

**Milieu gélosé-cétrimide**

Hydrolysate pancréatique de gélatine	20,0 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Sulfate dipotassique	10,0 g
Cétrimide	0,3 g
Gélose	13,6 g
Eau purifiée	1000 mL
Glycérol	10,0 mL

ajoutez si nécessaire une quantité de sulfate de gentamicine correspondant à 20 mg de gentamicine base et répartissez en boîtes de Petri.

01/2018:20614  
corrigé 11.0



Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant. Ajustez le pH pour qu'il soit de  $7,2 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu gélosé mannitol-sel**

Peptone pancréatique de caséine	5,0 g
Peptone peptique de tissu animal	5,0 g
Extrait de viande de boeuf	1,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Chlorure de sodium	75,0 g
Gélose	15,0 g
Rouge de phénol	0,025 g
Eau purifiée	1000 mL

Chauffez à ébullition pendant 1 min en agitant. Ajustez le pH pour qu'il soit de  $7,4 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Milieu renforcé pour clostridies**

Extrait de viande de boeuf	10,0 g
Peptone	10,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Amidon soluble	1,0 g
Glucose monohydraté	5,0 g
Chlorhydrate de cystéine	0,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Acétate de sodium	3,0 g
Gélose	0,5 g
Eau purifiée	1000 mL

Faites gonfler la gélose, dissolvez en chauffant à ébullition sous agitation constante. Si nécessaire, ajustez le pH pour qu'il soit de  $6,8 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

**Gélose Columbia**

Peptone pancréatique de caséine	10,0 g
Peptone peptique de viande	5,0 g
Peptone pancréatique de coeur	3,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Amidon de maïs	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Gélose, selon pouvoir gélifiant	10,0-15,0 g
Eau purifiée	1000 mL

Faites gonfler la gélose, dissolvez en chauffant à ébullition sous agitation constante. Si nécessaire, ajustez le pH pour qu'il soit de  $7,3 \pm 0,2$  à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé. Laissez refroidir à 45-50 °C ;

**2.6.14. ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES<sup>(4)</sup>**

L'essai des endotoxines bactériennes (EEB) est destiné à la détection ou la quantification des endotoxines produites par des bactéries gram-négatives, au moyen d'un lysat d'amoebocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*). Il peut être réalisé par 3 techniques : gélification (induction de la formation d'un gel), turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène), colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique).

6 méthodes sont décrites dans le présent chapitre :

Méthode A. Gélification : essai limite.

Méthode B. Gélification : essai semi-quantitatif.

Méthode C. Turbidimétrie cinétique.

Méthode D. Colorimétrie cinétique.

Méthode E. Colorimétrie en point final.

Méthode F. Turbidimétrie en point final.

Effectuez l'essai par l'une des 6 méthodes décrites. En cas de doute ou de litige, la décision finale est prise sur la base des résultats obtenus par la méthode A, sauf indication contraire dans la monographie.

L'essai est effectué dans des conditions permettant d'éviter toute contamination par des endotoxines.

**1. APPAREILLAGE**

Dépyrogénez dans un four à air chaud, par une méthode validée, toute la verrerie et les autres éléments d'appareillage résistant à la chaleur. La durée et la température minimales de chauffage sont généralement de 30 min à 250 °C. Si de l'appareillage en plastique est utilisé (par exemple des microplaques ou des pointes de pipette pour distributeurs automatiques), l'absence de contamination détectable par des endotoxines et l'absence d'interférence de ce matériel dans l'essai doit être établie.

*NOTE* : dans le présent chapitre, le terme « tube » est employé pour désigner tous types de récipients, par exemple les puits de microplaques.

**2. RÉACTIFS ET SOLUTIONS****(1) Lysat d'amoebocytes**

Le lysat d'amoebocytes est un produit lyophilisé obtenu à partir d'un lysat d'amoebocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*) conformément aux dispositions définies par l'Autorité compétente.

