

Réactif LAL recombinant

PyroSmart NextGen™

Fabriquée par :



124 Bernard E. Saint-Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
PN002641-FR rev2 17 févr. 2021

Téléphone : (508) 540-3444

Numéro vert : (888) 395-2221

Fax : (508) 540-8680

Assistance technique : (800) 848-3248

Service à la clientèle : (800) 525-8378

PyroSmart NextGen™

Réactif cinétique chromogène recombinant pour la détection et la quantification des endotoxines des bactéries à Gram négatif (lipopolysaccharides)

Utilisation prévue

Le test recombinant PyroSmart NextGen™ peut être utilisé comme un test alternatif aux tests officiels pour les tests réalisés sur le produit fini des médicaments injectables d'origine humaine (y compris les produits biologiques), des médicaments injectables d'origine animale et des dispositifs médicaux (1,2). Des orientations sur la validation des méthodes de test alternatives figurent dans l'USP <1223> et <1225> (3,4) et ces méthodes doivent se révéler équivalentes ou supérieures aux méthodes officielles. Ce test peut également être utilisé pour la quantification des endotoxines dans des articles non officiels (par exemple les matières premières, y compris l'eau, et pour le contrôle en cours de fabrication) sans validation de la méthode.

Le test recombinant PyroSmart NextGen™ n'est pas destiné à être utilisé pour la détection d'endotoxines dans des échantillons cliniques pour le diagnostic de maladies humaines telles que l'endotoxémie chez l'Homme.

Principe du test

Le réactif PyroSmart NextGen™ est constitué de trois protéines recombinantes : Facteur C, facteur B et enzyme procoagulante. En présence d'endotoxines, le facteur C recombinant devient une fraction activée qui à son tour active le facteur B recombinant et l'enzyme procoagulante recombinante ; ce qui entraîne finalement le clivage protéolytique d'un substrat chromogène incolore formulé avec le PyroSmart NextGen™. Le clivage du substrat libère de la *para*-nitroaniline (pNA), qui est jaune et absorbe à 405 nm (Figure 1). La variation de l'absorbance est mesurée en continu et à intervalles réguliers à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant une durée d'exécution appropriée. Plus la concentration en endotoxines est élevée, plus la pNA est libérée rapidement, ce qui entraîne un changement plus rapide de l'absorbance.

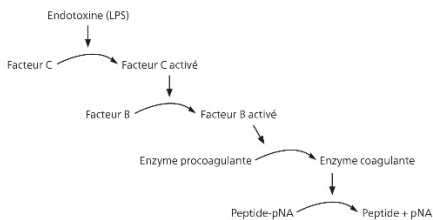


Figure 1 Mécanisme en cascade commençant par l'activation du facteur C par les endotoxines et entraînant une augmentation de l'absorbance suite à la libération de la pNA

Précautions en matière de sécurité

La toxicité du PyroSmart NextGen™ n'a pas été déterminée. Il convient donc de faire preuve de prudence lors de la manipulation du PyroSmart NextGen™.

Conditions de stockage

La date de péremption est indiquée sur le flacon et sur l'emballage extérieur.

Tableau 1 : Conditions de stockage du PyroSmart NextGen™

Réactif lyophilisé	Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C
Tampon de reconstitution	Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C. Conserver à température ambiante au moins 30 minutes avant le test
Réactif reconstitué	Doit être utilisé immédiatement après la reconstitution (dans les 20 minutes)

Conditions de test

Le PyroSmart NextGen™ peut être utilisé pour quantifier la concentration en endotoxines de deux façons :

- Test de détermination du délai de réaction :** où le temps nécessaire pour atteindre un seuil de DO (appelé délai de réaction) est déterminé. Des concentrations en endotoxines plus élevées donnent des délais de réaction plus courts. La courbe étalon est construite en traçant le log du délai de réaction (axe des ordonnées) en fonction du log de la concentration de l'étalon (axe des abscisses), et est utilisée pour calculer les concentrations en endotoxines dans les échantillons.
- Test de détermination de la vitesse :** où la vitesse moyenne (V_{moy} : mAbs/ min) est calculée sur la durée du test. Des concentrations plus élevées en endotoxines donnent des valeurs de V_{moy} plus élevées. La courbe étalon est construite en traçant V_{moy} (axe des ordonnées) en fonction de la concentration de l'étalon (axe des abscisses) et est utilisée pour déterminer les concentrations en endotoxines dans les échantillons.

