/ml. La soluzione deve essere agitata al vortex vigorosamente per almeno 1 minuto prima di procedere.
4. Trasferire 0,1 ml degli 0,05 EU/ml di soluzione di endotossina in 0,9 ml di acqua per reagenti LAL in un contenitore adatto e etichettare 0,005 EU/ml. La soluzione deve essere agitata al vortex vigorosamente per almeno 1 minuto prima di procedere.

## Procedura del test

Fare riferimento ai manuali del lettore per micropiastra e del software WinKQCL™ per informazioni più dettagliate sulla programmazione di un test Kinetic-QCL™.

1. Creare un **modello** specifico per il test da eseguire. Un modello contiene il nome dell'analista, il tipo di test, i numeri di lotto dei reagenti, il numero e la concentrazione di endotossina standard, il numero di replicati, e come GLI standard ed campioni saranno disposti nella micropiastra.
2. Il **tipo di saggio** deve essere selezionato come **Kinetic-QCL**. I parametri di modello di default che seguono non devono essere modificati senza precedente qualificazione:

Delta t (secondi)	150
Filtro di misura (nm)	405
Delta mOD	200
Numero di letture	40

3. Stampare il protocollo impostato ed utilizzarlo come guida nel preparare la micropiastra.
4. "Avviare" il test, seguendo le istruzioni del software WinKQCL™.

5. Dispensare con attenzione 100 µl di acqua per reagenti LAL, endotossina standard, campioni di prodotto, controlli positivi di prodotti (vedere pagine 22-24 per le istruzioni del prodotto di controllo positivo), ecc., nel pozzetti della micropiastra.
6. Sistemare la piastra nel lettore per micropiastra e chiudere lo sportello.
7. Preincubare la piastra  $\geq 10$  minuti a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
8. Verso la fine del periodo di pre-incubazione ricostituire ognuna delle fiale Kinetic-QCL™ con 2,6 ml di acqua per reagenti LAL per fiala. Mescolare con delicatezza ma a fondo.  
**Nota:** Non passare il lisato al vortex.
9. Raccogliere i reagenti in un contenitore per reagenti e mescolare agitando con delicatezza il contenitore da lato a lato.
10. Usando un pipettatore a otto canali dispensare 100 µl del reagente Kinetic-QCL™ nei pozzetti della micropiastra iniziando dalla prima colonna (A1-H1) e procedendo in sequenza fino all'ultima colonna usata. Aggiungere il reagente il più velocemente possibile.  
**Nota:** evitare di causare bolle!
11. Fare clic immediatamente sul pulsante OK nel software WinKQCL™ per iniziare il test.  
**Nota:** il test Kinetic-QCL™ viene effettuato con il coperchio della micropiastra rimosso.

## Caratteristiche di prestazione

### Linearità

La linearità della curva standard calcolata all'interno del range di concentrazione utilizzato deve essere verificata. Non meno di tre endotossine standard, ampliando il range di concentrazione desiderato, e un campione non usato di acqua per reagenti LAL devono **essere testati** almeno in triplicato secondo i parametri di un test di qualificazione iniziale. Standard aggiuntivi devono essere inclusi per abbracciare ogni intervallo di log sopra il range della curva standard.

Il valore assoluto del coefficiente di correlazione ( $r$ ) della curva standard calcolata deve essere  $\geq 0,980$ .

### Riproducibilità

Campioni replicati devono essere analizzati per stabilire una buona tecnica e un basso coefficiente di variazione. Il coefficiente di variazione (C.V.) è la deviazione standard "campione" dei tempi di reazione divisi per la media e si esprime solitamente come percentuale. Il C.V.% dei tempi di reazione per i replicati deve essere inferiore al 10%. Con l'esperienza si dovrebbero ottenere valori attorno al 3–4%.

