

# Rekombinantes LAL-Reagenz

## PyroSmart NextGen®

### Gebrauchsanweisung



ASSOCIATES OF  
**CAPE COD**  
INCORPORATED  
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Telefon: (508) 540-3444  
Gebührenfrei: (888) 395-2221  
Fax: (508) 540-8680  
Technischer Kundendienst: (800) 848-3248  
Kundendienst: (800) 525-8378

PN002641-de rev4

Juni 2024

### PyroSmart NextGen®

Rekombinantes kinetisches chromogenes Reagenz zum Nachweis und zur Quantifizierung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden)

### VERWENDUNGSZWECK

Der PyroSmart NextGen® rekombinante Assay kann als alternativer Test zur arzneibuchkonformen Endproduktprüfung von injizierbaren Humanarzneimitteln (einschließlich biologischer Produkte), injizierbaren Tierarzneimitteln und Medizinprodukten eingesetzt werden (1,2,3). Leitlinien zur Validierung von alternativen Testmethoden sind in USP <1223> und <1225> (4,5) zu finden. Für derartige Methoden muss die Gleichwertigkeit bzw. Überlegenheit gegenüber Arzneibuchmethoden nachgewiesen werden. Dieser Assay kann darüber hinaus für die Quantifizierung von Endotoxinen in Substanzen, die nicht durch das Arzneibuch reguliert sind (z. B. Rohstoffe einschließlich Wasser sowie für Inprozesskontrollen) ohne Methodenvalidierung verwendet werden.

Der PyroSmart NextGen® rekombinante Assay ist nicht für den Nachweis von Endotoxinen in klinischen Proben zur Diagnose von Humanerkrankungen wie z. B. Endotoxämie beim Menschen bestimmt.

### TESTPRINZIP

Das PyroSmart NextGen® Reagenz besteht aus drei rekombinanten Proteinen: Faktor C, Faktor B und Proclotting Enzyme. In Gegenwart von Endotoxin wird der rekombinante Faktor C aktiviert. Diese aktivierte Form führt wiederum zur Aktivierung des rekombinanten Faktors B und des rekombinanten Proclotting Enzyms. Dies führt letztlich zur proteolytischen Abspaltung eines im PyroSmart NextGen® formulierten farblosen chromogenen Substrats. Die Spaltung des Substrats setzt Para-Nitroanilin (pNA) frei, das gelb ist und bei 405 nm absorbiert (Abbildung 1). Die Änderung der Absorption wird über eine geeignete Laufzeit kontinuierlich in regelmäßigen Abständen bei 37 ± 1 °C gemessen. Je größer die Endotoxinkonzentration ist, desto schneller wird pNA freigesetzt, was zu einer schnelleren Änderung der Absorption führt.

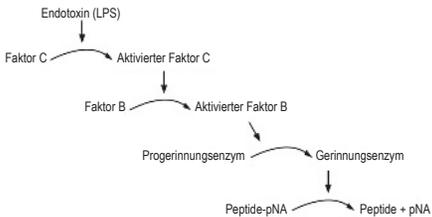


Abbildung 1: Der Mechanismus der Kaskade verläuft von dem durch Endotoxin aktivierten Faktor C bis hin zur Freisetzung von pNA und der damit verbundenen Absorptionssteigerung

Tabelle 1: Mit PyroSmart NextGen® gelieferte Materialien  
HINWEIS: Auch als Großpackung erhältlich.

Komponente	Anzahl der Fläschchen	Hinweise
PyroSmart NextGen® Reagenz	2	Jedes Fläschchen mit 2,8 ml Rekonstitutionspuffer rekonstituieren.
PyroSmart NextGen® Rekonstitutionspuffer	2	

### SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Die Toxizität von PyroSmart NextGen® wurde bislang nicht ermittelt. Beim Umgang mit PyroSmart NextGen® ist daher Vorsicht geboten.

### AUFBEWAHRUNGSBEDINGUNGEN

Das Verfallsdatum ist auf dem Fläschchen und auf der Außenverpackung angegeben.

