



PN000856-fr Rev1 Licence des États-Unis n° 700 Janvier 2011

PYROCHROME®

pour la détection et la quantification des endotoxines des bactéries gram-négatives (lipopolysaccharides)

Le test du lysat d'amœbocytes de *limule* (LAL), utilisé conformément aux recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) des É-U (1), peut remplacer le test d'apyrogénicité sur lapin de l'U.S. Pharmacopeia (USP) pour le test de produit final de « médicaments injectables à usage humain (y compris les produits biologiques), de médicaments injectables à usage vétérinaire et de dispositifs médicaux ». Le test LAL est recommandé pour la quantification des endotoxines dans les produits bruts utilisés dans la production, notamment l'eau, et pour la surveillance des taux d'endotoxines dans la fabrication. Le Bacterial Endotoxins Test de l'USP (2) est le test LAL officiel référencé dans des monographies spécifiques de l'USP et est harmonisé avec les chapitres équivalents de la Pharmacopée européenne (EP) (3) et de la Pharmacopée japonaise (JP) (4).

Résumé du test

Le lysat d'amœbocytes de *limule* est un extrait aqueux de cellules sanguines (amœbocytes) de la limule *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxines, des facteurs du LAL sont activés en une cascade protéolytique qui entraîne le clivage d'un substrat peptidique artificiel incolore présent dans le Pyrochrome® LAL. Le clivage protéolytique du substrat libre de la paranitroaniline (pNA), une substance jaune qui absorbe à 405 nm. Pour réaliser le test, ajouter un volume de Pyrochrome® à un volume d'échantillon, puis incuber le mélange réactionnel à 37 °C. La vitesse de la production de pNA augmente avec la concentration d'endotoxines dans l'échantillon. Le test Pyrochrome® peut être utilisé de deux manières pour quantifier la concentration d'endotoxines (5). Avec la méthode cinétique, on détermine le temps nécessaire pour atteindre une certaine absorbance à 405 nm (temps de réaction). Plus la concentration d'endotoxines est élevée, plus le temps de réaction est court. Le test requiert une instrumentation spécialisée pour incuber plusieurs échantillons à une température contrôlée (généralement 37 °C) et pour mesurer la densité optique à intervalles réguliers. On peut établir des courbes d'étalonnage en reportant le logarithme du temps de réaction en fonction du logarithme de la concentration d'une endotoxine étalon, et utiliser ces courbes pour calculer la concentration en endotoxines d'échantillons. L'autre méthode est la méthode chromogène en point final, dans laquelle on mesure la quantité de pNA libérée après une période d'incubation fixe. On établit une courbe d'étalonnage de la densité optique mesurée en fonction de concentrations connues d'endotoxine étalon, et on utilise cette courbe pour déterminer la concentration dans des échantillons. Pour les échantillons qui absorbent à 405-410 nm, on peut utiliser une modification par diazotation. Dans cette méthode, la pNA (formé avec la méthode chromogène en point final) réagit avec un nitrite dans du HCl puis avec de la N-(1-naphthyl)-éthylènediamine (NEDA) pour former un dérivé magenta diazoé qui absorbe dans la plage 540-550 nm.

Les méthodes du test Pyrochrome® sont rapides, spécifiques, simples à réaliser et très sensibles. La limite de détection dépend de la méthode et de l'instrumentation utilisées ; la sensibilité peut atteindre 0,001 unités d'endotoxine (UE) par mL.

Historique et principe biologique

La coagulation du sang de *limule* a été décrite par Howell en 1885 (6). Dans les années 50, Bang a découvert au Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts É-U, que les bactéries gram-négatives provoquent la coagulation du sang de *limule* (7). Plus tard, Levin et Bang ont déterminé que la réaction est enzymatique et que les enzymes sont situées dans des granules des amœbocytes (8, 9). Ils ont montré que la coagulation est déclenchée par un composant structuré unique de la paroi cellulaire bactérienne appelé endotoxine ou lipopolysaccharide (10). Selon les connaissances actuelles, la réaction est une cascade d'étapes d'activation enzymatique aboutissant au clivage de la protéine, le coagulogène. Le produit insoluble du clivage du coagulogène, la coaguline, s'unit par interaction ionique. Si une quantité suffisante de coaguline est formée, une turbidité apparaît suivie par la formation d'un gel-caillot. Cette interaction constitue la base d'un test de détection des endotoxines, le test du lysat d'amœbocytes de *limule* (LAL). En 1977, des