Les paramètres du logiciel pour les deux tests sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Paramètres du logiciel pour les tests PyroSmart NextGen™

	Test de détermination du délai de réaction	Test de détermination de la vitesse
Agitation	10 s	10 s

Lecture	Cinétique, absorbance	Cinétique, absorbance
Longueur d'onde	405 nm	405/490 nm*
Intervalle de lecture	30 s**	30 s**
Durée d'exécution	60 min	30 min
Réduction des données	DO seuil = 0,03 DO	Pyros® eXpress : V_{moy} Gen5™ : V_{moy} SoftMax® Pro : V_{max}

*Ou 405/492 nm en fonction de la capacité du lecteur de plaques

**L'intervalle peut varier en fonction du lecteur de plaques

Matériel et équipement

Le matériel fourni avec le PyroSmart NextGen™ est répertorié dans le Tableau 3. Le matériel et l'équipement nécessaires mais non fournis avec le PyroSmart NextGen™ figurent dans le Tableau 4.

Tableau 3 : Matériel fourni avec le PyroSmart NextGen™

Composant	Nb de flacons	Remarques
Réactif PyroSmart NextGen™	2	Reconstituer chaque flacon avec 2,8 ml de tampon de reconstitution
Tampon de reconstitution PyroSmart NextGen™	2	-

Tableau 4 : Matériel et équipement requis mais NON fournis avec le PyroSmart NextGen™

Type d'équipement	Spécification	Description/Réf. catalogue ⁺
Lecteur de plaques (absorbance) avec incubation	Capable de maintenir une température de 37°C lors de la lecture de l'absorbance	par exemple BioTek® ELx808™, lecteurs Molecular Devices ou l'équivalent
Logiciel du lecteur de plaques	Permet la réduction des données en fonction du délai de réaction ou de la vitesse	par exemple Pyros® eXpress ou Gen5™ pour ELx808™, SoftMax® Pro pour les lecteurs Molecular Devices ; ou l'équivalent
Endotoxines étalons de contrôle (CSE)++	10 ng/flacon calibrées par rapport aux RSE avec le PyroSmart NextGen™	par exemple ACC EC010-5 ou l'équivalent
Eau de réactif LAL (LRW)	Exempte d'endotoxines interférentes	par exemple ACC WP050C ou l'équivalent
Microplaques à 96 puits	Microplaques à couvercle, non recouvertes, non traitées, exemptes d'endotoxines interférentes	par exemple ACC CA961-10 ou l'équivalent
Tubes de dilution en verre dépyrogéné	Exempts d'endotoxines interférentes, ne doivent pas interférer avec le test	par exemple ACC TB240-5, TB013-5, TB016C ou l'équivalent
Un jeu de micropipettes monocanal réglables	Capables de distribuer des volumes de 5-20 µl, 20-100 µl et 100-1000 µl	Modèle Gilson, Rainin ou Eppendorf conventionnel compatible avec les embouts ci-dessous ou l'équivalent
Embouts de pipette	Exempts d'endotoxines interférentes Capables de distribuer des volumes de : 5-20 µl, 20-100 µl et 100-1000 µl	par exemple ACC PPT25, PPT10 ou l'équivalent
Pipette à répétition avec corps de seringue compatibles	Distribution automatique des aliquotes	par exemple pipette à répétition Eppendorf Xstream® avec Combitips BioPur® de 2,5 ml ou l'équivalent
Agitateur-mélangeur vortex	Tout type	Tout type
Minuteur	Tout type	Tout type
Parafilm M®	Le côté en contact avec le papier protecteur est généralement exempt d'endotoxines détectables.	American National Can™
Portoir pour tubes	Tout type	Tout type
Porte-plaques incliné	Tout type	Tout type

+Remarque : Les produits ne sont pas tous disponibles dans le monde entier. S'adresser à un fournisseur local.

++Remarque : Le certificat d'analyse et la puissance qui y est indiquée sont spécifiques à une combinaison du PyroSmart NextGen™ et du lot de CSE. Un lot donné de CSE peut présenter des puissances différentes (UE/ng) lorsqu'il est testé avec différents lots de PyroSmart NextGen™. De même, différents lots de CSE auront probablement des puissances différentes lorsqu'ils seront testés avec le même lot de PyroSmart NextGen™.

Contrôles

Contrôle négatif: L'eau de réactif LAL (LRW) sert de contrôle négatif.

Courbe étalon: Une courbe étalon sous la forme d'une série géométrique devrait permettre d'obtenir la plage de concentrations en endotoxines requise. Pour des exemples, voir le Tableau 5.