Tabelle 2: Lagerungsbedingungen für PyroSmart NextGen®

<b>Lyophilisiertes Reagenz</b>	Bei 2–8 °C lagern. Vor Gebrauch für mindestens 30 min auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.
<b>Rekonstitutionspuffer</b>	Bei 2–8 °C lagern. Vor Gebrauch für mindestens 30 min auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.
<b>Rekonstitutionspuffer</b>	Raumtemperatur Sollte innerhalb von 3 bis 20 Minuten nach der Rekonstitution verwendet werden

### 1. PYROSART NEXTGEN® TESTDURCHFÜHRUNG IN EINEM MICROPLATE READER MIT ABSORPTIONSFUNKTION

#### ASSAYBEDINGUNGEN

Die Endotoxinkonzentration lässt sich in zwei verschiedenen Verfahren mit PyroSmart NextGen® quantifizieren:

- Onset Time Assay:** Hierbei wird die Zeit bis zum Erreichen einer Schwellenwert-OD (die sogenannte Onset Time) ermittelt. Eine höhere Endotoxinkonzentration bewirkt eine kürzere Onset Time. Die Standardkurve wird erstellt, indem die logarithmische Onset Time (Y-Achse) gegen die logarithmische Standardkonzentration (X-Achse) aufgetragen wird. Sie dient zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben.
- Raten-Assay:** Hierbei wird die mittlere Rate (Vmean: mAbs/min) über den Verlauf des Tests berechnet. Eine höhere Endotoxinkonzentration bewirkt einen höheren Vmean-Wert. Die Standardkurve wird erstellt, indem Vmean (Y-Achse) gegen die Standardkonzentration (X-Achse) aufgetragen wird. Sie dient zur Ermittlung der Endotoxinkonzentration in den Proben.

Die Softwareeinstellungen für beide Assays sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Softwareeinstellungen für PyroSmart NextGen® Assays in einem Microplate-Reader

	Onset Time-Assay	Raten-Assay
<b>Schütteln</b>	10 Sek.	10 Sek.
<b>Ablesen</b>	Kinetisch, Absorption	Kinetisch, Absorption
<b>Wellenlänge</b>	405 nm	405/490 nm*
<b>Ablesintervall</b>	30 Sek.**	30 Sek.**
<b>Laufzeit</b>	60 min	30 min
<b>Datentransformation</b>	Onset-OD = 0,03 oder Schwellenwert- mOD = 30	Pyros® eXpress: Vmean Gen5®; Mean V, SoftMax® Pro; Vmax

\*Oder 405/492 nm, je nach Ausstattung des Plate-Readers

\*\*Je nach Plate-Reader kann das Intervall variieren

### MATERIALIEN UND GERÄTE

Die mit PyroSmart NextGen® gelieferten Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zusätzliche erforderliche, jedoch NICHT mit PyroSmart NextGen® gelieferte Materialien und Geräte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Erforderliche, jedoch NICHT mit PyroSmart NextGen® gelieferte Materialien und Geräte für Assays im Microplate-Reader

Gerätetyp	Spezifikation	Beschreibung/Bestellnr.
<b>Microplate-Reader mit Inkubatorfunktion</b>	Fähigkeit zur Einhaltung einer Temperatur von 37 °C während der Erfassung der Absorptionsmesswerte	z. B. BioTek® ELx808™, Photometer von Molecular Devices oder gleichwertig
<b>Plate-Reader-Software</b>	Möglichkeit der Datentransformation nach Onset Time oder Rate	z. B. Pyros® eXpress oder Gen5™ für ELx808™, Softmax® Pro für Photometer von Molecular Devices oder gleichwertig
<b>Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE)++</b>	10 ng/Fläschchen, kalibriert gegen RSE mit PyroSmart NextGen®	z. B. ACC EC010-5 oder gleichwertig

