

Lysat d'améboocyte de *limule*

CHROMO-LAL

Fabriqué par : **ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED**
124 Bernard E. Saint Jean Drive - E. Falmouth, MA 02536 USA

Téléphone : (508) 540-3444
 Numéro vert : (888) 395-2221
 Fax : (508) 540-8680
 Assistance technique : (800) 848-3248
 Service à la clientèle : (800) 525-8378

Licence américaine n° 700 PN001087-fr rev5 Oct. 2019

**LYSAT D'AMÉBOCYTE DE LIMULE
CHROMO-LAL**

pour la détection et la quantification des endotoxines de bactéries à Gram négatif (lipopolysaccharides)

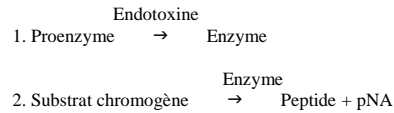
RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Dans les années 1950, Frederik Bang a observé que l'infection par des bactéries à Gram négatif entraînait une coagulation intravasculaire dans la limule *Limulus polyphemus* (1). Levin et Bang ont démontré que la coagulation était causée par l'activation d'un certain nombre d'enzymes situées dans les cellules sanguines (améboocytes) de la limule *Limulus polyphemus*, et que cette activation était initiée par l'endotoxine (lipopolysaccharide) présente dans les parois des cellules bactériennes à Gram négatif (2, 3, 4). Le test chromogène, introduit en 1977 (5, 6), est une modification qui permet de mesurer la concentration en endotoxines en fonction de l'intensité de la couleur plutôt que par turbidité ou gélication dans le mélange réactionnel. Les résultats obtenus par cette méthode modifiée sont généralement comparables à ceux obtenus avec les méthodes par caillot de gel ou de turbidimétrie dans la marge d'erreur des tests.

Dans le test Chromo-LAL, le réactif LAL colyophilisé avec le substrat sont mélangés dans un rapport 1:1 avec l'échantillon de test dans une microplaque, ou l'équivalent et incubés dans un lecteur à 37 ± 1 °C. Les mesures d'absorbance sont collectées avec le temps après l'ajout de Chromo-LAL et analysées par un logiciel approprié. Le temps (temps d'apparition) nécessaire pour qu'un échantillon atteigne une absorbance spécifiée (DO d'apparition) est calculé ; et une courbe étalon, montrant la corrélation linéaire entre le logarithme du temps d'apparition et le logarithme de la concentration en endotoxines étalons, est générée. La plage maximale des concentrations en endotoxines pour la courbe étalon est de 0,005 UE/mL - 50 UE/mL. La sensibilité (λ) de l'analyse est définie comme la plus faible concentration utilisée dans la courbe étalon. La sensibilité maximale de ce test est de 0,005 UE/mL.

PRINCIPE BIOLOGIQUE

Le LAL contient des enzymes qui sont activées dans une série de réactions en présence d'endotoxines. La dernière enzyme activée dans la cascade est le chromophore, la para-nitro-aniline (pNA), du substrat chromogène, produisant une couleur jaune.



La quantité de pNA libérée et mesurée photométriquement à 405 nm est proportionnelle à la quantité d'endotoxines dans le système. Plus la concentration en endotoxines est élevée, plus la réaction est rapide.

RÉACTIFS

Les réactifs non ouverts sont stables à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du contenant. Avant reconstitution, porter les réactifs à température ambiante et tapoter avec les flacons contenant la substance lyophilisée sur une surface dure pour faire descendre toute substance libre au fond du flacon.

1. Chromo-LAL, lysat d'améboocyte de limule colyophilisé avec un substrat chromogène

Ce réactif est un extrait aqueux d'améboocytes de *L. polyphemus*, tamponné à un pH de 7, et colyophilisé avec le substrat chromogène. Reconstituer le Chromo-LAL immédiatement avant utilisation avec 3,2 mL d'eau de réactif LAL (LRW). Cette solution est stable pendant 24 heures à 2-8 °C ou pendant deux semaines à une température inférieure ou égale à -20 °C en cas de congélation immédiate après reconstitution et en l'absence de contamination. Le Chromo-LAL peut être congelé et décongelé une fois. Une contamination peut être indiquée par une couleur jaune foncé qui se développe rapidement après reconstitution. Le réactif deviendra lentement jaune dans des conditions normales d'utilisation.