Tableau 5 : Exemples de plages de courbes étalons et de configurations pour les deux tests

Test de détermination du délai de réaction		
Concentration en CSE (ou RSE) en UE/ml	Volume de LRW	Solution de CSE (ou RSE) en UE/ml
50	-	-
5	900 µl	100 µl de 50 UE/ml
0,5	900 µl	100 µl de 5 UE/ml
0,05	900 µl	100 µl de 0,5 UE/ml
0,005	900 µl	100 µl de 0,05 UE/ml
Test de détermination de la vitesse		
Concentration en CSE (ou RSE) en UE/ml	Volume de LRW	Solution de CSE (ou RSE) en UE/ml
0,1	1960 µl	40 µl de 5 UE/ml
0,05	500 µl	500 µl de 0,1 UE/ml
0,025	500 µl	500 µl de 0,05 UE/ml
0,0125	500 µl	500 µl de 0,025 UE/ml
0,00625	500 µl	500 µl de 0,0125 UE/ml

Contrôles de produit positifs (PPC): Les PPC sont des contrôles d'adéquation (inhibition/activation) et consistent en un échantillon (ou une dilution de l'échantillon) auquel des endotoxines étalons sont ajoutées. Les endotoxines ajoutées doivent permettre d'obtenir une concentration qui se situe au milieu de la courbe étalon. Par exemple, si la courbe étalon varie de 50 à 0,005 UE/ml, mettre dans les 50 µl d'échantillon 5 µl de 5 UE/ml pour obtenir une concentration finale de 0,5 UE/ml. Si la courbe étalon varie de 0,1 à 0,00625 UE/ml, mettre dans les 50 µl d'échantillon 5 µl de 0,5 UE/ml pour obtenir une concentration finale de 0,05 UE/ml.

Procédure de test

- Allumer le lecteur de plaques pour permettre l'équilibrage à 37 °C.
- Configurer le logiciel en utilisant les paramètres appropriés (voir le Tableau 2).
- Préparer les contrôles appropriés.
- Préparer la microplaque comme indiqué à la Figure 2. La mise en place des microplaques est décrite plus en détail ci-dessous.
- Lire le test.

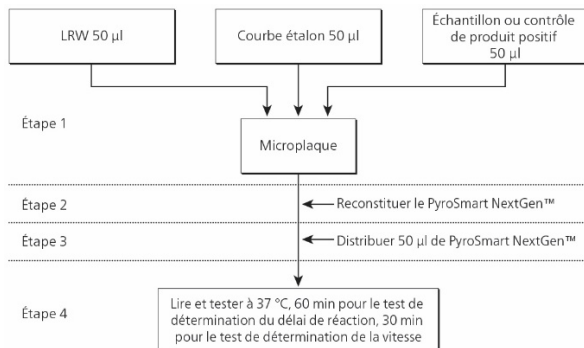


Figure 2 : Préparation de la microplaque

ÉTAPE 1 : Transférer un échantillon de test

Transférer 50 µl de l'échantillon à tester (contrôle négatif x2, série d'étalons d'endotoxines x2, dilutions d'échantillon x2 et PPC pour chaque dilution d'échantillon x2) dans les puits appropriés de la microplaque comme défini dans la disposition des plaques du logiciel.

ÉTAPE 2 : Reconstituer le réactif LAL recombinant PyroSmart NextGen™

Tapoter délicatement sur le flacon pour faire descendre les substances en suspension en bas du flacon. Relâcher la dépression en soulevant le bouchon de manière aseptique. Jeter le bouchon. Transférer 2,8 ml de tampon de reconstitution PyroSmart NextGen™ dans le flacon de réactif et couvrir avec du Parafilm. Laisser le culot se dissoudre complètement dans la solution pendant au moins 3 minutes avant de l'utiliser. Juste avant l'utilisation, faire tourner le flacon pour assurer l'homogénéité mais éviter un mélange vigoureux qui pourrait provoquer une formation de mousse excessive et une perte de sensibilité. Utiliser immédiatement dans les 20 minutes qui suivent la reconstitution.

ÉTAPE 3 : Distribuer le PyroSmart NextGen™ dans la microplaque

Retirer le couvercle de la plaque. Utiliser la pipette à répétition réglée pour distribuer des aliquotes de 50 µl, une aliquote à la fois. Éviter toute contamination croisée en utilisant la pipette à un angle de 45 degrés pour distribuer le réactif sur le côté du puits. Commencer par les contrôles négatifs, puis l'étalon de la plus faible concentration jusqu'à la concentration la plus élevée et finalement tous les échantillons. Procéder aussi rapidement que possible (pas plus de 30 secondes). Remettre le couvercle de la plaque.

ÉTAPE 4 : Lire le test

Transférer la microplaque dans un lecteur de plaques. Retirer le couvercle de la plaque et fermer le lecteur. Commencer le test.

