UNIVERSITE DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1991 THESE N° 335

RECHERCHE DES ENDOTOXINES PAR LE LIMULUS TEST

THESE

POUR LE

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 30 Septembre 1991

par

Johanna STROECKEN

née le 6 Septembre 1966 à St-Léonard-de-Noblat (H.-V.)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur J.-A. NICOLAS, *Professeur* ..... PRESIDENT
Madame C. BOSGIRAUD, *Maître de Conférences* ..... JUGE
Madame J. NOUYRIGAT, *Biologiste* ..... JUGE

U N I V E R S I T E D E L I M O G E S

F A C U L T E D E P H A R M A C I E

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er Assesseur)
  Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2e Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie Fondamentale
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
OUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

A Monsieur le Professeur J. A. NICOLAS,

Professeur des Universités de Bactériologie
et Virologie, Paritologie

Vous avez accepté la Présidence
de ma thèse,

Veuillez y trouver l'expression
de mes sincères remerciements.

À Madame C. BOSGIRAUD,

Maître de Conférences des Universités
de Bactériologie

Vous m'avez fait l'honneur de
diriger mon travail et d'accepter
de le juger,

Je tiens à vous exprimer tous mes
remerciements.

A Madame J. NOUYRIGAT,

Responsable du laboratoire de Biologie
de "RHONE POULENC RORER PHARMA SPECIALITES"
Unité de Maisons-Alfort

Vous m'avez fait l'honneur de
m'accepter dans votre Service,

Je vous remercie pour vos conseils
prodigués tout au long du stage

A Marie-Christine,

Pour sa gentillesse et son aide
lors de la réalisation de ce travail,

A Madame A. CIURLA,
A Madame J. RENAUD,

Pour leur disponibilité et leur aide
accordées lors de ce travail.

A ma Famille,

Qui m'a soutenue au cours de mes études.

A mes Amis,

Qui ont fait preuve d'indulgence.

A Philippe,

Pour son soutien affectueux.

P L A N

INTRODUCTION

1ERE PARTIE : Etude théorique

CHAPITRE I : GELIFICIATION

CHAPITRE II : CHROMOGENIE

CHAPITRE CONCLUSION ET APPLICATIONS

2EME PARTIE: Mise en application des différentes techniques

CHAPITRE I : GELIFICATION EN POINT FINAL

CHAPITRE II : TURBIDIMETRIE

CHAPITRE III : DOSAGE CHROMOGENIQUE POINT FINAL

CHAPITRE IV : DOSAGE CHROMOGENIQUE CINETIQUE

3EME PARTIE : Choix d'une technique pour le dosage des endotoxines

CHAPITRE I : COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE DOSAGE

CHAPITRE II : ETUDE DES BESOINS D'UN LABORATOIRE

CONCLUSION

INTRODUCTION

Le test LAL permet la détection qualitative d'endotoxine. Le LAL (Lysat d'Amoébocyte de Limule) est préparé à partir du Limulus Polyphemus.

Le Limulus Polyphemus, ou crabe fer à cheval, est un arthropode présent dans les eaux littorales atlantiques américaines. Il se présente sous la forme d'un crustacé vert olivâtre de 60 centimètres, pesant plusieurs kilogrammes. Sur sa face ventrale, on observe un appendice caudal en forme d'aiguillon. (2)

Le Limulus possède une hémolymphe véhiculant des éléments figurés de la taille d'un macrophage humain appelés amoebocytes. Ces cellules contiennent des granules denses qui sont libérées lors d'une lyse et engendrent une coagulation. Il s'agit d'un polypeptide, le coagulogène, de structure rectiligne avec quelques liaisons di-sulfures et d'un poids moléculaire de 27000. Chez le Limulus Polyphemus, le coagulogène se compose approximativement de 215 acides aminés.

Il peut se scinder en deux peptides :

- un peptide C, soluble, de 45 acides aminés et contenant l'extrémité COOH de la chaîne,

- un peptide insoluble de 170 acides aminés, appelé la coaguline.

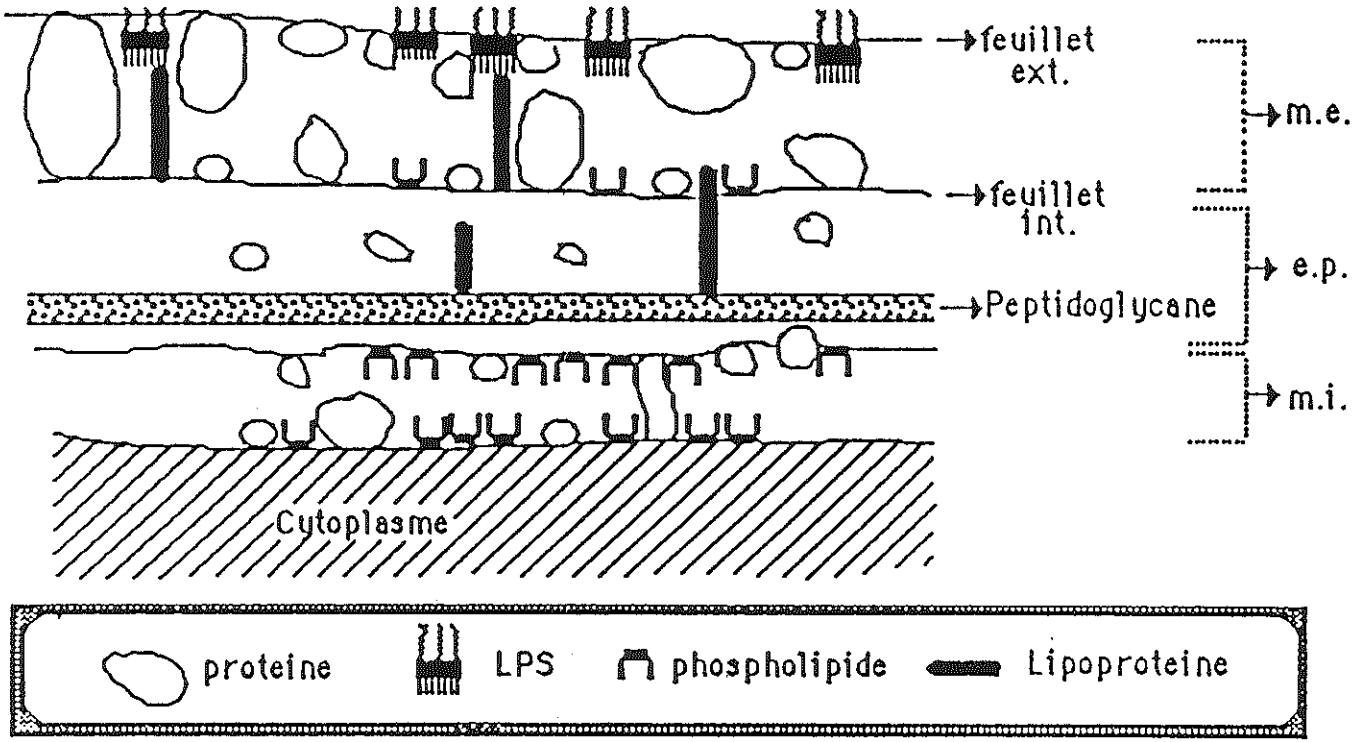
C'est la coaguline qui peut ensuite se polymériser pour former un gel stable.

Ce mécanisme de clivage du coagulogène fait appel à des enzymes pré-coagulants.

Les Limulus Polyphemus sont pêchés puis, par ponction cardiaque, on prélève l'hémolymphe. Le prélèvement est ensuite centrifugé et on recueille le culot contenant les amoebocytes. Ces cellules sont alors lavées puis lysées par contact avec de l'eau distillée ou un autre procédé tel que le chloroforme.

Le lysat sert à préparer les différents réactifs utilisés pour les tests LAL.

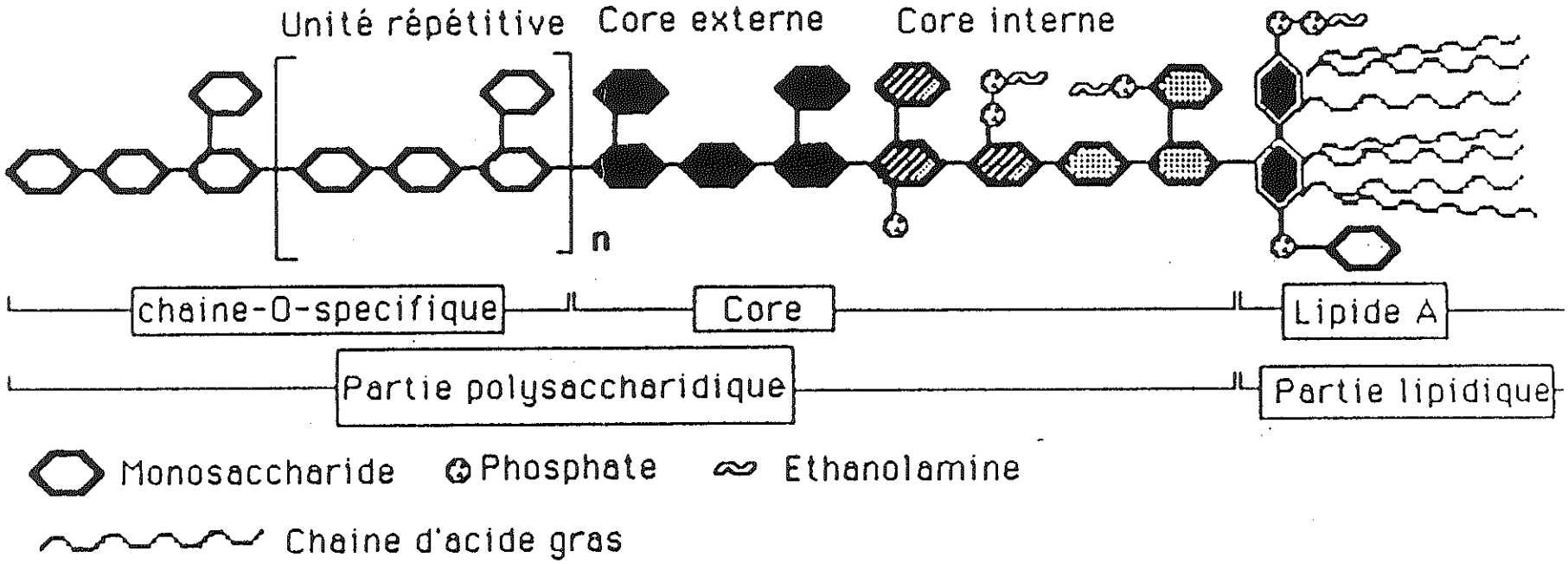
In vitro, on obtient la gélification du lysat en ajoutant d'infimes quantités d'endotoxines. Les endotoxines sont des **LIPOPOLYSACCARIDES** qui sont présents dans la membrane des bactéries gram négatives.



Organisation de la paroi des bactéries GRAM - et localisation schématique des LPS d'après WECKESSER et coll. (4).
(m.i. = membrane interne, m.e. = membrane externe, e.p. = espace périplasmique.)

L'activité **PYROGENETIQUE** se situe au niveau du lipide A qui est relié à la partie **POLYOSIDIQUE** par le KDO (acide 2 Keto 3 desoxyoctonique).

Schéma structural du LPS de Salmonella selon LUDERITZ et Coll.



En avril 1989, la pharmacopée européenne a remplacé le test du lapin par le test LAL (Limulus Amoebocyte Lysat) pour la détection des endotoxines dans les eaux pour préparations injectables. A court terme, le test LAL devrait remplacer le test du lapin dans le contrôle final des solutions parentérales.

Il existe différentes techniques de dosages :

- gélification
- chromogénie.

Pour ces deux types de dosages,il existe deux possibilités :

- dosage en point final,
- dosage cinétique.

Actuellement la technique de référence est le dosage par gélification point final.

Il est intéressant d'étudier chaque technique afin de les comparer. Pour cela, nous réalisons une étude théorique qui est ensuite suivie d'une étude expérimentale.

1ERE PARTIE :

ETUDE THEORIQUE

CHAPITRE I - G E L I F I C A T I O N

L'addition d'une solution contenant des endotoxines à une solution de LAL provoque une turbidimétrie, une précipitation ou une gélification du mélange.

Si la réaction est arrêtée au bout d'un temps prédéterminé, c'est un dosage en point final. Nous observons alors la présence ou l'absence d'un gel ferme.

D'autre part, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en endotoxine. La mesure de la turbidimétrie dans le temps nous permet donc de définir la concentration en endotoxine : c'est le dosage cinétique ou turbidimétrique.

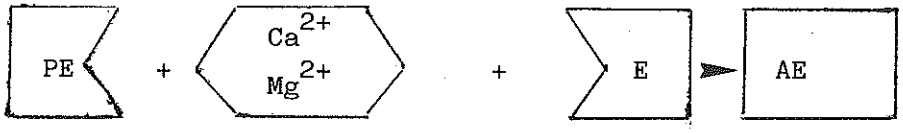
I - MECANISME DE LA REACTION LAL-ENDOTOXINES

(2)

La réaction nécessite la présence de certains cations bivalents, d'un système enzymatique favorisant la coagulation des protéines coagulables contenues dans le lysat.

Le mécanisme peut être schématisé ainsi :

a) Activation d'une enzyme précoagulable par les ions calcium et magnésium et les endotoxines :



PE = enzyme précoagulable, masse = 150 000

E = endotoxine

AE = enzyme de gélification = coagulase = enzyme activée, masse = 21 000

b) Hydrolyse du coagulogène par la coagulase

$$\text{coagulogène} \xrightarrow{\text{coagulase}} \text{coaguline} + \text{peptide C}$$

l'hydrolyse se fait au niveau de l'arginine.

c) Polymérisation de la coaguline

$$\text{coaguline} \xrightarrow{\text{polymérisation}} \text{gel} \quad (= \text{coagulum})$$

La vitesse de la réaction dépend de la concentration en endotoxine mais aussi du pH et de la température du mélange.

REMARQUES : (6)

- pH de la réaction :

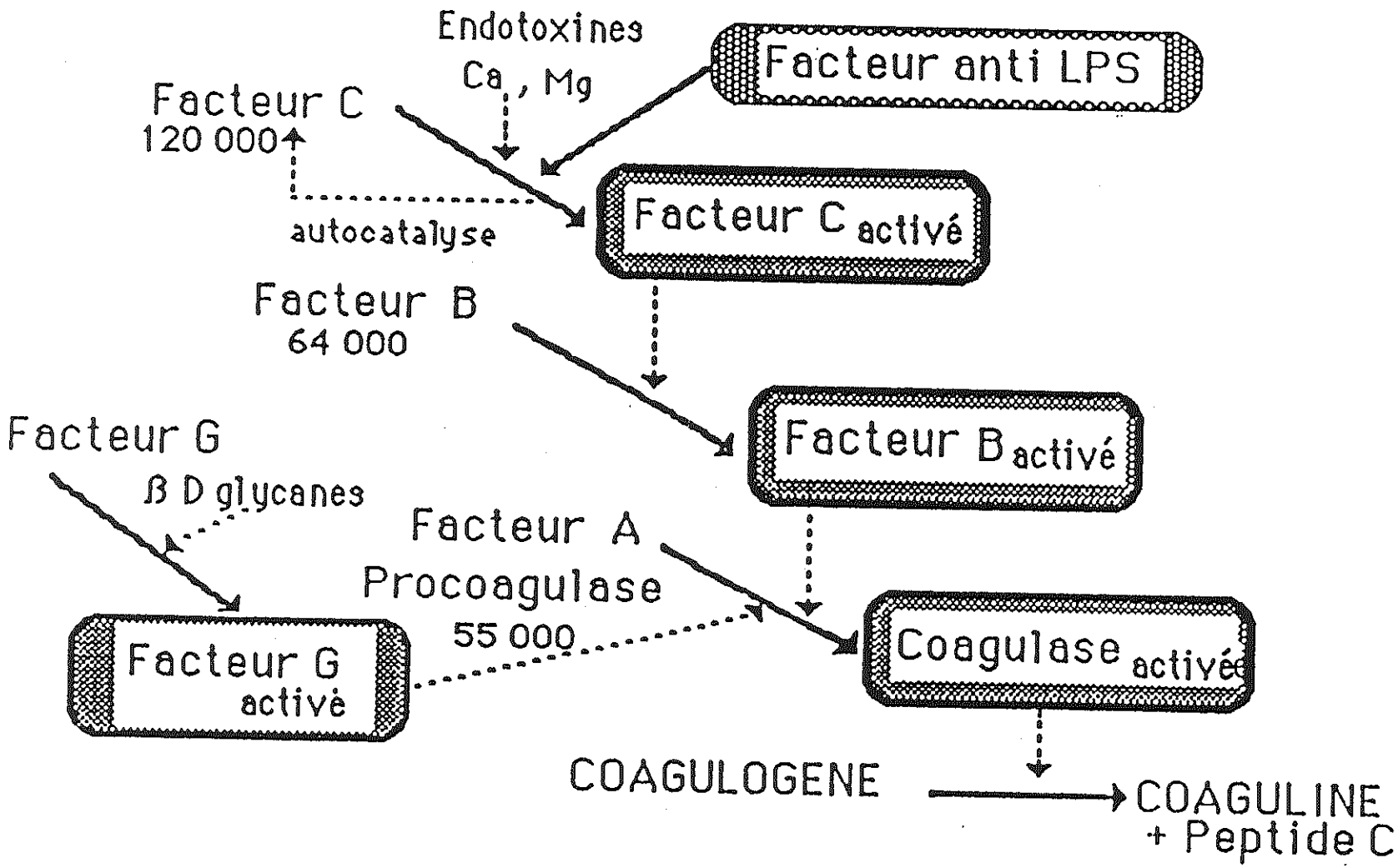
Le test LAL est une cascade de réactions enzymatiques qui n'ont lieu que dans des zones de pH bien définies et avec un pH optimum pour chaque étape. La gamme de pH varie de 6 à 8.

D'autre part, l'utilisation d'acide ou de base peut, par hydrolyse, réduire et même éliminer l'activité biologique des lipopolysaccharides en activant le lipide A. Ce dernier est attaché au coeur polyosidique par l'acide 2 Kéto 3 desoxyoctonique qui est un ose à 8 carbones spécifique des lipopolysaccharides bactériennes. L'hydrolyse acide agit sur cette liaison labile provoquant ainsi la libération du lipide A qui est alors insoluble dans les solvants aqueux d'où perte de son activité pyrogénétique. L'hydrolyse alcaline est une saponification des acides gras.

Il est donc important de respecter le pH de la réaction en se plaçant à un pH voisin de 7.

- Faux positifs :

Il faut savoir que dans le mécanisme de la gélation du LAL, il existe une voie alternative provoquant la formation de coaguline et ce en l'absence d'endotoxine. La formation du gel est alors due à la présence de ßD glucanes qui permet l'activation d'un facteur G contenu dans le lysat.



Mécanisme de la gélation du LAL d'après MORITA et coll

II - MATERIEL ET REACTIFS

A) MATERIEL :

a) Dosage en point final :

- bain-marie à 37° C, plus ou moins 1° C
- thermomètre de contrôle
- chronomètre
- agitateur type Vortex
- pH mètre
- micropipettes et embouts stériles
- tubes pour réaction et dilution
- pipettes de 2, 5 et 10 ml.

b) Dosage cinétique :

En plus du matériel utilisé pour le dosage en point final, nous utilisons un turbidimètre à lecture automatique qui est relié à un système informatique permettant le recueil des données et le calcul des résultats.

c) Remarques :

Tout le matériel en contact direct avec les essais doit être exempt d'endotoxine ou en contenir une quantité inférieure à la sensibilité déclarée du lysat.

Pour cela, le meilleur procédé est la chaleur sèche avec une température d'au moins 200° C. Si nous utilisons du matériel stérile, nous devons nous rappeler que 2 % de celui-ci est contaminé par des endotoxines.

D'autre part, les endotoxines peuvent être absorbées sur la paroi des tubes ou des pipettes fabriquées avec certain verre ou plastique. De ce fait, il est conseillé de travailler avec du matériel en verre borosilicaté.

B) REACTIFS :

1 - LAL (2)
(Lysat d'Amoebocytes de Limule)
C'est un réactif spécifique des endotoxines. Il possède une très grande sensibilité permettant la détection de doses d'endotoxines non décelables par l'essai sur le lapin. C'est la raison pour laquelle il existe un certain nombre de "faux positifs" vis à vis des normes officielles de contrôle. Le lysat doit être standardisé vis à vis d'au moins deux endotoxines de référence car sa sensibilité varie avec les endotoxines. Le manipulateur doit vérifier la sensibilité du réactif à chaque fois qu'il change de lot.

Le lysat se présente sous la forme d'un lyophylisat stable pendant environ 1 an. En solution, il doit être utilisé rapidement. Il se conserve 24 heures à la température ambiante ou bien pendant 1 mois au congélateur. Nous devons éviter les cycles congélation-décongélation.

Lors de la reconstitution du lysat, nous devons l'agiter lentement sans faire mousser.

2 - L'EAU (14)

Après le lysat, l'eau est le composant le plus important du test. En effet, nous l'utilisons pour la reconstitution des réactifs, dans les dilutions des échantillons, dans les témoins négatifs et lors des tests du matériel. L'eau pour préparation injectable ne peut pas être employée car donnant un test négatif chez le lapin, il peut être positif avec le LAL. Nous utilisons une eau qui entraîne une augmentation de température inférieure à 0,3° C chez trois lapins et aucune granulation ou viscosité au bout d'une heure avec le LAL.

L'eau doit contenir une quantité d'endotoxines inférieure à 10 % de la sensibilité déclarée du lysat ou de la limite de détection.
De plus, afin d'éviter les problèmes de contamination, nous travaillons avec des petits volumes.

3 - ENDOTOXINES (7)

Nous utilisons une endotoxine standard de contrôle (RCE) qui est caractérisée par rapport à une endotoxine standard de référence (RSE). Très souvent, nous utilisons l'endotoxine d'Echerichia coli mais également celle de Salmonella abortus. Elle est exprimée en ng/ml ou en unité d'endotoxine par millilitre. Le ratio de conversion entre les deux grandeurs doit être précisé par le fabricant.

L'endotoxine est sous forme lyophilisée mais sa remise en solution doit être suivie d'une agitation importante. Nous ne devons pas conserver des solutions diluées en raison de la forte absorption par les parois. La solution reconstituée se conserve 15 jours à + 4° C.

4 - ACIDE ET BASE (14)

La réaction endotoxine-lysat devant se réaliser à pH 7, il est quelquefois nécessaire d'ajuster le pH de l'échantillon. Dans cette éventualité, nous pouvons utiliser :

- une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M LAL, préparée à partir d'acide chlorhydrique R et d'eau LAL,

- ou une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M LAL, préparée à partir d'hydroxyde de sodium R et d'eau LAL.

L'une et l'autre doivent être apyrogènes. Nous le vérifions en réalisant un test LAL sur le mélange des deux solutions.

III - MODE OPERATOIRE

A) DOSAGE EN POINT FINAL :

Ce test, d'apparence simple, doit être réalisé de façon très rigoureuse.

Nous préparons un bain-marie à 37° C où nous plaçons les tubes qui serviront pour le dosage.

Nous reconstituons les différentes solutions avec de l'eau LAL. Nous agitons énergiquement pour la solution d'endotoxine et inversement pour le lysat.

Nous diluons la solution d'endotoxine de façon à obtenir une concentration correspondant à deux fois la sensibilité du lysat (2λ).

Le pH de la solution à analyser est ajusté entre 6 et 7.

Nous répartissons ensuite 0,1 ml de lysat dans des tubes ; nous laissons incuber 5 minutes puis nous ajoutons :

- pour le témoin négatif : 0,1 ml d'eau LAL
- pour le témoin positif : 0,1 ml de la solution d'endotoxine à 2λ
- pour les essais : 0,1 ml d'échantillons.

Nous travaillons toujours en duplicata.

Tous les tubes sont agités et mis à incuber à 37° C pendant une heure exactement.

La lecture se fait par retournement des tubes à 180° lentement.

La présence d'endotoxine se traduit par un test positif, c'est à dire qu'il y a formation d'un gel stable, collant au fond du tube. La concentration en endotoxine est alors supérieure à λ.

Les résultats et les interprétations peuvent être rassemblés dans le tableau ci-après. (13)

TEMOIN POSITIF	TEMOIN NEGATIF	ESSAIS	COMMENTAIRES	CONCLUSIONS
+	-	+	Résultat conforme	Présence d'endotoxine dans l'échantillon
+	-	-	Résultat conforme	Absence d'endotoxine dans l'échantillon
+	+	+	Résultat non conforme	Vérifier la verrerie, l'eau apyrogène, problème de contamination possible : il faut recommencer le test.
-	-	-	Lysat et/ou endotoxine dégradés ou préparation incorrecte	Vérifier le pH, la température du bain-mari. Recommencer le test en utilisant, dans un 1er temps, un nouveau lot de lysat puis, dans un 2ème temps, un nouveau lot d'endotoxine.

B)DOSAGE TURBIDIMETRIQUE :
(14)

Pour ce dosage, les réactifs sont reconstitués selon les indications du fabricant.

A partir d'une solution mère d'endotoxine, nous préparons une gamme étalon comportant au moins quatre concentrations.

Pour le dosage, nous mélangeons 0,4 ml d'échantillon ou d'étalon à 0,1 ml de réactif. Un blanc est également préparé en utilisant 0,4 ml d'eau LAL. Tous les tubes sont dupliqués.

Les tubes sont ensuite placés dans la chambre d'un lecteur incubateur à 37° C.

La lecture de l'absorbance s'effectue à 380 nm à intervalle régulier.

Des logiciels permettent d'enregistrer les absorbances en fonction du temps, de calculer le temps de réaction, de visualiser la cinétique de la réaction dans chaque tube, de tracer la droite logarithme de la concentration en endotoxines en fonction du logarithme du temps de latence (TR) et enfin de calculer les paramètres de l'équation de la droite et le coéfficient de corrélation.