2. Endotoxines étalons

Les endotoxines étalons de contrôle (CSE) ne sont pas fournies avec le Chromo-LAL et doivent être commandées séparément. Les endotoxines étalons de contrôle (CSE), obtenues auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., sont utilisées pour construire des courbes étalons, valider le produit et préparer les contrôles d'inhibition. Chaque flacon contient un poids mesuré d'endotoxines. De manière alternative, l'étalon de référence des endotoxines USP peut être utilisé. Suivre les instructions du fabricant pour la reconstitution et le stockage des endotoxines étalons. Les lots de CSE peuvent présenter différentes puissances (UE/ng) quand ils sont testés avec différents lots de Chromo-LAL. En cas d'utilisation de CSE, les concentrations en endotoxines peuvent être exprimées en UE/mL si la puissance d'un lot donné de CSE a été déterminée avec le lot de Chromo-LAL en question. (10,11).

3. Eau de réactif LAL (LRW)

LRW est une eau stérile, préparée par distillation ou osmose inverse et exempte d'endotoxines détectables lors de tests avec le Chromo-LAL. Des flacons supplémentaires de LRW peuvent être obtenus auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.

Précautions et avertissements : Le Chromo-LAL est exclusivement destiné au diagnostic *in vitro*. Ne pas utiliser ces réactifs pour la détection de l'endotoxémie. Faire preuve de prudence lors de la manipulation du

réactif Chromo-LAL car sa toxicité n'a pas été déterminée et des allergies au LAL ont été signalées (7). Il faut recourir à une technique aseptique. Tous les matériaux entrant en contact avec les échantillons et les réactifs doivent être exempts d'endotoxines détectables. Les matériaux stables à la chaleur, y compris la verrerie propre, peuvent être rendus exempts d'endotoxines détectables par exposition à la chaleur sèche à une température minimale de 250 °C pendant au moins 30 minutes (8).

COLLECTE ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Prélever les échantillons de manière à éviter toute contamination microbienne. Utiliser une technique aseptique lors de la manipulation des échantillons et des réactifs. Tester les échantillons aussitôt que possible après le prélèvement ; sinon, les conserver à une température de 2 à 8 °C. Si une croissance bactérienne est prévue, les échantillons peuvent être congelés. Confirmer que le stockage ne réduit pas le niveau des endotoxines détectables dans l'échantillon (les endotoxines peuvent être adsorbées à la surface du contenant). De nombreuses substances interfèrent avec le test Chromo-LAL. Une interférence est indiquée par inhibition, la récupération d'une quantité d'endotoxines inférieure à celle que l'on sait être présente dans un échantillon ; ou par désinhibition, la récupération d'une quantité d'endotoxines supérieure à celle que l'on sait être présente (consulter la rubrique « Procédures » pour la détection des interférences). Il est généralement possible de pallier les interférences en diluant l'échantillon avec de l'eau de réactif LAL. Ne pas diluer au-delà de la dilution maximale acceptable (MVD ; 9, 10, 11, 12).

$$MVD = \frac{\text{limite d'endotoxines} \times \text{concentration du produit}}{\lambda}$$

Certains composés peuvent nécessiter un traitement spécial en plus de la dilution pour éliminer les interférences. Par exemple, les produits sanguins contenant des enzymes activées peuvent donner de faux positifs. Ces types d'échantillons peuvent être dilués avec de l'eau de réactif LAL et chauffés à une température minimale de 75 °C pendant une durée qui permet d'éliminer les interférences sans perte d'activité endotoxinique. Les échantillons qui absorbent fortement à 405 nm peuvent interférer avec le test et nécessiter une dilution préalable.