chercheurs japonais ont découvert que le LAL activé par des endotoxines entraîne également le clivage de petits peptides chromogènes qui comportent un site de clivage acide aminé similaire au coagulogène, et du paranitroanilide, un chromophore (11). Le clivage entraîne la libération de pNA, une substance jaune qui absorbe la lumière à 405 nm. Dans cette adaptation chromogène du test LAL, la concentration en coagulogène est réduite par dilution pour minimiser une interférence lors de l'ajout du substrat chromogène au LAL. Ainsi, quand on ajoute des endotoxines au réactif LAL chromogène, une coloration se forme et non une turbidité ou un gel-caillot. Dans toutes les versions du test LAL (gel-caillot, turbidimétrie et chromogène), le point final (gel-caillot, turbidité ou couleur) apparaît d'autant plus vite que la concentration en endotoxines est élevée. Des informations complémentaires sur les types de test LAL, la réaction et les applications sont disponibles dans la littérature (12, 13, 14).

Réactifs

Le Pyrochrome® est conditionné sous la forme d'un lyophilisat, à raison de 3,2 mL/flacon. Il contient un extrait aqueux d'amœbocytes de *Limulus polyphemus*, un stabilisateur, des sels, un tampon et un substrat chromogène.

Le Pyrochrome® n'est pas étiqueté avec une sensibilité spécifique. La sensibilité d'un test donné (désignée λ) est la plus petite concentration d'endotoxines utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. La plus grande sensibilité, λ, du Pyrochrome® est de 0,001 UE/mL pour la méthode cinétique et de 0,005 UE/mL pour la méthode en point final. Le Pyrochrome® est exclusivement destiné à des fins diagnostiques *in vitro*. Il n'est pas destiné au diagnostic d'une endotoxémie chez l'humain. La toxicité du Pyrochrome® n'a pas été déterminée. On a cependant rapporté qu'un contact prolongé ou répété du LAL avec la peau a entraîné une réaction allergique de type I chez certaines personnes (15). Il faut donc prendre des précautions lors de la manipulation du Pyrochrome®.

Procédure de reconstitution :

- Tapoter délicatement le flacon de Pyrochrome® pour faire tomber le produit en vrac au fond du flacon. Rompre le vide en soulevant le bouchon gris. Ne pas contaminer l'orifice du flacon. Retirer le bouchon et l'éliminer ; ne pas injecter au travers du bouchon et ne pas le réutiliser. La présence d'une petite quantité de poudre de LAL sur le bouchon n'affecte pas le test.
- Reconstituer le Pyrochrome® avec 3,2 mL de tampon Pyrochrome® ou de tampon Glucashield® (disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.). Pour obtenir une sensibilité de 0,001 UE/mL avec un lecteur de microplaque, il est nécessaire de reconstituer le Pyrochrome® avec du Glucashield®. Il est possible d'obtenir cette même sensibilité avec soit du tampon de reconstitution Pyrochrome®, soit du tampon Glucashield® dans un lecteur de tube. La solubilisation du lyophilisat prend quelques minutes ; il faut donc le réhydrater au moins 5 minutes avant l'utilisation. Tournoyer le flacon pour homogénéiser la solution ; ne pas agiter vigoureusement afin d'éviter la formation excessive de mousse et une perte de sensibilité. En dehors des périodes d'utilisation, couvrir le flacon avec du Parafilm M® et conserver au froid (entre 2 et 8 °C). Le Pyrochrome® doit être utilisé dans les 8 heures qui suivent la reconstitution.

Conditions de stockage

Le Pyrochrome® lyophilisé est relativement stable ; conservé correctement, il préserve toute son activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Conserver le produit entre 2 et 8 °C. Une température supérieure à 37 °C peut entraîner une détérioration rapide du Pyrochrome® lyophilisé comme indiqué par une perte de sensibilité et un net jaunissement du produit. Le Pyrochrome® est livré dans des conteneurs isothermes pour le protéger des températures élevées. Avant la reconstitution, le Pyrochrome® est sensible à la lumière et doit être conservé dans l'obscurité.