La sensibilité de la technique se situe autour de 0,001 EU/ml et la zone de linéarité s'étend sur 8 logarithmes.

IV - TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

Outre l'ajustement du pH de l'échantillon à analyser, nous devons rechercher une éventuelle activation ou inhibition de la réaction. La présence de substances inhibitrices dans l'échantillon serait responsable de "faux négatifs" ce qui serait dangereux pour les malades. Dans le cas de substances activatrices, nous obtiendrions des "faux positifs" entrainant le rejet de lots conformes.
(3)

A) LEVEE DE L'INTERFERENCE - CALCUL DE LA MVD :

Il existe de nombreux procédés :

- filtration,
- neutralisation,
- dialyse (nous utilisons alors la solution demeurant dans la chambre de dialyse),
- addition de substance déplaçant les endotoxines absorbées,
- ultrafiltration (quand le facteur d'interférence passe à travers un filtre dont la limite nominale de séparation correspond à une masse moléculaire relative de 10 000 à 20 000, donc très inférieure à celle des endotoxines),
- dilution : c'est la technique la plus utilisée.

Mais avant d'utiliser cette technique simple, il faut définir la dilution maximale valide ou MVD.

MVD : (1)

La MVD correspond à la plus grande dilution donnant un résultat positif pour un échantillon qui non dilué renferme une quantité d'endotoxines suffisantes pour entrainer des réactions indésirables telles que l'hyperthermie.

Afin de calculer la MVD, nous devons définir deux paramètres :

* M : la dose humaine de produit administrée par la voie prévue par heure, en ml d'une solution spécifique,

* K : la dose seuil d'endotoxine en unité d'endotoxine (EU) qu'un patient peut recevoir par cette voie, sans réaction indésirable.

Ces deux paramètres nous permettent de calculer la concentration maximale d'endotoxine permise ou MAEC (Maximum Available Endotoxine Concentration)

$$\mathbf{MAEC = M/K}$$

Puis, pour calculer la MVD, il suffit de diviser la MAEC par la sensibilité du lysat (λ)

$$\mathbf{MVD = MAEC/\lambda}$$

Cette dilution est spécifique d'un produit et de la sensibilité du lysat utilisé. (17)

B) CHOIX DE LA DILUTION DE L'ECHANTILLON : (14)

Lorsqu'un échantillon présente un pouvoir activateur ou inhibiteur pouvant être levé par une dilution, il nous faut définir la dilution à utiliser pour faire les dosages en routine. Pour cette détermination, nous réalisons un test préliminaire d'inhibition.

PRINCIPE DE L'ESSAI :

Nous préparons deux séries identiques de dilution du produit à analyser, la plus grande dilution correspondant à la MVD. Dans une série nous ajoutons une surcharge d'endotoxine égale à deux fois la sensibilité du lysat. L'autre série sert de témoin. Nous réalisons ensuite un test LAL sur les deux gammes.

INTERPRETATION DES RESULTATS :

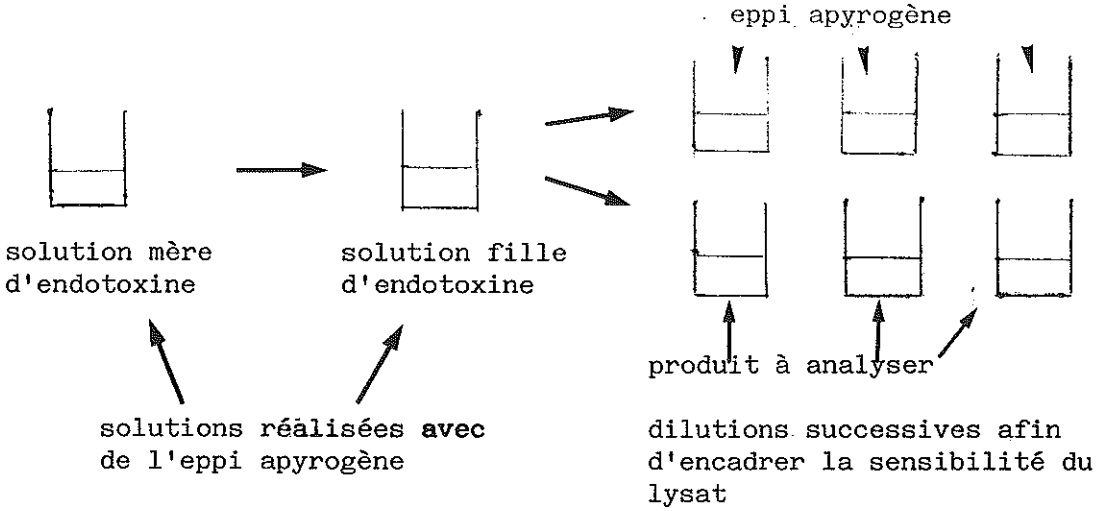
TEMOINS	TUBES AVEC SURCHARGE	CONCLUSION
Tous les tubes sont négatifs	Tous les tubes sont positifs	Le produit ne contient pas d'endotoxine et il n'est pas inhibiteur.
Tous les tubes sont négatifs	Les premiers tubes sont négatifs mais les autres sont positifs	Le produit ne contient pas d'endotoxine et il est inhibiteur : l'inhibition disparaît en diluant le produit.
Tous les tubes sont négatifs	Tous les tubes sont négatifs	Le produit contient peut-être des endotoxines et il est inhibiteur. L'inhibition n'est pas éliminée par la dilution. Il faudra utiliser un autre moyen.
Les premiers tubes sont positifs puis les autres négatifs	Tous les tubes sont positifs	Le produit contient des endotoxine mais il n'est pas inhibiteur.
	Les premiers tubes sont positifs et les autres sont négatifs	Erreur de manipulation.

Lorsqu'une inhibition peut être levée par une dilution, nous vérifions qu'à cette dilution nous retrouvons bien la sensibilité du lysat.

C) TEST D'INHIBITION-ACTIVATION :

Il faut savoir que l'eau pure n'est ni inhibitrice ni activatrice. Donc, si nous réalisons deux gammes de dilution de l'endotoxine, l'une dans le produit à analyser, l'autre dans l'eau, nous pourrons, par comparaison des résultats des deux tests, mettre en évidence un éventuel pouvoir inhibiteur ou activateur.

REALISATION PRATIQUE :



Il faut bien agiter entre chaque dilution.

Nous réalisons ensuite un test LAL afin de déterminer la sensibilité du lysat en présence ou en l'absence de la préparation à examiner. Si elle ne diffère pas de plus d'un facteur ou deux, la préparation à examiner est considérée comme n'interférant pas dans l'essai dans les conditions expérimentales. L'échantillon pourra donc être utilisé tel quel ; dans le cas contraire, il faut éliminer ces interférences.

D) SUBSTANCES INHIBITRICES :

Il existe des inhibiteurs communs du test LAL. Ce sont :

- le pH
- les sels
- les alcools
- les solvants organiques
- les détergents
- le silicone
- les agents chélatants
- les inhibiteurs de la serine protéase.

E) REMARQUE SUR L'ACTIVATION :

Très peu de produits lors du test LAL donnent des taux d'endotoxine supérieurs à ceux escomptés. Il existe deux catégories de "faux positifs" :

- les vrais "faux positifs" provoquent la formation de gel en l'absence d'endotoxine,

- les faux "faux positifs" plus nombreux, augmentent l'activation de l'enzyme gélifiante ou la réaction de coagulation en réponse à la présence d'endotoxine.

V - VALIDATION DU TEST LAL

La validation consiste à montrer la reproductibilité de la méthode :

- en vérifiant la capacité intrinsèque à manipuler,
- en vérifiant la sensibilité du lysat.

A) CAPACITE INTRINSEQUE A MANIPULER :

Avant tout essai, le manipulateur doit, en fonction de son équipement et de son laboratoire, exécuter son test jusqu'à obtention d'une répétabilité de ses résultats. La méthode par gélification, méthode de référence, a une variabilité acceptable de 50 %.

On procède également à la validation du laboratoire (matériels d'environnement).

Cette validation, basée sur des règles statistiques, va donc permettre de vérifier la capacité intrinsèque à manipuler et donc à rechercher des endotoxines mais aussi à vérifier le bon fonctionnement des réactifs (lysat, endotoxine, eau) et la qualité du matériel utilisé.

La validation doit être vérifiée dans le temps.

B) CONTROLE DE VALIDITE DU LYSAT :

Nous devons confirmer, pour chaque nouveau lot de lysat, la sensibilité annoncée par le fournisseur.

Pour cela, nous préparons deux séries de dilutions d'endotoxine de façon à encadrer la sensibilité du lysat.

Nousréalisons un test LAL, toujours en doublant les tubes, et nous notons la concentration la plus faible d'endotoxine donnant une réaction positive pour chaque série. La sensibilité du lysat est l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes de ces concentrations.

C) DOSAGE TURBIDIMETRIQUE :

La pente de la droite de régression de la droite étalon doit être comprise entre - 0,1 et - 1. Le coéfficient de corrélation doit être inférieur ou égal à - 0,98. (14)

Pour des conditions opératoires parfaitement définies, un même manipulateur doit toujours retrouver la même pente (communication personnelle).

CHAPITRE II - C H R O M O G E N I E

Le principe fondamental du test reste le même. L'endotoxine va activer une cascade enzymatique qui va modifier une protéine soluble présente dans le réactif, le **coagulogène**, en une protéine insoluble formant le gel, la **coaguline**.

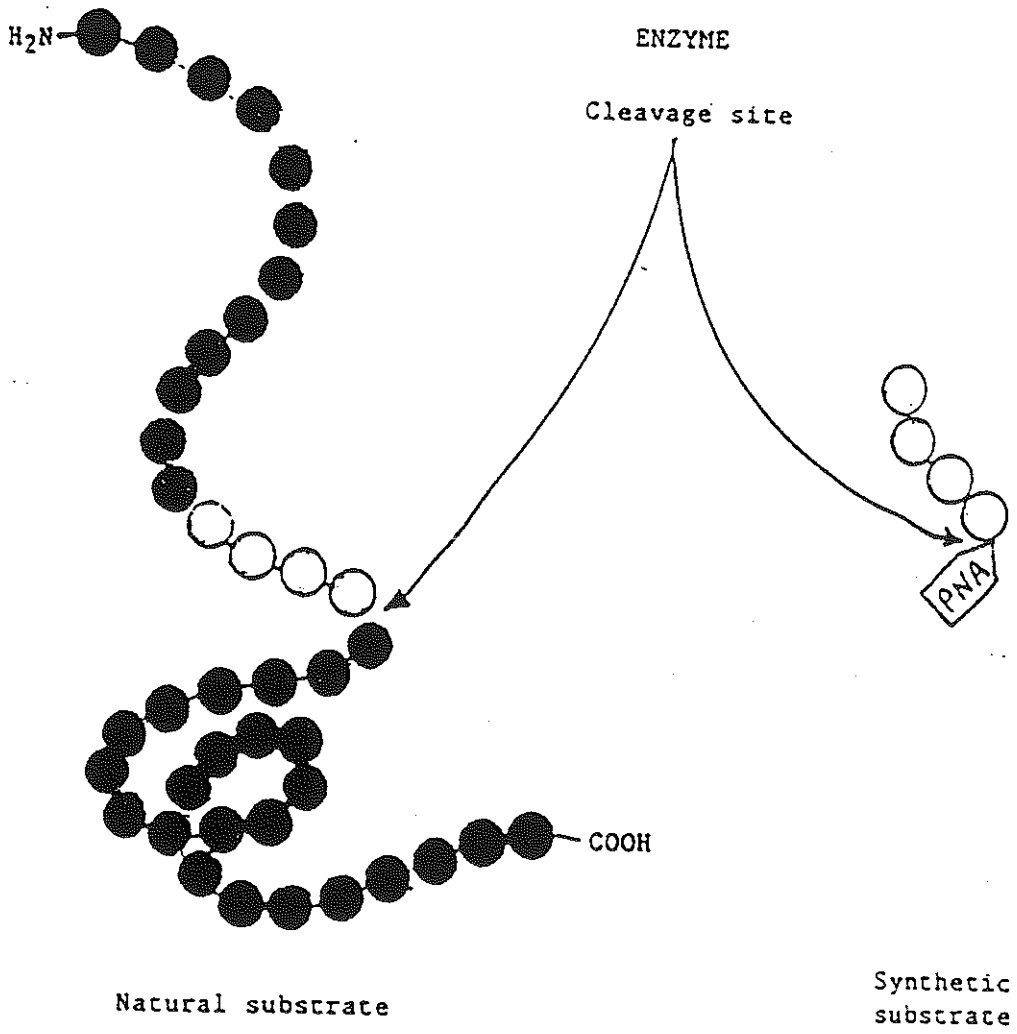
Le gel étant très fragile, nous allons le remplacer par une coloration.

I - PRINCIPE

L'enzyme activée, hydrolysant le coagulogène, agit spécifiquement entre l'arginine et la lysine. Il a été reconstitué un substrat en se basant sur le modèle du coagulogène. C'est un peptide de quatre acides aminés dont celui du côté C terminal est l'arginine. Sur cet arginine, nous avons fixé une molécule de para-nitroaniline (pNA).

Ac - Ile - Glu - Arg - pNA

(5)


H_2N
ENZYME
Cleavage site
PNA
COOH
Natural substrate
Synthetic substrate

L'enzyme que contient le lysat d'amoebocyte, une fois activée par les endotoxines, peut scinder cette molécule en un tétrapeptide et en pNA. Le pNA ainsi libéré colore en jaune la solution. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de pNA libérée.

En résumé, nous avons donc :

proenzyme du lysat $\xrightarrow{\text{endotoxines}}$ enzyme active

Ac - Ile - Glu - Arg - pNA (12) $\xrightarrow{\text{enzyme activée}}$ peptide + pNA

(Le pic d'absorption du pNA est à 405 nm).

Il existe deux techniques de dosage :

- en point final : nous fixons le temps de la réaction et nous notons l'augmentation de la densité optique,

- en cinétique : nous notons le temps nécessaire pour que la densité optique s'élève à 0,2 unité.

II - MATERIEL ET REACTIFS

A) MATERIEL :

Comme pour la technique par gélification, tout le matériel doit être stérile et apyrogène. De même, pour la verrerie, nous utiliserons de préférence du matériel borosilicaté.

Quelle que soit la technique employée, il est nécessaire de se munir :

- d'un bain-marie ou bloc chauffant thermostaté,
- d'un chronomètre,
- d'un agitateur type Vortex,
- d'un pH mètre,
- de tubes pour les dilutions,
- de pipettes de 2, 5 et 10 ml,
- d'une micropipette avec embouts stériles,
- d'un distributeur manuel type multipipette (R) avec réservoir stérile à usage unique, type combitips (R) eppendorf,
- d'un photomètre à filtre ou un spectrophotomètre ou un lecteur de microplaque permettant une lecture à 405 nm.

B) REACTIFS :

Parmi les réactifs utilisés, nous distinguons :

- les réactifs spécifiques au dosage en point final,
- les réactifs spécifiques au dosage en cinétique,
- les réactifs communs.

1 - REACTIFS SPECIFIQUES AU DOSAGE EN POINT FINAL :

La réaction se fait en deux temps :

* activation de la proenzyme
* libération du para-nitroaniline.

De ce fait, lysat et substrat chromogénique sont séparés.

a) LAL :

C'est toujours du lysat d'amoebocyte de limulus mais débarrassé du coagulogène. C'est un lyophilisat tamponné à pH 7. La remise en solution par de l'eau LAL se fait extemporanément. Nous pouvons conserver cette solution à - 20° C pendant un mois.

b) Substrat chromogénique :

C'est un peptide greffé par du para-nitroaniline. Une fois reconstituée, la solution est stable pendant un mois à + 4° C. Nous ne devons jamais la congeler. Avant d'utiliser le produit pour le dosage, il doit être placé à 37° C car c'est la température optimale de la réaction.

Le substrat est tamponné à pH 9. A ce pH, les endotoxines ne peuvent plus intervenir dans la réaction : il n'y a donc plus de risque de contamination.

2 - REACTIFS SPECIFIQUES AU DOSAGE EN CINETIQUE :

Pour cette technique, le lysat et le substrat chromogénique forment une seule préparation que nous remettons en solution extemporanément. Cette solution ne se garde que quelques heures si elle est placée à 4° C et à l'abri de la lumière. (5)

3 - REACTIFS COMMUNS :

a) Eau LAL :

Elle ne doit pas donner de réaction positive donc, selon la sensibilité de la méthode utilisée, la limite en endotoxine peut varier.

C'est cette eau que nous utilisons pour les dilutions et les reconstitutions des solutions.

b) Tampon Tris :

Il est stérile et apyrogène.
C'est un tampon à pH 9 dosé à 50 mM.

c) Endotoxine :

C'est une endotoxine standard de contrôle testée contre une endotoxine standard de référence.

Lors de la remise en solution et avant chaque utilisation, il faut agiter vivement. La solution peut se conserver 15 jours à 4° C.

4 - REACTIFS DIVERS :

Si la lecture de l'absorbance n'est pas faite par un lecteur automatique, nous devons arrêter la réaction. Les mesures de densité optique sont faites manuellement après avoir arrêté la réaction. Pour cela, nous devons utiliser :

- ou de l'acide acétique à 25 % m/V
- ou de l'acide citrique à 20 % m/V
- ou du SDS à 2 % m/V

III - MODES OPERATOIRES

(14)

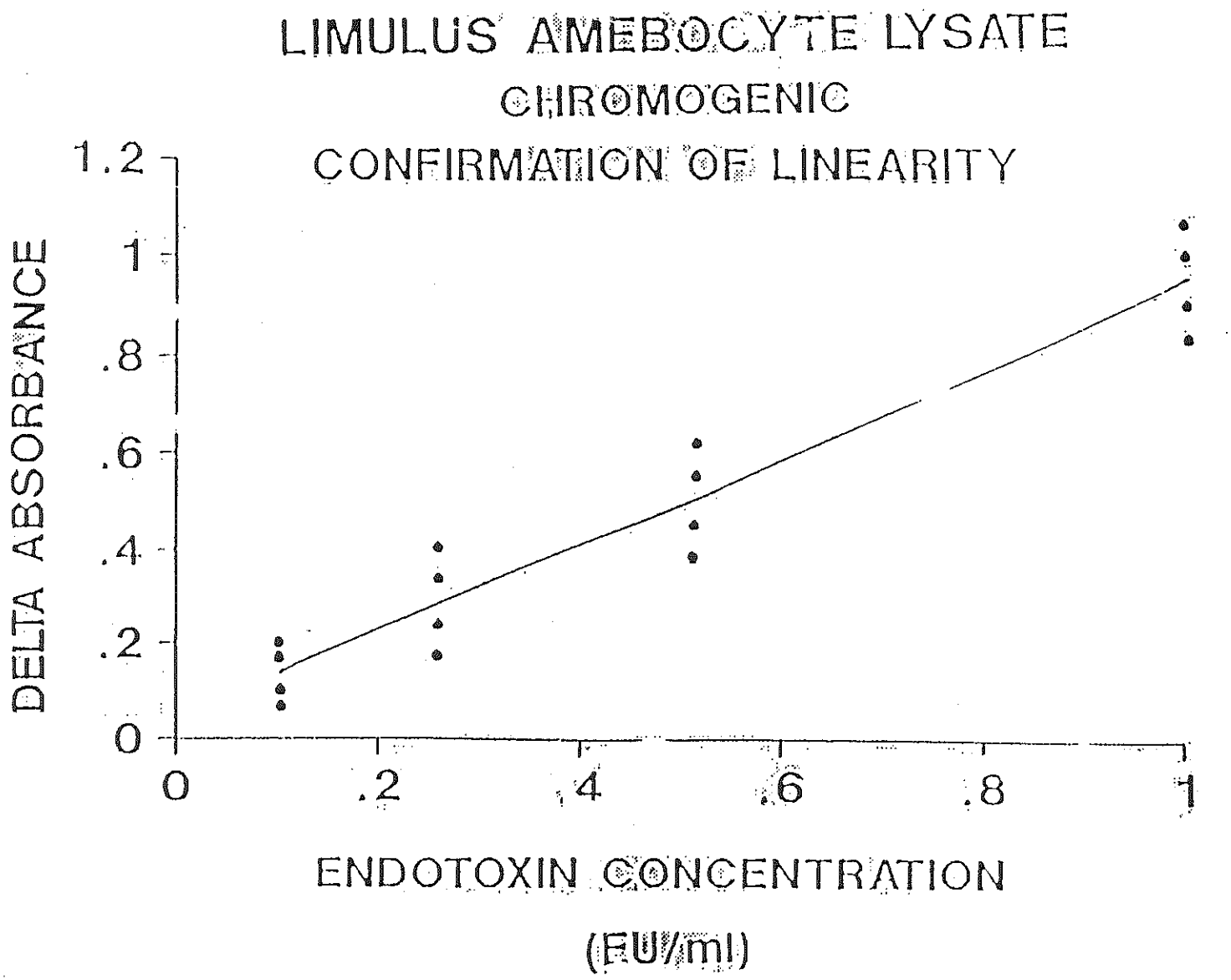
Quelle que soit la technique utilisée, lorsque nous réalisons un test LAL, nous devons toujours éviter les contaminations.

A) DOSAGE EN POINT FINAL :

Rappelons que pour cette technique, la mesure de l'absorbance est faite au bout d'un temps pré-déterminé.

Chaque jour, nous devons faire une gamme étalon. Pour cela, nous préparons un blanc et au moins 4 dilutions d'endotoxines dans de l'eau LAL.

Les plaques ou les tubes servant au dosage sont préchauffés pendant 10 minutes. Le lysat et le substrat chromogénique sont placés à la température ambiante. Ensuite, nous procédons à la répartition des différents produits selon le protocole indiqué sur la page suivante.


LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE
CHROMOGENIC
CONFIRMATION OF LINEARITY
DELTA ABSORBANCE
1.2
1
.8
.6
.4
.2
0
0
.2
.4
.6
.8
1
ENDOTOXIN CONCENTRATION
(EU/ml)

PRODUITS	QUANTITES	
	TUBES	MICROPLAQUES
Dilutions du standard ou échantillon ou blanc réactif (bien agiter)	100 µl	50 µl
	Incubation à 37° C pendant au moins 10 minutes.	
Lysat	100 µl	50 µl
	Incubation à 37° C pendant la durée donnée par le fabricant.	
Substrat chromogènique	200 µl	100 µl
	Incubation à 37° C pendant la durée donnée par le fabricant.	
Réactif d'arrêt	200 µl	100 µl

On mesure ensuite l'absorbance à 405 nm, puis on trace la courbe des absorbances en fonction des concentrations d'endotoxines. La connaissance de la densité optique de l'échantillon permet, grâce à la courbe, de calculer la concentration en endotoxine.

La droite qu'on obtient présente une zone de linéarité d'un logarithme.

REMARQUES :

Elles sont au nombre de trois :

- pour augmenter la sensibilité de la réaction, il suffit d'accroître le temps d'incubation produit-lysat car on augmente le taux d'enzyme activée.

- si nous disposons d'un appareil de lecture automatique de microplaque, le réactif d'arrêt n'est pas nécessaire.

- si la densité optique de l'échantillon est supérieure à celle de la dilution la plus concentrée d'endotoxine, nous devons diluer l'échantillon.

Par cette technique, nous obtenons un résultat rapide malgré les trois étapes :

* dépôt du lysat,
* dépôt du substrat chromogénique,
* dépôt du réactif d'arrêt.

A l'heure actuelle, nous voulons éliminer la deuxième étape en combinant lysat et substrat chromogénique en un seul réactif.

B) DOSAGE EN CINETIQUE :

(14)

Dans cette technique, l'absorbance du mélange lysat, substrat chromogénique et endotoxine est déterminée à intervalle de temps régulier. Le logarithme du temps de latence de la réaction étant inversement proportionnel au logarithme de la concentration en endotoxine, nous pouvons calculer la quantité d'endotoxine se trouvant dans un échantillon.

Le dosage est réalisé sur les microplaques comme suit :

- on dispose 100 µl d'échantillon ou d'étalon dans les puits,
- on laisse incuber 10 minutes puis on ajoute 100 µl de réactif.

On agite et on place la microplaque dans le lecteur incubateur à 37° C.

On prépare dans les mêmes conditions : un témoin positif et un témoin négatif. Tout est fait en double.

