

Le reazioni avverse alla somministrazione dei preparati parenterali sono state descritte fin dal XIX secolo ed inizialmente denominate “febbre da iniezione”. Tali reazioni derivavano dall’iniezione, insieme al farmaco, di sostanze note con il termine **pirogeni**: sostanza che nell’uomo o nell’animale provocano un aumento della temperatura corporea con le stesse caratteristiche della febbre.

Oggi è noto che i pirogeni sono un gruppo eterogeneo di sostanze di origine microbica e non, fra cui le più importanti e più conosciute sono le endotossine o lipopolisaccaridi (LPS) derivanti dai batteri gram-negativi. Anche piccole dosi di endotossine provocano infatti una risposta infiammatoria nell’uomo e, quando entrano nel flusso sanguigno, possono indurre risposte deleterie incluso shock settico o persino la morte. L’LPS viene rilasciato dalla parete cellulare dei batteri gram-negativi in crescita o quando questi vengono uccisi da antibiotici o dal sistema immunitario dell’ospite

La riconosciuta pericolosità delle endotossine portò all'inserimento del test all'interno delle Farmacopee, fra cui quella europea. Le farmacopee stabiliscono infatti che per i prodotti farmaceutici iniettabili si debba garantire un contenuto endotossinico tale da non causare reazioni febbrili (E.P 5.1.10) e stabiliscono i metodi per la loro determinazione (E.P 2.6.14). Il Test più utilizzato è proprio il **LAL test**, esso si basa sull'utilizzo del lisato di amebociti prelevati dal sangue di granchi a ferro di cavallo, i *Limulus polyphemus*



All injectable pharmaceutical products and implantable medical devices need to be tested to ensure there is no presence of endotoxin, which can lead to a pyrogenic response (fever) and symptoms of septic shock.

The rabbit pyrogen test (RPT) is performed to check for the presence of pyrogens in products that could contain a Gram-negative or Gram-positive bacteria. Rabbits are used because their body temperature increases when they are injected with a pyrogenic product. From 1942 to 1983, the rabbit pyrogen test was the standard for pyrogen testing; however, it was labor-intensive, lengthy, and expensive. In 1983, the FDA and US Pharmacopeia adopted the bacterial endotoxin test utilizing *Limulus* amoebocyte.

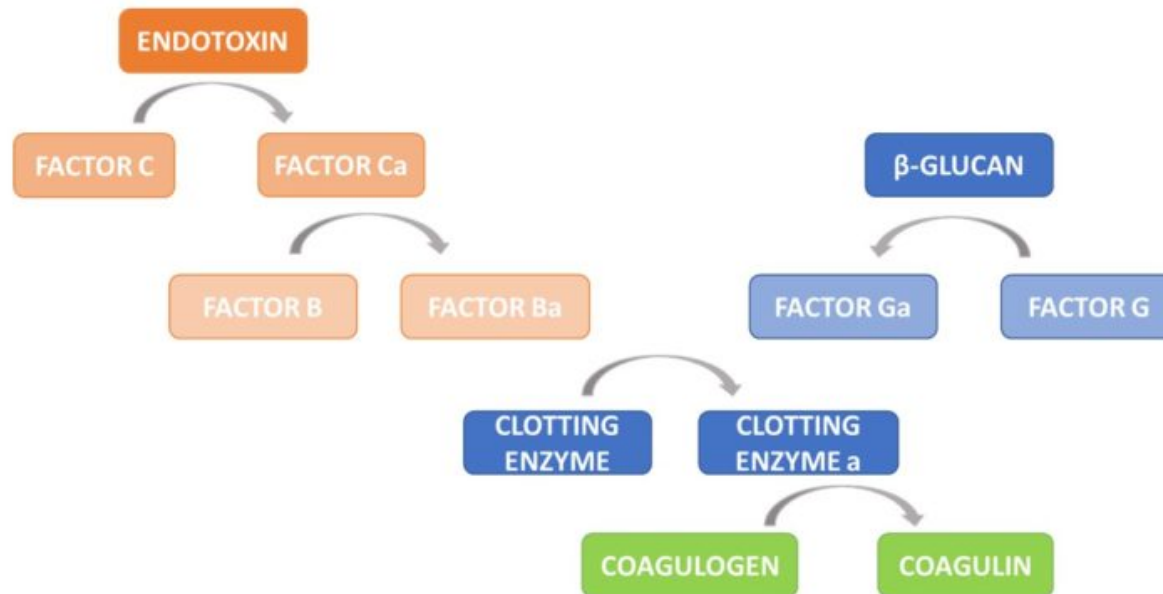
Fred Bang, nel 1956, osservò che l'infezione del granchio *Limulus polyphemus* con batteri Gram-negativi provocava una coagulazione intravascolare, dovuta ad una reazione tra endotossina e una proteina di coagulazione. A partire da questa scoperta F. Bang e J. Levin inventarono il test delle endotossine.