<b>LAL-Reagenzwasser (LRW)</b>	Frei von störenden Endotoxinen	z. B. ACC WP050C oder gleichwertig
<b>96-Well-Mikrotiterplatten</b>	Unbeschichtete, unbehandelte Mikrotiterplatten mit Abdeckung, frei von störenden Endotoxinen	z. B. ACC CA961-10 oder gleichwertig
<b>Entpyrogenisierte Verdünnungsröhrchen aus Glas</b>	Frei von störenden Endotoxinen	z. B. ACC TB240-5, TB013-5, TB16C oder gleichwertig
<b>Ein Satz einstellbarer Einkanal-Mikropipetten</b>	Mögliche Abgabevolumina von 5–20 µl, 20–100 µl und 100–1000 µl	Traditionelle Modelle von Gilson, Rainin oder Eppendorf, passend zu den nachstehenden Spitzen, oder gleichwertig
<b>Pipettenspitzen</b>	Frei von störenden Endotoxinen. Mögliche Abgabevolumina von: 5–20 µl, 20–100 µl und 100–1000 µl	z. B. ACC PPT25, PPT10 oder gleichwertig
<b>Repetierpipette mit kompatiblen Spritzenzylindern</b>	Automatische Abgabe von Aliquots	z. B. Eppendorf Xstream® Repetierpipette mit BioPur® Combitips 2,5 ml oder gleichwertig
<b>Vortex-Mixer</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Stoppuhr</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Parafilm M®</b>	Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist typischerweise frei von nachweisbaren Endotoxinen.	American National Can™
<b>Röhrchenständer</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Geneigter Plattenständer</b>	Beliebig	Beliebig

+Hinweis: Nicht alle Produkte sind weltweit erhältlich. Wenden Sie sich an den lokalen Lieferanten.

++Hinweis: Analysezertifikat und die darin angegebene Aktivität sind spezifisch für eine Kombination einer PyroSmart NextGen®- und einer KSE-Charge. Dieselbe KSE-Charge ergibt in Tests mit verschiedenen Chargen von PyroSmart NextGen® möglicherweise unterschiedliche Aktivitäten (EU/ng). Entsprechend ergeben verschiedene KSE-Chargen in Tests mit derselben Charge von PyroSmart NextGen® wahrscheinlich unterschiedliche Aktivitäten.

### KONTROLLEN

**Negativkontrolle:** LAL-Reagenzwasser (LRW) dient als Negativkontrolle. **Standardkurve:** Eine Standardkurvenreihe als geometrische Folge sollte den erforderlichen Bereich der Endotoxinkonzentrationen umfassen. Beispiele siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Beispiele für Standardkurvenbereiche und Einstellungen für beide Assays

KSE- (bzw. RSE-) Konzentration in EU/ml	Onset Time-Assay	
	LRW-Volumen	KSE- (bzw. RSE-) Lösung in EU/ml
<b>50</b>	-	-
<b>5</b>	900 µl	100 µl von 50 EU/ml
<b>0,5</b>	900 µl	100 µl von 5 EU/ml
<b>0,05</b>	900 µl	100 µl von 0,5 EU/ml
<b>0,005</b>	900 µl	100 µl von 0,05 EU/ml
KSE- (bzw. RSE-) Konzentration in EU/ml	Raten-Assay	
	LRW-Volumen	KSE- (bzw. RSE-) Lösung in EU/ml
<b>0,1</b>	1960 µl	40 µl von 5 EU/ml
<b>0,05</b>	500 µl	500 µl von 0,1 EU/ml
<b>0,025</b>	500 µl	500 µl von 0,05 EU/ml
<b>0,0125</b>	500 µl	500 µl von 0,025 EU/ml
<b>0,00625</b>	500 µl	500 µl von 0,0125 EU/ml

**Positive Produktkontrollen (PPKs):** PPKs sind Eignungskontrollen (Hemmung/Verstärkung) und bestehen aus einer Probe (bzw. einer Verdünnung der Probe) mit Zusatz von Standardendotoxin. Die zugegebene Endotoxinkonzentration sollte dem mittleren Bereich der Standardkurve entsprechen. Für einen Standardkurvenbereich von

beispielsweise 50 bis 0,005 EU/ml werden 50 µl der Probe mit 5 µl von 5 EU/ml versetzt, um eine Endkonzentration von 0,5 EU/ml zu erreichen. Für einen Standardkurvenbereich von 0,1 bis 0,00625 EU/ml werden 50 µl der Probe mit 5 µl von 0,5 EU/ml versetzt, um eine Endkonzentration von 0,05 EU/ml zu erreichen.