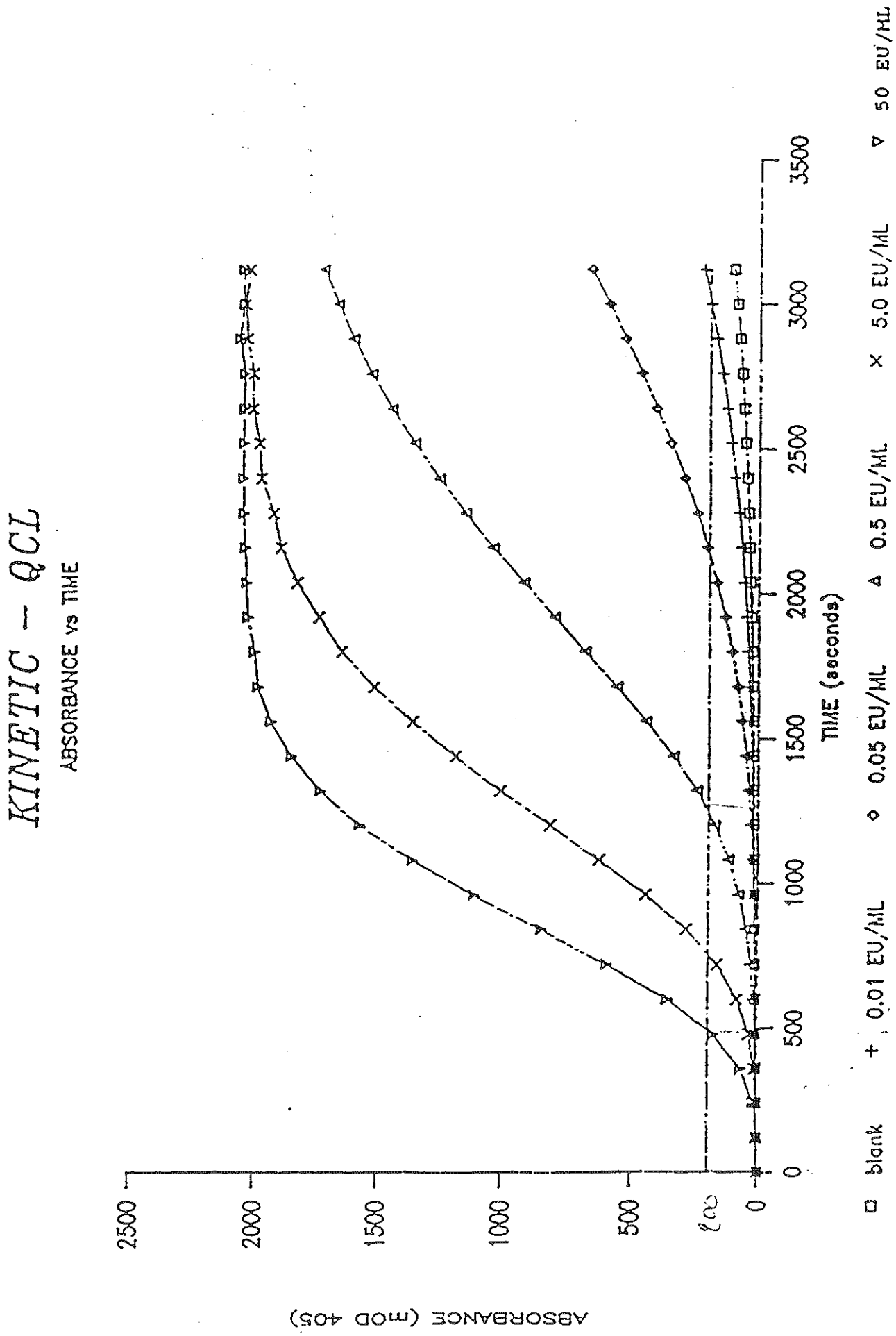
La densité optique est mesurée régulièrement.

On note le temps nécessaire pour que l'absorbance augmente de 0,2 unité dans chaque puits.

La concentration en endotoxine est déterminée à l'aide d'une droite d'étalonnage et en tenant compte des dilutions.

La sensibilité de la technique est de 0,005 EU/ml et présente une zone de linéarité de 5 logarithmes.

Courbe Absorbance en fonction du temps.



REMARQUE :

Si le produit est coloré, il n'y a pas de problème car nous notons la variation de densité optique par rapport à l'absorbance initiale de chaque puits.

Par rapport au dosage en point final, cette technique présente l'avantage de pouvoir travailler avec une courbe d'étalonnage archivée.

IV - VALIDATION DES TESTS CHROMOGENIQUES

La validation des tests est nécessaire pour pouvoir affirmer ensuite, lors des dosages de routine, que les résultats obtenus sont fiables. Nous devons valider la technique mais aussi l'essai vis à vis d'un produit donné. (18)

A) VALIDATION DE LA TECHNIQUE :

(14)
Cette procédure sera effectuée lorsqu'une nouvelle personne va faire l'essai, lors de l'emploi de nouveaux lots de réactifs et lors de l'essai de matériel nouveau.

Quelle que soit la technique utilisée, point final ou cinétique, nous réalisons quatre séries de dilutions d'une endotoxine standard de contrôle afin de tracer la courbe d'étalonnage. Les dilutions comprennent les points extrêmes de la zone linéaire plus, au moins, deux points dans la zone linéaire. Nous préparons également un témoin négatif. Chaque point est fait en duplicata.

Cela nous permet de faire une analyse de régression linéaire qui diffère selon la technique.

1 - POINT FINAL :

L'analyse de régression linéaire est faite sur les valeurs de l'absorbance des étalons par rapport à la concentration en endotoxine de ces étalons.

La courbe d'étalonnage doit remplir les conditions suivantes :

- le coéfficient de corrélation doit être égal ou supérieur à 0,98,

- la pente de la droite de régression doit être comprise entre 0,4 et 1,5.

2 - CINETIQUE :

L'analyse de la régression est réalisée sur le logarithme du temps par rapport au logarithme de la concentration en endotoxine.

Le coéfficient de corrélation doit être inférieur ou égal à - 0,98 et la pente doit être comprise entre - 0,1 et - 1.

3 - REMARQUE :

L'utilisateur du test LAL doit s'assurer que l'endotoxine de contrôle qu'il emploie a été étalonnée par le laboratoire fabricant du réactif selon une procédure utilisant quatre flacons d'endotoxine standard de contrôle et un flacon d'endotoxine standard de référence. (5)

B) VALIDATION DE L'ESSAI VIS A VIS DU PRODUIT :

Le but est de déterminer les concentrations du produit à utiliser pour que la sensibilié de la méthode, avec du produit, soit la même que celle avec de l'eau. On appelle sensibilité de la méthode, la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour générer la courbe.

Nous réalisons un test qui permet de mettre en évidence une éventuelle activité inhibitrice ou activatrice d'un produit vis à vis de la réaction. Il existe deux types d'essais.

1 - TECHNIQUE PAR SURCHARGE : (14)

Nous surchargeons le produit à tester par une quantité connue d'endotoxine. Nous préparons également un témoin du produit sans surcharge et une gamme étalon (endotoxine dans l'eau).

Nous procédons à un dosage chromogénique.

L'essai est validé si :

- la droite d'étalonnage est conforme,
- la concentration de la surcharge est retrouvée à plus ou moins 25 %.

Si le taux de recouvrement en endotoxine est supérieur à 125 %, le produit est activateur ; si ce taux est inférieur à 75 %, le produit inhibiteur. Dans les deux cas, il faut refaire l'essai avec des dilutions du produit jusqu'à ce qu'il soit conforme tout en respectant la MVD. Si aucune dilution ne permet l'essai en respectant la MVD, il faut éliminer les interférences par une autre méthode.

2 - GAMME ETALON DANS LE PRODUIT :

Nous réalisons une gamme étalon d'endotoxine dans le produit à analyser. Cette gamme comprend au moins quatre concentrations situées dans la zone de linéarité de la technique. Il est nécessaire de disposer d'un produit ayant une concentration en endotoxine non détectable avec la méthode utilisée.

Nous faisons un dosage chromogénique puis, à partir des résultats obtenus, nous faisons une analyse de régression linéaire.

Pour la technique en point final, l'essai sera conforme si la courbe d'étalonnage obtenue satisfait aux conditions suivantes :

- linéarité : coéfficient de corrélation supérieur ou égal à 0,98,
- différence des densités optiques entre la plus basse et la plus haute concentration en endotoxine comprise entre 0,4 et 1,5 unités.

Pour la technique cinétique, les conditions sont :

- coéfficient de corrélation inférieur ou égal à - 0,98,
- pente de régression comprise entre - 0,1 et - 1.

Si les résultats ne sont pas conformes, nous réalisons de nouveaux tests mais sur des dilutions, sans toutefois dépasser la MVD.

C) PROCEDURE EN ROUTINE :

Lorsque le manipulateur, le matériel, la méthode et le produit ont été validés, on peut alors travailler en routine.

1 - TECHNIQUE EN POINT FINAL :

Nous réalisons une gamme étalon une fois par jour puis ensuite il suffit de faire un point de la gamme. Les contrôles à faire sont :

- gamme étalon ou un point de la gamme,
- témoin négatif,
- témoin d'inhibition (produit à tester auquel nous avons ajouté une surcharge connue d'endotoxines).

Tous les tubes sont faits en duplicata.

2 - TECHNIQUE EN CINETIQUE :

Nous ne faisons pas de gamme étalon tous les jours. Nous nous servons des archives et nous ne faisons qu'un point de la gamme.

Nous faisons un témoin d'inhibition et un témoin négatif.

Les résultats des témoins ne doivent pas différer de plus ou moins 25 % de leurs valeurs archivées.

Lors des dosages en routine, il faut travailler selon une procédure très stricte.

CHAPITRE III - C O N C L U S I O N

A P P L I C A T I O N S

Le dosage des endotoxines par le test LAL est une méthode plus rapide mais aussi plus sensible que la technique du lapin. De plus, la reproductibilité et la fiabilité du test LAL ont été démontrées par comparaison avec la méthode sur le lapin qui est l'essai reconnu par la pharmacopée. Les tests ont donné des résultats identiques pour 97,21 % des échantillons et divergent pour 2,80 % des cas dont 2,20 % vont dans le sens d'une plus grande sévérité avec le test LAL. Nous notons donc une réelle contradiction dans 0,6 % des cas.

La pratique du test LAL par la gélification est simple ; cependant certaines règles doivent être parfaitement suivies :

- travailler aseptiquement mais sans flamme car le lysat peut être détruit par la chaleur,
- pH de la réaction à 7,
- température d'incubation à 37° C,
- temps et incubation pendant 1 heure,
- absence de vibration pendant l'incubation.

Malgré ces précautions, si la réaction est positive, le gel obtenu reste fragile. La lecture est donc délicate. La mise en place du test chromogénique a permis d'éviter ce problème. De plus, le dosage est devenu quantitatif et plus sensible.

L'utilisation du test LAL est à l'heure actuelle en extension. Toute nouvelle application du test doit être validée. Pour cela nous effectuons :

- une étude des conditions expérimentales,
- une comparaison des résultats obtenus par ce test avec ceux de la technique du lapin.

Les différentes applications sont les suivantes :

a) Médicaments, produits de diagnostic et réactifs :

Nous utilisons le test LAL pour la recherche d'endotoxine éventuellement contenue dans :

- les médicaments à usage parentéral de petit et grand volumes. Pour les solutés massifs, le test peut servir à la vérification de cas douteux chez le lapin,
- les solutions pour dialyse rénale et hémodialyse,
- les produits radiopharmaceutiques où l'essai des pyrogènes sur le lapin n'est pas praticable,

- les produits de contraste mais les composés organoiodés inhibant la réaction, il faut séparer les substances pyrogènes contenues dans le produit par ultrafiltration,

- les médicaments d'origine biologique et dérivés du sang. Ces produits sont responsables de "faux positifs".
Pour résoudre ce problème, on est amené à faire des dosages quantitatifs par rapport à une endotoxine de référence et on fixe alors une norme d'acceptation en comparaison avec le lapin. D'autre part, le test LAL présente un intérêt supplémentaire lorsqu'on a des produits contenant des protéines hétérologues pour le lapin qui provoquent des réactions de sensibilisation (avec augmentation de température dès la première injection).

- les matières premières avec notamment l'eau et les préparations destinées à l'administration parentérale,

- les produits radioactifs injectables ayant des périodes courtes.
Cette technique permet également de diminuer les dangers pour les manipulateurs car ils travaillent avec des doses faibles,

- les préparations présentant une activité pharmacologique ou toxique pour le lapin.

b) Matériel médico-chirurgical :

Dans ce cas, nous devons faire attention au problème d'absorption des endotoxines. Nous pouvons citer :

- les seringues et cartouches à usage unique,
- les nécessaires pour perfusion et transfusion,
- les matériaux implantables,
- les membranes dialyseurs.

c) Techniques humaines et vétérinaires :

Le test LAL peut être utilisé à des fins diagnostics lorsqu'on recherche la présence d'endotoxine dans le liquide céphalorachidien, l'urine, le sang, l'exudat oculaire

d) Applications diverses :

Nous retrouvons le test LAL dans :

- l'agro-alimentaire : poisson, lait, viande, produits surgelés,
- l'évaluation de performances des filtres.

e) Projet :

- vaccins viraux,
- étalonnage de vaccins microbiens,
- diagnostics,
- pureté des milieux de culture,
- dosage des protéases, d'antiprotéases,
- étude taxonomique des bactéries et virus.

2EME PARTIE :

MISE EN APPLICATION DES DIFFERENTES TECHNIQUES

Cette partie représente la partie pratique de notre travail. Nous avons dans un premier temps vérifié mon aptitude à réaliser des tests LAL. Pour cela, j'ai réalisé une validation de lysat selon un protocole déjà utilisé dans le laboratoire. Nous avons utilisé la technique par gélification en point final.

Une fois cette validation effectuée, j'ai pu réaliser les dosages quotidiens ainsi que des essais :

- tests d'inhibition sur des produits,

- applications des autres techniques de dosages :

* turbidimétrie
* chromogénie point final
* chromogénie cinétique.

CHAPITRE I - G E L I F I C A T I O N

E N P O I N T F I N A L

Nous avons utilisé cette technique de référence afin de vérifier la sensibilité donnée d'un lysat. Nous avons également réalisé des dosages en routine et des tests d'inhibition.

I - VALIDATION DE LA SENSIBILITE D'UN LYSAT

Des dilutions d'une solution d'endotoxine sont préparées de façon à encadrer la sensibilité donnée du lysat. Un test LAL est ensuite réalisé.

A) MATERIEL :

- un bain marie à 37° C,
- un Vortex,
- un chronomètre,
- erlemeyerde 25 ml,
- fioles jaugées 50 ml et 100 ml,
- pipettes de 2, 5 et 10 ml,
- tubes pour réaction de diamètre inférieur à 7,5 mm à fond rond,
- une micropipette de 100 μl et embouts stériles.

Tout le matériel en verre est borosilicaté et apyrogène.

B) REACTIFS :

- endotoxine standard de contrôle : flacon contenant 25 x 10^5 EU/ml lorsqu'il est reconstitué par 5 ml d'eau LAL,
- lysat : la sensibilité donnée est de 0,125 EU/ml (flacon pour 50 tests),
- eau LAL.

C) MODE OPERATOIRE :

Nous réalisons les dilutions successives de l'endotoxine de contrôle comme suit :

1/100e : concentration de la solution : 25 x 10^3 EU/ml

1/50e : concentration de la solution : 500 EU/ml

1/10e : concentration de la solution : 50 EU/ml

1/10e : concentration de la solution : 5 EU/ml

1/10e : concentration de la solution : 0,500 EU/ml

1/2 : concentration de la solution : 0,250 EU/ml

1/2 : concentration de la solution : 0,125 EU/ml

1/2 : concentration de la solution : 0,062 EU/ml

1/2 : concentration de la solution : 0,031 EU/ml.

Le lysat est reconstitué par 5,2 ml d'eau LAL puis réparti dans les tubes à raison de 100 µl. Nous les laissons 10 minutes à 37° C avant d'ajouter 100 µl des différentes dilutions d'endotoxine. Les solutions utilisées contiennent 0,500 - 0,250 - 0,125 - 0,062 et 0,031 EU/ml. Nous préparons également un blanc à partir de l'eau LAL.

Tous les tubes sont préparés en double. Nous laissons incuber à 37° C.

La manipulation est réalisée par deux personnes.

D) RESULTATS :

Après exactement une heure d'incubation, les tubes sont lentement retournés à 180°.

La réaction est positive (+) lorsque se forme un gel ferme collant au fond du tube. Dans le cas contraire, elle est négative (-).

	Blanc	0,500	0,250	0,125	0,062	0,031
TECHNICIENNE	- -	+ +	+ +	+ +	- -	- -
STAGIAIRE	- -	+ +	+ +	+ +	- -	- -

Dans les deux cas :

- la dernière concentration présentant un gel est celle à 0,125 EU/ml soit la sensibilité annoncée,
- le blanc est négatif.

Les résultats sont identiques.

II - DOSAGE EN ROUTINE

Ce test par gélification est utilisé chaque jour pour des contrôles d'eau in process, pour des validations de fours et de matériel.

A) MATERIEL ET REACTIFS :

Nous travaillons dans les mêmes conditions que pour l'essai de validation du lysat (I).

B) MODE OPERATOIRE :

Chaque jour, nous réalisons :

- un témoin positif contenant une concentration en endotoxine égale à 2 fois la sensibilité du lysat,
- un témoin négatif préparé à partir de l'eau LAL qui est également utilisé pour les dilutions des solutions à tester.

Les solutions à tester sont ajustées à pH 7 à l'aide d'une solution de soude à 0,1 N apyrogène.
100 µl de chaque solution sont déposés dans 2 tubes qui sont placés à 37° C.

Le lysat est ensuite ajouté et nous laissons incuber 1 heure.

C) RESULTATS :

L'eau in process doit contenir moins de 0,25 EU/ml.

Les témoins positifs doivent présenter un gel ferme collant et les témoins négatifs doivent être limpides.

Si les solutions testées ne présentent aucun gel, elles contiennent moins de 0,125 EU/ml. L'eau est conforme.Dans le cas de la formation d'un gel, nous devons refaire un test LAL sur des solutions diluées au 1/2. Si pour ce nouvel essai les tubes sont négatifs (absence de gel) l'eau contient alors moins de 2 x 0,125 EU/ml, c'est à dire moins de 0,25 EU/ml : elle est donc conforme.

Si pour le deuxième essai les tubes sont encore positifs, l'eau contient alors plus de 0,25 EU/ml ; cette eau ne peut pas être utilisée pour la production de médicaments.

D) CONCLUSIONS :

Pour obtenir des résultats d'un test LAL, il faut quelquefois 2h30 : c'est donc très long. De plus, le résultat obtenu n'est que semi quantitatif.

III - TEST D'INHIBITION

Nous allons étudier le comportement de la daunorubicine vis à vis du test LAL par gélification.

Nous travaillons sur une solution contenant 1 mg/ml de chlorhydrate de daunorubicine.

A) TEST PRELIMINAIRE D'INHIBITION :

Ce test consiste à réaliser deux séries de dilutions du produit à analyser. Nous allons jusqu'à la MVD.

Dans une série, nous ajoutons une surcharge en endotoxine, l'autre servant de témoin. Nous faisons un test LAL sur les deux gammes.

1 - DETERMINATION DE LA MVD :

Rappelons que la MVD est la plus grande dilution pouvant être utilisée pour mettre en évidence une quantité minimum d'endotoxine qui serait toxique pour le malade.

a) Eléments nécessaires au calcul :

Ils sont au nombre de trois :

- concentration maximum d'endotoxine dans le chlorhydrate de daunorubicine. Cette valeur est indiquée dans la pharmacopée américaine (USP XXII) et dans le "guideline on validation of the limulus amoebocyte lysate test". Le produit ne doit pas contenir plus de 5 unités d'endotoxine par mg.

- Sensibilité de la méthode :
la sensibilité donnée du lysat est de 0,125 EU/ml.

- concentration de la solution chlorhydrate de daunorubicine.
Nous utilisons une solution à 1 mg/ml.

b) Calcul de la MVD :

Dans un premier temps, il faut déterminer la MAEC (Maximum Available Concentration Endotoxine) qui est la concentration d'endotoxine permise dans le produit à la dose administrable.

Notre solution est à 1 mg/ml de chlorhydrate de daunorubicine.

Il doit y avoir moins de 5 EU/mg.

La MAEC est donc de 5 EU/ml.

$$MVD = \frac{5}{0,125} = 40$$

c) Conclusion :

Si nous observons une inhibition ou une activation de la réaction par le produit, nous pourrons éliminer l'interférence en diluant le chlorhydrate de daunorubicine sans toutefois dépasser le 1/40e.

2 - MANIPULATION :

2.1 - Préparation des dilutions :

a) Matériel :

- erlemeyer de 25 ml,
- pipettes apyrogènes en verre de 2, 5 et 10 ml,
- une micropipette de 100µl et des embouts stériles,
- une spatule apyrogène,
- une fiole jaugée de 50 ml,
- une balance,
- un Vortex.

b) Réactifs :

- Chlorhydrate de daunorubicine,
- eau LAL et eau ppi,
- endotoxine.

Ce sont les mêmes que dans l'essai précédent.

c) Mode opératoire :

- à l'aide de la spatule, nous déposons 100 mg de chlorhydrate de daunorubicine dans la fiole jaugée puis nous complétons à 50 ml par de l'eau ppi. La concentration est de 2 mg/ml.

Nous réalisons ensuite les dilutions suivantes :

* 1/2 concentration du produit : 1 mg/ml
* 1/5e concentration du produit : 0,4 mg/ml
* 1/25e concentration du produit : 0,08 mg/ml
* 1/40e concentration du produit : 0,05 mg/ml

- pour l'endotoxine, après reconstitution, la solution est agitée 20 minutes au Vortex. La solution contient 25 x 10^5 EU/ml. Nous effectuons des dilutions successives : 1/100e, 1/50e, 1/10e, 1/10e, 1/10e. La concentration finale est 0,5 EU/ml.

2.2 - Test LAL :

a) Matériel :

- un bain marie thermostaté à 37° C,
- des tubes apyrogènes en verre de 7,5 mm de diamètre,
- une micropipette de 100µl et des embouts stériles,
- un chronomètre.

b) Réactifs :

- eau LAL,
  LAL numéro 9L2470 : la sensibilité est 0,125 EU/ml.

c) Mode opératoire :

Le lysat est reconstitué puis déposé dans les tubes (100µl). Nous laissons incuber 10 minutes à 37° C.

L'addition des solutions de chlorhydrate de daunorubicine est faite selon le schéma suivant.

Pour chaque concentration de chlorhydrate de daunorubicine, 4 tubes sont préparés.

	TUBES			
	1	2	3	4
Solution de chlorhydrate de daunorubicine	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Solution d'endotoxine à 0,5 EU/ml	50 µl	50 µl		
Eau LAL			50 µl	50 µl

Les concentrations réelles de chlorhydrate de daunorubicine mises en oeuvre pour le test LAL sont 1 mg/ml - 0,5 mg/ml - 0,2 mg/ml -0,04 mg/ml - 0,025 mg/ml.

3 - RESULTATS :

CONCENTRATION EN CHLORHYDRATE DE DAUNORUBICINE	0,025 mg/ml	0,04 mg/ml	0,2 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
Surcharge d'endotoxine (0,25 EU/ml)	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
Sans surcharge	- -	- -	- -	- -	- -

+ = gel ferme collant
- = absence de gel

4 - INTERPRETATIONS :

- Le produit ne contient pas d'endotoxine,

- une solution contenant au plus 0,5 mg/ml de chlorhydrate de daunorubicine n'inhibe pas la réaction du test LAL. Pour les dosages en routine, nous allons éviter de nous placer dans le cas limite : nous allons travailler avec une solution contenant 0,2 mg/ml de produit.

B) DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DU LYSAT DANS UNE SOLUTION DE CHLORHYDRATE DE DAUNORUBICINE A 0,2 mg/ml :

Dans une solution de chlorhydrate de daunorubicine à 0,2 mg/ml, nous réalisons des dilutions d'endotoxine de façon à encadrer la sensibilité du lysat. Nous comparons la sensibilité trouvée avec celle d'un témoin qui est de l'endotoxine diluée dans de l'eau ppi.

1 - MANIPULATION :

Avant de réaliser le test LAL, il nous faut préparer les dilutions des endotoxines dans l'eau et le produit.

1.1 - Préparation des dilutions :

a) Matériel :

- des erlemeyer de 25 ml,
- des pipettes en verre apyrogènes de 2, 5 et 10 ml,
- une micropipette de 100 µl avec embouts stériles,
- une spatule apyrogène,
- une fiole jaugée de 100 ml en verre borosilicaté et apyrogène,
- une balance,
- un Vortex.

b) Réactifs :

- chlorhydrate de daunorubicine en poudre, lot n° 4040377/8926800,
- eau pour préparation injectable Méram,
- Endotoxine de contrôle : lyophilisat n° 8L2830 A : le flacon contient 2,5 x 10^6 EU/ml lorsqu'il est reconstitué par 5 ml d'eau ppi.

c) Mode opératoire :

Nous préparons une solution de chlorhydrate de daunorubicine en pesant 100 mg de poudre dans la fiole jaugée puis nous complétons à 100 ml par l'eau ppi, puis nous diluons au 1/5e.

La concentration est de 0,2 mg/ml.

Nous agitons pendant 20 minutes la solution d'endotoxine reconstituée extemporanément puis nous la diluons au 1/100e. Cette solution contient alors 2,5 x 10^4 EU/ml. A partir de celle-ci, nous réalisons deux suites de dilutions, l'une dans l'eau ppi et l'autre dans le chlorhydrate de daunorubicine à 0,2 mg/ml. Les dilutions successives sont les suivantes :

* 1/50e : concentration en endotoxine = 500 EU/ml
* 1/10e : concentration en endotoxine = 50 EU/ml
* 1/10e : concentration en endotoxine = 5 EU/ml
* 1/10e : concentration en endotoxine = 0,5 EU/ml

A partir des deux solutions à 0,5 EU/ml, nous préparons les gammes de dilution servant au test LAL.

Nous réalisons des dilutions au 1/2 de façon à encadrer la sensibilité du lysat (= 0,125 EU/ml).

Les concentrations en endotoxine des dilutions de la gamme sont :

0,250 EU/ml
0,125 EU/ml
0,062 EU/ml
0,031 EU/ml

1.2 - Test LAL :

Nous reconstituons le lysat par 5,2 ml d'eau LAL ; nous en répartissons 100 µl dans les tubes et nous laissons incuber 10 minutes à 37° C.

Nous ajoutons ensuite la solution à tester et nous agitons. Tous les tubes sont dupliqués.

Nous laissons incuber 1 heure à 37° C.

2 - RESULTATS :

CONCENTRATION EN ENDOTOXINE EU/ml	0,500	0,250	0,125	0,062	0,031
Dilutions dans eau ppi	+ +	+ +	+ +	+ +	- -
Dilutions dans chlorhydrate de daunorubicine à 0,2 mg/ml	+ +	+ +	+ +	- -	- -

+ = Gel ferme collant
- = absence de gel.

SENSIBILITE DU LYSAT :

- dans l'eau ppi = 0,062 EU/ml,
- dans le chlorhydrate de daunorubicine = 0,125 EU/ml.

Nous effectuons le rapport des sensibilités :

$$\frac{0,062}{0,125} = 0,5$$

Il n'y a pas d'inhibition de la réaction par le produit.

3 - CONCLUSION :

L'étude montre que pour des dosages en routine, nous pouvons travailler avec une solution à 0,2 mg/ml ce qui permet d'éviter les problèmes d'inhibition, tout en respectant la MVD.

