



Détermination quantitative des endotoxines

Introduction

Les endotoxines appartiennent à la famille hétérogène des pyrogènes (encadré 1) et sont des composants de la membrane cellulaire externe des bactéries gram-négatives. Contrairement aux exotoxines (par exemple la toxine botulique), les endotoxines ne déclenchent une réaction immunitaire que lorsque la bactérie se lyse (décomposition de la cellule). Des composants membranaires sont alors libérés, qui sont reconnus par le système immunitaire humain et déclenchent une réaction inflammatoire. Le symptôme le plus courant en cas de contact avec des endotoxines est la fièvre, car les endotoxines stimulent la sécrétion de cytokines. D'autres réactions telles qu'une augmentation de la fréquence cardiaque ou une diminution du nombre de lymphocytes et de plaquettes sanguines peuvent s'ensuivre. De fortes doses d'endotoxines peuvent même entraîner une insuffisance hépatique ou la mort par choc hémorragique. Si l'exposition d'une personne en bonne santé se fait par le biais du tractus gastro-intestinal, la réaction immunitaire déclenchée par les endotoxines est généralement sans danger. Mais si les endotoxines pénètrent directement dans la circulation sanguine, par exemple par le biais des médicaments contaminés administrés par voie intraveineuse, cela peut avoir les conséquences décrites ci-dessus.

Principe du test

Pour s'assurer que les médicaments tels que les antibiotiques intraveineux et autres solutions injectables sont exempts

d'endotoxines, on utilise le plus souvent un test spécifique très sensible basé sur le lysat d'amœbocytes prélevés dans le sang des limules (*Limulus polyphemus*). Les amœbocytes sont l'équivalent chez les invertébrés des globules blancs des vertébrés. Les amœbocytes déclenchent une réaction de coagulation lorsqu'ils rencontrent une substance étrangère dans la circulation sanguine. Cette réaction est aujourd'hui utilisée de manière standard pour la détection d'endotoxines. Le tableau 1 présente un aperçu des méthodes basées sur cette réaction.

Encadré 1:

Différence entre pyrogènes et endotoxines

Pyrogène est un terme générique désignant des substances à effet inflammatoire qui provoquent une réaction du système immunitaire. Elles peuvent provenir de contaminants microbiens mais aussi non microbiens. En général, les pyrogènes sont divisés en deux groupes: les endotoxines et les pyrogènes non endotoxiniques (NEP). Alors que les endotoxines proviennent exclusivement de bactéries gram-négatives, les NEP peuvent provenir de bactéries gram-positives, de virus, de levures ou de moisissures. En plus, des substances d'origine non biologique, telles que des particules de plastique ou des composés métalliques, peuvent également agir comme pyrogènes. Si vous êtes intéressé par la détection générale de pyrogènes, nous sommes à votre disposition pour vous conseiller.

Tableau 1: Méthodes de test pour la détermination des endotoxines

	Gel-clot	Chromogène	Turbidimétrique
Analyse	qualitatif ou semi-quantitatif	quantitatif	quantitatif
Principe de mesure	visuel	photométrique (changement de couleur)	photométrique (turbidité)
Référence	Ph. Eur. 2.6.14, méthode A resp. B	Ph. Eur. 2.6.14, méthode D resp. E	Ph. Eur. 2.6.14, méthode C resp. F
Avantage	- techniquement simple - méthode la plus fréquemment utilisée	- très sensible (limite de détection à 0.005 EU / mL) - saisie automatique des données - dilutions plus élevées permettent de neutraliser les facteurs perturbateurs	
Inconvénient	- sensibilité limitée - sensible aux chocs	- plus exigeant sur le plan technique - interférences sur les échantillons troubles ou colorés	

Détermination de l'endotoxine chez Interlabor Belp AG

Chez Interlabor, la méthode chromogène-cinétique, qui permet une détermination quantitative de la teneur en endotoxines, est désormais proposée en standard en plus du test gel-clot. Le principe du test repose sur le clivage enzymatique d'un chromophore (p-nitroanilines) en présence d'endotoxines, ce qui entraîne une coloration jaunâtre de la solution et peut être mesurée par photométrie. Grâce à sa grande sensibilité, le test permet l'analyse de matrices d'échantillons difficiles, car les facteurs perturbateurs peuvent être neutralisés par une dilution plus élevée. Sur demande, nous vous proposons également la méthode turbidimétrique.

Analyse dans le cadre GMP

Pour une détermination quantitative des endotoxines dans le cadre GMP, il faut d'abord procéder à une vérification spécifique au produit. Lors d'essais préliminaires, nous vérifions la solubilité ainsi que les éventuelles propriétés du produit qui inhibent ou favorisent la réaction. Sur la base des résultats des essais préliminaires, nous procédons ensuite à la vérification conformément aux critères de la pharmacopée (Ph. Eur. 2.6.14¹ et USP <85>²).

Données clés chez Interlabor Belp AG

Selon le projet, différentes qualités d'analyse et différents délais de traitement peuvent être proposés:

- Qualité de l'analyse: ISO 17025 ou GMP (après vérification)
- Délai:
 - Standard env. 8 - 10 jour ouvrables
 - Express env. 5 jours ouvrables
 - Vérification env. 8 - 12 semaines
- Prix d'analyse: Configuration de la méthode CHF 120.- par série d'échantillon, chaque échantillon routine CHF 90.- prix de la vérification sur demande
- Quantité d'échantillon: Routine env. 1 g ou vérification env. 5 g
Quantité dépendent de la spécification

Nous vous conseillerons avec plaisir lors d'un entretien personnel.

Références

1. <https://gmpua.com/Validation/Method/LAL/EUPHARMACOPOEIA.pdf>
2. <https://www.usp.org/harmonization-standards/pgd/general-methods/bacterialendotoxins>

INTERLABOR BELP AG



Interlabor Belp AG

Aemmenmattstrasse 16
3123 Belp, Suisse
Tél. +41 (0)31 818 77 77
www.interlabor.ch
info@interlabor.ch

Heures d'ouvertures

Du lundi au vendredi
07.30 – 12.00 heures
13.30 – 17.00 heures