### TESTVERFAHREN

- Den Plate-Reader einschalten, um es auf 37 °C äquilibrieren zu lassen.
- Die Software mit geeigneten Einstellungen einrichten (siehe Tabelle 3).
- Die geeigneten Kontrollen und Proben vorbereiten.
- Den Testlauf gemäß Abbildung 2 vorbereiten. Der Testaufbau wird nachstehend ausführlicher beschrieben.
- Den Test ablesen.

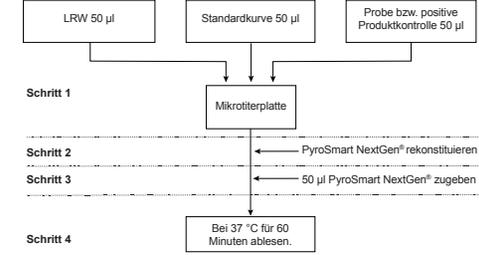


Abbildung 2: Ein Schema des Testverfahrens für Assays im Microplate-Reader

#### SCHRITT 1: Testprobe überführen

50 µl Testprobe (Negativkontrolle x2, Endotoxin-Standardreihe x2, Probenverdünnungen x2 und PPK für jede Probenverdünnung x2) in die entsprechenden, wie im Software-Plattenlayout definierten Wells der Mikrotiterplatte überführen.

#### SCHRITT 2: PyroSmart NextGen® rekombinantes LAL-Reagenz rekonstituieren

Sowohl das Reagenz als auch den Rekonstitutionspuffer auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen. Leicht gegen das Reagenzfläschchen klopfen, damit loses Material zum Boden fällt. Durch aseptisches Anheben des Stopfens das Vakuum brechen. Den Stopfen verwerfen. 2,8 ml PyroSmart NextGen®-Rekonstitutionspuffer in das Reagenzfläschchen überführen und mit Parafilm abdecken. Das Fläschchen in der ersten Minute vorsichtig schwenken, dann die nächsten 2 Minuten stehen lassen (Rekonstitutionszeit vor Gebrauch von insgesamt 3 Minuten). Vor Gebrauch nicht erneut mischen, um eine übermäßige Schaumbildung und einen Verlust der Sensitivität zu vermeiden. Bei übermäßigem Mischen 10 Minuten stehen lassen oder mit einer manuellen Pipette dispensieren, um eine Blasenbildung zu vermeiden. Das Reagenz muss innerhalb von 20 min nach der Rekonstitution verwendet werden.

#### SCHRITT 3: PyroSmart NextGen® in die Mikrotiterplatte pipettieren

Die Plattenabdeckung abnehmen. Einen sterilen Combitip mit dem rekonstituierten Reagenz füllen und die Abgabe von 50 µl Aliquots einstellen, ein Aliquot nach dem anderen. Kreuzkontamination vermeiden, indem die Pipette in einem Winkel unter 45 Grad gehalten und das Reagenz an die Wand der Kavität dispensiert wird. Bei einer elektronischen Pipette wird eine Dosiergeschwindigkeit von 5 oder weniger empfohlen, um eine Blasenbildung zu vermeiden. Die Zugabe erfolgt zuerst zu den Negativkontrollen, anschließend zu den Standards von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration und zum Schluss zu allen Proben. Hierbei so rasch wie möglich vorgehen (maximal 30 Sekunden). Die Plattenabdeckung wieder aufsetzen.

#### SCHRITT 4: Den Test ablesen.

Die Mikrotiterplatte in einen Plate-Reader stellen. Die Plattenabdeckung abnehmen und den Plate-Reader schließen. Den Test starten.