Rappelons toutefois, que si nous changeons de lot de lysat ou de fabricant, il faudra refaire le dernier essai car les réponses obtenues peuvent être différentes suivant le lysat utilisé.

CHAPITRE II : T U R B I D I M E T R I E

Nous avons travaillé à l'aide d'un turbidimètre à lecture automatique permettant de visualiser la cinétique de la réaction. Nous avons réalisé différentes gammes étalons.

I - APPAREIL ET REACTIFS

A) APPAREIL :

Nous utilisons un turbidimètre à lecture automatique de la Société Amilabo. Cet appareil est accompagné d'un incubateur, d'un système informatique et d'une imprimante. Il existe différents types de logiciels :

- logiciel pour le dosage en routine : il délivre une feuille de résultats où sont indiquées les caractéristiques de la droite étalon (pente, coéfficient de corrélation), les temps de réaction des échantillons à doser et les résultats obtenus : produit conforme ou non conforme (la concentration en endotoxine trouvée est confrontée à une valeur théorique à ne pas dépasser),

- logiciel de standardisation de l'endotoxine standard de contrôle vis à vis de l'endotoxine standard de référence. Ce logiciel sert lors de la validation du système,

- logiciel pour les essais : + 1ère utilisation du système
  + test d'inhibition

Grâce à ce programme, nous pouvons visualiser :

* pour chaque tube : la courbe de la cinétique de la réaction endotoxine - lysat ; le temps de réaction observé (temps nécessaire pour que la turbidité augmente : 20 miliunités) et sa valeur corrigée, et la concentration en endotoxine trouvée (figures A, B et D).
* la droite de régression de la gamme étalon ainsi que ses caractéristiques (figure C).

C'est ce dernier logiciel que nous avons utilisé afin de contrôler la façon de manipuler. Cet appareil est agréé FDA avec une précision de + ou - 25 % et permet 32 dosages.

Lors de l'utilisation, nous indiquons :

- les concentrations de la gamme étalon,

- les numéros des lots du lysat, de l'endotoxine et de l'eau LAL,

- les unités utilisées pour les concentrations en endotoxine : ng/ml, EU/ml ou UI/ml,

- le facteur de conversion des unités si nous ne travaillons pas en ng/ml.

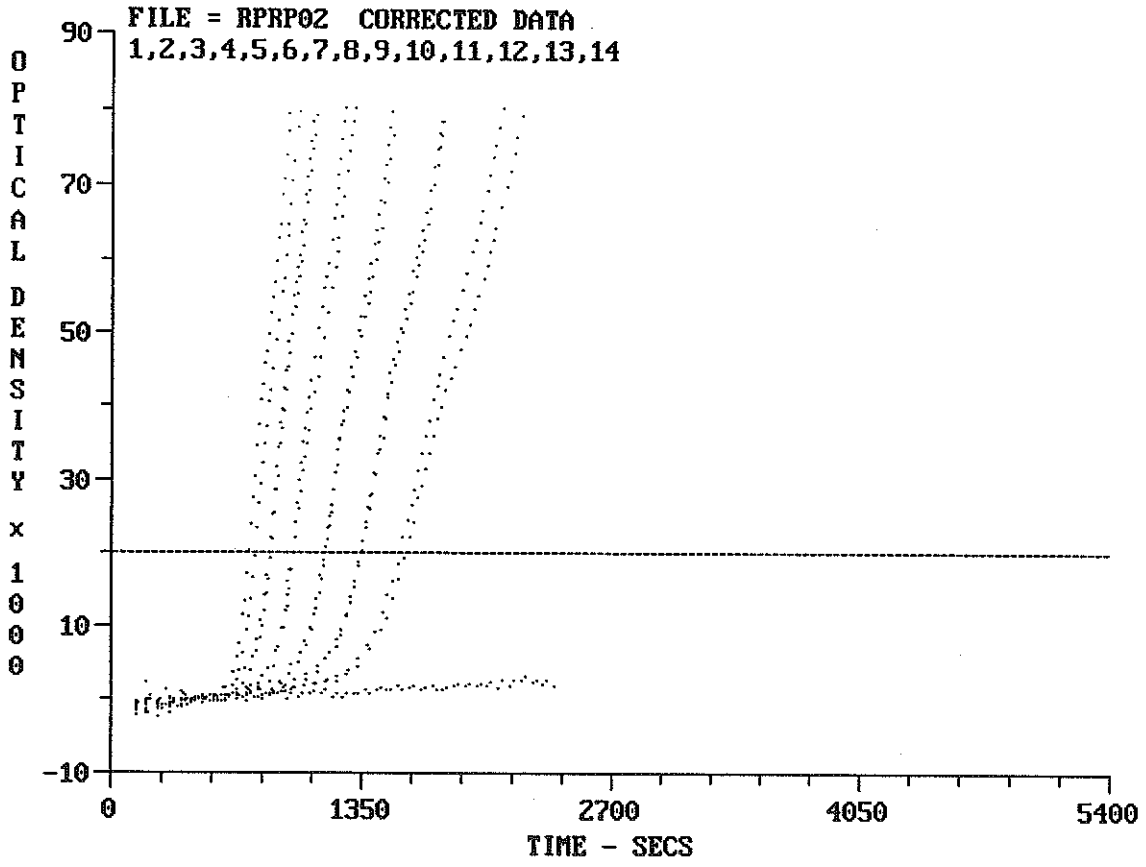

FILE = RPRP02 CORRECTED DATA
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14
OPTICAL DENSITY x 1000
90
70
50
30
10
-10
0
1350
2700
4050
5400
TIME - SECS

FIGURE A

LAL-5000 DATA ANALYSIS

LAL-5000 Data Analysis - ver. 2.0 - 02/08/90
Copyright Associates of Cape Cod Inc. 1985 - 1990
All Rights Reserved

File = RPRP02 Date = 05/27/91 Time = 12:53 Tech. = stroeck
Water lot no. = 050-391
LAL lot = 42-58-500 T Endo lot = CSE 51 units = ng/ml
LAL-5000 serial no. = DEMO. Computer ID = Portable AMILABO
Temperature data module A: average = 36.63, min. = 36.6, max = 36.8
Technician's comments:
gamme etalon avec materil amilabo

Corrected Onset Times (seconds)
Baseline corrected using data from 400 to 600 secs.
No drift correction
Onset times calculated at optical density = 0.02

Tube Loc	Description	Spk conc	Concentration or Dilution		Raw Onset	Corr. Onset
1	W NEG CON		0.		0	0.0
2	W NEG CON		0.		0	0.0
3	STD 1(1)		0.1	ng/ml	740	738.5
4	STD 1(2)		0.1	ng/ml	770	770.7
5	STD 1(1)		0.05	ng/ml	850	852.2
6	STD 1(2)		0.05	ng/ml	840	841.3
7	STD 1(1)		0.025	ng/ml	970	970.0
8	STD 1(2)		0.025	ng/ml	990	981.1
9	STD 1(1)		0.0125	ng/ml	1150	1142.6
10	STD 1(2)		0.0125	ng/ml	1160	1151.0
11	STD 1(1)		0.00625	ng/ml	1350	1346.1
12	STD 1(2)		0.00625	ng/ml	1350	1338.4
13	STD 1(1)		0.003125	ng/ml	1570	1560.0
14	STD 1(2)		0.003125	ng/ml	1610	1586.4

FIGURE B

Regression calculation using standard curve no. 1, set(s) 1,2
Values for log-log regression line
Slope = -0.2151 Y intercept = 2.653 Correlation coefficient = 0.9977

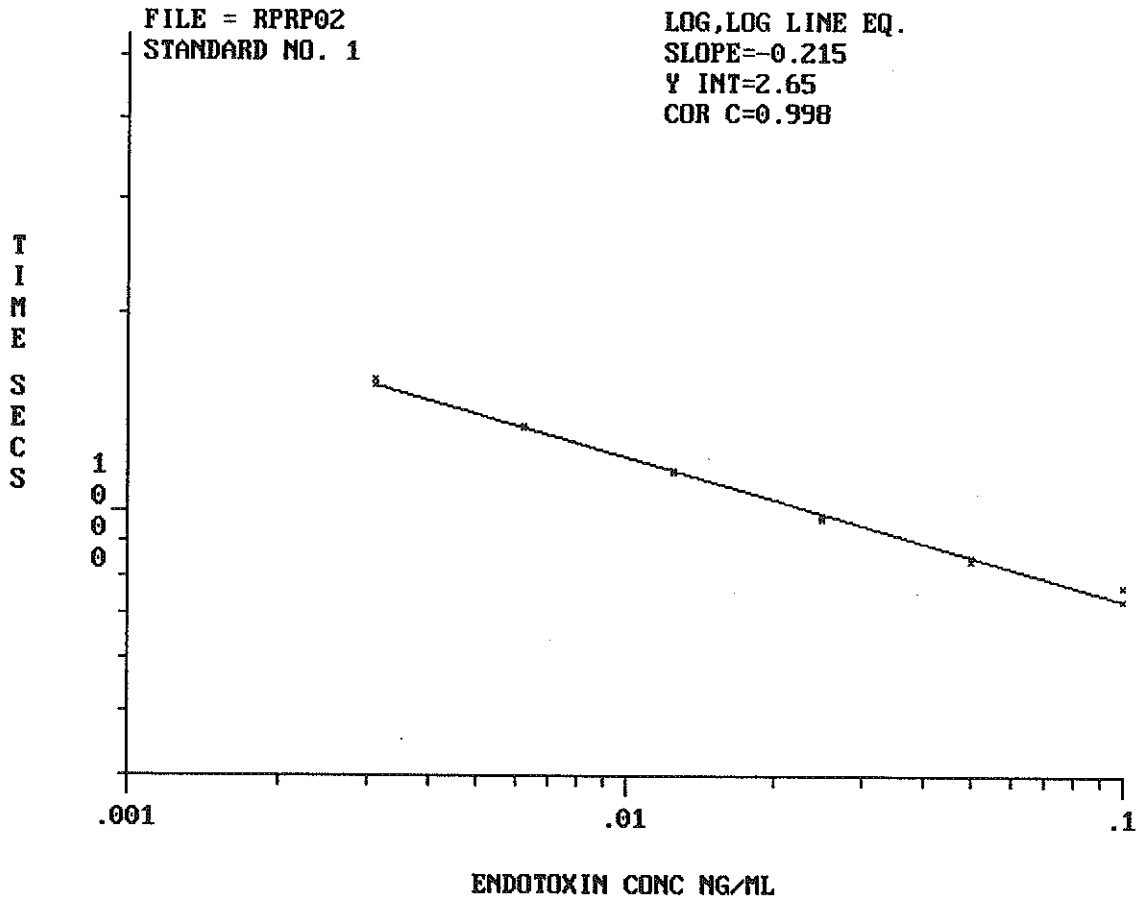


FIGURE C

CALCULATION OF ENDOTOXIN CONCENTRATIONS

File = RPRP02 Date = 05/27/91 Time = 12:53 Tech. = stroeck
Baseline corrected 400 - 600 secs. No drift correction
LAL lot no. = 42-58-500 T Water lot no. = 050-391

Endotoxin lot no.	Units	Standard Curve No(s)
CSE 51	ng/ml	1

Standard curve parameters calculated from current file
Standard curve: number = 1 Description = rprpma
Endotoxin lot no. CSE 51
Concentration range = 0.00313 - 0.100 ng/ml
Slope = -0.215 Y int. = 2.65 Correlation coef. = 0.998
Min., Max. valid onset times = 754.6 - 1573.2 secs.

Tube Loc	Description	Spk Conc ng/ml	Concentration or Dilution		Endotoxin Concentration measured ng/ml	dil. adj. ng/ml
1	W NEG CON		0.		Not detected after 2350 secs	
2	W NEG CON		0.		Not detected after 2390 secs	
3	STD 1(1)		0.1	ng/ml	*0.0995	*0.0995
4	STD 1(2)		0.1	ng/ml	0.0816	0.0816
5	STD 1(1)		0.05	ng/ml	0.0512	0.0512
6	STD 1(2)		0.05	ng/ml	0.0543	0.0543
7	STD 1(1)		0.025	ng/ml	0.0280	0.0280
8	STD 1(2)		0.025	ng/ml	0.0266	0.0266
9	STD 1(1)		0.0125	ng/ml	0.0131	0.0131
10	STD 1(2)		0.0125	ng/ml	0.0126	0.0126
11	STD 1(1)		0.00625	ng/ml	0.00611	0.00611
12	STD 1(2)		0.00625	ng/ml	0.00627	0.00627
13	STD 1(1)		0.003125	ng/ml	0.00308	0.00308
14	STD 1(2)		0.003125	ng/ml	*0.00285	*0.00285

* indicates outside range of standards

FIGURE D

B) REACTIFS :

- LAL : c'est le même lysat que celui utilisé pour le dosage par gélification en point final. Ce sont des flacons pour 50 tests.

- Endotoxine : le flacon reconstitué contient 100 ng/ml. Cette solution se conserve 15 jours à + 4° C.

- Eau LAL : elle doit contenir moins de 10^{-3} EU/ml.

II - MANIPULATION

A l'aide de cet appareil et de ces réactifs, nous avons essentiellement réalisé des gammes étalons. Elles sont toutes réalisées selon un protocole très strict :

- reconstitution des réactifs,

- agitation 10 minutes au Vortex de la solution mère d'endotoxine (100 ng/ml),

- dilution au 1/100e de la solution mère d'endotoxine ; agitation 1 mn au Vortex : la concentration obtenue est 1 ng/ml.

Puis, nous opérons selon le schéma indiqué ci-après.

SOLUTION A 1 ng/ml

↓

DILUTION AU 1/10e : Concentration obtenue 0,1 ng/ml

↓

dépôt dans 2 tubes à réaction de 0,4 ml

↓

DILUTION AU 1/2 : Concentration obtenue 0,05 ng/ml

↓

dépot dans 2 tubes à réaction de 0,4 ml

↓

DILUTION AU 1/2 : Concentration obtenue 0,025 ng/ml

↓

dépôt

↓

DILUTION AU 1/2 : Concentration obtenue 0,0125 ng/ml

↓

dépôt

↓

DILUTION AU 1/2 : Concentration obtenue 0,00625 ng/ml

↓

dépôt

↓

DILUTION AU 1/2 : Concentration obtenue 0,003125 ng/ml

↓

dépôt

Toutes les dilutions sont agitées une minute au Vortex.

Nous déposons ensuite, à l'aide d'une pipette, 100µl de lysat dans tous les tubes.

Les tubes sont agités puis placés dans l'incubateur.

La turbidité est lue toutes les 10 secondes jusqu'à une augmentation de 20 miliunités.

III - RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec les tubes à dilutions les pipettes et les cônes de micropipette d'Amilabo, puis nous avons utilisé notre propre matériel. Nous avons également changé de manipulateur.

Dans les tableaux pages suivantes, nous avons rassemblé les résultats selon l'ordre des manipulations.

* 1er tableau : description des manipulations,
* 2ème tableau : récapitulatif de tous les temps de réaction,
* 3ème tableau : récapitulatif de concentrations trouvées,
* 4ème tableau : récapitulatif des caractéristiques des droites de régression.

TABLEAU 1

DESCRIPTION DES MANIPULATIONS

N° MANIPULATION	CARACTERISTIQUES	
	Manipulateur	Matériel
1	Stagiaire	Petits matériels Amilabo
2	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire et pipettes Amilabo
3	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire
4	Technicienne	Petits matériels du laboratoire
5	Stagiaire	Petit matériels du laboratoire
6	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire
7	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire et pipettes stériles à usage unique
8	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire
9	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire
10	Stagiaire	Petits matériels du laboratoire et pipettes stériles à usage unique

Petits matériels = tubes pour dilution, pipettes en verre, cônes de distribution.

TABLEAU 2

TEMPS DE REACTIONS SELON LES CONCENTRATIONS EN ENDOTOXINE
(temps en secondes)

N° de la manipulation	SOLUTION 0,1000 ng/ml	SOLUTION 0,0500 ng/ml	SOLUTION 0,0250 ng/ml	SOLUTION 0,0125 ng/ml	SOLUTION 0,0062 ng/ml	SOLUTION 0,0031 ng/ml
1	740 770	850 840	970 990	1 150 1 160	1 350 1 350	1 570 1 610
2	790 790	930 920	1 140 1 160	1 340 1 310	1 700 1 550	
3	1 230 1 160	1 390 1 410	1 680 1 750	1 950 1 970	2 240 2 260	2 440
4	1 110 1 050	1 290 1 270	1 490 1 510	1 620 1 500	1 920 1 900	2 250
5	 1 040	1 080 1 080	1 150 1 140	1 300 1 280	1 480 1 480	
6	1 070 1 070	1 110 1 070	1 210 1 200	1 400 1 350	1 580 1 580	1 880 1 830
7	1 070 1 040	1 220 1 120	1 200 1 260	1 400 1 430	1 740 1 730	1 820 1 930
8	1 180 1 220	1 300 1 220	1 340 1 390	1 530 1 480	1 660 1 660	1 750 1 800
9	1 150 1 130	1 310 1 290	1 410 1 410	1 550 1 520	1 700 1 730	1 940 1 780
10	840 860	1 010 860	1 220 1 140	1 300 1 320	1 530 1 500	1 770 1 770

TABLEAU 3

CONCENTRATIONS EN ENDOTOXINE RETROUVEES
(ng/ml)

N° de la manipulation	SOLUTION 0,1000 ng/ml	SOLUTION 0,0500 ng/ml	SOLUTION 0,0250 ng/ml	SOLUTION 0,0125 ng/ml	SOLUTION 0,0062 ng/ml	SOLUTION 0,0031 ng/ml
1	0,1000 0,0820	0,0510 0,0540	0,0280 0,0270	0,0130 0,0130	0,0061 0,0063	0,0031 0,0028
2	0,0980 0,1000	0,0510 0,0540	0,0230 0,0220	0,0120 0,0140	0,0049 0,0071	
3	0,0890 0,1100	0,0520 0,0490	0,0230 0,0190	0,0120 0,0110	0,0066 0,0065	<u>0,0045</u>
4	0,0950 0,1200	0,0470 0,0490	0,0240 0,0240	0,0150 <u>0,0210</u>	0,0064 0,0069	0,0030
5	<u>0,0550</u> <u>0,0360</u>	0,0430 0,0430	0,0310 0,0300	0,0140 0,0130	0,0055 0,0057	
6	<u>0,0480</u> <u>0,0490</u>	0,0410 0,0500	0,0260 0,0280	0,0120 0,0150	0,0064 0,0065	0,0027 0,0030
7	<u>0,0740</u> 0,0890	0,0420 <u>0,0660</u>	<u>0,0400</u> 0,0280	0,0140 0,0140	0,0047 0,0051	0,0037 <u>0,0020</u>
8	0,0960 0,0760	0,0430 <u>0,0730</u>	<u>0,0340</u> 0,0240	0,0120 0,0150	0,0058 0,0060	0,0037 <u>0,0023</u>
9	0,1000 0,1000	<u>0,0370</u> 0,0440	0,0230 0,0220	0,0130 0,0140	0,0070 0,0060	0,0030 0,0047
10	0,0990 0,1200	0,0430 0,0550	<u>0,0170</u> 0,0250	0,0130 0,0170	0,0059 0,0063	0,0031 0,0031

Les chiffres soulignés sont à plus ou moins **25 %** de la valeur théorique.

TABLEAU 4

CARACTERISTIQUES DES DROITES

N° MANIPULATION	PENTE	Y (valeur hypothétique si x = 0)	COEFFICIENT DE CORRELATION
1	- 0,215	2,650	0,998
2	- 0,254	2,640	0,996
3	- 0,232	2,840	0,997
4	- 0,206	2,830	0,995
5	- 0,155	2,820	0,983
6	- 0,194	2,770	0,994
7	- 0,177	2,830	0,981
8	- 0,122	2,950	0,983
9	- 0,152	2,900	0,997
10	- 0,214	2,700	0,991

Pente moyenne = 0,171

Coéfficient de variation = 24,93 %

IV - INTERPRETATION

A) ANALYSE DES TEMPS DE REACTIONS :

Nous observons que les manipulations 1, 2 et 10 présentent des faibles temps de réactions. Ces trois manipulations ont été réalisées avec des pipettes stériles à usage unique. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer que ces faibles temps de réactions sont uniquement dus à l'utilisation de ces pipettes. Dans la manipulation 7, ce sont ces mêmes pipettes qui ont été utilisées et les temps de réactions sont plus élevés.

Le fait d'avoir changé de manipulateur (manipulation 4) n'entraîne pas de modification importante.

B) ANALYSE DES CONCENTRATIONS RETROUVEES :

Pour les manipulations 5 et 6, nous notons une erreur de manipulation la solution contenant théoriquement 0,05 ng/ml a été dosée deux fois de suite.

Au total, nous avons 113 valeurs ; 12 valeurs sont hors des limites c'est-à-dire à + ou - 25 % de valeur théorique. Ceci nous fait un taux d'erreur de 10,62 %. Mais quatre erreurs sont dues au manipulateur donc en réalité nous avons 7,08 % d'erreur.

Nous considérons que les valeurs expérimentales trouvées pour une même valeur théorique appartiennent à une distribution normale.

Pour chaque concentration théorique, nous calculons les écarts types :

CONCENTRATION THEORIQUE	ECART TYPE
0,1 ng/ml	0,01167
0,5 ng/ml	0,00461
0,025 ng/ml	0,00308
0,0125 ng/ml	0,00114
0,00625 ng/ml	0,00062
0,003125 ng/ml	0,00054

Nous constatons que la précision du dosage augmente avec les dilutions.

C) ANALYSE DES DROITES DE REGRESSION :

Nous constatons que les pentes et les Y internes varient beaucoup et même pour des manipulations identiques. Théoriquement, pour des conditions opératoires parfaitement définies, la pente et Y interne sont constants à + ou - 10 %.

Dans notre cas, pour des manipulations semblables (3-5-6-8 et 9), le coéfficient de variation est de 24,93 % et par rapport à la pente moyenne nous observons des écarts de :

* pour la manipulation 3 : 35,07 %
* pour la manipulation 5 : 9,36 %
* pour la manipulation 6 : 13,45 %
* pour la manipulation 8 : 28,65 %
* pour la manipulation 9 : 11,11 %

Nous ne sommes pas reproductibles malgré la standardisation de chaque étape de la manipulation.

Il est à noter que nous avons utilisé du matériel qui n'était pas forcément adapté à cette manipulation :

- utilisation d'erlemeyer pour la dilution au 1/100e (absence de cône d'agitation),

- cône de distribution de micropipettes que nous avons stérilisé à l'autoclave. Ces cônes ont été utilisés ainsi, sans avoir évalué l'incidence de la stérilisation sur les caractéristiques des cônes.

V - CONCLUSION

Ce dosage apparaît intéressant pour sa précision (écart type des concentrations expérimentales faible) et surtout du fait que nous pouvons tout visualiser.

Cependant il faut améliorer sa reproductibilité en travaillant avec un matériel mieux approprié. Du matériel qui est parfaitement adapté à un type de dosage ne l'est pas forcément pour une autre méthode. Il faut également définir une procédure de travail très précise.

CHAPITRE III - DOSAGE CHROMOGENIQUE

POINT FINAL

Pour étudier ce type de dosage, nous travaillons avec une méthode manuelle en trois temps :

- 1 : addition du lysat
- 2 : addition du substrat
- 3 : addition de réactif d'arrêt.

I - APPAREIL - REACTIFS

La réaction colorée est réalisée dans des tubes placés dans un bain marie à 37° C.

Nous mesurons la densité optique des solutions en utilisant un spectrophotomètre à lampe quartz-iode. La longueur d'onde est fixée à 405 nm. Pour faire la réaction, nous utilisons un kit coatest[R] endotoxine de Kabi Pharmacia. Celui-ci se compose :

- d'un substrat chromogénique, S2423. La solution reconstituée est à 2 mmol/l,
- du lysat d'amoebocytes lyophilisé qui est remis en solution extemporanément,
- de l'endotoxine de contrôle qui est reconstituée selon l'indication du fournisseur de façon à obtenir 12 EU/ml,
- d'un tampon tris à 50 mmol/l pH9, stérile et apyrogène,
- d'un flacon d'eau stérile et apyrogène.

Lors du dosage, nous préparons extemporanément une solution de travail qui est un mélange à volume égal de substrat chromogénique et de tampon tris. D'autre part, le réactif d'arrêt est préparé au laboratoire ; c'est une solution d'acide acétique à 20 %.

II - ETUDE DU TEST

Ce dosage est une réaction colorée. Nous mesurons l'absorbance d'une gamme étalon d'endotoxine et nous traçons la droite des absorbances en fonction des concentrations.

La droite est linéaire pour des concentrations allant de 0,1 à 1 EU/ml.

Notre étude portera essentiellement sur la réalisation de cette droite étalon qui sera toujours effectuée de la façon suivante :

a) Préparation de la gamme étalon :

SOLUTION APYROGENE	SOLUTION D'ENDOTOXINE A 12 EU/ml	CONCENTRATION FINALE
µl	µl	EU/ml
2000	0	0
1975	25	0,15
1950	50	0,3
1900	100	0,6
1850	150	0,9

La solution à 12 EU/ml est agitée pendant 10 minutes au vortex. Les dilutions sont agitées 1 minute au vortex.

b) Dosage :

	QUANTITE
Etalon	100 µl
Incubation à 37° C : 5 mn	
LAL	100 µl
Incubation à 37° C : 10 mn	
Solution de travail	200 µl
Agitation	
Incubation à 37° C : 3 mn	
Réactif et arrêt	400 µl

Les densités optiques sont lues immédiatement.

Nous avons étudié, à partir de gammes étalons :

- la reproductibilité
- la répétabilité
- la stabilité dans le temps de la coloration du dosage.

A) REPRODUCTIBILITE :

Cette étude est faite à partir de dosages effectués sur des gammes étalons préparées selon le protocole décrit précédemment.

