



Les endotoxines dans l'eau de dialyse - Nature et recherche

Mme KUPPEL - Laboratoire FRESENIUS - LIMOGES

EXIGENCES RÉGLEMENTAIRES

Jusqu'à un passé récent, les principaux contrôles effectués sur les systèmes de production d'eau pour hémodialyse, étaient les analyses microbiologiques. La Pharmacopée Européenne a ensuite fixé les limites en endotoxines des eaux pour hémodialyse. Enfin en Juin 2000, la circulaire DGS/DH/AFSSAPS n° 2000-337 donne les différentes règles techniques à respecter quant à la conception, l'exploitation, l'entretien, la surveillance et le contrôle des installations pour la production d'eau pour hémodialyse des patients insuffisants rénaux.

En ce qui concerne les endotoxines, la circulaire présente un programme minimum annuel de contrôle des installations de traitement d'eau en fonction du nombre de séances effectuées par an. Elle donne également un exemple de programme d'analyse à réaliser à la réception d'une installation d'eau, indiquant notamment qu'un dosage des endotoxines est nécessaire en sortie d'osmoseur et au retour de boucle.

HISTORIQUE DE LA RECHERCHE DES ENDOTOXINES

Dans les années 40, les différentes Pharmacopées Européennes et Américaines élaborèrent et adoptèrent le test de recherche des substances pyrogènes in vivo chez le lapin qui consistait à mesurer l'élévation de température après injection intraveineuse du produit à tester. Ce test est susceptible de détecter les endotoxines mais aussi d'autres substances pyrogènes d'origine bactérienne telles que les toxines de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* ou des *Streptocoques* du groupe D qui sont thermolabiles ou d'origine virale ou fongique.

L'essai pyrogène sur le lapin a longtemps été le seul test prescrit par les monographies, mais son manque de sensibilité, son coût et les efforts de diminution du travail en routine sur les animaux ont entraîné ces dernières années le remplacement de ce test par l'essai in vitro réalisé à l'aide d'un réactif, le lysat d'amœbocyte de limule : LAL.

QUE SONT DONC CES ENDOTOXINES ?

Les endotoxines injectées dans la circulation générale à des taux de quelques ng sont capables d'entraîner des chocs graves. Elles ont été identifiées comme responsables de fièvres dues aux injections dès le début du XXème siècle.

Les endotoxines sont un des composants essentiels de la paroi de tous les germes à Gram négatif. Elles sont constituées de lipopolysaccharides (LPS), de protéines et de phospholipides.

Le LPS est l'unité structurale des endotoxines. Il est enchâssé dans le feuillet externe de la paroi de la bactérie. Il est formé d'une partie lipidique - le lipide A - et d'une partie polysaccharidique elle-même constituée d'un noyau central - le core - et de chaînes O spécifiques.

Le lipide A est la partie biologiquement active du LPS responsable de la pyrogénéité. La nature chimique polysaccharidique des endotoxines entraîne leur thermo résistance au cycle de stérilisation par la vapeur.

La stérilisation par voie humide (autoclavage) détruira les bactéries mais ne détruira pas les endotoxines. Il est donc nécessaire de différencier stérilité et pyrogène.

Leur taille leur permet de passer les filtres stérilisants ; seule l'ultrafiltration a des seuils de coupures inférieurs à 30 Kdalton permet d'éliminer les endotoxines bactériennes.

LA RECHERCHE

L'essai permettant la détection des endotoxines bactériennes est un essai in vitro réalisé à l'aide d'un réactif, le lysat d'amœbocyte de limule : LAL.

Les amœbocytes sont les seules cellules circulantes du sang de limule. Les limules sont des arthropodes marins, classe des Merostomes dont la taille peut atteindre 60 cm.

Véritables fossiles vivants, ces animaux ont très peu évolué en 300 millions d'années. L'espèce utilisée, le *Limulus polyphemus*, vit sur les côtes orientales d'Amérique du Nord. Il existe une espèce asiatique voisine : *Tachypleus tridentatus*.

Comment a-t-on eu l'idée d'utiliser les limules pour la recherche des endotoxines bactériennes ?

Les amœbocytes ont des fonctions phagocytaires et sont susceptibles d'aggrégation ou de lyse avec libération des granules qu'ils renferment ; ce dernier stade engendre une coagulation locale en cas de blessure ou généralisée et létale en cas d'anomalie infectieuse (observé par LEVIN après injection de *Vibrio*).

Dans les années 60, LEVIN et BANG démontrèrent que le taux de gélification du lysat d'amœbocytes de limule (ou LAL) était proportionnel à la concentration d'endotoxines ajoutées au lysat et ils ont suggéré que cette réaction soit utilisée comme un essai pour les endotoxines.

A partir de cela se sont développées différentes techniques :

- la méthode par gélification
- la chromogénique point final
- la chromogénique cinétique
- la turbidimétrie

EXEMPLE DE DEUX MÉTHODES

Seules les méthodes par gélification et la méthode chromogénique cinétique sont utilisées dans notre laboratoire.