### 2. PYROSART NEXTGEN® IN PYROS® KINETIX FLEX TUBE-READER DURCHFÜHREN

#### ASSAYBEDINGUNGEN

PyroSmart NextGen® kann zur Quantifizierung der Endotoxinkonzentration als **Onset Time-Assay** verwendet werden: Hierbei wird die Zeit bis zum Erreichen einer Schwellenwert-OD (die sogenannte Onset Time) ermittelt. Eine höhere Endotoxinkonzentration bewirkt eine kürzere Onset Time. Die Standardkurve wird erstellt, indem

die logarithmische Onset Time (Y-Achse) gegen die logarithmische Standardkonzentration (X-Achse) aufgetragen wird. Sie dient zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben.

Die Einstellungen für die Software des Tube-Readers sind je nach verwendetem Softwaretyp in Tabelle 6 oder Abbildung 3 beschrieben.

Tabelle 6: Pyros® EQS Softwareeinstellungen für PyroSmart NextGen® Assays

	Allgemeine Einstellungen
<b>Ablesen</b>	Kinetisch, Absorption
<b>Wellenlänge</b>	405 nm
<b>Ableseintervall</b>	10 Sek.
<b>Laufzeit</b>	80 min
<b>Datentransformation</b>	Schwellenwert-MOD = 20
<b>Ablesen</b>	Kinetisch, Absorption
<b>Baseline Adjustment</b>	An, 125–325 Sekunden

Spezifische Einstellungen für Pyros® eXpress:

Abbildung 3: Pyros® eXpress Softwareeinstellungen für PyroSmart NextGen® Assays

## MATERIALIEN UND GERÄTE

Die mit PyroSmart NextGen® gelieferten Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zusätzliche erforderliche, jedoch NICHT mit PyroSmart NextGen® gelieferte Materialien und Geräte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Erforderliche, jedoch NICHT mit PyroSmart NextGen® gelieferte Materialien und Geräte für Assays im Tube-Reader

Gerätetyp	Spezifikation	Beschreibung/Bestellnr.
<b>Tube-Reader mit Inkubationsfunktion</b>	Fähigkeit zur Einhaltung einer Temperatur von 37 °C während der Erfassung der Absorptionsmesswerte	Pyros® Kinetix Flex
<b>Tube-Reader-Software</b>	Möglichkeit der Datentransformation nach Onset Time	Pyros® eXpress oder Pyros® EQS
<b>Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE)++</b>	10 ng/Fläschchen, kalibriert gegen RSE mit PyroSmart NextGen®	z. B. ACC EC010-5 oder gleichwertig
<b>LAL-Reagenzwasser (LRW)</b>	Frei von störenden Endotoxinen	z. B. ACC WP050C oder gleichwertig
<b>8 x 75 mm Entpyrogenisierte Reaktionsröhrchen</b>	Borosilikat, frei von störenden Endotoxinen	z. B. ACC TK100-10 oder gleichwertig
<b>Entpyrogenisierte Verdünnungs-röhrchen aus Glas</b>	Frei von störenden Endotoxinen	z. B. ACC TB240-5, TB013-5, TB16C oder gleichwertig
<b>Ein Satz einstellbarer Einkanal-Mikropipetten</b>	Mögliche Abgabevolumina von 5–20 µl, 20–100 µl und 100–1000 µl	Traditionelle Modelle von Gilson, Rainin oder Eppendorf, passend zu den nachstehenden Spitzen, oder gleichwertig
<b>Pipettenspitzen</b>	Frei von störenden Endotoxinen. Mögliche Abgabevolumina von: 5–20 µl, 20–100 µl und 100–1000 µl	z. B. ACC PPT25, PPT10 oder gleichwertig
<b>Repetierpipette mit kompatiblen Spritzenzylindern</b>	Automatische Abgabe von Aliquots	z. B. Eppendorf XStream® Repetierpipette mit BioPur® Combitips 2,5 ml oder gleichwertig
<b>Vortex-Mixer</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Stoppuhr</b>	Beliebig	Beliebig

<b>Parafilm M®</b>	Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist typischerweise frei von nachweisbaren Endotoxinen.	American National Can™
<b>Röhrchenständer</b>	Beliebig	Beliebig
<b>Röhrchenständer für Reaktionsröhrchen</b>	Mit PK Flex geliefert	

+Hinweis: Nicht alle Produkte sind weltweit erhältlich. Wenden Sie sich an den lokalen Lieferanten.