*NOTE* : le lysat d'amoebocytes réagit non seulement avec les endotoxines, mais également avec certains  $\beta$ -glucanes. Il existe des préparations de lysat d'amoebocytes ne réagissant pas avec les glucanes ; elles sont obtenues par élimination du facteur G (responsable de la réaction avec les glucanes) dans le lysat d'amoebocytes, ou par inhibition du système réactif du facteur G. Ces préparations peuvent être utilisées pour effectuer l'essai des endotoxines bactériennes en présence de glucanes.

(4) Ce chapitre a fait l'objet du processus d'harmonisation des pharmacopées. Voir chapitre 5.8. Harmonisation des pharmacopées.

**(2) Solution de lysat**

Dissolvez du lysat d'amœbocytes dans de l'eau EEB ou dans un tampon, comme recommandé par le fabricant du lysat, sous agitation modérée. Conservez le lysat reconstitué au réfrigérateur ou au congélateur, comme indiqué par le fabricant.

**(3) Eau EEB (eau pour essai des endotoxines bactériennes)**

Eau pour préparations injectables R ou eau produite par un autre procédé ne présentant pas de réaction avec le lysat utilisé à la limite de détection du réactif.

**3. PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE ÉTALON D'ENDOTOXINE**

Préparez une solution mère étalon d'endotoxine à partir d'une préparation de référence d'endotoxine étalonnée par rapport à l'étalon international, par exemple l'étalon d'endotoxine PBR.

La teneur en endotoxines est exprimée en Unités Internationales (UI). L'équivalence en Unités Internationales de l'étalon international est indiquée par l'Organisation mondiale de la Santé.

*NOTE : une Unité Internationale (UI) d'endotoxine équivaut à une Unité d'Endotoxine (U.E.).*

Pour la préparation et la conservation de la solution mère étalon d'endotoxine, suivez les instructions figurant sur la notice et l'étiquette.

**4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS ÉTALONS D'ENDOTOXINE**

Après avoir énergiquement agité la solution mère étalon d'endotoxine, préparez les dilutions en série appropriées de cette solution avec de l'eau EEB.

Utilisez ces solutions dès que possible pour éviter une éventuelle perte d'activité par adsorption.

**5. PRÉPARATION DES SOLUTIONS À EXAMINER**

Préparez les solutions à examiner en dissolvant ou en diluant la substance active ou le produit médicinal à examiner avec de l'eau EEB. Pour la dissolution ou la dilution de certaines substances ou préparations, l'emploi d'autres solutions aqueuses peut être plus approprié. Si nécessaire, ajustez le pH de la solution à examiner ou de la dilution utilisée, de telle sorte que le mélange de cette solution et du lysat ait un pH compris dans l'intervalle spécifié par le fabricant du lysat (généralement 6,0 à 8,0). L'ajustement du pH peut être effectué au moyen d'un acide, d'une base ou d'un tampon approprié, selon les recommandations du fabricant du lysat. Les acides et les bases peuvent être préparés à partir de solutions concentrées ou de solides, avec de l'eau EEB, dans des récipients exempts d'endotoxines détectables. L'absence dans les tampons d'endotoxines détectables et de facteurs d'interférence doit être vérifiée.

**6. DÉTERMINATION DE LA DILUTION MAXIMALE SIGNIFICATIVE**

La Dilution Maximale Significative (DMS) est la dilution maximale d'un échantillon à laquelle la limite en endotoxines peut être déterminée. Elle est calculée à l'aide de la formule :

$$\frac{\text{limite en endotoxines} \times \text{concentration de la solution à examiner}}{\lambda}$$

*Limite en endotoxines* : la limite en endotoxines d'une substance administrée par voie parentérale, définie sur une base posologique, est égale à :

$$\frac{K}{M}$$

*K* = dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle,

*M* = dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Lorsque le produit est destiné à être administré par injections rapprochées ou en perfusion continue, *M* est la dose maximale totale par heure.

La limite en endotoxines des produits pour administration parentérale est spécifiée en UI/mL, UI/mg, UI/Unité d'activité biologique, etc. dans les monographies.

*Concentration de la solution à examiner :*

- mg/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à la masse (UI/mg),
- Unités/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport à l'unité d'activité biologique (UI/Unité),
- mL/mL si la limite en endotoxines est spécifiée par rapport au volume (UI/mL).