Oggi esistono principalmente tre metodologie per il test LAL (Limulus Amebocyte Lysate):

- gel-coagulo o gel-clot;
- test turbidimetrico;
- test cromogenico.

Tutti e tre i metodi si basano sulla stessa cascata di reazione mediata da LPS nel limulus che vede la presenza di diversi attori: proenzimi serina proteasi (fattore C, fattore B), un proenzima proclottante e una proteina gelificante, il coagulogeno.

L'LPS attiva dapprima il proenzima fattore C alla forma attiva del fattore C. il fattore C attivato, attiva a sua volta il fattore B, il quale converte l'enzima proclottante in enzima coagulante. L'enzima di coagulazione attivato scinde due legami peptidici nel coagulogeno, una molecola simile al fibrinogeno, per produrre un gel di coagulina insolubile. La cascata della coagulazione, oltre che dall'endotossina, viene anche attivata dall'(1,3) – β -D-glucano che attiva il proenzima fattore G portando all'attivazione dello stesso enzima proclottante.



Rappresentazione schematica della cascata enzimatica del limulus attivata dall'endotossina

Test Cromogenico

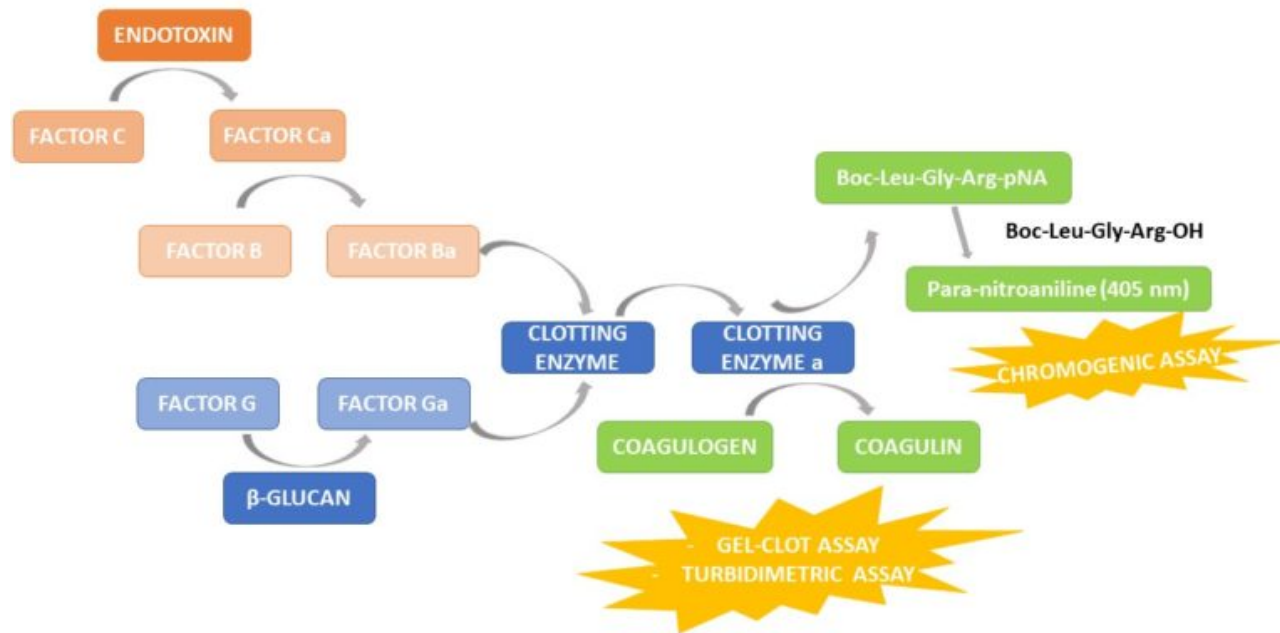
L'enzima di coagulazione attivato dall'endotossina scinde un substrato cromogenico sintetico, utilizzato specificatamente per il dosaggio delle endotossine batteriche **Boc-Leu-Gly-Arg- p - nitroanilide (pN/A)**, rilasciando la p-nitroanilina di colore giallo. Il colore generato viene misurato fotometricamente a 405 nm. La quantità di endotossina nel campione è determinata dal tempo richiesto l'apparizione del colore giallo.

Test Gel-clot

La presenza di endotossina attiva l'enzima di coagulazione generando la formazione un coagulo di gel nel campione.