Le Pyrochrome® reconstitué est généralement transparent et légèrement opalescent. Certains lots peuvent parfois montrer une légère turbidité homogène. La présence de petites fibres ou de filaments n'est pas indicatrice d'une contamination et n'affecte pas l'activité ; cependant, un précipité floconneux ou un net jaunissement indique une détérioration du réactif, qui ne doit pas être utilisé. Le Pyrochrome® reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé ; les flacons peuvent être conservés maximum 8 heures entre 2 et 8 °C. Noter qu'il peut être nécessaire d'utiliser un réactif fraîchement reconstitué pour obtenir une sensibilité maximale. Ne pas congeler le Pyrochrome® reconstitué.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés aseptiquement dans des conteneurs exempts d'endotoxines détectables. Pour minimiser l'adsorption d'endotoxines sur les surfaces du conteneur, il est recommandé d'utiliser des flacons en verre réutilisables dépyrogénés ou des flacons stériles jetables en polystyrène ou en polyéthylène téréphtalate (PET). Tous les conteneurs en plastique ne sont pas exempts d'endotoxines détectables. De plus, des substances diffusées par certains plastiques peuvent interférer avec le test. L'adéquation du matériel de laboratoire doit être testée en sélectionnant de manière aléatoire des flacons d'un lot. Rincer ces flacons avec un petit volume d'eau pour réactif LAL (ERL) à température ambiante pendant une heure, et tester l'eau de rinçage comme un échantillon. L'eau de rinçage doit contenir significativement moins d'endotoxines que la plus faible concentration d'étalon à utiliser. En outre, l'eau de rinçage ne doit pas inhiber ni augmenter le test, ce qui se vérifie en testant la récupération d'une quantité connue d'endotoxines ajoutées. Le pH du mélange réactionnel (un volume d'échantillon, ou d'échantillon dilué, mélangé avec un volume

égal de Pyrochrome®) doit être compris entre 6 et 8. Ajuster le pH de l'échantillon avec du HCl, du NaOH ou un tampon (exempt d'endotoxines détectables). Diluer du HCl ou du NaOH concentré avec de l'ERL de façon à obtenir une concentration appropriée et utiliser un volume n'entraînant pas de dilution significative de l'échantillon analysé. Si un précipité se forme dans l'échantillon lors de l'ajustement du pH, diluer l'échantillon (sans dépasser la DMV – voir la section « Limites de la procédure ») avant d'ajuster le pH. Ne pas ajuster le pH d'eau ou de sérum physiologique non tamponné. La dilution à elle seule peut permettre de remédier aux problèmes de pH.

Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent les ions, se lient aux endotoxines ou modifient l'état hydrophobe des endotoxines peuvent interférer avec le test. Une interférence peut être détectée par une augmentation ou une diminution significative de la récupération d'endotoxines, par rapport à ce qui est attendu, après l'ajout d'une quantité connue d'endotoxine étalon à l'échantillon (voir la section « Limites de la procédure »). Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon réduit la concentration et l'activité des substances interférentes et génère des résultats de test valides. Les contrôles appropriés et les schémas de dilution sont présentés dans la section « Procédure de test ». Les échantillons doivent être testés le plus rapidement possible après le prélèvement. Il est conseillé de congeler les échantillons non stériles qui doivent être conservés ou transportés avant le test. Les échantillons censés contenir de faibles concentrations d'endotoxines doivent être testés pour une perte d'endotoxines pendant le stockage.

Procédure de test

Réactifs de test fournis avec le Pyrochrome®

- Pyrochrome®* (voir la description plus haut dans les sections « Réactif » et « Procédure de reconstitution »).
- Tampon de reconstitution Pyrochrome®* (n° de référence C1500 seulement). Utiliser le tampon pour reconstituer le Pyrochrome® comme décrit plus haut.
- Tampon de reconstitution Glucashield®* (n° de référence CG1500 seulement). Utiliser le tampon pour reconstituer le Pyrochrome® comme décrit plus haut.
- Endotoxine étalon de contrôle* (EEC) - Kit de diazotation (CD060) uniquement : Chaque flacon d'EEC contient 10 ng. Reconstituer l'EEC avec le volume spécifié sur le certificat d'analyse (CA indiquant la puissance de l'EEC). L'EEC est spécialement formulée pour une solubilisation rapide. Après l'ajout de l'ERL, mélanger le flacon avec un agitateur vortex pendant 30-60 secondes. L'EEC est alors prête à l'utilisation. Si l'utilisation n'est pas immédiate, mélanger le flacon avec un agitateur vortex pendant 30 secondes avant l'utilisation. Procéder ensuite aux dilutions appropriées pour obtenir les concentrations désirées d'endotoxines. Mélanger à l'agitateur vortex entre les dilutions. Conservée entre 2 et 8 °C, l'EEC reconstituée reste stable pendant sept jours. Ne pas congeler l'EEC reconstituée.