$\lambda$  = pour la technique de gélification, sensibilité déclarée du lysat (UI/mL) ; pour les techniques turbidimétrique et colorimétrique, concentration la plus basse utilisée sur la courbe d'étalonnage.

**7. TECHNIQUE DE GÉLIFICATION (MÉTHODES A ET B)**

La technique de gélification permet la détection ou la quantification des endotoxines grâce à la propriété que possède le lysat de coaguler en présence d'endotoxines. La concentration minimale d'endotoxines requise pour produire la coagulation du lysat dans des conditions normalisées est la sensibilité déclarée du lysat. Afin d'assurer la fidélité et la validité de l'essai, des contrôles préliminaires, décrits sous 1. Contrôles préliminaires, sont effectués pour confirmer la sensibilité déclarée et vérifier l'absence de facteurs d'interférence.

**1. CONTRÔLES PRÉLIMINAIRES****(i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat**

Avant d'utiliser le lysat pour la réalisation de l'essai, confirmez la sensibilité déclarée  $\lambda$  de la solution de lysat, exprimée en UI/mL, sur une série de solutions préparées en 4 exemplaires. Ce contrôle est effectué chaque fois qu'un nouveau lot de lysat est utilisé ou que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions de l'essai.

Préparez en 4 exemplaires une série de solutions étalons comprenant au minimum 4 concentrations respectivement équivalentes à  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0,5\lambda$  et  $0,25\lambda$ , en diluant la solution mère étalon d'endotoxine avec de l'eau EEB.

Mélangez dans chacun des tubes un volume égal (0,1 mL par exemple) de la solution de lysat et de l'une des solutions étalons. Si le lysat utilisé est lyophilisé en ampoules ou en flacons unitaires, ajoutez directement les solutions étalons dans le flacon ou l'ampoule. Incubez le mélange de réaction pendant une durée donnée, selon les recommandations du fabricant de lysat (généralement à  $37 \pm 1$  °C pendant  $60 \pm 2$  min), en évitant toute vibration. Vérifiez l'intégrité des gels : pour les tubes, sortez un à un chacun des tubes de l'incubateur et retournez-le en le faisant pivoter de 180° environ d'un seul mouvement sans à-coups. S'il s'est formé un gel solide qui reste en place lors de l'inversion du tube, enregistrez le résultat comme positif. Dans le cas contraire, le résultat est négatif.

L'essai n'est valable que si un résultat négatif est obtenu avec chaque exemplaire de la solution étalon ayant la concentration la plus faible.

Le point final est la plus faible concentration, dans la série de solutions étalons d'endotoxine de concentration décroissante, qui entraîne la gélification du lysat. Déterminez la moyenne géométrique de la concentration au point final en calculant la

moyenne des logarithmes des concentrations au point final des 4 séries de dilution, prenez l'antilogarithme de cette valeur comme l'indique l'expression :

$$\text{Moyenne géométrique de la concentration au point final} = \text{antilog} \frac{\sum e}{f}$$

$\sum e$  = somme des concentrations au point final, en valeurs logarithmiques, obtenues dans les séries de dilutions utilisées,

$f$  = nombre d'exemplaires.

La valeur ainsi obtenue est la sensibilité mesurée de la solution de lysat en UI/mL. Si cette valeur est comprise entre 0,5λ et 2λ (bornes incluses), la sensibilité déclarée est confirmée et utilisée pour les essais réalisés avec ce même lysat.

**(ii) Recherche de facteurs d'interférence**

Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-1, et utilisez des solutions à examiner de dilution inférieure à la DMS, ne contenant pas d'endotoxines détectables. Opérez comme décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

Tableau 2.6.14.-1

Solution	Concentration en endotoxines/Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines	Diluant	Facteur de dilution	Concentration en endotoxines	Nombre d'exemplaires
A	Néant/Solution à examiner	-	-	-	4
B	2λ/Solution à examiner	Solution à examiner	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
C	2λ/Eau EEB	Eau EEB	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
D	Néant/Eau EEB	-	-	-	2

Solution A = solution de la préparation à examiner ne contenant pas d'endotoxines détectables.