PROCÉDURE DE TEST

Équipement et matériel nécessaires mais non fournis :

1. Tubes à essais, microplaques ou l'équivalent exempts d'endotoxines détectables. Les tubes à essais et les microplaques exempts d'endotoxines susceptibles de causer des interférences sont disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.
2. Pipettes et embouts de pipettes exempts d'endotoxines détectables. Disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.
3. Pipettes répétitives avec seringues de distribution exemptes d'endotoxines détectables.
4. Agitateur-mélangeur vortex.
5. Parafilm M[®]. Le côté en contact avec le support en papier est normalement non pyrogène.

6. Lecteur optique équipé d'un logiciel approprié et capable de maintenir une température uniforme de 37 ± 1 °C.
7. Logiciel Kinetic. Un logiciel qui collecte et stocke les mesures de densité optique (DO) à de courts intervalles est nécessaire. Le logiciel doit également calculer le « temps d'apparition » pour l'échantillon dans chaque puits. Un temps d'apparition est le temps nécessaire pour que la DO d'un puits donné atteigne une valeur de DO spécifiée (DO d'apparition). La valeur choisie pour un test effectué dans une microplaque peut se situer entre 0,03 et 0,2 unité de densité optique ; toutefois, la même valeur doit être utilisée pour les tests de routine que celle utilisée pour la validation de l'analyse pour ce produit.

Le logiciel doit générer les paramètres de la courbe étalon (pente, ordonnée à l'origine et coefficient de corrélation) et calculer les concentrations en endotoxines dans les échantillons inconnus. Le logiciel peut effectuer des calculs supplémentaires tels que le calcul de la concentration en endotoxines récupérées dans le contrôle positif du produit après soustraction de toute endotoxine endogène de l'échantillon.

Courbe étalon

Lors de la préparation d'une courbe étalon, inclure une courbe étalon composée d'au moins trois concentrations en endotoxines, en double exemplaire, pour chaque jeu d'échantillons testés. Des concentrations supplémentaires doivent être ajoutées de manière à ce qu'il y ait au moins un étalon par incrément logarithmique de la plage (10). Préparer les concentrations en endotoxines étalons par dilution en série en commençant par la concentration la plus élevée ou concentration « mère ». Mélanger la concentration mère environ 30 secondes à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex avant d'effectuer le premier transfert.

Tout schéma de dilution peut être utilisé pour préparer des endotoxines étalons et les concentrations utilisées pour construire la courbe peuvent couvrir n'importe quelle plage entre les limites de 0,005 et 50 UE/mL. La plus faible concentration retenue dans la courbe est la sensibilité (λ) de l'analyse.

Le tableau ci-dessous donne un exemple de préparation d'une série à large plage avec λ égal à 0,005 UE/mL.

Concentrations étalons UE/mL	Eau de réactif LAL (µL)	Solution étalon d'endotoxines
50	950	50 µL de la solution mère
5	900	100 µL de la solution à 50 UE/mL
0,5	900	100 µL de la solution à 5 UE/mL
0,05	900	100 µL de la solution à 0,5 UE/mL
0,005	900	100 µL de la solution à 0,05 UE/mL
Contr. nég.	1 000	

Une courbe étalon archivée (10) n'est pas recommandée. Les paramètres de la courbe changent au cours du temps après reconstitution du réactif. Par conséquent, les

concentrations étalons en endotoxines doivent être incluses avec chaque test.

Contrôle négatif

Des contrôles négatifs, en double exemplaire, doivent être inclus avec chaque jeu d'échantillons. Le contrôle négatif est la LRW utilisée pour diluer les échantillons pour le test. Le temps d'apparition du contrôle négatif doit être supérieur d'au moins 10 % à celui de l'étalon le moins concentré. Une fois que la performance caractéristique du contrôle négatif est connue, l'opérateur peut arrêter l'analyse avant que le temps d'exécution prédéfini soit écoulé (consulter la rubrique « Temps d'exécution des analyses » ci-dessous). Arrêter l'analyse seulement s'il est possible de conclure, à partir d'une inspection visuelle de la cinétique de réaction, que la plus faible concentration de l'étalon a atteint la DO d'apparition et que la DO du contrôle négatif est caractéristiquement faible.