Test Turbidimetrico

Il test turbidimetrico misura la presenza di particelle solide in una soluzione, ovvero la torbidità. In presenza di endotossina, il lisato svilupperà torbidità dovuta al taglio del substrato endogeno da parte dell'enzima proclottante attivato. La torbidità viene letta come valore di densità ottica (OD) pari circa a 340 nm. La velocità di sviluppo della torbidità è direttamente proporzionale alla concentrazione di endotossina presente nel campione.



Rappresentazione schematica del principio alla base dei tre diversi metodi

Inhibition/enhancement test

Per ciascun prodotto in analisi, preliminarmente all'esecuzione del test delle endotossine, è necessario eseguire una qualifica iniziale del metodo, chiamata anche “**inhibition/enhancement testing**”, al fine di individuare le condizioni idonee per l'analisi (diluizione e diluente) che minimizzino le interferenze con i risultati del test. Generalmente il campione viene testato a diverse diluizioni fino alla **massima diluizione valida** o **MVD** utilizzando diversi diluenti. L'MVD rappresenta la massima diluizione del campione che consente di determinare una quantità di endotossina pari al limite di endotossina stabilito. Essa dipende quindi dal limite di endotossina stabilito per il prodotto (EL), dalla concentrazione del prodotto (generalmente la concentrazione del principio attivo) e dalla sensibilità del metodo scelto (λ). L'MVD viene calcolata come:

$$\mathbf{MVD = (Endotoxin\ Limit) \times (Product\ Concentration) / \lambda}$$

Il **limite di endotossina** o **EL** rappresenta la quantità di endotossina che può essere contenuta in un prodotto senza rappresentare un pericolo per la salute del paziente. Il calcolo del limite di endotossina per qualsiasi farmaco dipende da tre variabili:

la via di somministrazione;

la dose di prodotto somministrato per chilogrammo di peso corporeo;

la durata (tempo) della somministrazione.

$$EL = K/M$$

Dove, K = dose soglia di pirogeni e M = dose massima raccomandata di prodotto per chilogrammo di peso corporeo del paziente.

I capitoli delle farmacopee relativi al test delle endotossine riportano delle tabelle che dettagliano il valore di K e M da considerare per ciascuna tipologia di prodotto.

In aggiunta durante la fase di qualifica del metodo, è necessario verificare che il valore di pH della mistura campione e lisato sia contenuto all'interno del range 6.0-8.0, qualora ricadesse al di fuori dell'intervallo deve essere aggiustato con le apposite soluzioni tampone.

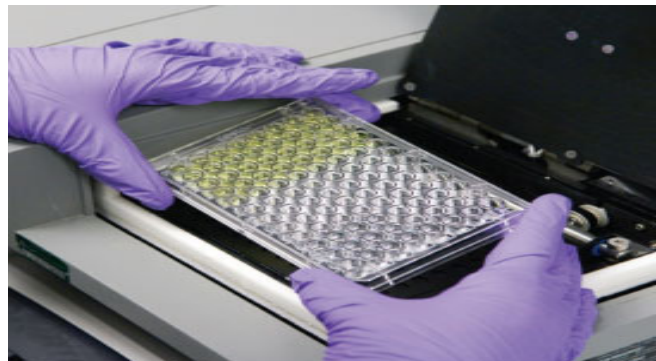
A questo punto, identificate le condizioni migliori per il test, si può procedere all'esecuzione del test in routine

LAL test – metodo cinetico cromogenico

Il campione da analizzare, tal quale o diluito, viene dispensato in una piastra da 96 pozzetti e mescolato con un'uguale quantità del reagente LAL. Il reagente LAL contiene il lisato derivato dagli amebociti del granchio a ferro di cavallo e il substrato cromogenico sintetico.

Nella stessa piastra viene preparata una curva standard composta generalmente da 3 o 4 punti a concentrazione nota di endotossina. La piastra preparata viene inserita in un lettore di micropiastre, ad una temperatura di 37°C e la comparsa del colore giallo viene monitorata nel tempo misurando l'assorbanza a 405 nm. Il tempo necessario per la comparsa del colore giallo, chiamato **tempo di reazione**, è inversamente proporzionale alla quantità di endotossina presente. La quantità di endotossina viene calcolata sulla base del suo tempo di reazione confrontandola con la curva standard. Il metodo cromogenico può essere di tipo cinetico oppure end-point: con il metodo LAL cromogenico cinetico, viene determinata la comparsa della reazione di colorazione in funzione del tempo mentre nel caso del metodo endo-point si esegue la lettura di assorbanza in un determinato punto temporale

