

Validation d'une méthode de détection et de quantification des endotoxines bactériennes dans les préparations stériles injectables au moyen d'une technique de colorimétrie cinétique.

Gils Marie¹, Levaux Camille¹, Wachtelaer Audrey¹, Gilman Benjamin¹, Pollain Natacha¹, Roland Isabelle¹

¹Centre Hospitalier Universitaire de Liège, 4000 Liège, Belgique, marie.gils@chuliege.be

Introduction

Les **endotoxines bactériennes** libérées lors de la **lyse de bactéries GRAM négatives** doivent être recherchées dans les préparations injectables ; leur présence, en quantité supérieure à la limite admise, pouvant conduire à un **choc septique**.

→ Essai des endotoxines bactériennes (Ph.Eur. 2.6.14 & USP <85>)

- Détection ou quantification des endotoxines au moyen d'un lysat d'amœbocytes de limules (LAL)
- 3 Techniques : gélification, turbidimétrie et **colorimétrie**.

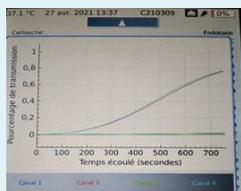
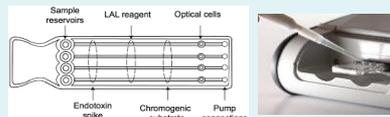


→ CHU de Liège:

- Changement de technique : GELIFICATION → **COLORIMETRIE CINETIQUE** (Méthode D – Ph.Eur. 2.6.14)
- **Validation technique de colorimétrie cinétique**

Principe colorimétrie cinétique – NEXGEN PTS (Charles River)

- ❖ Cartouche: 4 micro-puits
 - ✓ 2,4: contrôles positifs;
 - ✓ 1,3: analyses échantillons
- ❖ Dépôt: 25 µL
- ❖ Température: 37°C
- ❖ Réaction enzymatique – en présence d'endotoxines
- ❖ Détection – Spectrophotomètre UV



Résultats

- Validation de l'équipement et des conditions opératoires (différentes pour chaque préparation à analyser);
- Formation des manipulateurs à l'utilisation en routine de l'équipement;
- 25 préparations validées;
- Gain en terme de
 - Temps: 15 minutes vs. 1h (gélification);
 - Manipulation: semi-automatisé vs. manuel ;
 - Précision: quantitatif vs. qualitatif/semi-quantitatif.

Méthode

Validation équipement

→ **Recours monographie USP <85>/ Ph.Eur. 2.6.14**

→ **Développement fiche de validation**

❖ Description du produit

- ✓ Libellé, forme galénique, principes actifs, concentration et voie d'administration

❖ Mode d'administration

- ✓ Dilution de la préparation (concentration), dose maximale par administration, dose maximale par 24h

❖ Phase 1 – Calculs

- ✓ CLE – concentration limite en endotoxine

$$CLE = K/M$$

K = Dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène par kilogramme de masse corporelle,
K = 5,0 UE/Kg (voie IV) // K = 0,2 UE/Kg (voie IT)

M = Dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle. Si le produit est administré en injections rapprochées ou en perfusion continue, M est la dose maximale totale par heure. » (Ph.Eur.2.6.14)

- ✓ DMV – dilution maximale validée

$$DMV = CLE/y$$

y = concentration la plus basse utilisée sur la courbe d'étalonnage
 Pour chacun des types de cartouche, une DMV sera établie. Plus la cartouche est sensible, plus la DMV est importante. Il faut toujours privilégier la cartouche la moins sensible permettant d'effectuer la dilution souhaitée.

Cartouche 10 → 0,1 EU/mL (y=0,1)
 Cartouche 5 → 0,05 EU/mL (y=0,05)
 Cartouche 1 → 0,01 EU/mL (y=0,01)
 Cartouche 0,5 → 0,005 EU/mL (y=0,005)

❖ Phase 2 – Détermination de la dilution à valider



→ **Rédaction protocole de validation et d'usage de l'équipement**

Discussion

En tant que pharmacien, nous nous devons de garantir la sécurité et la qualité des préparations produites à la pharmacie.

La recherche systématique des endotoxines dans les préparations destinées à être administrées par voie intraveineuse ou intrathécale fait partie intégrante de cet objectif permanent de qualité et de sécurité. C'est pourquoi la mise en place d'une méthode quantitative de détection des endotoxines permet de renforcer la sécurité et la qualité des préparations réalisées pour nos patients.