Détection des interférences

Un échantillon auquel une quantité connue d'étalon d'endotoxines est ajouté (échantillon dopé) est appelé un contrôle positif du produit ; ce contrôle pour détecter une inhibition ou une désinhibition est inclus dans un protocole de test de routine. En comparant la récupération de la concentration en endotoxines dans le contrôle positif du produit avec la concentration connue qui a été ajoutée, il est possible de déterminer si l'échantillon inhibe (moins d'endotoxines détectées que ce qui est présent) ou désinhibe (plus d'endotoxines détectées que ce qui est présent) l'analyse.

La concentration moyenne calculée en endotoxines ajoutées (concentration dans l'échantillon dopé moins la concentration dans l'échantillon) doit se situer entre 50 % et 200 % de la concentration du dopage prévue pour démontrer que le produit n'inhibe ni ne désinhibe l'analyse.

La concentration choisie pour le dopage dépendra de la plage de la courbe étalon et de la limite d'endotoxines pour la dilution ou la concentration de l'échantillon de test (seuil de réussite ou d'échec, 10).

La concentration du dopage doit être l'une des concentrations utilisées dans la courbe étalon et doit se situer près du centre de l'intervalle étalon. Pour la courbe à large plage illustrée ci-dessus et avec des échantillons dont le seuil de réussite ou d'échec est inférieur ou égal à 1 UE/mL, il est possible de choisir une concentration en endotoxines de 0,5. Pour la même plage d'étalons et avec des échantillons dont le seuil de réussite ou d'échec est supérieur à 1 UE/mL, il est possible de choisir un maximum de 5,0 UE/mL. Pour des plages plus étroites de concentrations étalons, par exemple de 0,005 à 1,6 UE/mL, une concentration de 4λ ou 0,02 UE/mL serait plus appropriée, surtout si le seuil de réussite ou d'échec est bien inférieur à 1 UE/mL.

Analyse - Exemple pour une microplaque à 96 puits

1. Porter les échantillons et les contrôles à température ambiante. Mélanger vigoureusement chacun d'eux à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex juste avant de les transférer dans le(s) puits de la microplaque.
2. Transférer 100 µL de l'échantillon ou du contrôle sur la microplaque.

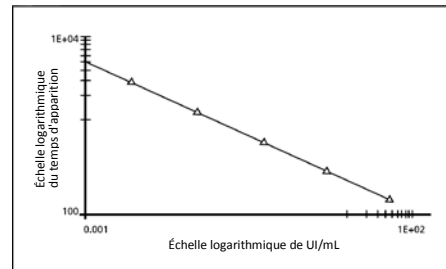
3. Préincuber la microplaque à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant au moins 10 minutes.
4. Reconstituer le réactif Chromo-LAL avec 3,2 mL d'eau de réactif LAL ou un tampon Glucashield®.
5. Transférer le plus rapidement possible, à l'aide d'une pipette répétitive, 100 µL de réactif Chromo-LAL reconstitué dans chaque puits. Le rapport de l'échantillon au lysat doit être de 1:1
6. Recouvrir la microplaque avec du Parafilm et bien mélanger sans éclabousser le mélange réactionnel ; c'est facultatif pour certains lecteurs.
7. Retirer le couvercle en Parafilm et placer immédiatement la microplaque non couverte dans l'incubateur/lecteur de microplaques réglé pour lire à 405 nm et incubé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Démarrer le logiciel Kinetic.

Temps d'exécution des analyses

Le temps nécessaire pour terminer la réaction dépend de la plage de concentrations en endotoxines choisie pour la courbe étalon et des caractéristiques spécifiques du lot. Le « temps d'exécution », en utilisant une DO d'apparition de 0,05, est généralement réglé sur 60 minutes pour une sensibilité d'analyse de 0,05 UE/mL ou sur 100 minutes pour une sensibilité de 0,005 UE/mL.