Solution B = contrôle d'interférence.

Solution C = témoin pour la sensibilité déclarée du lysat.

Solution D = témoin négatif (eau EEB).

Déterminez la moyenne géométrique de la concentration au point final pour les solutions B et C à l'aide de l'expression donnée sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

La recherche de facteurs d'interférence doit être effectuée chaque fois que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales.

L'essai n'est valable que si aucune des solutions A et D ne donne de réaction positive et si le résultat obtenu avec la solution C confirme la sensibilité déclarée du lysat.

Si la sensibilité du lysat déterminée avec la solution B est comprise entre 0,5λ et 2λ (bornes incluses), la solution à examiner ne contient pas de facteurs d'interférence dans les conditions expérimentales utilisées. Dans le cas contraire, il y a interférence de la solution à examiner dans l'essai.

Si la préparation à examiner interfère dans l'essai à une dilution inférieure à la DMS, répétez la recherche de facteurs d'interférence à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS. L'emploi d'un lysat plus sensible permet une dilution plus poussée de la préparation à examiner, et peut ainsi contribuer à l'élimination d'éventuelles interférences.

Les facteurs d'interférence peuvent être éliminés par un traitement approprié, validé, tel que la filtration, la neutralisation, la dialyse ou le chauffage. Pour vérifier que le traitement choisi permet d'éliminer l'interférence constatée sans entraîner de déperdition en endotoxines, répétez la recherche de facteurs d'interférence sur la préparation à examiner additionnée d'étalon d'endotoxine et soumise au traitement choisi.

2. ESSAI LIMITE (MÉTHODE A)

**(i) Mode opératoire**

Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-2, et effectuez l'essai sur ces solutions selon le mode opératoire décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

Tableau 2.6.14.-2

Solution	Concentration en endotoxines/Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines	Nombre d'exemplaires
A	Néant/Solution à examiner diluée	2
B	2λ/Solution à examiner diluée	2
C	2λ/Eau EEB	2
D	Néant/Eau EEB	2

Préparez la solution A et la solution B (témoin positif-produit) en utilisant une dilution inférieure ou égale à la DMS et en la traitant comme décrit sous 1. Contrôles préliminaires, (ii) Recherche de facteurs d'interférence. Les solutions B et C (témoins positifs) contiennent l'étalon d'endotoxine à une concentration équivalente à deux fois la sensibilité déclarée du lysat. La solution D (témoin négatif) est constituée d'eau EEB.

**(ii) Interprétation**

L'essai n'est valable que si les résultats obtenus avec chacun des exemplaires des solutions B et C sont positifs et si les 2 résultats obtenus avec la solution D sont négatifs.

Si les 2 résultats obtenus avec la solution A sont négatifs, la préparation à examiner satisfait à l'essai.

Si les 2 résultats obtenus avec la solution A sont positifs, la préparation à examiner ne satisfait pas à l'essai.

Si l'un des résultats obtenus avec la solution A est positif et l'autre négatif, répétez l'essai. Si, lors de la répétition, les 2 résultats obtenus avec la solution A sont négatifs, la préparation à examiner satisfait à l'essai ; si l'un des résultats obtenus pour la solution A (ou les deux) est positif, la préparation à examiner ne satisfait pas à l'essai.

Toutefois, si une préparation qui ne satisfait pas à l'essai a été examinée à une dilution inférieure à la DMS, l'essai peut être répété à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS.

3. ESSAI QUANTITATIF (MÉTHODE B)

**(i) Mode opératoire**

Cet essai permet de quantifier les endotoxines bactériennes présentes dans la solution à examiner par titrage en point final. Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans

2. Méthodes analytiques

le tableau 2.6.14.-3, et effectuez l'essai sur ces solutions selon le mode opératoire décrit sous 1. Contrôles préliminaires,  
(i) Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat.

