

<h1>Lysat d’amœbocytes de limule</h1>
PYROCHROME®
<p>Fabriqué par : ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED 124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536</p>
<p>Téléphone : +1 (508) 540-3444 Numéro vert : +1 (800) 395-2221 Fax : +1 (508) 540-8680 Assistance technique : +1 (800) 848-3248 Service clientèle : +1 (800) 525-8378</p>
<p>PN000856-fr rev4</p>
<p>Oct. 2019</p>

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 être utilisé pour (1) le test en point final de « médicaments injectables à usage humain (y compris les produits biologiques), de médicaments injectables à usage animal 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 libère 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.

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. Si la courbe d’étalonnage par régression linéaire satisfait à tous les critères d’acceptation, des courbes d’étalonnage peuvent également être établies en utilisant la régression polyno-miale.

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 structuel 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 paranitroamide, 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).

Réactif

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.

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.

- 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).

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 ».

- Étuve à air chaud avec une capacité de chauffage à au moins 250 °C pour la dépyrogénéation de la verrerie. Les cycles habituellement utilisés pour la dépyrogénéation assurent que tous les articles placés dans l’étuve soient exposés au minimum pendant 30 minutes à 250 °C (2, 16, 17).

Contrôles

Les contrôles permettent d’assurer la validité du test. Les procédures recommandées sont décrites par la FDA (1) et l’USP (2), l’EP (3) et la JP (4).

- Contrôles d’endotoxines.**

a. Série d’étalons d’endotoxines. Pour chaque test, préparer une nouvelle série de dilutions à partir de la solution mère d’endotoxines. Ne pas utiliser des dilutions préparées antérieurement et conservées, à moins d’avoir validé la stabilité de la plage des concentrations. Pratiquer les dilutions en série géométrique pour obtenir la plage désirée des concentrations d’endotoxines. Des dilutions par deux sont recommandées pour la méthode en point final ; on peut utiliser des dilutions plus importantes pour la méthode cinétique. La plus faible concentration d’endotoxines dans toute série d’étalons est la limite de détection du test particulier ; elle est désignée par λ (remarque : des limites de détection de 0,005 et de 0,001 UE/mL sont possibles avec le Pyrochrome® en utilisant la méthode en point final et la méthode cinétique, respectivement). Pour obtenir la plage des étalons requise, utiliser le plus petit nombre possible de dilutions, avec des volumes de pipette adéquats afin d’optimiser l’exactitude. Les dilutions peuvent être effectuées dans des tubes à essai constitués de verre ou d’un plastique adéquat, ou directement dans des microplaques. Les concentrations maximales détectées avec le Pyrochrome® dépendent de la méthode. Consulter les durées d’incubation recommandées disponibles pour le Pyrochrome® comme guide.

b. Un contrôle positif (concentration unique d’endotoxine étalon) doit être inclus si la série d’étalons (voir la section a. ci-dessus) n’est pas préparée de la même manière que les contrôles positifs de produit (voir la section c. ci-dessous). La concentration d’endotoxines du contrôle positif doit être égale à celle d’un étalon du milieu de la courbe d’étalonnage. Une valeur de 0,5 UE/mL devrait convenir pour des contrôles positifs inclus dans une série d’étalons comprenant des concentrations de 0,005, 0,05,

0,5, 5 et 50 UE/mL. Si un test ne comporte pas de série d'étalons, il faut inclure un contrôle positif pour vérifier que l'utilisation des paramètres d'une courbe d'étalonnage antérieure (archivée) convient au calcul des concentrations d'endotoxines. Pour des informations détaillées, se reporter aux directives de la FDA (1) dans la section « Routine Testing of Drugs by the LAL Test » (Test de routine des médicaments avec le test LAL). Le contrôle positif doit être préparé dans de l'eau de la même manière que le contrôle positif de produit (CPP) dans le produit.

c. Les contrôles positifs de produit sont des contrôles d'inhibition/augmentation ; il s'agit d'une dilution de l'échantillon ou de l'échantillon lui-même auquel on a ajouté de l'endotoxine étalon. La concentration des endotoxines ajoutées dans l'échantillon analysé doit être identique à celle du contrôle positif. Voir la section b. ci-dessus pour la sélection d'une concentration appropriée d'endotoxines pour le contrôle positif de produit. L'ajout d'endotoxines à l'échantillon est souvent qualifié de « dopage » (échantillon « dopé »).

2. Contrôles négatifs.

Des contrôles négatifs constitués d'ERL doivent être inclus dans chaque test.