## Calcolo di concentrazione di endotossina

Durante il test, il lettore di micropietra/il software WinKQCL™ monitora l'assorbanza a 405 nm di ogni pozzetto della micropietra. Usando la lettura iniziale dell'assorbanza di ogni pozzetto e quella di base, il lettore determina il tempo necessario perché l'assorbanza possa aumentare di 0,200 unità di assorbanza. Il tempo è chiamato **tempo di reazione**. Il software WinKQCL™ effettua automaticamente una correlazione lineare log/log del **tempo di reazione** di ogni standard con la sua concentrazione di endotossina corrispondente. I parametri della curva standard sono indicati sulla stampa di report. Se il valore assoluto del coefficiente di correlazione ( $r$ ) è  $\geq 0,980$ , si può usare un modello polinomiale per costruire una curva standard e a sua volta per predire le concentrazioni di endotossina dei campioni del test. Il modello polinomiale di adattamento della curva (POWERCURVE™) è una funzione importante del software WinKQCL™ (vedere POWERCURVE™, pagina 20).

### Regressione lineare

Le informazioni fornite sotto sono un esempio di come il software WinKQCL™ effettua la correlazione lineare log/log e calcola le concentrazioni di endotossine in campioni non noti. Non è necessario effettuare separatamente questi calcoli. Per ogni campione di ogni prodotto, il software WinKQCL™ calcola la concentrazione di endotossina corrispondente dal tempo di reazione per quel campione. Il software modifica automaticamente il valore del risultato del **test finale** per tenere conto di ogni diluizione del prodotto.

## Correlazione lineare

### Calcoli di esempio

Standard	Concentrazione	Tempo medio di reazione (Sec)	Log Concentrazione	Log Tempo medio di reazione
Neg. Controllo	—	Non reattivo	—	—
S1	0,005 EU/ml	4351	-2,30103000	3,63858908
S2	0,05 EU/ml	2496	-1,30103000	3,39724458
S3	0,5 EU/ml	1406	-0,30103000	3,14798532
S4	5,0 EU/ml	895	0,69897000	2,95182304
S5	50,0 EU/ml	561	1,69897000	2,74896286
Campioni				
1	—	1576	—	3,19755621
2	—	943	—	2,97451169

$$\text{Pendenza} = \left( \frac{S_y}{S_x} \right) r$$

$$\text{intercetta } Y = \sum y / N - (\sum x / N \times \text{pendenza})$$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N(N-1)S_x S_y}$$

$$\text{Concentrazione di endotossina} = \text{antilog} \left[ \frac{\log \text{ tempo medio di reazione} - Y \text{ int.}}{\text{pendenza}} \right]$$

$x = \log_{10}$  concentrazione di endotossina in EU/ml.

$y = \log_{10}$  Tempo medio di reazione.

$N =$  Numero di standard usati.

$\sum x =$  Sommatoria di  $\log_{10}$  concentrazione di standard usata in EU/ml.

$\sum y =$  Sommatoria di  $\log_{10}$  Tempo di reazione.

$\sum xy =$  Sommatoria di  $\log_{10}$  tempi concentrazioni standard  $\log_{10}$  Tempo medio di reazione.

$$S_x = \text{Deviazione standard di } x = \sqrt{\frac{N\sum x^2 - (\sum x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{Deviazione standard di } y = \sqrt{\frac{N\sum y^2 - (\sum y)^2}{N(N-1)}}$$

**Calcoli usando dati di esempio:**

$$N = 5$$

$$\begin{aligned} \sum x &= -1,50514998 = \{-2,30103000 - 1,30103000 - 0,30103000 \\ &\quad + 0,69897000 + 1,69897000\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum y &= 15,88460488 = \{3,63858908 + 3,39724458 + 3,14798532 \\ &\quad + 2,95182304 + 2,74896286\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum xy &= -7,00641653 = \{-2,30103000 \times 3,63858908\} + \{-1,30103000 \times 3,39724458\} \\ &\quad + \{-0,30103000 \times 3,14798532\} \\ &\quad + \{0,69897000 \times 2,95182304\} \\ &\quad + \{1,69897000 \times 2,74896286\} \end{aligned}$$

$$S_x = 1,58113883$$

$$S_y = 0,35225503$$

$$r = \frac{5(-7,00641653) - (-1,50514998)(15,88460488)}{5(5-1)(1,58113883)(0,35225503)} = -0,99857152$$

$$\text{Pendenza} = \frac{0,35225503}{1,58113883} \times -0,99857152 = -0,22246740$$

$$\begin{aligned} \text{Intercetta } Y &= \frac{15,88460488}{5} - \left[ \frac{-1,50514998}{5} \times (-0,22246740) \right] \\ &= 3,17692098 - [(-0,30103000) \times (-0,22246740)] = 3,10995162 \end{aligned}$$