### (ii) Calcul et interprétation

L'essai n'est valable que si les 3 conditions suivantes sont satisfaites :

- (a) les 2 résultats obtenus pour la solution D (témoin négatif) sont négatifs,
- (b) les 2 résultats obtenus pour la solution B (témoin positif-produit) sont positifs,
- (c) la moyenne géométrique de la concentration au point final obtenue pour la solution C est comprise entre  $0,5\lambda$  et  $2\lambda$ .

Pour déterminer la concentration en endotoxines de la solution A, calculez la concentration au point final pour chacune des gammes, en multipliant le facteur de dilution au point final par  $\lambda$ .

La concentration en endotoxines de la solution à examiner est la concentration au point final obtenue pour les gammes. Si l'essai a été effectué avec la solution à examiner pré-diluée, calculez la concentration en endotoxines de la solution initiale en multipliant le résultat par le facteur de dilution.

Si aucune des dilutions de la solution à examiner ne donne de résultat positif, les conditions de validité de l'essai étant par ailleurs satisfaites, notez la concentration en endotoxines comme inférieure à  $\lambda$  (ou, si l'essai a été réalisé avec la solution pré-diluée, au plus petit facteur de dilution utilisé  $\times \lambda$ ). Si toutes les dilutions donnent un résultat positif, notez la concentration en endotoxines comme supérieure ou égale au plus grand facteur de dilution utilisé  $\times \lambda$  (par exemple, dans le tableau 2.6.14.-3, facteur de dilution initial  $\times 8 \times \lambda$ ).

La préparation à examiner satisfait à l'essai si la concentration en endotoxines des 2 gammes est inférieure à la limite spécifiée dans la monographie.

## 8. TECHNIQUES PHOTOMÉTRIQUES QUANTITATIVES (MÉTHODES C, D, E ET F)

### 1. TECHNIQUE TURBIDIMÉTRIQUE (MÉTHODES C ET F)

Cette technique consiste à mesurer l'accroissement de turbidité, par photométrie. Selon le principe expérimental mis en oeuvre, la méthode utilisée est dite turbidimétrie en point final ou turbidimétrie cinétique.

La turbidimétrie en point final (méthode F) repose sur l'existence d'une relation quantitative entre la concentration en endotoxines et la turbidité (absorbance ou transmission) atteinte dans le mélange réactif à la fin d'une période d'incubation.

La turbidimétrie cinétique (méthode C) repose sur la mesure du temps requis pour atteindre une absorbance ou une transmittance prédéfinie dans le mélange réactif, ou bien de la vitesse de développement de la turbidité.

L'essai est effectué à la température d'incubation recommandée par le fabricant du lysat (généralement  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### 2. TECHNIQUE COLORIMÉTRIQUE (MÉTHODES D ET E)

Cette technique consiste à mesurer la quantité de chromophore libéré par un peptide chromogène approprié lors de la réaction des endotoxines avec le lysat. Selon le principe expérimental mis en oeuvre, la méthode utilisée est dite colorimétrie en point final ou colorimétrie cinétique.

La colorimétrie en point final (méthode E) repose sur l'existence d'une relation quantitative entre la concentration en endotoxines et la quantité de chromophore libéré à la fin d'une période d'incubation.

La colorimétrie cinétique (méthode D) mesure le temps requis pour atteindre une absorbance prédéfinie dans le mélange réactif, ou bien la vitesse de développement de la coloration.

L'essai est effectué à la température d'incubation recommandée par le fabricant du lysat (généralement  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### 3. CONTRÔLES PRÉLIMINAIRES

Afin d'assurer la fidélité et la validité des techniques turbidimétriques et colorimétriques, des contrôles préliminaires sont effectués pour vérifier que les critères de validité de la courbe d'étalonnage sont satisfaits et que la solution à examiner n'interfère pas dans l'essai.

Il est nécessaire de valider la méthode d'essai chaque fois que des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales.

### (i) Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage

Cet essai est à effectuer pour chaque lot de lysat utilisé comme réactif.

A partir de la solution étalon d'endotoxine, préparez au moins 3 solutions de concentrations différentes comprises dans l'intervalle indiqué par le fabricant du lysat, pour établir la courbe d'étalonnage. Effectuez l'essai sur 3 exemplaires au moins de chacune de ces solutions étalons, suivant les instructions fournies par le fabricant du lysat (proportions en volume, temps d'incubation, température, pH, etc.).