In presenza di endotossina all'interno del campione si verifica la reazione che genera la colorazione gialla. Il tempo di reazione è inversamente proporzionale alla quantità di endotossina presente nel campione: quando il campione presenta una quantità elevata di endotossina la reazione avviene rapidamente, in presenza di una quantità di endotossina inferiore, il tempo di reazione aumenta. Il metodo cromogenico è estremamente sensibile, è possibile determinare fino a 0.001 EU/ml. Generalmente il software restituisce il risultato in EU/ml per ciascun campione analizzato calcolando la concentrazione di endotossina per confronto con la curva standard



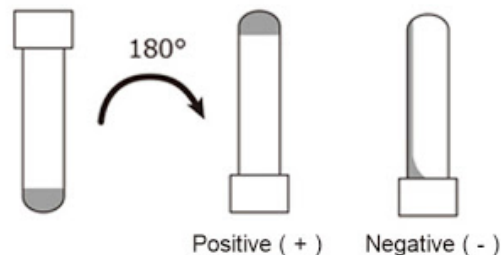
LAL test – Metodo Gel-Clot

Il metodo gel-clot viene eseguito introducendo in una provetta sterile e apirogena un volume nell'ordine dei microlitri di campione in esame e di reagente LAL. La soluzione viene agitata vigorosamente per circa 30 secondi e poi incubata a 37 °C per un'ora, durante la quale è necessario prestare attenzione a non muoverla. Trascorso il tempo la presenza di endotossina viene determinata osservando la formazione del coagulo di gel. La concentrazione minima di endotossina necessaria per causare la coagulazione in condizioni standard dipende dalla sensibilità del lisato scelta.

Terminata l'analisi viene capovolta la provetta:

se la soluzione non si stacca dal fondo, il campione contiene endotossine e il LAL si è coagulato.

Se la soluzione si stacca dal fondo, il campione non contiene endotossine.



Rappresentazione dei risultati ottenibili con il LAL test metodo gel-clot

LAL test – Metodo Turbidimetrico

La procedura generale prevede la misurazione della lunghezza d'onda della luce che passa attraverso la soluzione usando metodi spettrofotometrici. Il metodo turbidimetrico può essere di tipo cinetico oppure end-point: con il metodo LAL turbidimetrico cinetico, viene determinato l'incremento quantitativo della torbidità mentre nel caso del metodo end-point si esegue la lettura della torbidità in un determinato punto temporale.

Il test richiede l'impiego di una specifica strumentazione per incubare i campioni ad una temperatura controllata di 37°C e per leggere i valori di OD ad intervalli regolari. Il campione in esame viene dispensato all'interno di una micropiastra e mixato con una quantità di reagente LAL. All'interna della piastra viene preparata una curva standard costruita con diverse concentrazioni note di endotossina standardizzata. Le curve standard, costruite tracciando il logaritmo del tempo di inizio in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina standard, vengono usate per calcolare le concentrazioni di endotossina nel campione di analisi. La sensibilità dell'analisi turbidimetrica dipende dal lisato scelto: è possibile determinare fino a 0.001 EU/ml.

In presenza di endotossine nel campione, si verifica la reazione di coagulazione del reagente LAL, la quale produce una massa solida nella soluzione. Si otterrà di conseguenza un grado di torbidità maggiore rispetto al campione in assenza di endotossina. Anche in quest'ultimo l'incremento della torbidità è direttamente proporzionale alla quantità di endotossina presente nel campione ed il risultato viene elaborato dal software per confronto con la curva standard.

Si stanno oggi affacciando sulla scena tecnologie più rapide e sostenibili per il test cinetico cromogenico come il sistema a cartucce, nel quale tutti i reagenti necessari per il test sono caricati all'interno della cartuccia stessa. L'analista deve caricare il campione, diluito o tal quale, all'interno dei pozzetti della cartuccia ed in soli 15 minuti è possibile ottenere un risultato di tipo quantitativo



– esempio di cartucce per l'esecuzione del LAL test cinetico cromogenico

Quality control

In ciascun test eseguito vengono inseriti dei controlli negativi e positivi:

controllo negativo: rappresentato dall'acqua LAL o dal diluente utilizzato per diluire il prodotto in analisi. Questo deve risultare privo di endotossine.

controllo positivo: viene aggiunta una quantità di endotossina standard di riferimento al campione in analisi al fine di dimostrare che non vi siano delle interferenze nei risultati del test. Il recupero (quantificazione) di endotossina deve essere compreso fra il 50-200% della concentrazione teorica di endotossina aggiunta.

Inoltre, la curva standard preparata per l'esecuzione del metodo turbidimetrico e cromogenico, deve avere un coefficiente di correlazione R con un valore pari o superiore a 0,980 per far sì che il test sia considerato valido.