1 - RESULTATS :

Les résultats des dosages permettent de tracer les droites de régression et de calculer les coéfficients de corrélation et les pentes. (Voir les 5 pages suivantes).

CONCENTRATION EU/ml	Blanc	0,150	0,300	0,600	0,900
DENSITE OPTIQUE 1er tube	0,064	0,130	0,279	0,545	0,879
DENSITE OPTIQUE 2ème tube	0,035	0,138	0,282	0,563	0,846
Moyenne	0,049	0,134	0,280	0,554	0,862
Moyenne moins blanc	0	0,084	0,231	0,504	0,813

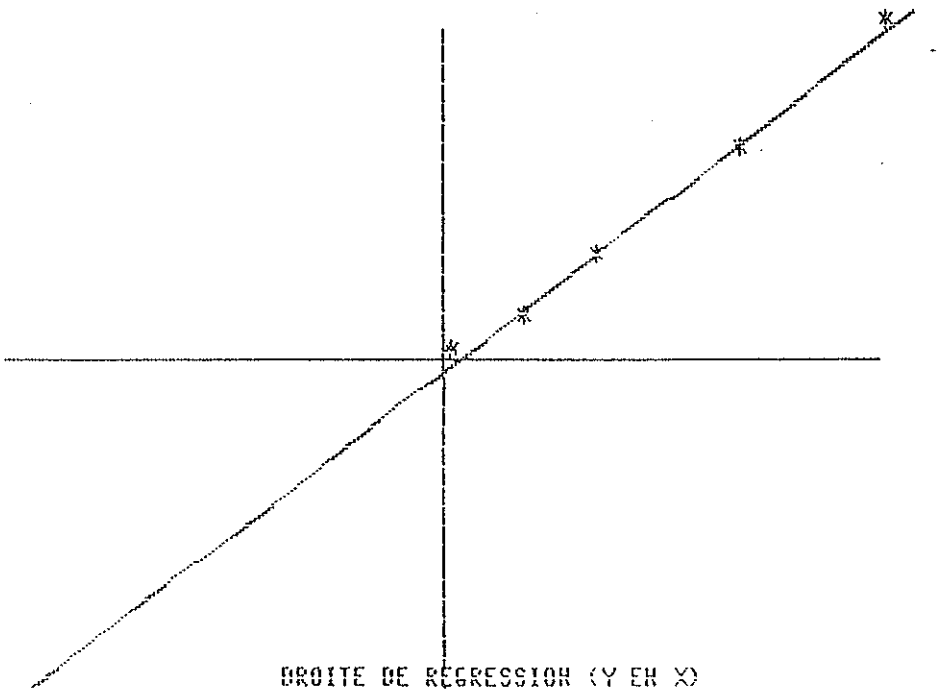
REGRESSION LINEAIRE
****
RESULTATS

X(I)	Y(I)
0	0
0.15	8.4E-2
0.3	0.231
0.6	0.504
0.9	0.813

EQUATION DE LA DROITE Y= 0.9186206896551*X+-3.18620689654E-2

COEFFICIENT DE CORRELATION= 0.9974893708031

****



CONCENTRATION EU/ml	Blanc	0,150	0,300	0,600	0,900
DENSITE OPTIQUE 1er tube	0,036	0,136		0,551	0,824
DENSITE OPTIQUE 2ème tube	0,050	0,141	0,239	0,470	0,812
Moyenne	0,043	0,138	0,239	0,510	0,818
Moyenne moins BLANC	0	0,095	0,196	0,467	0,775

****

REGRESSION LINEAIRE

****

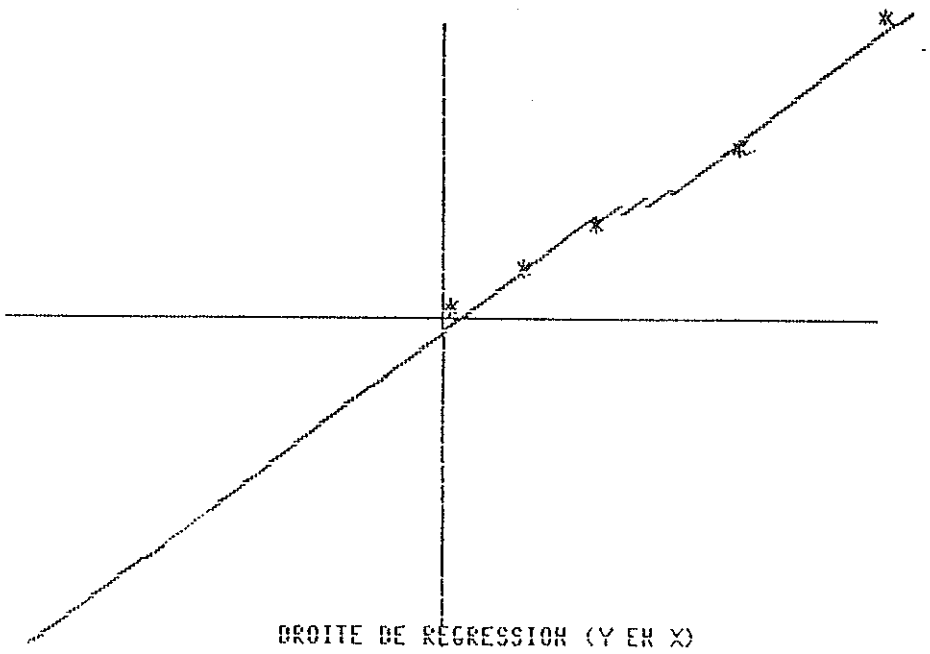
RESULTATS

X(I)	Y(I)
0	0
0.15	9.5E-2
0.3	0.196
0.6	0.467
0.9	0.775

EQUATION DE LA DROITE Y= 0.8675862068965*X+-3.17586206896E-2

COEFFICIENT DE CORRELATION= 0.9959214279005

****



DROITE DE REGRESSION (Y EN X)

CONCENTRATION EU/ml	Blanc	0,150	0,300	0,315	0,600
DENSITE OPTIQUE 1er tube	0,049	0,133	0,304	0,317	0,681
DENSITE OPTIQUE 2ème tube		0,149	0,311	0,326	0,641
Moyenne	0,049	0,141	0,307	0,321	0,661
Moyenne moins blanc	0	0,092	0,250	0,272	0,612

****

REGRESSION LINEAIRE

****

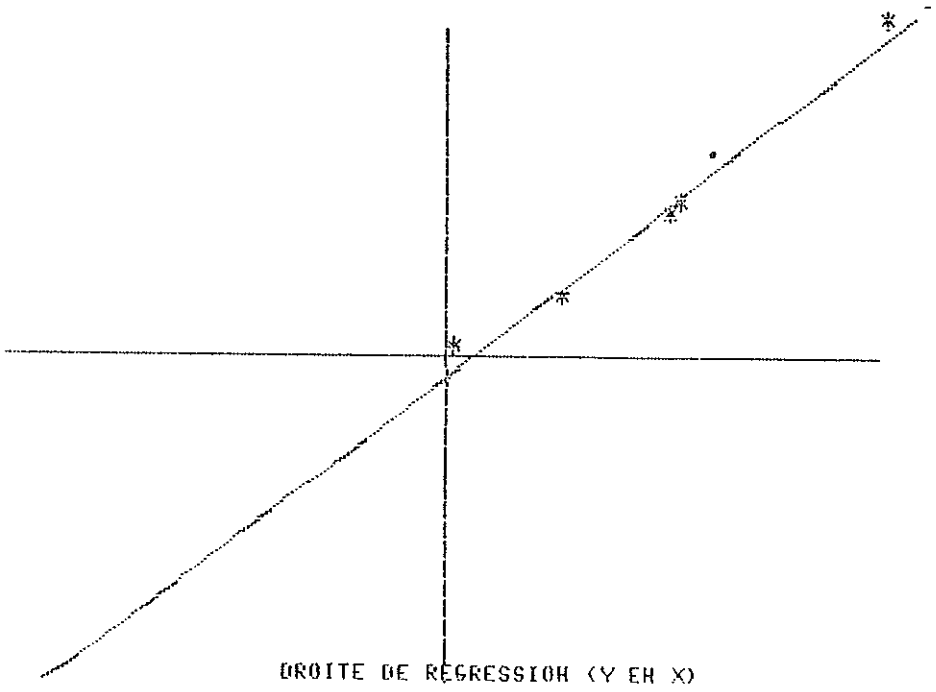
RESULTATS

X(I)	Y(I)
0	0
0.15	9.2E-2
0.3	0.25
0.315	0.272
0.6	0.612

EQUATION DE LA DROITE Y= 1.039692585895*X+-3.86360759493E-2

COEFFICIENT DE CORRELATION= 0.9915597691912

****



DROITE DE REGRESSION (Y EN X)

CONCENTRATION EU/ml	Blanc	0,150	0,300	0,600	0,900
DENSITE OPTIQUE 1er tube	0,025	0,170	0,282	0,595	0,856
DENSITE OPTIQUE 2ème tube	0,063	0,183	0,353	0,679	0,855
Moyenne	0,044	0,176	0,317	0,637	0,855
Moyenne sans blanc	0	0,132	0,273	0,593	0,811

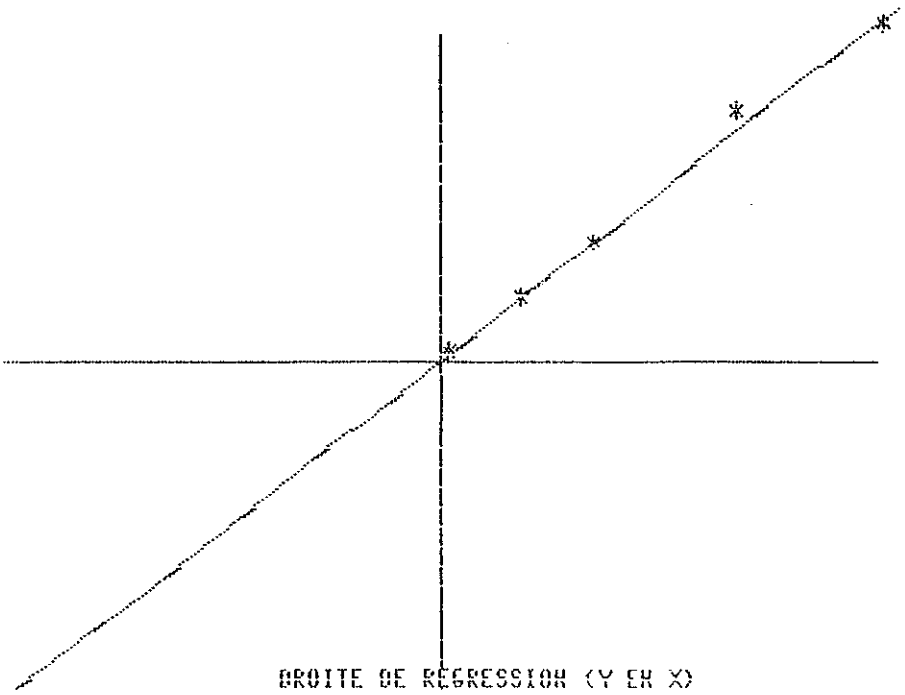
REGRESSION LINEAIRE
****
RESULTATS

X(I)	Y(I)
0	0
0.15	0.132
0.3	0.273
0.6	0.593
0.9	0.811

EQUATION DE LA DROITE Y= 0.9231609195402*X+ 1.7672413794E-3

COEFFICIENT DE CORRELATION= 0.9977989803561

****



DROITE DE REGRESSION (Y EN X)

CONCENTRATION EU/ml	Blanc	0,150	0,300	0,600	0,900
DENSITE OPTIQUE 1er tube	0,04	0,148	0,324	0,630	0,919
DENSITE OPTIQUE 2ème tube		0,145	0,322	0,640	0,944
Moyenne	0,04	0,146	0,323	0,635	0,931
Moyenne sans blanc	0	0,106	0,283	0,595	0,891

****

REGRESSION LINEAIRE

****

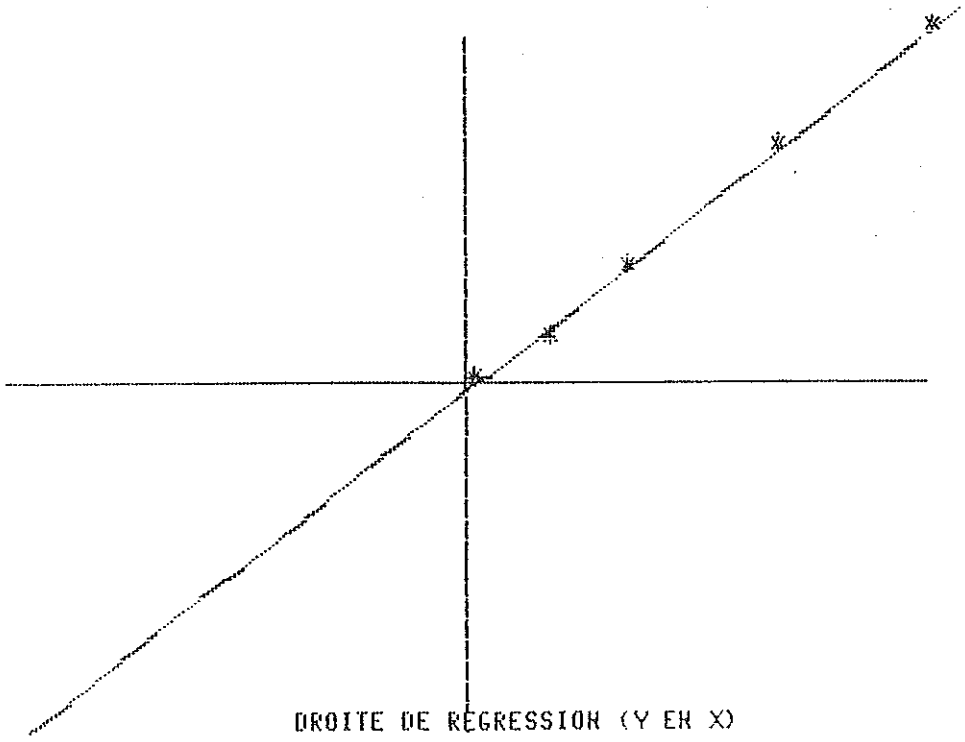
RESULTATS

X(I)	Y(I)
0	0
0.15	0.106
0.3	0.283
0.6	0.595
0.9	0.891

EQUATION DE LA DROITE Y= 1.012356321839*X+-1.98189655172E-2

COEFFICIENT DE CORRELATION= 0.9989490008454

****



DROITE DE REGRESSION (Y EN X)

2 - INTERPRETATIONS :

Toutes les droites obtenues sont conformes :

- les coéfficients de corrélation varient de 0,992 à 0,999,
- les pentes sont comprises entre 0,87 et 1,04.

Rappelons les normes : coéfficient de corrélation supérieur à 0,98 et pente comprise entre 0,4 et 1,4.

Le coéfficient de variation calculé à partir des pentes est de 7,35 %. Il est élevé mais nous devons noter qu'il y a eu peu d'essais de faits.

B) ETUDE DE LA REPETABILITE :

Nous préparons deux dilutions d'endotoxine :

* 0,3 EU/ml
* 0,9 EU/ml

Cinq tests LAL sont réalisés pour chaque dilution, dans l'ordre suivant :

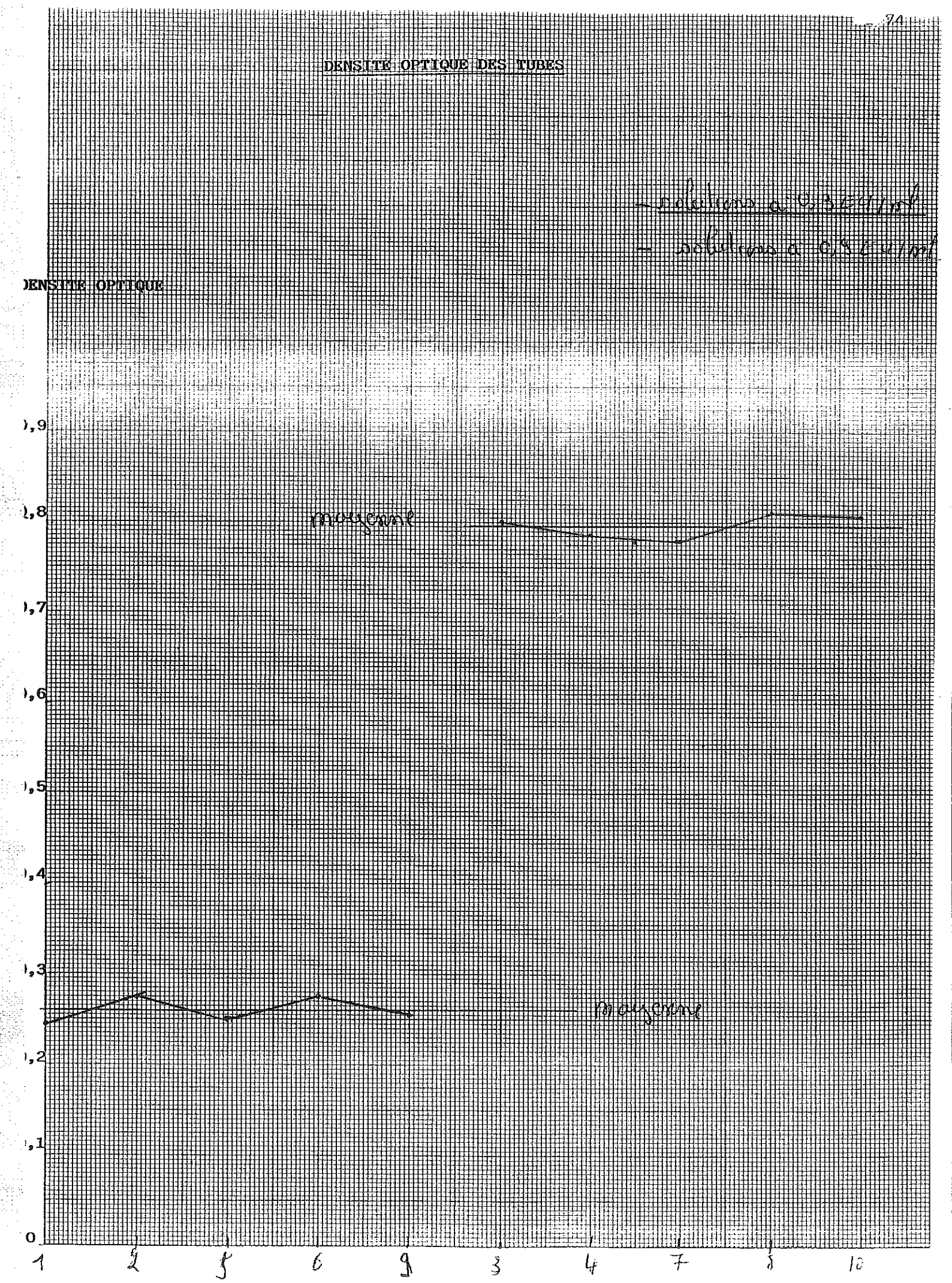
0,3 - 0,3 - 0,9 - 0,9 - 0,3 - 0,3 - 0,9 - 0,9 - 0,3 - 0,9

A la fin du dosage, les densités optiques sont mesurées.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7
CONCENTRATION EN ENDOTOXINE	0,300	0,300	0,900	0,900	0,300	0,300	0,900
DENSITES OPTIQUES	0,246	0,274	0,800	0,785	0,250	0,276	0,779

TUBES	8	9	10
CONCENTRATION EN ENDOTOXINE	0,900	0,300	0,900
DENSITES OPTIQUES	0,813	0,254	0,807

DENSITE OPTIQUE DES TUBES



Pour chaque concentration, nous considérons que les valeurs des densités optiques appartiennent à une distribution normale.

Pour la solution à 0,3 EU/ml, nous avons :
* moyenne = 0,261
* écart type = 0,013
* coéfficient de variation = 5,01 %

Pour la solution à 0,9 EU/ml, les valeurs sont :
* moyenne = 0,797
* écart type = 0,013
* coéfficient de variation = 1,81 %

Les écarts types sont semblables, la précision du dosage est la même pour les deux solutions.

Pour ce type de dosage, les coéfficients de variation sont satisfaisants.

C) CONSERVATION DE LA SOLUTION COLOREE :

L'étude est faite à partir de l'essai réalisé pour l'analyse de la répétabilité.

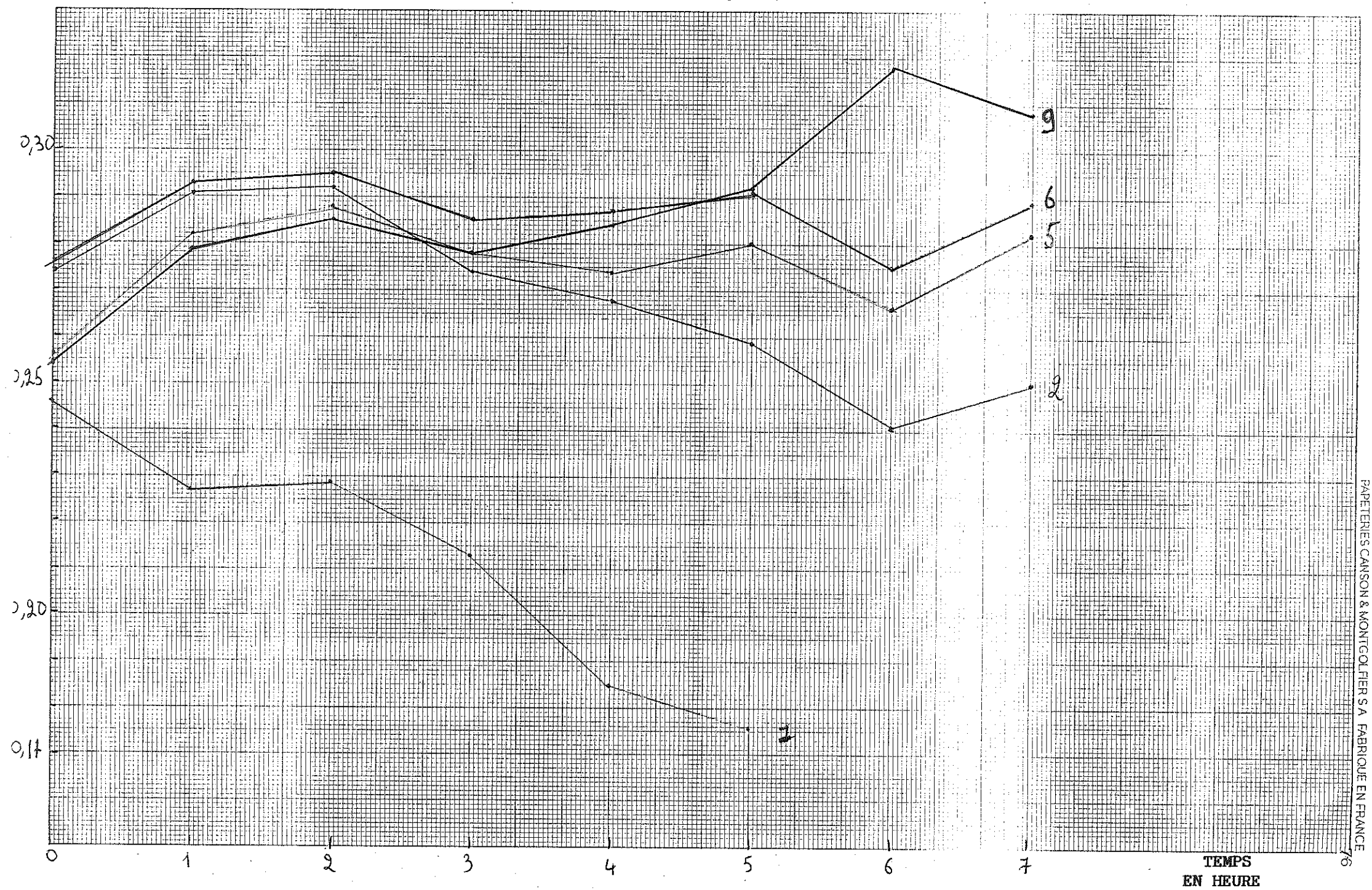
La densité optique des solutions est mesurée toutes les heures.