Tableau 2.6.14.-3

Solution	Concentration en endotoxines/Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines	Diluant	Facteur de dilution	Concentration en endotoxines	Nombre d'exemplaires
A	Néant/Solution à examiner	Eau EEB	1	-	2
			2	-	2
			4	-	2
			8	-	2
B	$2\lambda$ /Solution à examiner		1	$2\lambda$	2
C	$2\lambda$ /Eau EEB	Eau EEB	1	$2\lambda$	2
			2	$1\lambda$	2
			4	$0,5\lambda$	2
			8	$0,25\lambda$	2
D	Néant/Eau EEB	-	-	-	2

Solution A = solution à examiner à la dilution, inférieure ou égale à la DMS, à laquelle a été effectuée la recherche des facteurs d'interférence. Les dilutions suivantes de la solution à examiner ne doivent pas dépasser la DMS. Utilisez de l'eau EEB pour préparer une série de dilutions de 4 tubes contenant la solution à examiner aux concentrations de 1, 1/2, 1/4 et 1/8 de la dilution à laquelle a été effectué le contrôle des facteurs d'interférence. D'autres dilutions, ne dépassant pas la DMS, peuvent être utilisées si besoin est.

Solution B = solution A contenant l'étalon d'endotoxine à la concentration  $2\lambda$  (témoin positif-produit).

Solution C = une série de dilutions de 4 tubes d'eau EEB contenant l'étalon d'endotoxine à concentration  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0,5\lambda$  et  $0,25\lambda$ .

Solution D = eau EEB (témoin négatif).

Si, pour les méthodes cinétiques, l'intervalle de concentration souhaité est supérieur à  $2 \log_{10}$ , il convient de préparer des solutions étalons supplémentaires de façon à encadrer chaque incrément logarithmique de l'intervalle couvert par la courbe d'étalonnage.

La valeur absolue du coefficient de corrélation,  $|r|$ , doit être supérieure ou égale à 0,980 sur l'intervalle de concentration en endotoxines adopté.

#### (ii) Recherche de facteurs d'interférence

Choisissez une concentration en endotoxines coïncidant avec le milieu de la courbe d'étalonnage, ou s'en approchant.

Préparez les solutions A, B, C, D comme indiqué dans le tableau 2.6.14.-4. Effectuez l'essai sur 2 exemplaires au moins de chacune de ces solutions, suivant les instructions fournies par le fabricant du lysat (volumes d'échantillon et de solution de lysat, rapport de ces volumes, temps d'incubation, etc.).

L'essai n'est valable que si les conditions suivantes sont satisfaites :

- le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage établie à l'aide de la solution C est, en valeur absolue, supérieur ou égal à 0,980,
- le résultat obtenu avec la solution D n'est pas supérieur à la limite spécifiée pour le blanc dans la description du lysat utilisé comme réactif, ou est inférieur à la limite de détection de ce lysat.

Calculez le recouvrement moyen des endotoxines ajoutées en soustrayant (le cas échéant) la concentration moyenne en endotoxines de la solution seule (solution A, tableau 2.6.14.-4) de celle obtenue pour la solution contenant les endotoxines ajoutées (solution B, tableau 2.6.14.-4).

Tableau 2.6.14.-4

Solution	Concentration en endotoxines	Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines	Nombre d'exemplaires
A	Néant	Solution à examiner	Au moins 2
B	Concentration médiane de la courbe d'étalonnage	Solution à examiner	Au moins 2
C	Au moins 3 concentrations (la plus faible est désignée $\lambda$ )	Eau EEB	Au moins 2 pour chaque concentration
D	Néant	Eau EEB	Au moins 2

Solution A = solution à examiner éventuellement diluée, jusqu'à la DMS au maximum.

Solution B = préparation à examiner à la même dilution que la solution A, contenant des endotoxines ajoutées à une concentration coïncidant avec le milieu de la courbe d'étalonnage, ou s'en approchant.