Préparation de l'échantillon - Détermination de la dilution du test

Si un protocole de test a été développé auparavant pour le type d'échantillon à analyser, procéder à la dilution nécessaire pour le test et suivre les consignes de la section « Réalisation du test ». Si un protocole n'a pas été développé pour le type d'échantillon, procéder à une série de dilutions par dix de l'échantillon. Ne pas dépasser la dilution maximale valide du produit de plus d'un facteur 10. Se reporter à la section « Limites de la procédure » ci-dessous ou aux directives de la FDA (1) pour l'explication et le calcul de la dilution maximale valide (DMV) et de la concentration minimale valide (CMV). Préparer des dilutions appropriées de tous les échantillons avec un contrôle positif de produit pour chaque échantillon.

Réalisation du test

Observer une technique reproductible pour obtenir des résultats satisfaisants. Tous les contrôles et tous les échantillons doivent être testés au moins en double. Prendre des précautions pour éviter la contamination pendant la préparation du test. L'équipement doit être correctement étalonné et validé pour assurer des températures d'incubation uniformes.

1. Préparer l'instrumentation de test selon les besoins. En cas d'utilisation d'un système automatisé, cette phase comporte généralement une saisie des descripteurs des échantillons, la configuration des paramètres du test et l'allumage de l'incubateur réglé à 37 °C.

2. Ajouter au conteneur de réaction le volume approprié d'échantillon (contrôle négatif, étalon d'endotoxines, échantillon ou contrôle positif de produit) pour obtenir un rapport approprié avec l'ajout de Pyrochrome[®] (voir la section 3. ci-dessous).

Série de tests dans un lecteur de microplaque : un rapport lysat/échantillon de 1/1 est utilisé. Pour des performances optimales, utiliser un volume de 0,05 mL d'échantillon pour les méthodes suivantes : cinétique, point final ou diazotation. Sinon, il est possible d'utiliser 0,1 mL pour la méthode cinétique et la méthode en point final, même s'il est recommandé d'utiliser 0,05 mL pour obtenir la sensibilité maximale ou pour une courbe d'étalonnage sur une grande plage (plage supérieure à trois logarithmes).

Série de tests dans le lecteur de tube Pyros Kinetix[®] Flex : il est possible d'utiliser un rapport lysat/échantillon de 1/1 ou de 1/4. Un volume d'échantillon de 0,1 mL est requis pour les séries de tests utilisant un rapport réactif Pyrochrome[®] LAL/échantillon de 1/1. Pour les tests dans le lecteur de tube Pyros Kinetix[®] Flex qui utilisent un rapport réactif Pyrochrome[®] LAL/échantillon de 1/4, le volume d'échantillon doit être de 0,2 mL.

3. Ajouter le Pyrochrome[®] de manière appropriée, en fonction de la méthode et mélanger. Un mélange inadéquat est une cause fréquente de résultats de test insatisfaisants. La plupart des lecteurs de plaque disposent d'une fonction d'agitation.

a. Pour une microplaque, un rapport lysat/échantillon de 1/1 est utilisé et le volume de Pyrochrome[®] ajouté est égal au volume d'échantillon (voir la section 2. ci-dessus ; en général, 0,05 mL). Ajouter le Pyrochrome[®] le plus rapidement possible à tous les échantillons et mélanger pendant 5 à 30 secondes. Déposer la plaque sur un socle incubateur (pour un test en point final) ou dans un lecteur-incubateur de microplaque (pour un test cinétique). Lire la plaque avec le couvercle retiré.

b. Pour les méthodes utilisant des tubes à essai ou des cuvettes individuels, le volume de Pyrochrome[®] ajouté peut soit être égal au volume d'échantillon (0,1 mL dans un lecteur de tube Pyros Kinetix[®] Flex), soit correspondre à un quart du volume d'échantillon (0,05 mL dans un lecteur de tube Pyros Kinetix[®] Flex). Important : la durée de la réaction doit être la même pour tous les tubes. Dans le cas du lecteur de tube Pyros Kinetix[®] Flex, l'instrument détecte le tube à essai dès son insertion et démarre le chronométrage. Dans chaque conteneur de réaction à son tour, ajouter le Pyrochrome[®], mélanger pendant environ 2 secondes et placer le conteneur dans l'incubateur (pour la méthode en point final) ou dans le lecteur de tube (pour la méthode cinétique).

Que des microplaques ou des tubes à essai soient utilisés, une pipette automatique facilite l'ajout de Pyrochrome[®].

Prendre des précautions pour éviter la contamination du flacon de Pyrochrome[®] lors de la manipulation du réactif.