++Hinweis: Analysezertifikat und die darin angegebene Aktivität sind spezifisch für eine Kombination einer PyroSmart NextGen®- und einer KSE-Charge. Dieselbe KSE-Charge ergibt in Tests mit verschiedenen Chargen von PyroSmart NextGen® möglicherweise unterschiedliche Aktivitäten (EU/ml). Entsprechend ergeben verschiedene KSE-Chargen in Tests mit derselben Charge von PyroSmart NextGen® wahrscheinlich unterschiedliche Aktivitäten.

## KONTROLLEN

**Negativkontrolle:** LAL-Reagenzwasser (LRW) dient als Negativkontrolle.

**Standardkurve:** Eine Standardkurvenreihe als geometrische Folge sollte den erforderlichen Bereich der Endotoxinkonzentrationen umfassen. Beispiel siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Beispiele für Standardkurvenbereiche und Einstellung

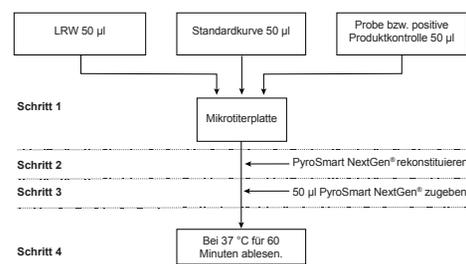
KSE- (bzw. RSE-) Konzentration in EU/ml	LRW-Volumen	KSE- (bzw. RSE-) Lösung in EU/ml
<b>50</b>	-	-
<b>1</b>	4900 µl	100 µl von 50 EU/ml
<b>0,1</b>	900 µl	100 µl von 1 EU/ml
<b>0,01</b>	900 µl	100 µl von 0,1 EU/ml
<b>0,001</b>	900 µl	100 µl von 0,01 EU/ml

**Positive Produktkontrollen (PPKs):** PPKs sind Eignungskontrollen (Hemmung/Verstärkung) und bestehen aus einer Probe (bzw. einer Verdünnung der Probe) mit Zusatz von Standardendotoxin. Die zugegebene Endotoxinkonzentration sollte dem mittleren Bereich der Standardkurve entsprechen. Für einen Standardkurvenbereich von beispielsweise 1 bis 0,001 EU/ml werden 200 µl der Probe mit 20 µl von 1 EU/ml versetzt, um eine Endkonzentration von 0,1 EU/ml zu erreichen.

## TESTVERFAHREN

- Den Tube-Reader einschalten und auf 37 °C äquilibrieren lassen.
- Die Software mit geeigneten Einstellungen (siehe Tabelle 6 für Pyros® EQS oder Abbildung 3 für Pyros® eXpress) für die spezifische verwendete Software einrichten.
- Die geeigneten Kontrollen und Proben vorbereiten.
- Den Testlauf gemäß Abbildung 4 vorbereiten. Der Testlauf wird nachstehend ausführlicher beschrieben.
- Den Test ablesen.

Abbildung 4: Ein Schema des Testverfahrens für Assays im Tube-Reader



### SCHRITT 1: Testprobe überführen

200 µl Testprobe (Negativkontrolle x2, Endotoxin-Standardreihe x2, Probenverdünnungen x2 und PPK für jede Probenverdünnung x2) in die entsprechenden, wie im Software-Layout definierten Röhrchen überführen.

### SCHRITT 2: PyroSmart NextGen® rekombinantes LAL-Reagenz rekonstituieren

Sowohl das Reagenz als auch den Rekonstitutionspuffer auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen. Leicht gegen das Reagenzfläschchen klopfen, damit loses Material zum Boden fällt.