N° tubes * / TEMPS	1	2	5	6	9
0 heure	0,246	0,274	0,256	0,276	0,254
1 heure	0,227	0,291	0,282	0,293	0,279
2 heures	0,229	0,292	0,288	0,295	0,285
3 heures	0,213	0,274	0,278	0,285	0,278
4 heures	0,185	0,268	0,274	0,287	0,284
5 heures	0,176	0,259	0,286	0,291	0,292
6 heures		0,241	0,266	0,275	0,317
7 heures		0,250	0,282	0,289	0,308

(* solution à 0,3 EU/ml)

DENSITE OPTIQUE

SOLUTION A 0,3 EU/ml



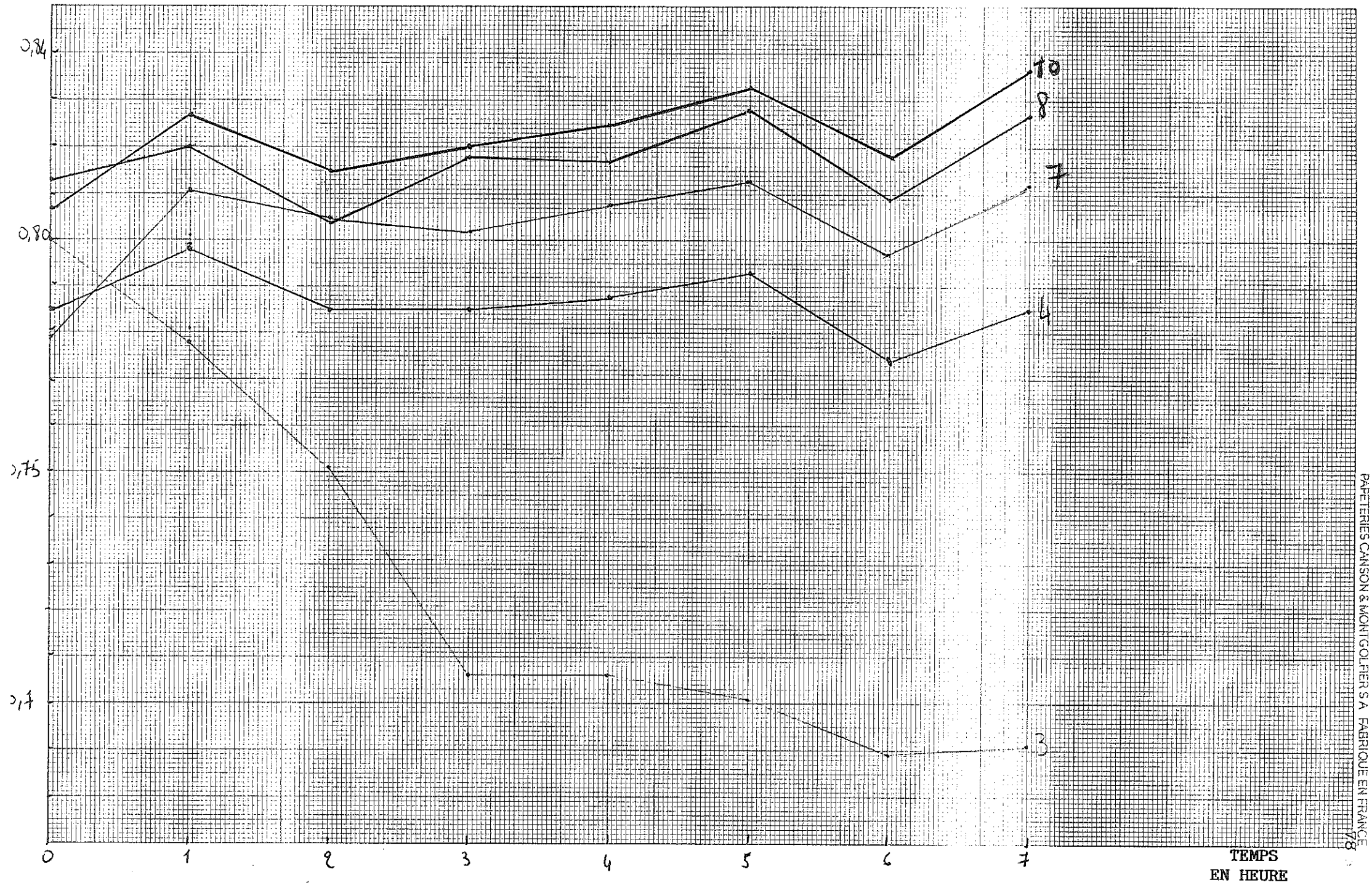
PAPETERIES CANSON & MONTGOLFIER S.A. FABRIQUE EN FRANCE

TEMPS \ N° tubes *	3	4	7	8	10
0 heure	0,800	0,785	0,779	0,813	0,807
1 heure	0,770	0,798	0,811	0,820	0,827
2 heures	0,751	0,785	0,805	0,804	0,815
3 heures	0,706	0,785	0,802	0,818	0,820
4 heures	0,706	0,788	0,808	0,817	0,825
5 heures	0,701	0,793	0,813	0,828	0,833
6 heures	0,689	0,774	0,797	0,809	0,818
7 heures	0,691	0,785	0,812	0,827	0,837

(* solution à 0,9 EU/ml)

DENSITE OPTIQUE

SOLUTION A 0,9 EU/ml



PAPETERIES CANSON & MONTGOLFIER S.A. FABRIQUE EN FRANCE 78

Pour la lecture des absorbances, nous commençons par les solutions à 0,3 EU/ml ; nous ne rinçons pas la cuve entre les lectures.

La courbe n° 1 correspond à la lecture du premier tube à 0,3 EU/ml, la courbe n° 3 correspond à la lecture du premier tube à 0,9 EU/ml.

Pour ces deux courbes, nous constatons une diminution de l'absorbance due à un phénomène de dilution.

Les courbes correspondant à 0,9 EU/ml évoluent de façon assez similaire. Il en est de même pour les courbes correspondant à 0,3 EU/ml pendant les trois premières heures.

En conclusion, nous devons donc mesurer toutes les densités optiques en même temps et dans des cuves bien sèches. La lecture doit se faire dans les trois premières heures qui suivent la réaction.

III - APPLICATIONS

Avant d'arriver sur le marché, chaque nouveau lot de médicaments subit un grand nombre de contrôles : matières premières, produits en cours de fabrication, produits finis.

Parmi les matières premières, nous distinguons les matières premières de conditionnement dont les bouchons qui, pour un produit destiné à la voie parentérale, doivent être stériles et apyrogènes. Pour vérifier l'apyrogénéicité des bouchons, nous réalisons un test LAL qui est fait sur une solution devant contenir la totalité des endotoxines éventuellement fixées sur les bouchons.

Les endotoxines étant fortement absorbées par les matières plastiques, pour préparer la solution, nous devons utiliser une procédure d'extraction. Cette procédure doit être validée. Pour cela, nous opérons en deux temps :

- vérification de l'absence de pouvoir activateur ou inhibiteur des bouchons sur la réaction endotoxine-lysat,

- quantification d'une solution d'extraction préparée à partir de bouchons ayant reçu préalablement un dépôt quantifié d'endotoxine.

Les quantifications effectuées dans la 2ème étape ont été réalisées selon la technique chromogénique point final.

EXTRAIT DE LA PROCEDURE

	CONTROLE DE DEPYROGENATION DES BOUCHONS	Page : 2/3

- Faire l'échantillon de 13 bouchons dans un récipient apyrogène
- Couvrir par 200 ml d'eau p p i chaude (60° C)
- Agiter - faire un temps de contact 15 minutes
- Recueillir cette 1e eau de lavage - A1
- Couvrir à nouveau par 200 ml d'eau p p i chaude (60° C)
- Agiter faire un temps de contact 30 minutes
- Recueillir cette 2e eau de rinçage - A2
- Faire la quantification de A1 et A2 par test L.A.L
- Prévoir le témoin d'eau p p i sous bouchon dans les mêmes conditions

A) DEPOT D'ENDOTOXINE :

Dans un premier temps, nous déposons, sur des bouchons apyrogènes, 200µl d'une solution d'endotoxine. Cette solution est quantifiée par la même technique et le même réactif qui sert ensuite pour la quantification des eaux de rinçage des bouchons.

Le test LAL utilisé est un test chromogénique en point final (coatest de Kabi).

1 - MATERIEL :

- tubes en verre apyrogènes,
- pipettes en verre apyrogènes,
- micropipette de 100µl et embouts stériles,
- un Vortex,
- bain-marie à 37° C,
- un thermomètre,
- un chronomètre,
- un spectrophotomètre réglé à 405 nm.

2 - REACTIFS :

- endotoxine de contrôle : lot 29007 51 ; le flacon contient 12 EU/ml lorsqu'il est reconstitué par 3,4 ml d'eau LAL,
- LAL : lot 29008 51 ; nous devons reconstituer le lysat par 1,4 ml d'eau LAL,
- substrat chromogénique : lot 29009 51 ; nous reconstituons la solution par 6,6 ml d'eau LAL,
- eau LAL : lot 28872 51 ; flacon de 50 ml,
- tampon : lot 89758 51 ; tampon Tris 50 mml/l pH 9.

3 - MODE OPERATOIRE :

a) Etalonnage :

La solution d'endotoxine est agitée 5 minutes au Vortex puis nous préparons des dilutions d'endotoxine selon le tableau ci-après.

SOLUTION D'ENDOTOXINE 0 12 EU/ml (µl)	EAU APYROGENE (µl)	CONCENTRATION FINALE EN ENDOTOXINE (EU/ml)
25	1975	0,15
50	1950	0,3
100	1900	0,6
150	1850	0,9

b) Dosage :

Nous plaçons des tubes à incuber dans un bain-marie à 37° C puis nous ajoutons successivement :

- échantillon ou étalon : 100 µl

Nous laissons incuber 5 minutes à 37° C,

- LAL : 100 µl

Nous agitons et laissons incuber 10 minutes à 37° C,

- solution de travail à 37° C : 200 µl

Nous agitons et laissons incuber 3 minutes à 37° C,

- acide acétique à 20 % : 400 µl

Nous agitons et nous mesurons l'absorption de l'échantillon à 405 nm.

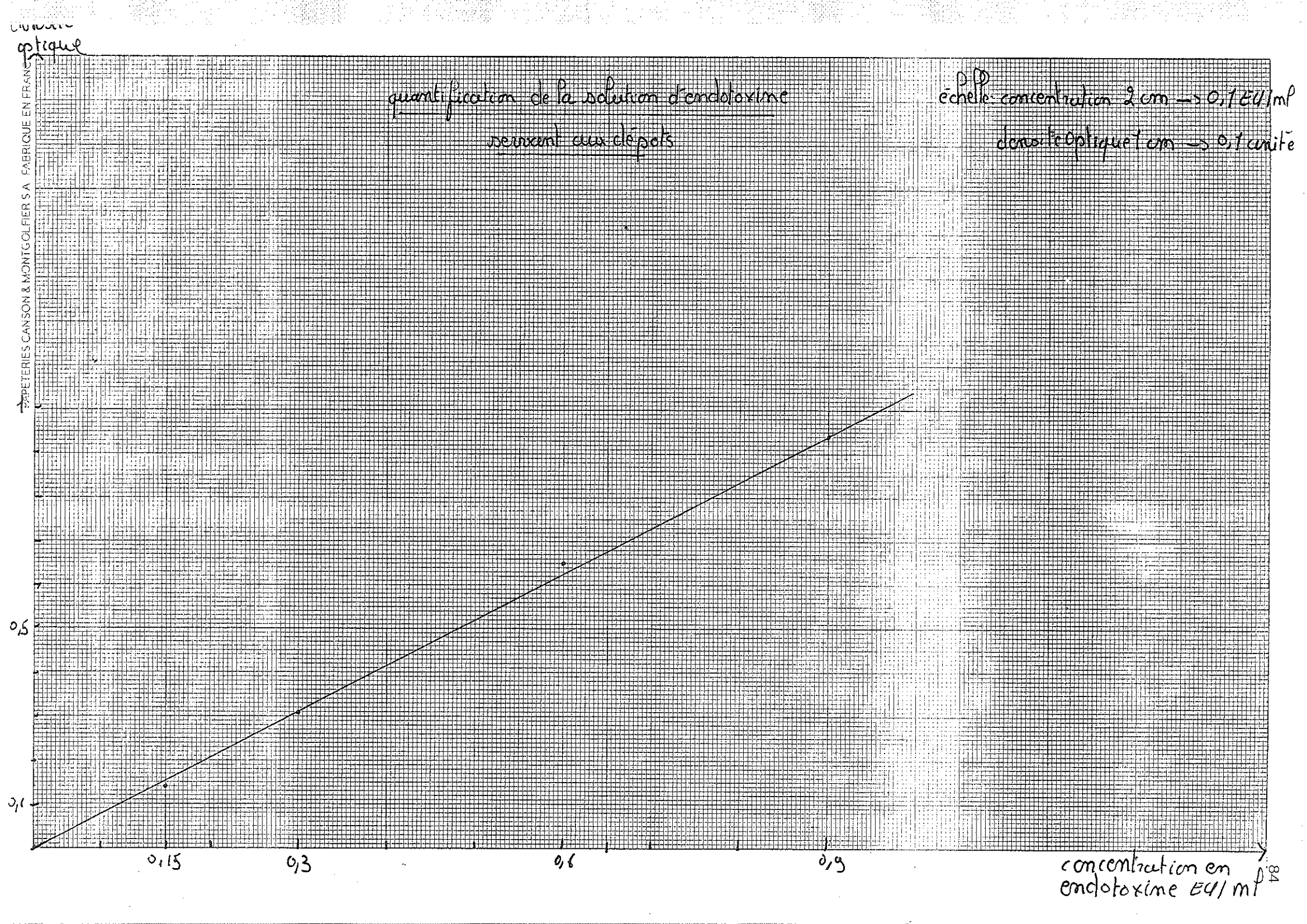
REMARQUES :

- tous les tubes sont dupliqués,
- la solution de travail est un mélange, à volume égal, de tampon tris et de substrat chromogénique.

4 - RESULTATS :

Concentration en endotoxine ou échantillon	0,15	0,3	0,6	0,9	Solution X
Densité optique du 1er tube	0,133	0,304	0,681	0,936	0,391
Densité optique du 2ème tube	0,149	0,311	0,641	0,954	0,433
MOYENNE	0,141	0,307	0,661	0,940	0,412

Solution X : solution servant à faire le dépôt.


densité optique
quantification de la solution d'endotoxine
serment aux dépots
échelle: concentration 2 cm → 0,1 EU/ml
densité optique 1 cm → 0,1 unité
0,5
0,1
0,15
0,3
0,6
0,9
concentration en endotoxine EU/ml
84

Pente de la droite :

$$\frac{0,94 - 0,31}{0,9 - 0,3} = 1,05$$

La droite est conforme car la pente est comprise entre 0,4 et 1,5. Nous pouvons donc calculer la concentration de la solution à tester.

La concentration correspondant à une densité optique de 0,41 est 0,395 EU/ml.

Notre produit est dilué au 1/100e donc la concentration de la solution est :

$$0,395 \times 100 = 39,5 \text{ EU/ml.}$$

Nous avons déposé 0,2 ml de cette solution sur la face interne de 13 bouchons. La quantité d'endotoxine totale est donc de :

$$0,2 \times 13 \times 39,5 = 102,7 \text{ unités.}$$

B) QUANTIFICATION DES EAUX DE RINCAGE :

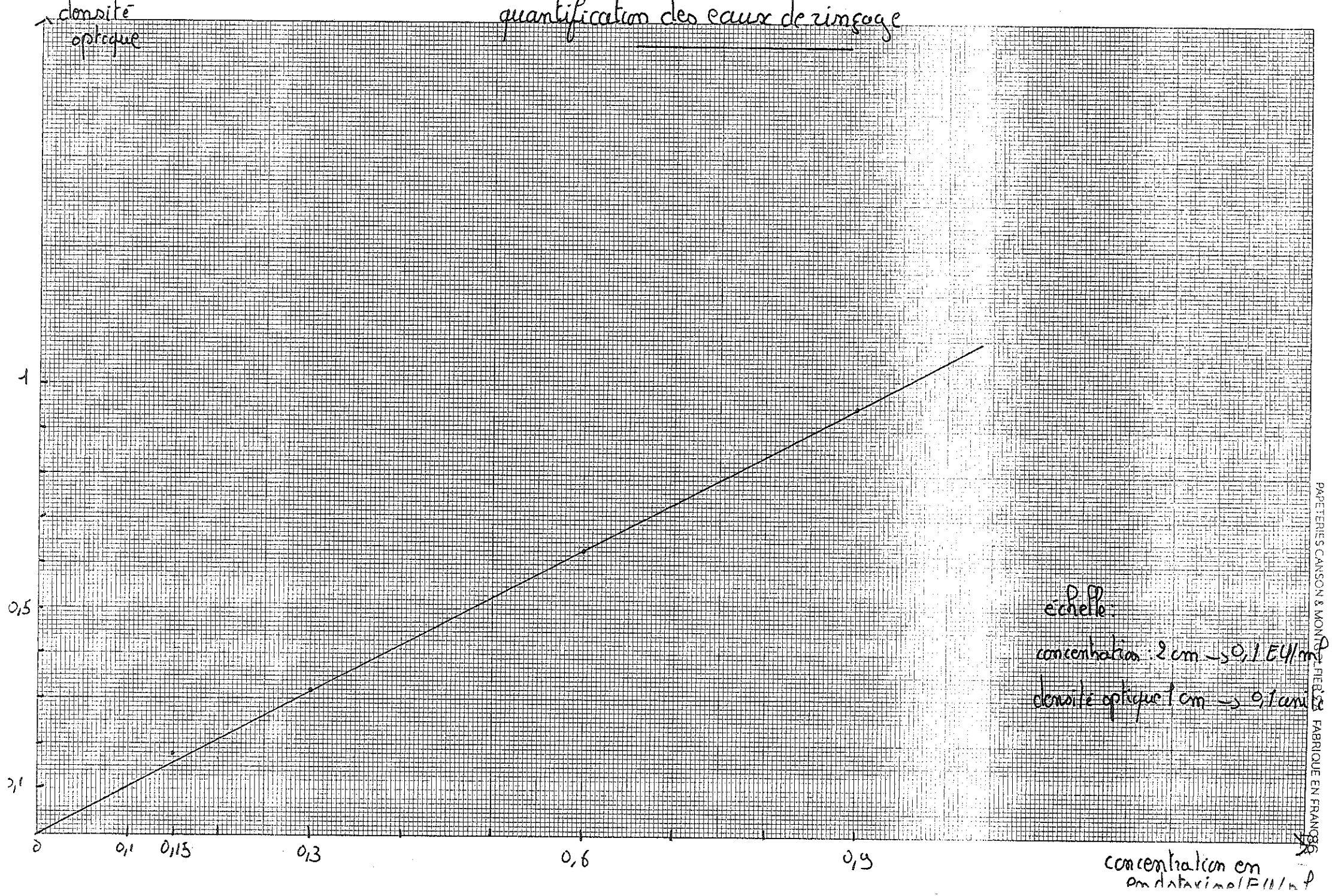
Les bouchons ayant reçu le dépôt d'endotoxine sont mis à sécher. Nous les traitons ensuite selon la procédure déjà utilisée par les essais d'inhibition et d'apyrogénéicité. Les bouchons sont alors rincés par deux fois 200 ml d'eau ppi.

Ces solutions de rinçage sont ensuite quantifiées en utilisant la même technique, le même matériel et les mêmes réactifs que pour le dosage précédent.

RESULTATS :

ETALONS OU ECHANTILLONS	**0,15**	**0,3**	**0,6**	**0,9**	**Témoin eppi**	**1ère eau**	**2ème eau**
DENSITE OPTIQUE 1er TUBE	0,170	0,282	0,595	0,968	0,018	0,412	0,153
DENSITE OPTIQUE 2ème TUBE	0,183	0,353	0,679	0,932	0,022	0,422	0,167
MOYENNE	**0,177**	**0,317**	**0,634**	**0,950**	**0,02**	**0,417**	**0,160**

quantification des eaux de rinçage



PAPETERIES CANSON & MONTGOLFIER FABRIQUE EN FRANCE

Pente de la droite d'étalonnage :

$$\frac{0,950 - 0,315}{0,9 - 0,6} = 1,06$$

La droite est conforme, nous pouvons donc déduire les concentrations en endotoxine des solutions.

Nous tenons compte de la densité optique du témoin que nous retranchons à celle des eaux de rinçage :

1ère eau : 0,417 - 0,02 = 0,397
2ème eau : 0,160 - 0,02 = 0,140

Les concentrations correspondantes sont :

1ère eau : 0,38 EU/ml
2ème eau : 0,135 EU/ml

La quantité d'endotoxine contenue dans chaque eau de rinçage est :

1ère eau : 0,38 x 200 = 76 unités
2ème eau : 0,135 x 200 = 27 unités

soit un total de 76 + 27 = 103 unités.

C) CONCLUSION :

Nous avons déposé 102,7 unités d'endotoxine, nous recueillons 103 unités d'endotoxine.

Les bouchons étant apyrogènes avant d'avoir effectué le dépôt, nous avons donc recueilli la totalité des endotoxines.

La procédure utilisée pour le contrôle de dépyrogénation des bouchons a été efficace.

L'utilisation de ce dosage nous permet de conclure avec beaucoup plus de précision que si nous avions travaillé avec la technique de référence.

CHAPITRE IV - D O S A G E

C H R O M O G E N I Q U E C I N E T I Q U E

La mise en pratique de ce dosage a été précédée d'un stage de formation et d'information sur la technique. Nous avons travaillé avec un lecteur automatique de densité optique.

I - APPAREIL

Pour ce dosage chromogénique, nous utilisons le système Kinetic QCL de Whittaker, agréé FDA. Il se compose principalement :

- d'un lecteur de microplaque Kinetic QCL thermostaté à 37° C comportant 4 filtres (340 - 405 - 450 et 620 nm),
- d'une imprimante,
- d'un réactif colyophilisé : LAL et substrat chromogénique,
- de logiciels intégrés permettant la réalisation de validation et l'interprétation de tests LAL. Ils permettent l'archivage des noms de techniciens, des noms de produits et de 30 courbes d'étalonnage.

II - MANIPULATION - PRINCIPE

Il s'agit d'un dosage en microplaque où sont mélangés 100µl de réactifs et 100µl d'échantillon. L'ensemble est placé dans le lecteur incubateur. La densité optique est lue toutes les 2 minutes jusqu'à une augmentation de l'absorbance de 0,2 unité.

A partir d'une gamme étalon d'endotoxine, le logiciel trace la droite logarithme du temps de réaction en fonction du logarithme de la concentration. Elle est linéaire de 0,005 à 50 EU/ml.

La concentration en endotoxine de l'échantillon est calculée automatiquement à partir de son temps de réaction par rapport à la droite étalon.

Grâce à cet appareil, nous pouvons réaliser :

- un test préliminaire d'inhibition-activation en comparant le taux d'endotoxine retrouvé dans les différentes dilutions du produit par rapport à la concentration théorique ajoutée dans ces dilutions.
- des dosages : l'appareil permet d'inclure un contrôle positif produit (ppc) et donc de vérifier l'absence d'inhibition ou d'activation dans le produit lors de l'essai en routine.
- l'étalonnage de l'endotoxine standard de contrôle par rapport à l'endotoxine standard de référence.

En routine, nous pouvons également travailler avec une courbe archivée si les lots de réactifs sont les mêmes. Dans ce cas, un seul point de la gamme est préparé. Lors d'un dosage, la concentration retrouvée pour ce contrôle ne doit pas différer de plus ou moins 25 % de la valeur théorique.

REMARQUE :

En début de manipulation, nous définissons le test que nous voulons réaliser :

- sensibilité de la méthode,
- numéro de lot des réactifs,
- nom du technicien,
- nom du produit testé,
- dilutions utilisées,
- utilisation d'un ppc,
- nombre d'essais.

L'appareil, après avoir reçu toutes ces informations, fournit une feuille de travail qui est une carte précise pour la distribution des étalons et des échantillons sur la plaque de titration.

EXEMPLE D'UNE FEUILLE DE TRAVAIL

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

TEMPLATE

ROUTINE ASSAY	LAL ..... Lot# 0L2500	TIME: 16:06:24
TEST# 1: 0.05	WATER ... Lot# 0L2830	DATE: 11-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN	ENDOTOXIN Lot# 0L2560	PAGE # 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BLANK	BLANK	P 2,PPC	P 2,PPC									A
B	STD 1	STD 1	P 3,S 1	P 3,S 1									B
C	STD 2	STD 2	P 3,PPC	P 3,PPC									C
D	STD 3	STD 3	P 4,S 1	P 4,S 1									D
E	STD 4	STD 4	P 4,PPC	P 4,PPC									E
F	P 1,S 1	P 1,S 1											F
G	P 1,PPC	P 1,PPC											G
H	P 2,S 1	P 2,S 1											H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

	SAMPLES	PRODUCT NAME	LOT NUMBER	DILUTION
Prod. 1	1+PPC	POSTE 1	156	1
Prod. 2	1+PPC	POSTE 5	256	1
Prod. 3	1+PPC	BOUCHONS KIDROLASE	425	1
Prod. 4	1+PPC	CERUBIDINE	189	2

A la fin de chaque essai, un bulletin d'analyse est imprimé. Il comporte :

- le nom du produit,
- le numéro de lot du produit,
- la dilution testée,
- la concentration en endotoxine de l'échantillon,
- la valeur et la conformité du ppc,
- la gamme d'étalonnage utilisée,
- la date,
- le numéro de lot des réactifs,
- le nom du technicien,
- le type d'essai.

EXEMPLE D'UN BULLETIN D'ANALYSE

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

ROUTINE ASSAY
TEST# 1: 0.05
TECHNICIAN: STROECKEN

LAL ..... Lot# OL 1920
WATER ... Lot# OL 2130
ENDOTOXIN Lot# OL 1460

TIME: 12:16:29
DATE: 20-MAR-1991

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.222, Y-INT = 3.045)

BOUCHON PHARMA Lot# 4933 2 EAU

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU	TEST RESULT EU/ml
S 1	100	A 5	1581	1574	.207	20.700
		A 6	1566			
PPC	100	B 5	1196	1181	.756	
		B 6	1165			

PPC CONCENTRATION: .5

ENDOTOXIN RECOVERED: .549
(PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: _____

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2200 sec.)

III - UTILISATION DU SYSTEME KINETIC QCL

Afin de tester les capacités de ce système, nous avons réalisé différents essais :

- réalisation d'une gamme d'étalonnage,
- essais de reproductibilité et de répétabilité,
- comparaisons des résultats obtenus par rapport à la gélification.

A) ETUDE DE LA DROITE D'ETALONNAGE :

La réalisation d'une droite d'étalonnage et d'un blanc réactif permet de vérifier la façon de travailler. D'autre part, pour pouvoir interprêter les résultats d'un dosage, la droite d'étalonnage doit être conforme.

1 - MANIPULATION :

La droite d'étalonnage sera toujours réalisée de la même façon au cours des différents essais.

a) Matériel :

- lecteur incubateur,
- Vortex,
- tubes en verre borosilicaté apyrogènes,
- pipettes graduées de 1 ml,
- micropipette de 100µl et embouts stériles.

b) Réactifs :

- colyophilisat LAL-substrat : flacon pour 24 tests,
- solution d'endotoxine contenant 50 EU/ml agitée pendant 20 minutes,
- eau LAL contenant moins de 0,002 EU/ml.

c) Mode opératoire :

Trois concentrations d'endotoxine sont préparées à partir de la solution mère à 50 EU/ml :

- standard 3 contenant 5 EU/ml :
0,9 ml d'eau LAL + 0,1 ml de la solution à 50 EU/ml
- standard 2 contenant 0,5 EU/ml :
0,9 ml d'eau LAL + 0,1 ml de la solution à 5 EU/ml
- standard 1 contenant 0,05 EU/ml :
0,9 ml d'eau LAL + 0,1 ml de la solution à 0,5 EU/ml.