**Campione 1**

Conc. endotossina

$$\text{EU/ml} = \text{antilog} \left[ \frac{3,19755621 - 3,10995162}{-0,22246740} \right]$$

$$= \text{antilog} \{-0,39378622\}$$

$$= 0,404 \text{ EU/ml}$$

**Campione 2**

Conc. endotossina

$$\text{EU/ml} = \text{antilog} \left[ \frac{2,97451169 - 3,10995162}{-0,22246740} \right]$$

$$= \text{antilog} \{0,60880796\}$$

$$= 4,063 \text{ EU/ml}$$

## POWERCURVE™

Se il valore assoluto del coefficiente di correlazione ( $r$ ) è  $\geq 0,980$ , si può usare un modello polinomiale per costruire una curva standard e per predire le concentrazioni di endotossina dei campioni del test. Si è determinato che questo modello polinomiale (POWERCURVE™) migliora l'accuratezza della predizione delle concentrazioni di endotossina su tutta la gamma di endotossina (5-log). L'uso del modello POWERCURVE™ richiede l'uso del software WinKQCL™.

Quando si usa POWERCURVE™, viene generata una curva standard usando i valori del tempo di reazione  $\log_{10}$  e la loro corrispondente concentrazione di endotossina  $\log_{10}$  per definire un'equazione polinomiale. L'ordine dell'equazione polinomiale usata per generare la curva di regressione è determinato dal numero di endotossine standard nel test. L'ordine del polinomio sarà sempre inferiore di uno al numero delle endotossine standard, con un massimo di un quarto ordine polinomiale per test con cinque o più endotossine standard e un minimo di un secondo ordine polinomiale per test con tre standard.

Si arriva presto alla soluzione di queste equazioni polinomiali usando il software WinKQCL™ POWERCURVE™. Le informazioni fornite sotto sono un esempio della soluzione di un'equazione polinomiale usando lo stesso set di dati dell'esempio della correlazione lineare a pagina 18.

#### Modello (POWERCURVE™) polinomiale

---

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$$

---

$$A = 3,0837355$$

---

$$B = -0,2043195$$

---

$$C = 0,0289368$$

---

$$D = -0,0059597$$

---

$$E = -0,0050336$$

---

I parametri della curva standard sono indicati sulla stampa di report. Il software WinKQCL™ POWERCURVE™ usa questi parametri per calcolare la concentrazione di endotossina corrispondente dal tempo di reazione per quel campione. Il software modifica automaticamente il valore del risultato del **test finale** per tenere conto di ogni diluizione del prodotto.

È importante notare che il modello polinomiale POWERCURVE™ **NON PUÒ** essere usato per test di **qualificazione iniziali**. In quei casi è necessario comunque usare la regressione lineare. Inoltre il modello polinomiale POWERCURVE™ è stato valutato solo per i reagenti Kinetic-QCL™ e PYROGENT™-5000 forniti da Lonza.

## Inibizione del prodotto

Si verifica l'inibizione del prodotto quando sostanze nel campione del test interferiscono con la reazione LAL. Nel test Kinetic-QCL™, questa inibizione ha come effetto un tempo di reazione più lungo, che indica livelli di endotossina inferiori a quelli che potrebbero essere realmente presenti nel campione del test. La mancanza di inibizione del prodotto deve essere determinata per ogni singolo specifico campione, non diluito o a una diluizione appropriata.

Per verificare la mancanza di inibizione del prodotto, a una parte di campione del test (o una diluizione del campione del test) viene aggiunta una quantità nota di endotossina.

Si raccomanda che il risultato dell'aggiunta di endotossina sia di una concentrazione finale di endotossina nel campione pari a 0,5 EU/ml. Per i campioni che possono contenere un livello di endotossina di background >1 EU/ml, l'aggiunta di endotossina deve avere come risultato una concentrazione finale di endotossina di 5,0 EU/ml.

In un test di inibizione/aumento, la soluzione con aggiunta (PPC) viene testata con il campione senza aggiunta, e le loro rispettive concentrazioni di endotossina, e l'endotossina rilevata nel campione con aggiunta sono calcolate automaticamente. L'endotossina rilevata deve essere uguale alla concentrazione nota dell'aggiunta entro un range del 50 – 200%<sup>8</sup>.