LE TEST PAR GÉLIFICATION

Une cascade enzymatique est à l'origine de la gélification de lysat :

- les endotoxines activent un facteur C du lysat
- ce facteur C active un second facteur B
- le facteur B activé va à son tour activer une autre enzyme présente dans le lysat : la procoagulase
- une fois activée en coagulase, cette enzyme est capable de scinder une protéine coagulogène du lysat en peptide C et coaguline
- la coaguline insoluble est responsable de la formation du gel.

La quantité de coagulase est proportionnelle à la quantité d'endotoxines présentes.

Les concentrations en endotoxines sont exprimées en UE (unité d'endotoxines) ou EU (en anglais). Cette unité représente une activité d'endotoxines définie pour tous les réactifs testés par rapport à un étalon international d'endotoxines (EC6). On rencontre également des résultats exprimés en UI (unité internationale) ; cette unité utilisée uniquement par la Pharmacopée Européenne, représente également une activité d'endotoxines définie pour tous les réactifs testés par rapport à un étalon différent (PBR). Néanmoins, les réactifs sont aujourd'hui calibrés pour que 1 EU = 1 UI.

La technique est simple : on met en contact 100 ml d'échantillon avec 100 ml de lysat. On procède alors à une incubation d'une heure à la suite de laquelle si la quantité d'endotoxines présente dans l'échantillon est supérieure au seuil de sensibilité du lysat, une coagulation se produit ; dans le cas contraire le mélange reste liquide.

On désigne par λ le seuil de sensibilité d'un lysat.

Dans un premier temps il faut effectuer une vérification de sensibilité du lysat.

La présence du gel est notée \oplus et son absence est notée \ominus .

La sensibilité limite est la dernière valeur pour laquelle on a un résultat positif. On peut ainsi déterminer une sensibilité expérimentale qui pour que la manipulation et le réactif soient déclarés valides ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de la sensibilité théorique.

Sur ce principe et à chaque nouveau produit à tester, on recherchera les facteurs d'interférence pouvant rendre le test invalide. Pour cela deux séries de manipulations sont réalisées :

- une dans une eau exempte d'endotoxine,
- une dans le produit à tester.

La sensibilité moyenne obtenue dans l'eau ne doit pas différer de plus d'un facteur 2 de celle obtenue dans le produit.

En cas d'interférence, celle-ci pourra être levée le plus souvent par dilution ou ajustement de pH.

LA MÉTHODE CHROMOGÉNIQUE CINÉTIQUE

En étudiant la séquence en acides aminés de la protéine coagulogène, on s'est aperçu que la coagulase coupait toujours après un radical arginine (1 site de coupure chez *Limulus polyphemus* et deux chez *Tachypleus tridentatus*).

On a donc cherché à rendre le test LAL quantitatif en synthétisant un analogue du substrat naturel et en reproduisant la séquence peptidique du site de coupure de l'enzyme. On a lié aux 4 acides aminés du site actif, une paranitroaniline (PNA) ; l'enzyme coupant après l'arginine libérera la PNA à l'origine de la coloration jaune dont on suivra l'absorbance à 405 nm.

En chromogénique cinétique, les endotoxines de l'échantillon vont activer, par l'intermédiaire de différents facteurs, la procoagulase ; cette enzyme activée va scinder un petit peptide, le substrat chromogène (incolore) et libérer la PNA jaune.

L'absorbance du mélange LAL/substrat/endotoxine est déterminée à intervalle de temps réguliers.

Le logarithme du temps de latence de la réaction est inversement proportionnel au logarithme de la concentration en endotoxines.

Le photomètre réalise une première lecture des densités optiques à T0, et à partir de cette D.O. initiale, le temps nécessaire (Tr) pour que l'absorbance augmente de 0,2 unités est déterminé.

La concentration en endotoxines des échantillons est calculée automatiquement à l'aide d'une droite d'étalonnage et des dilutions réalisées.

On peut donc donner un résultat quantitatif du taux d'endotoxines.

CONCLUSION

Les accidents dus à des réactions fébriles dans les cas de dialyse ont été corrélés à la concentration endotoxines/bactéries dans le dialysat. En effet la présence d'une forte concentration en endotoxines, permet à celles-ci de traverser la membrane.

Il est défini dans la Pharmacopée Européenne, que l'eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse peut être obtenue à partir d'eau potable par distillation, osmose inverse, par échange d'ions ou par tout autre procédé approprié.

Pour l'eau de dilution des solutions de dialyse, la Pharmacopée Européenne donne une concentration maximale admise de 0,25 UI/ml.

La méthode de recherche des endotoxines bactériennes utilisant le réactif L.A.L., permet, grâce à une gamme de mesures très large, de déterminer la teneur en endotoxines en différents points des systèmes de purification, aussi bien sur une eau de ville brute que sur l'eau de dilution. Il faut noter qu'il n'y a pas de limite dans le décret pour les eaux de ville, toutefois un taux d'environ 50 EU/ml est couramment admis.

Cette méthode est donc adaptée à la vérification du bon fonctionnement, du bon usage et de la bonne maintenance des installations de production d'eau pour hémodialyse. Cette surveillance permet de s'assurer que les systèmes sont aptes à fournir une eau conforme aux limites et permettra d'intégrer les risques de contamination liés à chaque circuit et à leur usage.