Chaque dilution est agitée 1 minute au Vortex puis répartie selon la feuille de travail. Un blanc avec de l'eau LAL est également préparé. Les dépôts sont de 100µl.

Après une incubation de 5 minutes à 37° C, 100 µl de lysat sont ajoutés. La microplaque est placée dans le lecteur incubateur où elle est agitée. La densité optique est lue jusqu'à une augmentation de 0,2 unité par puits.

2 - RESULTATS :

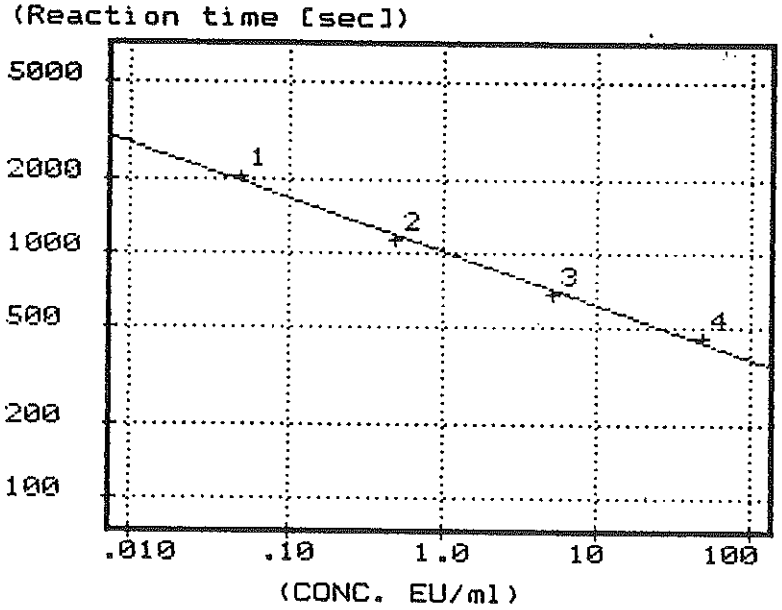
La feuille de résultats délivrée par l'appareil indique la pente et le coéfficient de corrélation de la droite d'étalonnage. Pour être conforme, la droite doit avoir :

- un coéfficient de corrélation inférieur à - 0,98,
- une pente comprise entre - 0,1 et - 1.

GAMME D'ETALONNAGE

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

ROUTINE ASSAY	LAL ..... Lot# 0L2500	TIME: 11:39:47
TEST# 1: 0.05	WATER ... Lot# 0L2830	DATE: 19-FEB-199
TECHNICIAN: STROECKEN	ENDOTOXIN Lot# 0L2560	PAGE # 1



CORR:	-.997
SLOPE:	-.219
Y-INT:	3.005

SUMMARY DATA

STANDARDS	CONCENTRATION EU/ml	WELL	REACTION TIME(sec)	AVG. TIME
BLANK	BLANK	A 1	****	****
		A 2	****	
STD. 1	.05	B 1	2048	2021
		B 2	1993	
STD. 2	.5	C 1	1131	1143
		C 2	1154	
STD. 3	5	D 1	668	676
		D 2	684	
STD. 4	50	E 1	452	448
		E 2	444	

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2160 sec.)

3 - REMARQUES :

- Le blanc sert à vérifier qu'il n'y a pas de contamination lors de la manipulation. Il n'est pas pris en compte pour tracer la droite.

- La droite obtenue est automatiquement archivée. Par ce fait, pour un test défini, elle annule et remplace la précédente.

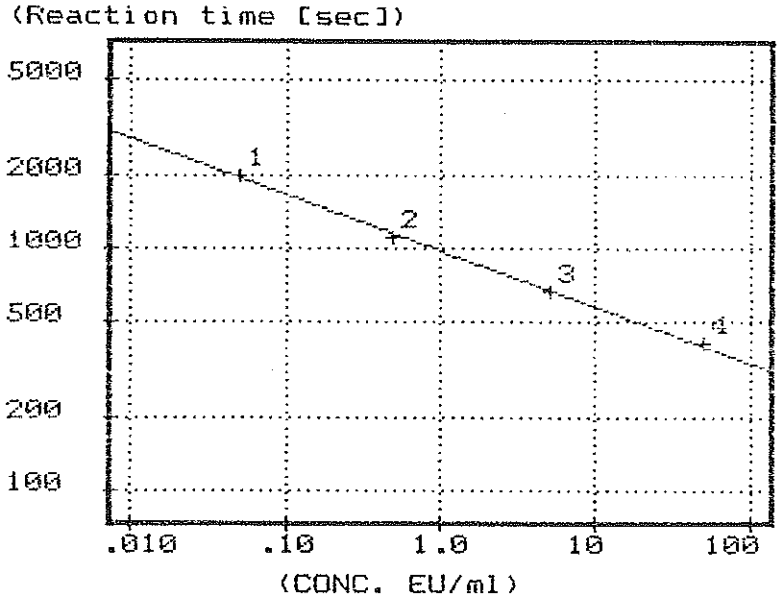
- En routine, lorsqu'un seul point de la gamme est préparé, la droite d'étalonnage n'est pas rectifiée en fonction de la valeur retrouvée (voir feuilles 1 et 2).

FEUILLE 1

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

ARCHIVED STANDARD CURVE

ROUTINE ASSAY	LAL ..... Lot# 0L2500	TIME: 15:07:43
TEST# 1: 0.05	WATER ... Lot# 0L2830	DATE: 22-FEB-1991
	ENDOTOXIN Lot# 0L2560	PAGE # 1



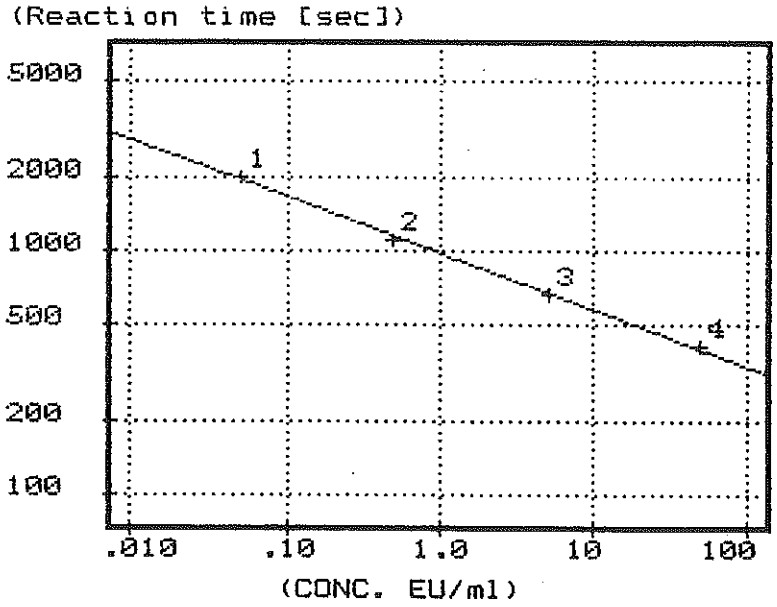
CORR:	-.999
SLOPE:	-.232
Y-INT:	2.989

STANDARDS	CONCENTRATION EU/ml	AVERAGE TIME(sec)
STD. 1	.05	2009
STD. 2	.5	1113
STD. 3	5	657
STD. 4	50	402

FEUILLE 2

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

ROUTINE ASSAY	LAL ..... Lot# 0L2500	TIME: 14:59:51
TEST# 1: 0.05	WATER ... Lot# 0L2830	DATE: 25-FEB-1991
TECHNICIAN: STROECKEN	ENDOTOXIN Lot# 0L2560	PAGE # 1



****
* CORR: -.999 *
* SLOPE: -.232 *
* Y-INT: 2.989 *
****

SUMMARY DATA
ARCHIVED STANDARD CURVE FROM:
22-FEB-1991

STANDARDS	CONCENTRATION EU/ml	WELL	REACTION TIME(sec)	AVG. TIME
STD. 1	.05	---	----	2009
STD. 2	.5	---	----	1113
STD. 3	5	---	----	657
STD. 4	50	---	----	402
BLANK	BLANK	A 1	****	****
		A 2	****	
STD.-CTL	.5	B 1	1100	1107
		B 2	1113	

PREDICTED VALUE = .579 EU

B) REPRODUCTIBILITE :

Cette analyse est faite à partir :

- des différentes gammes étalons,
- des surcharges des contrôles positifs produits.

1 - DROITES D'ETALONNAGE :

Toutes les gammes d'étalonnage ont été réalisées en suivant le protocole décrit précédemment.

Nous analysons d'une part les droites obtenues, d'autre part les variations de la valeur de la concentration du contrôle positif lorsque nous travaillons avec une courbe archivée.

a) Droite :

Le coéfficient de corrélation et la pente de régression de chaque droite étalon sont notés dans le tableau suivant :

TEMPS DE REACTION DES SOLUTIONS DE LA GAMME ETALON					COEFFICENT DE CORRELATION	PENTE
0,005 EU/ml	0,05 EU/ml	0,5 EU/ml	5 EU/ml	50 EU/ml		
	2021"	1143"	676"	448"	- 0,997	- 0219
	1944"	1162"	730"	479"	- 0,999	- 0202
3218"	2064"	1154"	715"	439"	- 0,999	- 0219
	2009"	1113"	657"	402"	- 0,999	- 0232
3015"	2086"	1132"	680"	427"	- 0,998	- 0234
2942"	2017"	1153"	688"	413"	- 0,998	- 0217
	1732"	1179"	702"	433"	- 0,998	- 0203
	2327"	1306"	788"	507"	- 0,997	- 0222
	2239"	1248"	750"	482"	- 0,998	- 0222
	2247"	1264"	729"	496"	- 0,996	- 0220

Les coéfficients de corrélation varient de - 0,999 à - 0,996 et sont donc tous conformes.

Les pentes varient de - 0,202 à - 0,234.

La moyenne des pentes est : - 0,219.

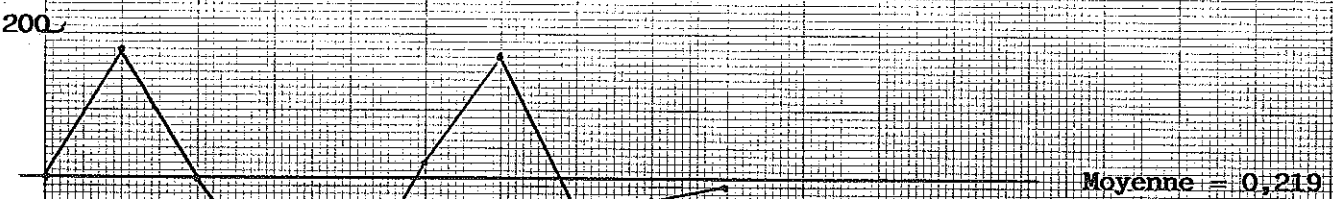
L'écart type est : 0,010

Le coéfficient de variation est : 4,72 %.

Les droites sont conformes et assez reproductibles.

PAPETERIES CANSON & MONTGOLFIER S.A. FABRIQUE EN FRANCE 100

VARIATIONS DES PENTES DES DROITES ETALON



b) Contrôle positif :

Les valeurs retrouvées lors des contrôles positifs sont les suivantes :

CONTROLE POSITIF POINT DE LA GAMME (EU/ml)	CONCENTRATION RETROUVEE (EU/ml)	COEFFICIENT DE CORRELATION	PENTE
0,5	0,579	- 0,999	- 0,232
5	5,22	- 0,998	- 0,234
0,5	0,458	- 0,999	- 0,232
0,5	0,575	- 0,999	- 0,232
0,5	0,486	- 0,999	- 0,232
0,5	0,538	- 0,999	- 0,232
0,5	0,451	- 0,999	- 0,232
0,5	0,49	- 0,999	- 0,232
0,5	0,455	- 0,998	- 0,203
0,5	0,435	- 0,999	- 0,232
0,5	0,522	- 0,999	- 0,232
0,5	0,445	- 0,999	- 0,232
0,5	0,551	- 0,998	- 0,222
0,5	0,614	- 0,998	- 0,222

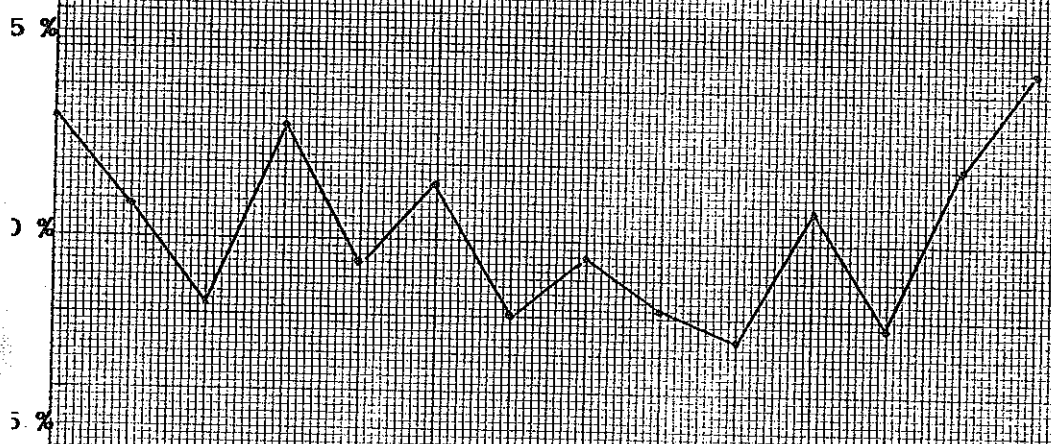
Pour un contrôle positif à 0,5 EU/ml, nous obtenons :

- une moyenne de 0,508 EU/ml,
- un écart type de 0,058 EU/ml,
- un coéfficient de variation de 11,70 %.

Le coéfficient de variation est important, cependant les valeurs sont toutes conformes car nous retrouvons la valeur du contrôle à plus ou moins 25 %.

CONTROLE POSITIF : (POURCENTAGE)

VALEUR RETROUVEE PAR RAPPORT
A LA VALEUR THEORIQUE



2 - CONTROLE POSITIF PRODUIT :

L'eau ne présente aucun effet inhibiteur ou activateur sur la réaction. De ce fait, si elle est surchargée avec une quantité connue d'endotoxine, lors d'un dosage, nous devons retrouver la quantité déposée. Lors de nos essais sur les eaux d'alambic des prélèvements quotidiens, nous avons noté les valeurs suivantes :

CONCENTRATION EN ENDOTOXINE DU PRODUIT	SURCHARGE DEPOSEE	SURCHARGE RETROUVEE
0,488	0,500	0,407
0,206	0,500	0,411
0,017	0,500	0,408
0,006	0,500	0,619
0,229	0,500	0,508
0,246	0,500	0,587
0,185	0,500	0,252
0,209	0,500	0,425
0,021	0,500	0,380
0,094	0,500	0,533
0,123	0,500	0,535
2,364	0,500	0,857
2,354	0,500	1,474
2,680	0,500	0,141
7,364	0,500	0,105
25,318	0,500	1,432
1,186	0,500	0,472
4,292	0,500	0,028
3,880	5,000	4,471
1,430	5,000	6,979
4,292	5,000	6,296

Les surcharges d'endotoxine doivent être adaptées à la quantité d'endotoxine contenue dans le produit :

- pour une concentration comprise entre 0 et 0,55 EU/ml, le contrôle positif produit doit être de 0,5 EU/ml,

- pour une concentration comprise entre 0,55 et 5 EU/ml, le contrôle positif produit doit être de 5 EU/ml,

- pour une concentration supérieure à 5 EU/ml, la solution doit être diluée.

3 - CONCLUSION :

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, il faut travailler selon une procédure parfaitement définie.

C) REPETABILITE :

Pour un même produit, plusieurs dosages sont réalisés. Notre étude est faite sur les temps de réaction et les concentrations en endotoxine. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau page suivante.

PRODUITS	TEMPS DE REACTION	CONCENTRATION D'ENDOTOXINE	MOYENNES		COEFFICIENTS DE VARIATION	
			Temps	Concentration	Temps	Concentration
A	493 - 484	39,998	494,526	36,791	2,28 %	8,29 %
	510 - 500	34,603				
	502 - 514	33,693				
	518 - 504	32,812				
	481 - 496	39,998				
	486 - 498	38,912				
	496	37,519				
B	1021 - 1041	1,394	1032,875	1,383	1,15 %	5,34 %
	1018 - 1020	1,469				
	1044 - 1022	1,382				
	1035 - 1062	1,289				
C	740 - 695	7,101	729,917	6,59	1,89 %	6,15 %
	726 - 735	6,551				
	720 - 724	6,926				
	741 - 742	6,125				
	740 - 743	6,126				
	727 - 726	6,714				

Les coéfficients de variation sont assez faibles, les résultats se répétent bien surtout pour les solutions les moins concentrées.
Les causes de variation des temps pour un même produit de concentration connue sont dues :
- aux erreurs de manipulation,
- à la sensibilité de la réaction et de l'appareil.

Pour le calcul des concentrations à partir des temps, s'ajoute l'erreur due à l'utilisation d'une droite étalon.

D'autre part, nous constatons que les coéfficients de variation des concentrations sont supérieurs à ceux des temps. Cela s'explique par le calcul des concentrations à partir d'une droite étalon dont la pente est faible. Il en résulte qu'une faible variation du temps entraîne une grande variation des concentrations.

Pour ce type de dosage, les coéfficients de variation observés peuvent être considérés comme faibles. Les résultats se répètent donc bien.

D) COMPARAISON AVEC LA GELIFICATION :

Il est intéressant de comparer des résultats de dosages obtenus par le test LAL chromogénique avec ceux du test pratiqué en routine, c'est-à-dire la gélification.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

CONCENTRATION EN ENDOTOXINE DANS LE PRODUIT PAR GELIFICATION	NOMBRE DE RESULTATS COMPARES	NOMBRE DE RESULTATS SEMBLABLES POUR LES 2 TECHNIQUES	NOMBRE RESULTATS DIVERGENTS POUR LES 2 TECHNIQUES
0 à 0,125 EU/ml	12	12	0
0,125 à 10 EU/ml	6	5	1
10 EU/ml	7	0	7

Pour les produits contenant moins de 0,125 EU/ml, tous les résultats concordent. Le manque de sensibilité de la méthode par gélification, méthode de référence, ne permet pas de préciser si les résultats sont proches de ceux obtenus par le dosage en cinétique.

Pour les produits contenant de 0,125 EU/ml à 10 EU/ml, selon la technique par gélification, les résultats obtenus ne sont pas contradictoires.

Par contre, pour les solutions contenant plus de 10 EU/ml, d'après le dosage par gélification, nous constatons que les valeurs trouvées par le dosage cinétique sont plus faibles.

Rappelons que les résultats obtenus par la gélification sont à plus ou moins une dilution au demi près alors que les résultats par dosage cinétique sont donnés à plus ou moins 25 %.

IV - APPLICATION

Nous avons utilisé le dosage chromogénique cinétique pour réaliser un test d'inhibition sur le chlorhydrate de dauborubicine.

Comme pour la technique par gélification, il nous faut définir la MVD.

Nous rappelons que le chlorhydrate de daunorubicine doit contenir moins de 5 EU/mg.

Pour une solution à 1 mg/ml, la MAEC est donc : 5 EU/ml.

La sensibilité choisie du dosage est de 0,05 EU/ml, donc la MVD est :

$$\frac{5}{0,05} = 100$$

Pour réaliser un dosage LAL par cette technique et dans ces conditions nous ne devons pas diluer plus de 100 fois le produit.

A) MANIPULATION :

Nous opérons en trois temps :

- préparation de la solution de travail,
- préparation de la gamme étalon,
- test LAL.

1 - PREPARATION DE LA SOLUTION DE CHLORHYDRATE DE DAUNORUBICINE :

a) Matériel :

Tout le matériel en contact direct avec le chlorhydrate de daunorubicine doit être stérile et apyrogène.

Nous utilisons :

- une spatule,
- une fiole jaugée de 100 ml en verre borosilicaté,
- 4 erlemeyer de 25 ml en verre borosilicaté,
- une micropipette de 100 µl avec des embouts stériles,
- des pipettes en verre de 2, 5 et 10 ml,
- une balance,
- un Vortex.

b) Produits :

- poudre de chlorhydrate de daunorubicine : flacon de 1,2 g
  Numéro de lot : 4040377/8926800
- eau pour préparation injectable : Méram

c) Mode opératoire :

Dans la fiole jaugée, 100 mg de chlorhydrate de daunorubicine sont pesés. Nous complétons à 100 ml avec l'eau ppi puis à partir de cette solution mère à 1 mg/ml, nous réalisons les dilutions suivantes :

* 1/5e : concentration de la solution = 0,20 mg/ml
* 1/10e : concentration de la solution = 0,10 mg/ml
* 1/50e : concentration de la solution = 0,02 mg/ml
* 1/100e : concentration de la solution = 0,01 mg/ml.

2 - PREPARATION DE LA GAMME ETALON :

a) Matériel :

- un Vortex,
- des tubes pour dilutions en verre borosilicaté et apyrogènes de 2 et 5 ml,
- une micropipette de 100µl et embouts stériles.

b) Réactifs :

- un flacon d'endotoxine contenant 50 EU/ml après reconstitution ; lot numéro OL 2560
- un flacon d'eau LAL : lot numéro OL 2830.

c) Mode opératoire :

Nous remettons en solution les endotoxines par 2,4 ml d'eau LAL puis nous agitons 20 minutes au Vortex.

Nous préparons ensuite les dilutions suivantes :

* 1/10e : concentration de la solution = 5 EU/ml
* 1/100e : concentration de la solution = 0,50 EU/ml
* 1/1000e : concentration de la solution = 0,05 EU/ml.

3 - ESSAIS :

a) Matériel :

- un lecteur incubateur de microplaque Kinetic QCL,
- une microplaque stérile,
- une micropipette de 100µl avec embouts stériles.

b) Réactifs :

- LAL-substrat : lyophilisat numéro OL 2500
- eau LAL numéro OL 2830
- Gamme étalon d'endotoxine
- solutions de chlorhydrate de daunorubicine aux concentrations obtenues ci-dessus.

c) Dosage :

Nous répartissons 100µl d'eau LAL, de gamme étalon et de produit dilué sur la microplaque. Nous faisons deux dépôts pour le blanc et les points de la gamme. Pour le produit, nous faisons quatre dépôts par dilution car deux d'entre eux sont surchargés en endotoxine par addition de 10µl de la solution à 5 EU/ml, soit 0,5 EU/ml. Nous laissons incuber 10 minutes à 37° C, puis nous ajoutons, dans chaque puits, 100µl de substrat LAL reconstitué extemporanément. Nous agitons et remettons à 37° C. La densité optique est ensuite mesurée toutes les deux minutes jusqu'à augmentation de 0,2 unité.

B) RESULTATS :

Afin de pouvoir interpréter les résultats, la droite étalon doit être conforme.

Le coéfficient de corrélation est de - 0,998 et la pente de - 0,203. Notre gamme est donc valide, nous pouvons analyser les résultats du test d'inhibition. Nous notons la quantité d'endotoxine retrouvée dans le chlorhydrate de daunorubicine après surcharge.

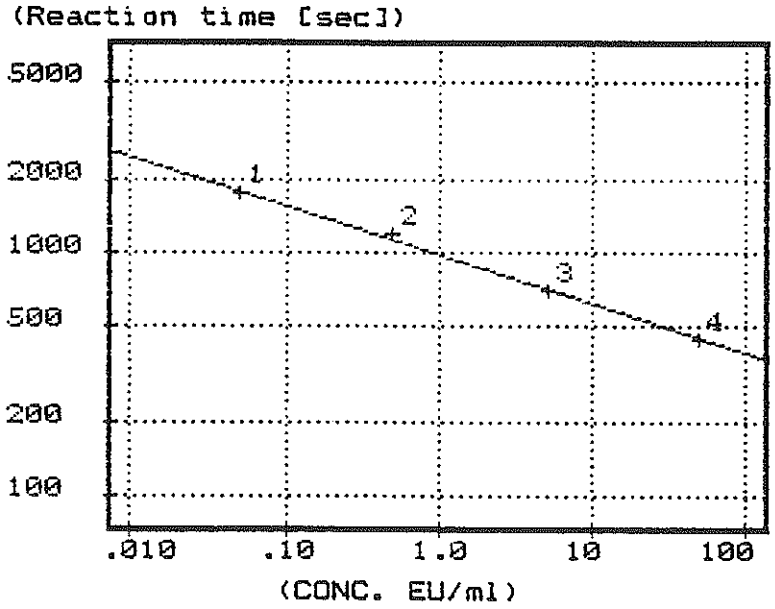
DILUTION	SURCHARGE	QUANTITE RETROUVEE
1	0,5 EU/ml	0,077 EU/ml
1/5	0,5 EU/ml	0,521 EU/ml
1/10	0,5 EU/ml	0,672 EU/ml
1/50	0,5 EU/ml	0,494 EU/ml
1/100	0,5 EU/ml	0,463 EU/ml

Tous les résultats sont donnés sur les 6 pages suivantes.

DROITE ETALON

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L
0 TIME: 12:19:23
TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 8-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560 — PAGE # 1



CORR:	-.998
SLOPE:	-.203
Y-INT:	2.989

SUMMARY DATA

STANDARDS	CONCENTRATION EU/ml	WELL	REACTION TIME(sec)	AVG. TIME
BLANK	BLANK	A 1	****	****
		A 2	****	
STD. 1	.05	B 1	1656	1732
		B 2	1808	
STD. 2	.5	C 1	1164	1179
		C 2	1193	
STD. 3	5	D 1	682	702
		D 2	721	
STD. 4	50	E 1	421	433
		E 2	444	

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2040 sec.)