RÉSULTATS

La concentration en endotoxines pour le temps d'apparition correspondant de l'échantillon inconnu est lue à partir de la courbe étalon qui est un diagramme log-log des temps d'apparition par rapport aux concentrations étalons, ou un diagramme arithmétique du logarithme des temps d'apparition par rapport au logarithme des concentrations étalons. Une courbe étalon typique est illustrée ci-dessous.



L'équation de la ligne log-log générée pour la courbe étalon illustrée est $Y = -0,2X + 3,14$, où Y = logarithme du temps d'apparition et X = logarithme de la concentration en endotoxines. La concentration en endotoxines dans un échantillon inconnu dont le temps moyen d'apparition est de 1 630 secondes serait calculée en convertissant le temps d'apparition en sa valeur logarithmique, 3,212, en résolvant l'équation pour trouver X et en utilisant l'antilogarithme de X pour obtenir la concentration :

$$\begin{aligned} X &= (Y - 3,14) / -0,2 \\ X &= (3,212 - 3,14) / -0,2 \\ X &= -0,36 \\ \text{Antilog}(-0,36) &= 0,44 \text{ UE/mL} \end{aligned}$$

LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

La procédure est limitée par l'étendue de la capacité d'inhibition ou de désinhibition de l'échantillon de test. Si l'interférence ne peut pas être palliée par la dilution ou d'autres moyens à la MVD, alors l'analyse Chromo-LAL ne peut pas être utilisée pour mesurer les endotoxines dans cet échantillon.

VALEURS ATTENDUES

La concentration en endotoxines de l'échantillon de test peut être quantifiée dans la plage de concentrations en endotoxines utilisée pour construire la courbe étalon. Afin de communiquer les résultats en unités d'endotoxines (UE) ou en unités internationales (UI) d'endotoxines, il est nécessaire d'utiliser soit l'endotoxine de référence étalon (USP, 2e Norme internationale) soit un étalon de contrôle dont la puissance est étalonnée par rapport à cette référence.

S'il est nécessaire de diluer l'échantillon de test pour pallier toute inhibition ou désinhibition, la plus petite quantité d'endotoxines détectable sera augmentée en conséquence.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

La linéarité de la courbe étalon, dans la plage de concentrations utilisée pour déterminer les niveaux d'endotoxines, doit être vérifiée en effectuant le test sur le nombre approprié de concentrations étalons (voir courbe ci-dessus) en triple exemplaire (10). Calculer les paramètres de la courbe étalon sans faire la moyenne des temps d'apparition des données répétées. La valeur absolue du coefficient de corrélation, r, doit être supérieure ou égale à 0,980. Le même critère de linéarité s'applique aux courbes étalons qui sont incluses dans les tests de routine (voir courbe étalon ci-dessus).

Remarque : Si le coefficient de corrélation des caractéristiques de performance de l'analyse de régression linéaire répond aux critères d'acceptation supérieurs ou égaux à 0,980, une analyse de régression polynomiale peut alors être utilisée pour générer les résultats pour le contrôle et les échantillons.

RÉFÉRENCES

1. Bang, F.B. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. *Biol. Bull. (Woods Hole, MA)* 105:361-362 (1953).
2. Levin, J., and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the Limulus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:337-345 (1964).
3. Levin, J., and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265-274 (1964).
4. Levin, J., and F.B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19: 186-197.
5. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. *J. Biochem.* 81:1567-1569.
6. Iwanaga, Morita, Harada, Nakamura, Niwa, Takada, Kimura, and Sakakibara. 1978. Chromogenic Substrates for Horseshoe Crab Clotting Enzymes Its

application for the assay of Bacterial Endotoxins. *Haemostasis* 7: 183-188.

7. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. Type I allergy induced by Limulus Amebocyte Lysate (LAL). *Clinical and Experimental Allergy* 22:417-419 (1992).
8. Tsuji, K. and S.J. Harrison. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. *Appl. Env. Microbiol.* 36:710-714 (1978).
9. USP, Bacterial endotoxins test. Current edition.
10. Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. July 15 (1991).
11. FDA 2012 Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers
12. European Pharmacopoeia, third edition publ. Section 2.6.14. Bacterial Endotoxins. European Pharmacopoeia Secretariat, Strasbourg, June (1996).