Chaque flacon d'EEC contient l'endotoxine non l'activité a été déterminée par rapport à l'endotoxine étalon de référence (EER) des États-Unis et est indiquée sur le CA. L'endotoxine étalon de référence de l'USP (identique à l'EER) peut être obtenue auprès de l'U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.

Remarque : Le CA et la puissance indiquée sur ce certificat sont spécifiques d'une combinaison du lot de Pyrochrome® et du lot d'EEC. Un lot donné d'EEC peut donner des puissances différentes (UE/ng) lors de tests avec différents lots de Pyrochrome® ou avec du Pyrotell ou du Pyrotell-T. De même, différents lots d'EEC montrent généralement des puissances différentes lors de tests avec le même lot de Pyrochrome®. **S'assurer d'utiliser la puissance et le CA corrects.**

Utiliser l'EEC pour la préparation des concentrations d'endotoxine étalon qui permettent d'établir les courbes d'étalonnage, pour des contrôles positifs et pour des contrôles positifs de produit (contrôles d'interférence). Ne pas utiliser cette EEC de 10 ng/flacon comme contrôle de dépyrogénéation.

- Réactifs de diazotation* - Kit de diazotation (CD060) uniquement : flacon 1a, HCl ; flacon 1, nitrite de sodium ; flacon 2, sulfamate d'ammonium ; flacon 3, NEDA. Reconstituer le flacon 1 avec l'ensemble du contenu du flacon 1a ; reconstituer le flacon 2 avec 4 mL d'eau ; reconstituer le flacon 3 avec 4 mL d'eau. Voir la section 5 ci-dessous pour la qualité d'eau requise.

Réactifs de test non fournis avec le Pyrochrome®

- Endotoxine étalon de contrôle* (EEC). (Associates of Cape Cod, Inc., numéro de référence EC010). Reconstituer l'EEC avec le volume spécifié sur le certificat d'analyse (CA indiquant la puissance de l'EEC) et comme indiqué dans la notice. Suivre les instructions de la notice pour l'utilisation et le stockage de l'endotoxine étalon. La puissance de l'EEC a été déterminée par rapport à l'endotoxine étalon de référence (EER) des États-Unis et est indiquée sur le CA. L'endotoxine étalon de référence de l'USP (identique à l'EER) peut être obtenue auprès de l'U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. **Remarque :** Le CA et la puissance indiquée sur ce certificat sont spécifiques d'une combinaison du lot de Pyrochrome® et du lot d'EEC. Un lot donné d'EEC peut donner des puissances différentes (UE/ng) lors de tests avec différents lots de Pyrochrome®, du Pyrotell ou d'autres marques de réactif LAL (1). De même, différents lots d'EEC montrent généralement des puissances différentes lors de tests avec le même lot de Pyrochrome®. **S'assurer d'utiliser la puissance et le CA corrects.**

Utiliser l'EEC pour préparer les dilutions d'endotoxine étalon qui permettent

d'établir les courbes d'étalonnage, pour les contrôles positifs et pour les contrôles positifs de produit (contrôles d'interférence).

- Eau pour réactif LAL* (ERL). Associates of Cape Cod, Inc. est l'un des fabricants recommandés (plusieurs tailles et configurations d'emballage sont disponibles). On peut également utiliser de l'eau stérile pour injection de l'USP exempte de bactériostatique ou de l'eau pour irrigation de l'USP, disponibles dans le commerce, à condition d'avoir démontré que ces eaux sont acceptables pour une utilisation comme ERL. La concentration maximale en endotoxines de l'eau stérile pour injection de l'USP n'est que de 0,25 UE/mL ; l'eau stérile pour injection peut donc contenir des endotoxines détectables et ne pas convenir à l'utilisation.