Critères de validité du test

Pour que le test soit valable, les conditions énumérées dans le Tableau 6 doivent être remplies.

Tableau 6 : Exemples de plages de courbes étalons et de configurations pour les deux tests

Critères	Validité
Contrôle négatif	Test de détermination du délai de réaction : Le délai de réaction des contrôles négatifs doit être supérieur à celui de l'étalon le moins concentré. Test de détermination de la vitesse : La valeur de Vmoy du contrôle négatif doit être inférieure à celle de l'étalon le moins concentré. Elle doit être inférieure ou égale à 1,0 mAbs/min.
Courbe étalon	La courbe étalon doit avoir une valeur absolue du coefficient de corrélation $\geq 0,980$.
Contrôles de produit positifs	La récupération du contrôle de produit positif doit se situer dans un intervalle de 50 à 200 % de la concentration nominale des endotoxines ajoutées.

Résultats

Tous les calculs décrits dans cette section sont effectués automatiquement par le logiciel configuré de manière appropriée. Contacter le service technique à l'adresse techservice@acciusa.com pour obtenir de l'aide.

Calcul des concentrations en endotoxines

Interpoler les concentrations en endotoxines de tous les échantillons testés (y compris les étalons et les contrôles) à l'aide de l'équation d'une ligne droite $Y = \text{pente} * X + \text{ordonnée à l'origine}$ (pour le test de détermination du délai de réaction : $Y = \log \text{délai de réaction}$ et $X = \log \text{concentration en endotoxines}$, pour le test de détermination de la vitesse : $Y = V_{\text{moy}}$ et $X = \text{concentration en endotoxines}$) réarrangée comme suit :

- **Test de détermination du délai de réaction :** $\text{Log concentration en endotoxines} = (\log \text{délai de réaction} - \text{ordonnée à l'origine}) / \text{pente}$
- **Test de détermination de la vitesse :** $\text{Concentration en endotoxines} = (V_{\text{moy}} - \text{ordonnée à l'origine}) / \text{pente}$

Récupération du PPC pour les échantillons dopés

$\% \text{ de récupération du PPC} = (\text{concentration moyenne de l'échantillon dopé} - \text{concentration moyenne de l'échantillon non dopé}) / \text{concentration nominale de l'ajout} * 100 \%$

Concentration finale en endotoxines dans les échantillons non dopés

Multiplier la concentration en endotoxines trouvée dans l'échantillon dilué par le facteur de dilution pour exprimer la concentration dans l'échantillon d'origine avant la dilution.

Limites de la procédure

La procédure est limitée par l'étendue de la capacité d'inhibition ou d'activation de l'échantillon testé. Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent les ions, lient les endotoxines, ou altèrent l'état hydrophobe des endotoxines peuvent interférer avec le test. Une interférence peut être détectée comme un pourcentage de récupération du PPC se situant en dehors de la plage de 50 à 200 %. Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon réduit la concentration et l'activité des substances interférentes. Les échantillons doivent être dilués dans de la LRW sans dépasser la dilution maximale acceptable qui est calculée selon l'USP (5) ou l'USP (8).

Autres substances interférentes :

- **Certaines protéases à sérine (par exemple la trypsine, les facteurs sanguins activés) provoquant un résultat faussement positif doivent être dénaturées (par exemple, par un traitement thermique) avant le test.**
- **Substances colorées telles que le sérum, l'albumine et le plasma d'origine animale**
- **Turbidité excessive**

Si la procédure ne peut pas être validée (1, 2) à une dilution de l'échantillon qui ne dépasse pas la dilution maximale acceptable, le test recombinant ne peut pas être utilisé comme test alternatif.

Références

- 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, juillet 2012.
- Guidelines on the Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (révision actuelle), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Alternative Microbiological Methods <1223>, United States Pharmacopeia (révision actuelle), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Validation of Compendial Procedures <1225>, United States Pharmacopeia (révision actuelle), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (révision actuelle), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopeia 2.4.16 (révision actuelle), European Pharmacopeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test 4.01, Japanese Pharmacopeia (révision actuelle), Tokyo, Japan.
- Medical Devices – Pyrogen and Endotoxins Testing <161>, United States Pharmacopeia (révision actuelle), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Références supplémentaires :

Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Innate Immunity*, 23, 136-146 (2017)

Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J *et al.*

Application of a Recombinant Three-Factor Chromogenic Reagent for BET filed in the Pharmacopeias. *Biol Pharm Bull*(2019)42(12)2024-2037

Muroi M, Ogura N *et al.*

Merci de contacter le service technique à l'adresse techservice@acciusa.com en cas de questions concernant l'utilisation du PyroSmart NextGen™.