Durch aseptisches Anheben des Stopfens das Vakuum brechen. Den Stopfen werfen. 2,8 ml PyroSmart NextGen®-Rekonstitutionspuffer in das Reagenzfläschchen überführen und mit Parafilm abdecken. Das Fläschchen in der ersten Minute vorsichtig schwenken, dann die nächsten 2 Minuten stehen lassen (Rekonstitutionszeit vor Gebrauch von insgesamt 3 Minuten). Vor Gebrauch nicht erneut mischen, um eine übermäßige Schaumbildung und einen Verlust der Sensitivität zu vermeiden. Bei übermäßigem Mischen 10 Minuten stehen lassen oder mit einer manuellen Pipette dispensieren, um eine Blasenbildung zu vermeiden. Das Reagenz muss innerhalb von 20 min nach der Rekonstitution verwendet werden.

### SCHRITT 3: PyroSmart NextGen® in die Reaktionsröhrchen geben

Einen sterilen Combitip mit dem rekonstituierten Reagenz füllen und die Abgabe von 50 µl Aliquots einstellen, ein Aliquot nach dem anderen. Mit der Pipette in einem Winkel von 45 Grad zum Reaktionsröhrchen (ohne die Innenwände des Röhrchens zu berühren) 50 µl des Reagenzes in das erste Replikat der Negativkontrolle geben. Das Röhrchen 1 Sekunde lang mit dem Vortex-Mixer mischen und sofort in die Kavität Nr. 1 im Röhrchen-Photometer einsetzen. Den Vorgang für die restlichen Röhrchen der Negativkontrollen wiederholen. Dann mit der Standardkurve fortfahren: von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration, ein Röhrchen nach dem anderen. Anschließend mit den Proben fortfahren.

### SCHRITT 4: Den Test ablesen.

Die Messung wird automatisch mit dem Einsetzen jedes Röhrchens gestartet. Den Test bis zum Abschluss laufen lassen.

## GÜLTIGKEITSKRITERIEN FÜR ASSAYLÄUFE FÜR ALLE ASSAYS

Für einen gültigen Lauf müssen die in Tabelle 9 aufgeführten Bedingungen erfüllt sein.

Tabelle 9: Beispiele für Standardkurvenbereiche und Einstellungen für alle Assays

Kriterien	Gültigkeit
<b>Negative Control</b>	<b>Onset Time-Assay:</b> Die Onset Time der Negativkontrollen muss länger sein als die des Standards mit der niedrigsten Konzentration. <b>Raten-Assay (gilt nur für die Plate-Reader -Methode):</b> Das Vmean der Negativkontrolle muss kleiner sein als das des Standards mit der niedrigsten Konzentration. Es sollte kleiner oder gleich 1,0 mAbs/min sein
<b>Standard Curve</b>	Die Standardkurve muss einen Absolutwert des Korrelationskoeffizienten von $\geq 0,980$ aufweisen.
<b>Positive Produktkontrollen</b>	Die Wiederfindung der positiven Produktkontrolle muss innerhalb von 50 bis 200 % der Nennkonzentration des Endotoxinzusatzes liegen.

## ERGEBNISSE

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Berechnungen werden von der entsprechend konfigurierten Software automatisch ausgeführt. Wenden Sie sich für weitere Unterstützung an den technischen Kundendienst unter techservice@accuisa.com.

### Berechnung der Endotoxinkonzentrationen

Die Endotoxinkonzentrationen aller Testproben (einschließlich Standards und Kontrollen) werden durch Interpolation gegenüber der Standardkurve unter Verwendung der Gleichung für eine Gerade wie folgt berechnet:

- Onset Time-Assay:**  
 $\text{Log Endotoxinkonzentration} = (\text{Log Onset Time} - \text{Y-Achsenabschnitt}) / \text{Steigung}$
- Raten-Assay (gilt nur für die Plate-Reader -Methode):**  
 $\text{Endotoxinkonzentration} = (\text{Vmean} - \text{Y-Achsenabschnitt}) / \text{Steigung}$

Die Polynomiale Regression kann auch für Onset Time-Assays verwendet werden.

### PPK-Wiederfindung für Spike-Proben

PPK-Wiederfindung in % = ((mittlere Konzentration in der Spike-Probe – mittlere Konzentration in der ungespiketen Probe) / (nominale Spikekonzentration)) x 100 %

### Endgültige Endotoxinkonzentration in ungespiketen Proben

Die für die verdünnte Probe ermittelte Endotoxinkonzentration mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren, um die Konzentration in der ursprünglichen Probe vor der Verdünnung zu erhalten.

## EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Das Verfahren wird durch das Ausmaß der Hemmungs- bzw. Verstärkungseigenschaften der getesteten Probe eingeschränkt. Substanzen, die Proteine denaturieren, Ionen chelatisieren, Endotoxine

binden oder den hydrophoben Status von Endotoxinen ändern, können den Test stören. Eine Störung lässt sich daran erkennen, dass die PPK-Wiederfindung in % außerhalb des Bereichs von 50 bis 200 % liegt. In den meisten Fällen reduziert eine Verdünnung der Probe die Konzentration und Aktivität der Störsubstanzen. Die Proben sollten in LRW verdünnt werden, das die gemäß den arzneimittelrechtlichen Vorschriften (6, 7, 8 oder 9) berechnete maximale gültige Verdünnung nicht überschreitet darf.

Sonstige Störsubstanzen:

- Manche Serumproteasen (z. B. Trypsin, aktivierte Blutfaktoren), die ein falsch-positives Ergebnis verursachen, müssen vor dem Test (zum Beispiel durch eine Hitzebehandlung) denaturiert werden.**
- Farbige Materialien wie z. B. Tierserum, Albumin und Plasma**
- Übermäßige Trübung**

Wenn das Verfahren bei einer Probenverdünnung, die innerhalb der maximalen gültigen Verdünnung liegt, nicht validiert werden kann (1, 2, 3), kann der rekombinante Test nicht als alternativer Test verwendet werden.

## LITERATURANGABEN

- Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, July 2012.
- Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Endotoxin Measurement Test Using Recombinant Proteins, Japanese Pharmacopeia, 18th Edition, Tokyo, Japan.
- Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (current revision), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
- Medical Devices – Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

### Zusätzliche Bibliographie:

- Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J, Aizawa M, Kobayashi Y, Kawabata S, Oda T. Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Immune Immun*, 23 (2), 136-146 (2017).
- Muroi M, Ogura N, Mizumura H, Aketagawa J, Oda T, Tanamoto K. Application of a recombinant three-factor chromogenic reagents, PyroSmart, for bacterial endotoxins test filed in the Pharmacopoeias. *Biol Pharm Bull*, 42 (12), 2024-2037 (2019).
- Stevens I, Ogura N, Kelley M, D'Ordine RL, Mizumura H, Oda T, Akiyoshi J, Jahngen EG. Advanced recombinant cascade reagent PyroSmart NextGen® for bacterial endotoxins test as described in the pharmacopoeias. *BPB Reports*, 5, 105-114 (2022).
- Kelley M, Stevens I, Akiyoshi J, Jahngen EG. Evaluation of recombinant cascade reagent PyroSmart NextGen® and Limulus amoebocyte lysate equivalency in a plate and tube reader for bacterial endotoxins testing. *BPB Reports*, 6, 11-15 (2023).
- Kelly M, Stevens I, Oda T, Akiyoshi J, Jahngen EG. A demonstration of the validation process for alternative endotoxin methods using PyroSmart NextGen® recombinant cascade reagent. *BPB Reports*, 6, 68-75 (2023)
- Kikuchi Y, Muroi M, Nakagawa Y, Ebisawa A, Hayashi M, Takeuchi H, Kawamoto Y, Matsumura K, Yoshimoto R, Tsuzuki N, Oikawa M, Hashimoto M, Hiramatsu Y, Fukami M, Kobayashi K, Sando M, Eto S, Mori M, Martinez O, Suzuki M, Sekiguchi S, Ouchi K, Fukuchi H, Kitagawa T, Kizawa M, Masuda T, Oda T, Mizumura H, Ogura N, Iida D, Sueoka K, Tanno Y, Tsuchiya M. Collaborative study of bacterial endotoxins test using recombinant Factor C-based procedure for detection of lipopolysaccharides (Part 3). *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 54 (4), 341-351 (2023).

Bitte wenden Sie sich mit Fragen zur Verwendung von PyroSmart NextGen® an den technischen Kundendienst unter techservice@accuisa.com.