Pour certifier que l'eau est acceptable comme ERL, il faut la tester comme échantillon avec un contrôle positif de produit (voir la section 1.c. dans la section « Contrôles »). Utiliser une ERL certifiée pour les dilutions des étalons et préparer les contrôles positifs (voir les sections 1.a. et 1.b. dans la section « Contrôles »). Établir une courbe d'étalonnage à partir des temps de réaction ou des tests en point final pour les étalons. Le coefficient de corrélation doit être d'au moins 0,980 (valeur absolue). La concentration d'endotoxines de l'eau testée peut être estimée par extrapolation de la courbe d'étalonnage au-dessous de la plus basse concentration d'endotoxines ; elle doit être significativement inférieure à celle de l'étalon à la plus faible concentration. En outre, la concentration d'endotoxines du contrôle positif de produit doit être à ± 25 % de celle du contrôle positif.

- Tampon Glucashield®*. Disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc. (n° de référence GB051), ce tampon peut être utilisé à la place du tampon de reconstitution Pyrochrome® pour éviter une interférence des (1→3)-β-D-glucanes.

- Acide acétique à 50 %* (pour la méthode en point final). Préparer la solution en ajoutant un volume d'acide acétique glacial à un volume égal d'eau distillée ou d'eau obtenue par osmose inverse. (On peut utiliser de l'ERL, voir la section 2. ci-dessus, mais ce n'est pas obligatoire.)

- Eau* (pour la reconstitution des réactifs de diazotation uniquement). Toute source d'eau distillée (y compris l'ERL), d'eau désionisée ou d'eau obtenue par osmose inverse pour laboratoire est acceptable. Il n'est pas nécessaire que cette eau soit exempte d'endotoxines puisqu'elle est utilisée uniquement pour la diazotation.

Matériel et équipement

- Microplaques*. Microplaques couvertes de 96 puits (disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., n° de référence CA961). Les plaques doivent être certifiées ou testées pour la contamination par des endotoxines et/ou des glucanes ; elles ne doivent provoquer ni inhibition, ni augmentation. Vérifier les microplaques avant de les utiliser et les jeter si elles sont rayées ou si d'autres interférences optiques sont remarquées sur les puits ou sur le bas des puits.
- Tubes à essai*. La méthode cinétique peut être réalisée sur un lecteur-incubateur de tube comme le Pyros Kinetix® Flex en utilisant des tubes de culture de 8 x 75 mm, en verre borosilicaté dépyrogéné (Associates of Cape Cod, Inc. n° de référence TK100). La méthode en point final peut également être réalisée dans des tubes de culture de 8 x 75 mm ou de 10 x 75 mm, en verre borosilicaté dépyrogéné (Associates of Cape Cod, Inc. n° de référence TK100 et TB050, respectivement).

- Lecteur optique* permettant une mesure à 405 nm, ou à 540-550 nm pour la méthode par diazotation. Pour la méthode cinétique, utiliser un lecteur-incubateur de microplaque, comme le BioTek® ELx808™ ou le Molecular Devices VersaMax™, ou un lecteur de tube comme le lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc. n° de référence PKF32, PKF64 et PKF96).

Pour la méthode en point final, utiliser un lecteur de microplaque pour la mesure des microplaques ou, si le test est réalisé dans des tubes, un spectrophotomètre avec des cuvettes adéquates.

- Incubateur* permettant de maintenir 37±1 °C (requis uniquement pour la méthode en point final). Il est recommandé d'utiliser un socle incubateur sec pour microplaques (ou tubes, selon le cas). (On peut utiliser un bain d'eau pour la méthode en point final en tube à essai.) Les incubateurs doivent distribuer uniformément la chaleur.

- Portoirs pour tubes à essai* pour tenir et/ou incuber les tubes de dilution et les tubes à essai.

- Pipettes*, micropipettes avec embouts de pipette (les pipettes multicanaux sont utiles en cas d'utilisation de microplaques) ou pipettes automatiques avec corps de seringue en plastique. Il est recommandé d'utiliser des pipettes et embouts jetables exempts d'endotoxines et de glucanes, des substances interférentes. Associates of Cape Cod, Inc. propose la gamme de produits Pyroclear®, certifiée exempte d'endotoxines et de glucanes interférentes.

- Agitateur de type vortex*.

- Parafilm M®* (American National Can™). Le côté en contact avec la feuille de papier est typiquement exempt d'endotoxines détectables.

- Tubes à essai* exempts d'endotoxines interférentes avec une capacité adéquate pour préparer les dilutions de l'étalon d'endotoxines et des échantillons analysés. Pour les conteneurs convenant aux dilutions, voir la section « Prélèvement et préparation des échantillons ».