4. Lecture du résultat du test.

a. Pour la méthode cinétique, laisser le test réagir jusqu'à ce que tous les échantillons soient incubés pendant une durée significativement plus longue que le temps nécessaire pour que la plus faible concentration d'endotoxine étalon atteigne la DO405 de réaction. Les systèmes de test automatisés arrêtent généralement le test après une période prédéfinie. Demander les durées d'incubation recommandées comme guide.

b. Pour la méthode en point final, chronométrer précisément l'incubation, sortir la plaque ou les tubes à essai de l'incubateur, arrêter la réaction avec de l'acide acétique à 50 % (volume suffisant pour obtenir une concentration finale de 10 % d'acide acétique ; utiliser 0,025 mL pour un volume d'échantillon/Pyrochrome[®] de 0,05 mL) et lire la densité optique (DO) dans un spectrophotomètre ou un lecteur de microplaque (selon le cas) à 405 nm. Configurer le test et la mesure de manière à ce que la durée d'incubation soit identique (à ± 30 secondes près) pour chaque échantillon. La période d'incubation dépend de la plage des concentrations d'endotoxines désirée ; elle peut différer en fonction du lot de Pyrochrome[®]. Des tests préalables peuvent être nécessaires pour déterminer la durée d'incubation adéquate. Se reporter aux durées d'incubation recommandées comme guide.

Des tests préalables peuvent être nécessaires pour déterminer la durée d'incubation adéquate.

Résultats

1. Calculs préliminaires.

Pour la méthode cinétique, déterminer les temps pris par les échantillons pour atteindre un seuil de densité optique particulier (généralement 0,03 unités de DO) après avoir procédé à toutes les corrections de données. Les mesures de densité optique doivent être exprimées relativement à une mesure initiale considérée comme valant zéro unité de DO. Beaucoup de lecteurs de microplaque sont munis de logiciels qui procèdent à ces calculs. Le temps nécessaire pour atteindre la valeur de DO est appelé temps de réaction.

2. Établissement d'une courbe d'étalonnage.

a. Pour la méthode cinétique, établir une courbe d'étalonnage par régression du logarithme du temps de réaction en fonction du logarithme de la concentration d'endotoxines pour les étalons. L'équation de la droite de régression décrit la courbe d'étalonnage.

À condition que la valeur absolue du coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage soit d'au moins 0,980 (voir le point 2. de la section « Interprétation » ci-dessous), il est possible d'utiliser une équation linéaire de régression polynomiale (c'est-à-dire quadratique) de second degré/ordre pour calculer les concentrations d'endotoxines.

b. Pour la méthode en point final, établir une courbe d'étalonnage en reportant les mesures de densité optique en fonction des concentrations d'endotoxine étalon.

3. Calcul des concentrations d'endotoxines.

Calculer les concentrations d'endotoxines de tous les échantillons (y compris les étalons et les contrôles) en utilisant l'équation d'une droite

Y = aX + b modifiée en X = (Y – b) / a

où :

Y = logarithme du temps de réaction (méthode cinétique), ou densité optique (méthode en point final)

X : Méthode cinétique : X = logarithme de la concentration d'endotoxines (il est nécessaire de déterminer l'antilogarithme de X pour obtenir la concentration d'endotoxines)

Méthode en point final : X = concentration d'endotoxines

a = pente de la droite

b = ordonnée à l'origine

Multiplier la concentration d'endotoxines calculée à partir de la droite d'étalonnage par le facteur de dilution de l'échantillon pour obtenir la concentration de l'échantillon initial non dilué.

Ces calculs sont souvent effectués par le logiciel du test d'endotoxine.

Interprétation

1. Pour que le test soit valide, la concentration d'endotoxines des contrôles négatifs (estimée par extrapolation de la courbe d'étalonnage) doit être significativement inférieure à la plus faible concentration d'étalon.

2. Le coefficient de corrélation pour la courbe d'étalonnage incluse dans le test doit avoir une valeur absolue d'au moins 0,980.

3. La concentration moyenne d'endotoxines mesurée des contrôles positifs (pour la vérification d'une courbe archivée) doit se situer à maximum 25 % de la concentration nominale. Par conséquent, si le contrôle positif contient 0,125 UE/mL, la concentration mesurée doit se situer entre 0,09375 et 0,15625 UE/mL.

4. Les concentrations d'endotoxines peuvent être rapportées uniquement pour la plage située entre la plus faible et la plus forte concentration d'endotoxine étalon. Les résultats des échantillons situés en dehors de la plage doivent être rapportés comme inférieurs à la plus faible concentration d'étalon (non détectables) ou supérieurs à la plus forte concentration d'étalon.

Pour la méthode en point final, les concentrations valides d'endotoxines peuvent uniquement être calculées à partir des valeurs de DO qui se situent dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage.