TEST D'INHIBITION

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L
0 TIME: 15:18:31
TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 0-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.203, Y-INT = 2.989)

CERUBIDINE Lot# 11 03 91

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU
S 1	1	G 1	****	****	****
		G 2	****		
PPC	1	H 1	1622	1636	.077
		H 2	1650		

PPC CONCENTRATION: .5 — ENDOTOXIN RECOVERED: .077 (PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: inhibition
concentration de la solution en daunorubicine = 1mg/mL

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 1800 sec.)

TEST D'INHIBITION

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L2
0 TIME: 12:19:23
TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 8-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.203, Y-INT = 2.989)

CERUBIDINE Lot# 4400097

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU
S 1	5	F 1	****	****	****
		F 2	****		
PPC	5	G 1	1123	1112	.521
		G 2	1100		

PPC CONCENTRATION: .5 — ENDOTOXIN RECOVERED: .521
(PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: il n'y a pas d'inhibition
concentration de la solution en daunorubicine = 0,2 mg/ml

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2040 sec.)

TEST D'INHIBITION

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L2
0 TIME: 12:19:23
TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 8-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.203, Y-INT = 2.989)

CERUBIDINE Lot# 4400097

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU
S 1	10	H 1	****	****	****
		H 2	****		
PPC	10	A 3	1058	1056	.672
		A 4	1054		

PPC CONCENTRATION: .5 — ENDOTOXIN RECOVERED: .672 (PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: il n'y a pas d'inhibition
concentration de la solution en daunorubicine = 0,1 mg/ml

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2040 sec.)

TEST D'INHIBITION

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L:
0 TIME: 12:19:23
TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 8-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.203, Y-INT = 2.989)

CERUBIDINE Lot# 4400097

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU
S 1	50	B 3	****	****	****
		B 4	****		
PPC	50	C 3	1134	1124	.494
		C 4	1114		

PPC CONCENTRATION: .5 — ENDOTOXIN RECOVERED: .494
(PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: il n'y a pas d'inhibition
concentration de la solution en daunorubicine 0,02 mg/ml

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2040 sec.)

TEST D'INHIBITION

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L2
0 TIME: 12:19:23
TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 8-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.203, Y-INT = 2.989)

CERUBIDINE Lot# 4400097

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU
S 1	100	D 3	****	****	****
		D 4	****		
PPC	100	E 3	1123	1139	.463
		E 4	1155		

PPC CONCENTRATION: .5 — ENDOTOXIN RECOVERED: .463 (PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: il n'y a pas d'inhibition.
concentration de la solution en daunorubicine - 0,01 mg/ml

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 2048 sec.)

C) INTERPRETATION :

Il y a inhibition de la réaction lorsque le produit n'est pas dilué (1 mg/ml). L'inhibition disparaît avec une dilution du produit au 1/5e (0,2 mg/ml).

Afin de préciser la dose inhibitrice, nous poursuivons l'essai en examinant ce qui se passe pour une solution de chlorhydrate de daunorubicine située entre 1 mg/ml et 0,2 mg/ml.

Nous réalisons un deuxième essai en suivant le protocole précédent. Nous utilisons une solution contenant 0,5 mg/ml de chlorhydrate de daunorubicine.

Les feuilles de résultats ci-après montrent qu'il n'y a pas d'inhibition.

CONTROLE POSITIF

RHONE POULENC RORER

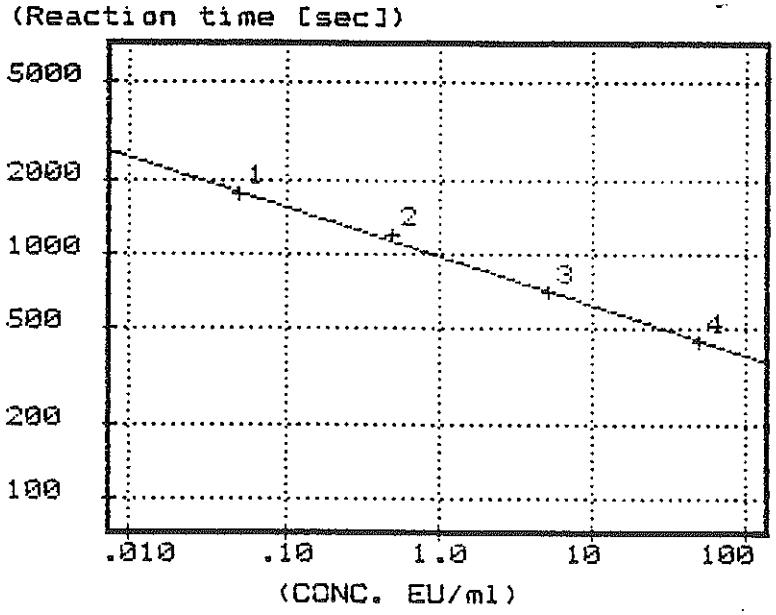
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L

0 TIME: 15:18:31

TEST# 1: 0,05 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 11-MAR-1991

TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560 — PAGE # 1



CORR: -.998

SLOPE: -.203

Y-INT: 2.989

SUMMARY DATA
ARCHIVED STANDARD CURVE FROM:
8-MAR-1991

STANDARDS	CONCENTRATION EU/ml	WELL	REACTION TIME(sec)	AVG. TIME
STD. 1	.05	---	----	1732
STD. 2	.5	---	----	1179
STD. 3	5	---	----	702
STD. 4	50	---	----	433
BLANK	BLANK	A 1	****	****
		A 2	****	
STD.-CTL	.5	B 1	1139	1143
		B 2	1147	

PREDICTED VALUE = .455 EU

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 1800 sec.)

TEST D'INHIBITION DE LA SOLUTION A 0,5 mg/ml

RHONE POULENC RORER
WHITTAKER BIOPRODUCTS, INC. - KINETIC-QCL

INHIBITION/ENHANCEMENT ASSAY — LAL ..... Lot# 0L
0 TIME: 15:17:40
TEST# 2: 0.005 — WATER ... Lot# 0L2830 — DATE: 8-MAR-1991
TECHNICIAN: STROECKEN — ENDOTOXIN Lot# 0L2560

(Standard curve parameters: CORR. = -.998, SLOPE = -.234, Y-INT = 3.080)

CERUBIDINE Lot# 4040377

SAMPLE	DILUTION	WELL	REACT. TIME	AVG. TIME	RAW EU
S 1	10	E 1	****	****	****
		E 2	****		
PPC	10	F 1	1210	1219	.466
		F 2	1227		

PPC CONCENTRATION: .5 — ENDOTOXIN RECOVERED: .466 (PPC - SAMPLE # 1)

CONCLUSION: Il n'y a pas d'inhibition
concentration de la solution en daunorubicine - 0,5 mg/mL

REVIEWED BY: _____ DATE: _____

(!!!! - data eliminated, **** - reaction time greater than 3960 sec.)

V - CONCLUSION

Par rapport à la technique de référence utilisée dans le laboratoire, le dosage cinétique présente l'avantage d'être quantitatif et de plus grande sensibilité.

Cependant, pour travailler en toute sécurité, il est important de valider la technique vis à vis d'une endotoxine standard de référence et de manipuler selon une procédure.

3EME PARTIE :

CHOIX D'UNE TECHNIQUE POUR LE DOSAGE DES ENDOTOXINES

CHAPITRE I - COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE DOSAGE

Le test LAL est de plus en plus pratiqué mais quelle technique choisir pour les dosages en routine ?

Automatisation, fiabilité, temps... doivent être pris en compte. De plus, la technique choisie doit être adaptée aux besoins du laboratoire.

Nous allons nous placer dns le cas d'un laboratoire pratiquant le test LAL par gélification point final. Cette méthode étant semie-quantitative et longue, le laboratoire cherche à améliorer le dosage des endotoxines.

Le dosage turbidimétrique et les dosages chromogéniques permettent de réaliser des dosages plus rapides et quantitatifs.

Nous allons comparer ces trois techniques.

ELEMENTS COMPARES	DOSAGE TURBIDIMETRIQUE	DOSAGE CHROMOGENIQUE	
		Point final	Cinétique
Matériel	- incubateur - turbidimètre à lecture automatique - logiciel - imprimante	- incubateur - spectrophotomètre	- lecteur incubateur automatique - logiciel - imprimante
Manipulation **- témoin**	DANS UN PREMIER TEMPS : UNE GAMME ETALON UN BLANC **LORSQUE NOUS SOMMES REPRODUCTIBLES**		
	un contrôle positif un blanc	2 points de la gamme un blanc	1 contrôle positif un blanc

- temps	TEMPS DE PREPARATION DU DOSAGE		
	30 mn	25 mn	40 mn
	TEMPS DE REACTION		
	30 mn	30 mn	45 mn
	TEMPS D'OBTENTION DES RESULTATS		
	60 mn	55 mn	85 mn
Résultats	QUANTITATIVITE		
	Droite linéaire sur 8 logarithmes	Droite linéaire sur 1 logarithme	Droite linéaire sur 5 logarithmes
	SENSIBILITE		
	0,001 EU/ml	0,01 EU/ml	0,005 EU/ml
	REPRODUCTIBILITE		
	Non mise en évidence	7,35 %	8,25 %
	REPETABILITE		
	Non mise en évidence	Coéfficients de variation des solutions très concentrées	
		5,04 %	5,34 %
		des solutions peu concentrées	
		1,81 %	8,29 %
Avantages	- technique en un temps - archivages des données et des résultats - grande linéarité et grande sensibilité - rapidité - visualisation de la cinétique des réactions	- matériel peu coûteux - rapidité	- technique en un temps - archivage des données et des résultats - grande linéarité et grande sensibité

Inconvénients	- appareillage coûteux - conservation courte du lysat - difficulté à obtenir des résultats reproductibles	- technique en 3 temps - conservation courte du lysat	- appareillage coûteux - dosage long - conservation courte du lysat
Amélioration		- méthode en 2 temps (en mélangeant lysat et substrat) - utilisation d'un lecteur incubateur automatique permettant un dosage en 1 temps mais cela augmente considérablement l'investissement	- assistance d'un ordinateur
Choix	technique intéressante pour des essais sur des produits (visualisation de la cinétique) et pour des dosages en routine (rapide)	technique intéressante pour les dosages en routine du fait de sa reproductibilité et de sa sensibilité suffisante	technique intéressante pour des essais sur des produits et pour la réalisation de validation

CHAPITRE II - ETUDE DES BESOINS D'UN LABORATOIRE

La mise en place d'un test LAL dans un laboratoire nécessite une étude des différentes techniques possibles mais également une étude des besoins de ce laboratoire. Afin de définir ces besoins il faut considérer, d'une part la situation actuelle, et d'autre part les projets de ce laboratoire.

I - DETERMINATION DE LA SITUATION D'UN LABORATOIRE VIS A VIS D'UN TEST LAL :

Dans notre cas, le laboratoire pratique déjà le test LAL par gélification.

A) ETUDE DU MATERIEL :

Le matériel nécessaire au dosage turbidimétrique ou chromogénique n'est pas exclusif à ce type de dosage. En effet, par exemple, un spectrophotomètre peut être déjà utilisé dans le laboratoire pour faire un autre dosage colorimétrique. Dans ce cas, il n'est peut-être pas nécessaire d'en acheter un autre. L'investissement est donc diminué.

D'autre part, il faut considérer le matériel servant à réaliser les dilutions : tubes, pipettes,...

Le matériel déjà utilisé pour le dosage doit être remis en question. Ce matériel qui était parfaitement adapté au dosage par gélification point final peut ne pas être adapté à une autre technique. S'il faut changer tout ce matériel, cela augmente l'investissement.

B) NOMBRE DE TESTS REALISES :

Il nous faut déterminer le nombre de tests réalisés par le laboratoire Pour cela, nous pouvons réaliser une étude statistique à partir des données de l'année antérieure.

A partir de ce nombre, nous devons évaluer le prix de revient des tests :

- nombre d'heures occupant une personne,
- prix des réactifs : il faut considérer le nombre de témoins. En effet l'utilisation d'un dosage turbidimétrique ou chromogénique nécessite la réalisation de gamme étalon chaque jour au moins durant la 1ère année qui suit la mise en place d'un tel dosage. Ce délai permet de vérifier la reproductibilité et la répétabilité.

II - ETUDE DES PROJETS DU LABORATOIRE

A) NOMBRE DE TESTS A REALISER :

Il faut considérer la production de l'entreprise où se situe le laboratoire :

- production de nouveaux produits devant subir un test d'apyrogénéicité,

- production de produits déjà fabriqués mais dont le test de lapin est remplacé par le test LAL (nouveau dossier d'AMM),

- production pour l'exportation : un pays peut demander des contrôles supplémentaires sur :
  * la matière première,
  * les matériaux de conditionnement,
  * les produits finis.

B) AUTRE ACTIVITE DU LABORATOIRE :

Le laboratoire peut projeter d'acheter du matériel qui pourrait servir à différents dosages dont le test LAL.

C) AMELIORATION DE LA QUALITE :

L'utilisation d'un nouveau mode de dosage doit être également l'occasion d'améliorer la qualité des dosages : reproductibilité, fiabilité...

L'utilisation d'un dosage quantitatif pourra également permettre d'accroître la qualité des médicaments produits. En effet, la détermination du niveau de contamination en endotoxine de matières premières pourra entraîner le rejet de lots trop souillés au départ.

III - CHOIX

En fonction des résultats des essais et des analyses des besoins, le Chef de laboratoire, en accord avec ses techniciens, devra choisir la méthode de dosage qui lui semble la mieux adaptée au laboratoire. Un même Chef dans un autre laboratoire pourrait choisir une autre méthode.

CONCLUSION

A l'heure actuelle, le test LAL se développe très rapidement. Il est de plus en plus utilisé et les techniques de dosages sont de plus en plus performantes.

De nombreux produits sont sur le marché :

- appareil de dosage,
- réactifs,
- tubes, pipettes... apyrogènes.

Un laboratoire doit savoir choisir sa technique de dosage. Pour cela il faut étudier toutes les possibilités qui sont offertes.

La réalisation de cette étude montre que l'utilisation de réaction colorée pour la recherche d'endotoxines a permis d'améliorer considérablement le test LAL :

- quantification,
- automatisation,
- fiabilité.

Cependant, le test LAL reste de maîtrise difficile. En effet, aux erreurs dues aux manipulations, s'ajoutent les erreurs dues à l'emploi de deux réactifs d'origine biologique :

- le lysat d'amoebocytes de limule,
- les endotoxines.

La validation du lysat vis à vis des endotoxines standard de référence a permis de progresser dans la qualité des résultats. Cependant le test LAL doit encore être perfectionné afin de produire des médicaments de qualité et sans danger pour le malade.

Au cours de cette étude qui a été réalisée lors d'un stage, j'ai pu apprécier l'utilité du test LAL. Celui-ci doit être le plus fiable et le plus rapide possible. En effet, lors de la mise en route d'un système de fabrication d'eau ultrafiltrée, les résultats des tests étaient positifs : l'eau était contaminée. Il a fallu annuler son utilisation, trouver la cause de la contamination et y remédier. La remise en route du système a nécessité des contrôles d'apyrogénéicité mais aussi une étude analytique. Tout ceci représente temps et argent mais a permis d'éviter le rejet ultérieur d'un lot de médicaments.

BIBLIOGRAPHIE

1 – COMMISSION EUROPEENNE DE PHARMACOPEE
L'essai au lysat d'amoebocytes de limule (LAL)- J.Pharm. Belgique, 256-264, 41, 4, 1986

2 – COMMISSION SFSTP
Rapport d'un groupe de travail sur le Limullus Test
Sciences et Techniques Pharmaceutiques
Novembre 1983, N° 9, 411-434

3 – COOPER James F.
Resolving LAL test interferences
Journal of Parenteral Science & Technology, 1990, 44, 13-15

4 – GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMOEBOCYTE LYSATE TEST AS AN ENDPRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN ET ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS AND MEDICAL DEVICES. Dec. 1987
Center for Drug Evaluation and Research,
Center for Biologic Evaluation and Research,
Center for Devices and Radiological Health,
Center for Veterinary Medicine

5 – LAL INFORMATION PYROGENT®
BULLETIN, Novembre 1989
Whittaker Bioproducts (60, rue Auguste Comte 94120 Fontenay sous Bois)

6 – LAL UPDATE PYROTELL
L"essai LAL et le pH, Mai 1990
Laboratoire Amilabo (BP 53 69684 CHASSIEUX Cedex)

7 – LAL UPDATE PYROTELL
Les Standards d'Endotoxine
Laboratoire Amilabo (PB 53 69684 CHASSIEUX Cedex)

8 – LINDSAY Gene K., ROSLANSKY Priscilla F. and NOVITSKY Thomas J.
Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin
Journal of Clinical Microbiology, May 1989, 947-951

9 – PEARSON Fréderick C.
Pyrogens : endotoxins, LAL testing and depyrogenation
Morton Grove, Illinois : Joseph R. robinson, 1985

10 – PHARMACOPEE EUROPENNE – IIème édition – V.2.1.9. 1987

11 – PHARMACOPEE FRANCAISE – Xème édition – V.2.1.9. Janvier 1989

12 – PHARMEUROPA. Strasbourg. 1989
European Workshop on Detection and Quantification of Pyrogen/ ed. by P. J. SCHORN
Strasbourg : concil of Europe, 1989

13 – TEST LAL
Bulletin technique N° 293440
IBF

14 – LE TEST LAL
Guide pratique de la recherche et du dosage des endotoxines à l'aide du lysat d'amoebocytes de limule, 1990
Rapport du groupe de travail SFSTP-Test limulus

15 – TWOHY Christine W., NIERMAN Mark L. and DURAN Anthony P.
Comparison of Limulus Amebocyte Lysates from Différent Manufacturers
Minneapolis Center for Microbiological Investigations, Food and Drug Administration, Minneapolis, Minnesota

16 – UNITED STATES PHARMACOPEIA XX-1980
Bacterial endotoxins test

17 – WEARY Marlys E.
Understanding and Setting Endotoxin Limits
Journal of Parenteral Science & Technology, 1990, 44, 16-18

18 – ZINK MC CULLOUGH Karen
Variability in the LAL Test
Journal of Parenteral Science & Technology, 1990, 44, 19-21

TABLE DES MATIERES

I N T R O D U C T I O N 9

1ERE PARTIE : Etude théorique..... 14

CHAPITRE I - GELIFICATION..... 15

I - MECANISME DE LA REACTION LAL-ENDOTOXINES..... 15

II - MATERIEL ET REACTIFS..... 18

A) MATERIEL..... 18

B) REACTIFS..... 18

1 - LAL..... 18

2 - L'EAU..... 19

3 - ENDOTOXINES..... 19

4 - ACIDE ET BASE..... 19

III - MODE OPERATOIRE..... 20

A) DOSAGE EN POINT FINAL..... 20

B) DOSAGE TURBIDIMETRIQUE..... 21

IV - TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON..... 22

A) LEVEE DE L'INTERFERENCE - CALCUL DE LA MVD 22

B) CHOIX DE LA DILUTION DE L'ECHANTILLON..... 23

C) TEST D'INHIBITION-ACTIVATION..... 24

D) SUBSTANCES INHIBITRICES..... 24

E) REMARQUE SUR L'ACTIVATION..... 25

V - VALIDATION DU TEST LAL..... 25

A) CAPACITE INTRINSEQUE A MANIPULER..... 25

B) CONTROLE DE VALIDITE DU LYSAT..... 25

C) DOSAGE TURBIDIMETRIQUE..... 25

CHAPITRE II - CHROMOGENIE..... 26

I - PRINCIPE..... 26

II - MATERIEL ET REACTIFS..... 28

A) MATERIEL..... 28

B) REACTIFS..... 29

1 - REACTIFS SPECIFIQUES AU DOSAGE EN POINT FINAL..... 29

2 - REACTIFS SPECIFIQUES AU DOSAGE EN CINETIQUE..... 29

3 - REACTIFS COMMUNS..... 29

4 - REACTIFS DIVERS..... 30

III - MODES OPERATOIRES..... 30
A) DOSAGE EN POINT FINAL..... 30
B) DOSAGE EN CINETIQUE..... 33
IV - VALIDATION DES TESTS CHROMOGENIQUES..... 35
A) VALIDATION DE LA TECHNIQUE..... 35
1 - POINT FINAL..... 35
2 - CINETIQUE..... 35
3 - REMARQUE..... 36
B) VALIDATION DE L'ESSAI VIS A VIS DU PRODUIT..... 36
1 - TECHNIQUE PAR SURCHARGE..... 36
2 - GAMME ETALON DANS LE PRODUIT..... 36
C) PROCEDURE EN ROUTINE..... 37
1 - TECHNIQUE EN POINT FINAL..... 37
2 - TECHNIQUE EN CINETIQUE..... 37

CHAPITRE III - CONCLUSION ET APPLICATIONS..... 38

2EME PARTIE : Mise en application des différentes techniques.... 40

CHAPITRE I - GELIFICATION EN POINT FINAL..... 42
I - VALIDATION DE LA SENSIBILITE DU LYSAT..... 42
A) MATERIEL..... 42
B) REACTIFS..... 42
C) MODE OPERATOIRE..... 42
D) RESULTATS..... 43
II - DOSAGE EN ROUTINE..... 43
A) MATERIEL ET REACTIFS..... 43
B) MODE OPERATOIRE..... 43
C) RESULTATS..... 44
D) CONCLUSIONS..... 44
III - TEST D'INHIBITION..... 44
A) TEST PRELIMINAIRE D'INHIBITION..... 44

1 - DETERMINATION DE LA MVD..... 44
2 - MANIPULATION..... 45
3 - RESULTATS..... 47
4 - INTERPRETATIONS..... 47
B) DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DU LYSAT DANS UNE SOLUTION DE CHLORHYDRATE DE DAUNORUBICINE A 0,2 mg/ml..... 47
1 - MANIPULATION..... 47
2 - RESULTATS..... 49
3 - CONCLUSION..... 49
CHAPITRE II - TURBIDIMETRIE..... 50
I - APPAREIL ET REACTIFS..... 50
A) APPAREIL..... 50
B) REACTIFS..... 55
II - MANIPULATION..... 55
III - RESULTATS..... 57
IV - INTERPRETATION..... 62
A) ANALYSE DES TEMPS DE REACTIONS..... 62
B) ANALYSE DES CONCENTRATIONS RETROUVEES..... 62
C) ANALYSE DES DROITES DE REGRESSION..... 63
V - CONCLUSION..... 64
CHAPITRE III - DOSAGE CHROMOGENIQUE POINT FINAL..... 65
I - APPAREIL - REACTIFS..... 65
II - ETUDE DU TEST..... 65
A) REPRODUCTIBILITE..... 67
1 - RESULTATS..... 67
2 - INTERPRETATIONS..... 73
B) ETUDE DE LA REPETABILITE..... 73
C) CONSERVATION DE LA SOLUTION COLOREE..... 75
III - APPLICATIONS..... 80
A) DEPOT D'ENDOTOXINE..... 82
1 - MATERIEL..... 82

2 - REACTIFS..... 82
3 - MODE OPERATOIRE..... 82
4 - RESULTATS..... 83
B) QUANTIFICATION DES EAUX DE RINCAGE..... 85
C) CONCLUSION..... 87
CHAPITRE IV - DOSAGE CHROMOGENIQUE CINETIQUE..... 88
I - APPAREIL..... 88
II - MANIPULATION - PRINCIPE..... 88
III - UTILISATION DU SYSTEME KINETIC QCL..... 93
A) ETUDE DE LA DROITE D'ETALONNAGE..... 93
1 - MANIPULATION..... 93
2 - RESULTATS..... 94
3 - REMARQUES..... 96
B) REPRODUCTIBILITE..... 99
1 - DROITES D'ETALONNAGE..... 99
2 - CONTROLE POSITIF PRODUIT..... 103
3 - CONCLUSION..... 104
C) REPETABILITE..... 104
D) COMPARAISON AVEC LA GELIFICATION..... 106
IV - APPLICATION
A) MANIPULATION
1 - PREPARATION DE LA SOLUTION DE CHLORHYDRATE DE DAUNORUBICINE..... 107
2 - PREPARATION DE LA GAMME ETALON..... 108
3 - ESSAIS..... 108
B) RESULTATS..... 109
C) INTERPRETATION..... 116
V - CONCLUSION..... 119

3EME PARTIE : Choix d'une technique pour le dosage des endotoxines..... 120
CHAPITRE I - COMPARAISON DES DIFFERENTES TECHNIQUES DE DOSAGE... 121

CHAPITRE II - ETUDE DES BESOINS D'UN LABORATOIRE..... 124

I - DETERMINATION DE LA SITUATION D'UN LABORATOIRE VIS A VIS d'UN TEST LAL..... 124

A) ETUDE DU MATERIEL..... 124

B) NOMBRE DE TESTS REALISES..... 124

II - ETUDE DES PROJETS DU LABORATOIRE..... 125

A) NOMBRE DE TESTS A REALISER..... 125

B) AUTRE ACTIVITE DU LABORATOIRE..... 125

C) AMELIORATION DE LA QUALITE..... 125

III - CHOIX..... 125

C O N C L U S I O N..... 127

B I B L I O G R A P H I E..... 129

STROECKEN (Johanna). — Recherche des endotoxines par le Limulus Test. — 136 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1991).

RESUME :

En avril 1989, la pharmacopée européenne a remplacé le test du lapin par le test LAL (Limulus Amoebocyte Lysat) pour la détection d'endotoxines dans les eaux pour préparations injectables.

A court terme, le test LAL devrait prendre de plus en plus d'extension :

— nouveaux domaines d'application (contrôle de produits...) ;
— nouvelles techniques de dosage (turbidimétrie et chromogénie).

MOTS CLES :

— Pyrogène.
— Apyrogène.
— Endotoxine.
— Limulus Test (LAL).
— Bonnes pratiques de fabrication.

JURY : Président : Monsieur J.-A. NICOLAS, Professeur.
Juges : Madame C. BOSGIRAUD, Maître de Conférences.
Madame J. NOUYRIGAT, Biologiste.