Una quantità di campione del test (o una diluizione) può essere preparata come in uno dei seguenti esempi:

### **Metodo della provetta**

Trasferire 50 µl della soluzione da 50,0 EU/ml in 4,95 ml di campione del test (o di diluizione). Questa soluzione contiene una concentrazione di endotossina di 0,5 EU/ml nel campione del test (o nella diluizione). Questo campione deve essere agitato vigorosamente al vortex per un minuto prima dell'uso.

Trasferire 100 µl di questa soluzione nella piastra a 96 pozzetti come indicato dal modello del test.

### **Metodo della piastra n. 1**

Trasferire 10 µl della soluzione a 5,0 EU/ml in ognuno dei pozzetti PPC nella piastra a 96 pozzetti, come indicato dal modello del test. Aggiungere a questi pozzetti 0,1 ml di campione del test (o diluizione). Ogni pozzetto ora contiene una soluzione di 0,5 EU/ml. Mescolare delicatamente battendo sul lato della piastra.

## Metodo della piastra n. 2

Posizionare 0,1 ml di campione del test (o diluizione) nei pozzetti PPC nella piastra a 96 pozzetti, come indicato dal modello del test. A questi pozzetti aggiungere 10 µl della soluzione a 5,0 EU/ml. Ogni pozzetto ora contiene una soluzione di 0,5 EU/ml. Mescolare delicatamente battendo sul lato della piastra.

Se si scopre che il campione del test (o la diluizione) sono inibitori per la reazione Kinetic-QCL™, il campione può necessitare di ulteriore diluizione fino a quando l'inibizione viene superata.

### Esempio: determinazione di una diluizione non inibitoria

Diluizione di campione	Endotossina rilevata
1/10	0,125 Inibitoria
1/20	0,212 Inibitoria
1/40	0,550 non inibitoria

Inizialmente si vorrà valutare l'inibizione del prodotto testando diluizioni di 10 volte del campione del test. Una volta che si è determinata la diluizione non inibitoria approssimativa, la diluizione esatta si può trovare testando diluizioni di due volte attorno a questa diluizione.

## Limitazioni e indicazioni

Il grado di inibizione o aumento sarà dipendente dalla concentrazione del prodotto. Se è necessario testare parecchie concentrazioni dello stesso prodotto, bisogna stabilire le caratteristiche di prestazione per ognuna indipendentemente.

Si possono trovare schemi di inibizione o aumento differenti da quelli visti con il test di gelificazione tradizionale LAL.

Può essere necessario modificare il pH del campione per stare nel range 6,0–8,0 usando idrossido di sodio o acido cloridrico liberi da endotossine per superare l'inibizione.

## Campioni colorati

Dal momento che la lettura iniziale dell'assorbanza di ogni pozzetto è usata a vuoto, campioni con colori significativi di per sé non costituiscono un problema particolare. Se il colore di background è  $\geq 1,5$  unità di assorbanza, il campione deve essere diluito e ritestato.

## Curva standard archiviata

Il software WinKQCL™ può essere avviato usando una curva standard archiviata. Ammesso che i numeri di lotto del reagente attuale per il reagente Kinetic-QCL™, l'acqua per reagenti LAL, e l'endotossina, come anche i parametri del lettore per micropiastra siano gli stessi usati per generare la curva standard archiviata valida, la curva standard archiviata può essere usata invece di posizionare nuove endotossine standard sulla piastra a 96 pozzetti.

Se si usa una curva standard archiviata, si deve testare un solo controllo standard contenente una concentrazione di endotossina uguale al punto medio, su base log, tra la concentrazione di endotossina delle endotossine standard più alta e più bassa nella curva standard archiviata. La concentrazione di endotossina predetta deve essere all'interno del range  $\pm 25\%$  del suo valore noto.