5. Pour démontrer que l'échantillon n'interfère pas de manière significative avec la réaction LAL-endotoxines, la concentration d'endotoxines mesurée du contrôle positif de produit doit se situer entre 50 et 200 % de la concentration nominale des endotoxines provenant du dopage. Avant de déterminer si les endotoxines provenant du dopage sont récupérées dans ces limites, soustraire la concentration d'endotoxines mesurée dans l'échantillon non dopé. Par exemple, pour que l'échantillon soit considéré comme exempt d'interférence significative, la concentration d'endotoxines mesurée dans un contrôle positif de produit de 0,125 UE/mL (après soustraction des endotoxines éventuellement présentes dans l'échantillon non dopé) doit se situer dans la plage 0,0625-0,25 UE/mL (50 à 200 % de 0,125 UE/mL). Si la concentration d'endotoxines mesurée dans l'échantillon non dopé est de 0,028 UE/mL et que celle du contrôle positif de produit est de 0,163 UE/mL, la concentration d'endotoxines provenant du dopage vaut 0,163 – 0,028 = 0,135 UE/mL ; elle se situe dans la plage et, si toutes les autres exigences sont satisfaites, le test de l'échantillon est valide.

Limites de la procédure

La procédure est limitée par l'importance de la capacité d'inhibition ou d'augmentation de l'échantillon pendant le test. Si la procédure ne peut pas être validée (1, 2) à une concentration d'échantillon qui est supérieure à la concentration minimale valide (CMV), le test des endotoxines des bactéries utilisant le réactif LAL ne peut pas remplacer le test d'apyrogénicité de l'USP. La CMV est calculée comme suit :

C
M
V
=

(
λ
)
(
d
o
s
e
d
'
é
c
h
a
n
t
i
l
l
o
n
)

(
l
i
m
i
t
e
d
e
t
o
l
é
r
a
n
c
e
a
u
x
e
n
d
o
t
o
x
i
n
e
s
)

{\displaystyle \ CMV ={\frac {(\lambda)(dose\ d'\ échantillon)}{(limite\ de\ tolérance\ aux\ endotoxines)}}}

où λ est exprimé en UE/mL, la dose d'échantillon en unités par kg de poids corporel, et la limite de tolérance aux endotoxines en UE/kg.

La dilution maximale valide (DMV) est la dilution d'échantillon contenant la CMV (1). Elle se calcule en divisant la concentration initiale de l'échantillon par la CMV.

La limite de tolérance aux endotoxines est de 0,2 UE/kg pour les médicaments administrés par voie intrathécale, et de 5 UE/kg pour tous les autres médicaments administrés par voie parentérale. La limite pour les dispositifs médicaux est exprimée par rapport au volume, en mL, d'extraction ou de rinçage obtenu comme décrit dans l'USP (18), sur base des limites pour les dispositifs. Pour les dispositifs qui n'entrent pas en contact avec le liquide céphalorachidien, la limite est de 20 UE/dispositif ; pour ceux qui entrent en contrat avec le liquide céphalorachidien, la limite est de 2,15 UE/dispositif. Conformément aux recommandations de la FDA (1), la limite pour les dispositifs liquides est la même que pour les médicaments.

Certaines protéases à sérine (comme la trypsine, les facteurs sanguins activés) entraînent un résultat faussement positif à moins qu'elles n'aient été dénaturées (par exemple, par un traitement thermique) avant le test. Les substances à coloration jaune comme un sérum animal, l'albumine et le plasma peuvent interférer avec un test chromogène basé sur la pNA. Pour ces produits, utiliser le test par diazotation (Associates of Cape Cod, Inc. n° de référence CD060). Une turbidité excessive dans un échantillon peut également interférer avec le test.

Valeurs attendues

Les endotoxines dans des échantillons peuvent être quantifiées dans la plage des concentrations d'endotoxine étalon utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. S'il est nécessaire de diluer l'échantillon pour éviter une inhibition ou une augmentation, la plus petite quantité d'endotoxine détectable augmente en conséquence. Même après une purification biochimique, les substances issues de sources biologiques peuvent encore contenir des taux mesurables d'endotoxines. Si la purification a été correctement effectuée et si l'eau n'a pas été contaminée après la production, l'eau obtenue par distillation, osmose inverse ou ultrafiltration peut contenir des concentrations d'endotoxines inférieures aux concentrations détectables.

Références

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

2. Bacterial Endotoxins Test, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.

4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.

5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.

6. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus* polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.

7. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.

8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.

9. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.

10. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.

11. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. 81:1567-1569.

12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.

13. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.

14. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125- 136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.

16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.

17. Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.

18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Notre équipe expérimentée est à votre disposition pour discuter des aspects pratiques et théoriques du test LAL.

Veillez nous contacter pour toute question relative à l'utilisation du Pyrochrome[®]. Nous nous engageons à remplacer tout produit dont les performances ne sont pas conformes aux spécifications ; contacter le service clientèle avant le renvoi du produit.