Solution C = solutions étalons d'endotoxine de mêmes concentrations que celles utilisées pour la validation décrite sous 3. Contrôles préliminaires, (i) Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage (témoins positifs).

Solution D = eau EEB (témoin négatif).

La solution à examiner est considérée comme exempte de facteurs d'interférence dans les conditions de l'essai si la concentration mesurée en endotoxines ajoutées est comprise entre 50 pour cent et 200 pour cent de la concentration connue en endotoxines ajoutées, après déduction des endotoxines éventuellement détectées dans la solution non additionnée d'endotoxines.

Si le taux de recouvrement en endotoxines n'est pas compris dans l'intervalle spécifié, la solution à examiner est considérée comme non exempte de facteurs d'interférence. Dans ce cas, répétez la recherche de facteurs d'interférence à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS. L'interférence exercée par la solution à examiner ou par la solution à examiner diluée (sans que la dilution dépasse la DMS) peut également être éliminée par un traitement approprié, validé, tel que la filtration, la neutralisation, la dialyse ou le chauffage. Pour vérifier que le traitement choisi permet d'éliminer l'interférence constatée sans entraîner de déperdition en

endotoxines, répétez la recherche de facteurs d'interférence sur la préparation à examiner additionnée d'étalon d'endotoxine et soumise au traitement choisi.

#### 4. ESSAI

##### (i) Mode opératoire

Opérez comme décrit sous 3. Contrôles préliminaires, (ii) Recherche de facteurs d'interférence.

##### (ii) Calcul

Calculez la concentration en endotoxines de chaque exemplaire de la solution A à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la solution C (témoin positif).

L'essai n'est valable que si les 3 conditions suivantes sont satisfaites :

- (1) les résultats obtenus pour la solution C satisfont aux exigences de validité définies sous 3. Contrôles préliminaires, (i) Vérification des critères de validité de la courbe d'étalonnage,
- (2) le recouvrement en endotoxines, calculé à partir de la concentration en endotoxines obtenue pour la solution B après déduction de la concentration en endotoxines obtenue pour la solution A, est compris entre 50 pour cent et 200 pour cent,
- (3) le résultat obtenu pour la solution D (témoin négatif) n'est pas supérieur à la limite spécifiée pour le blanc dans la description du lysat utilisé, ou est inférieur à la limite de détection de ce lysat.

##### (iii) Interprétation

La préparation à examiner satisfait à l'essai si la concentration moyenne en endotoxines des solutions A, après correction de dilution et concentration, est inférieure à la limite en endotoxines spécifiée pour le produit.

*Des recommandations sur l'essai des endotoxines bactériennes sont données dans le chapitre général 5.1.10.*

04/2016:20615  
corrigé 11.0



## 2.6.15. ACTIVATEUR DE PRÉKALLIKRÉINE

L'activateur de prékallikréine (PKA) transforme la prékallikréine en kallikréine et peut être titré sur la base de sa capacité à scinder le chromophore d'un substrat peptidique synthétique, la vitesse de réaction étant déterminée par spectrophotométrie et la concentration en PKA calculée par comparaison à une préparation de référence étalonnée en Unités Internationales.

L'Unité Internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international, qui est constitué par de l'activateur de prékallikréine cryodesséché. L'équivalence en Unités Internationales de l'étalon international est indiquée par l'Organisation mondiale de la Santé.

#### RÉACTIFS

L'activateur de prékallikréine dans l'albumine PBR est étalonné en Unités Internationales par rapport à l'étalon international.

*Solution tampon A.* Dissolvez 6,055 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane R, 1,17 g de chlorure de sodium R, 50 mg de bromure d'hexadiméthrine R et 0,100 g d'azide de sodium R dans de l'eau R. Ajustez à pH 8,0 avec de l'acide chlorhydrique 2 M R et complétez à 1000 mL avec de l'eau R.

*Solution tampon B.* Dissolvez 6,055 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane R et 8,77 g de chlorure de sodium R dans de l'eau R. Ajustez à pH 8,0 avec de l'acide chlorhydrique 2 M R et complétez à 1000 mL avec de l'eau R.