Per esempio in un test con una curva standard che spazia da 50,0 a 0,005 EU/ml, bisogna testare un controllo standard uguale a 0,5 EU/ml.

log 50,0	=	1,6990
log 0,005	=	-2,3010
<hr/>		
log medio	=	-0,3010
antilog -0,3010	=	0,5

In un test con una curva standard che spazia da 1,0 a 0,01 EU/ml, bisogna testare un controllo standard uguale a 0,1 EU/ml.

log 1,0	=	0,0000
log 0,01	=	-2,0000
<hr/>		
log medio	=	-1,0000
antilog -1,0000	=	0,1

## Correlazione con altri metodi

La FDA regola l'uso ufficiale del test LAL negli Stati Uniti. La potenza delle diverse preparazioni di endotossina varia nel test con gel tradizionale e nel metodo cromogenico. L'endotossina standard fornita in questo kit è stata confrontata con la Reference Standard Endotoxin (RSE) usando il test Kinetic-QCL™ Assay, e la potenza è di 50,0 EU/ml quando ricostituita usando il volume specificato sul certificato di analisi specifico per il lotto. La curva di calibrazione diluita da questo standard occuperà un range da 0,005 a 50,0 unità di endotossina/ml relativamente alla RSE. Bisogna tuttavia ricordare che il test con gel tradizionale è standardizzato da diluizioni di due volte, cosicché le variazioni appariranno abbastanza grandi rispetto a quelle del test Kinetic-QCL™ dove la standardizzazione è continua e le variazioni sono minime.

## Nota per i clienti internazionali

Altre agenzie di regolamentazione possono adottare diversi standard di prestazione che dovranno essere soddisfatti per essere in regola con le loro leggi.

## Bibliografia

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98:325 [1956].
2. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265 [1964].
3. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 115:337 [1964].
4. Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19:186 [1968].
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 23:170 [1970].
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* 2:55 [1973].
7. Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* 51:1790 [1972].
8. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. *United States Pharmacopeia* [USP].
9. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. *European Pharmacopoeia* [EP].
10. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. *Japanese Pharmacopoeia* [JP].
11. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers* [June 2012].

## Note

## Informazioni di contatto

### America del nord

Assistenza clienti: +1 800 638 8174 (numero gratuito)  
[order.us@lonza.com](mailto:order.us@lonza.com)  
Scientific Support: +1 800 521 0390 (numero gratuito)  
[scientific.support@lonza.com](mailto:scientific.support@lonza.com)

### Europa

Assistenza clienti: +32 87 321 611  
[order.europe@lonza.com](mailto:order.europe@lonza.com)  
Scientific Support: +32 87 321 611  
[scientific.support.eu@lonza.com](mailto:scientific.support.eu@lonza.com)

### Internazionale

Contattare il proprio distributore Lonza locale  
Assistenza clienti: +1 301 898 7025  
Fax: +1 301 845 8291  
[scientific.support@lonza.com](mailto:scientific.support@lonza.com)

### Uffici internazionali

Australia	+61 3 9550 0883
Belgio	+32 87 321 611
Brasile	+55 11 2069 8800
Francia	0800 91 19 81 (numero gratuito)
Germania	0800 182 52 87 (numero gratuito)
India	+91 40 4342 4000
Giappone	+81 3 6264 0660
Lussemburgo	+32 87 321 611
Singapore	+65 6521 4379
Paesi Bassi	0800 022 4525 (numero gratuito)
Regno Unito	0800 234 97 88 (numero gratuito)

---

Lonza Walkersville, Inc. – Walkersville, MD 21793

ELx808™ è un marchio registrato di  
BioTek Instruments, Inc.

Se non diversamente indicato, tutti i marchi registrati qui citati sono marchi di Lonza Group Ltd o delle sue affiliate. Le informazioni qui contenute sono quelle ritenute corrette e corrispondono alla più recente conoscenza scientifica e tecnologica. Tuttavia non si dà nessuna garanzia, esplicita o implicita, rispetto all'accuratezza delle stesse o ai risultati che si ottengono dall'uso di tali informazioni e nessuna garanzia è espressa o implicita rispetto all'uso di questi prodotti. L'acquirente si assume tutti i rischi dell'uso e/o della messa in opera. Ogni utilizzatore deve prendere la sua decisione e essere sicuro che i prodotti forniti da Lonza Group Ltd o dalle sue affiliate e le informazioni e le raccomandazioni date da Lonza Group o dalle sue affiliate (i) siano adatti per il processo o lo scopo inteso, (ii) soddisfino le leggi ambientali, della salute e della sicurezza, e (iii) non infrangano i diritti di proprietà intellettuale di alcuna terza parte.

© 2015 Lonza  
Tutti i diritti riservati.  
P50-650U-14-IT 12/15

RT-MN008-IT

---