

sont décrites dans le chapitre 5.1.1. *Méthodes de préparation des produits stériles*. La simulation avec des témoins-milieux peut être utilisée pour évaluer l'asepsie d'un procédé de fabrication. Ceci mis à part, l'essai de stérilité reste la seule méthode analytique qui convient aux produits préparés dans des conditions aseptiques ; il constitue par ailleurs, dans tous les cas, la seule méthode analytique à disposition des autorités amenées à contrôler la stérilité d'un échantillon du produit.

La probabilité de détecter des microorganismes par l'essai de stérilité augmente avec leur nombre dans l'échantillon contrôlé et varie selon la capacité de croissance des espèces microbiennes présentes. La probabilité de détection d'une très faible contamination même uniformément répartie au sein du lot est très réduite. L'interprétation des résultats de l'essai de stérilité repose sur l'hypothèse que tous les récipients constituant le lot donneraient le même résultat si leur contenu était contrôlé. Comme il est à l'évidence impossible de contrôler chacun des récipients, il convient d'appliquer un plan d'échantillonnage approprié. Dans le cas de la production dans des conditions aseptiques, il est recommandé d'examiner des échantillons répartis en récipients en début et en fin de lot et après toute intervention significative.

OBSERVATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les techniques microbiologiques/biochimiques conventionnelles sont généralement satisfaisantes pour l'identification des microorganismes isolés lors de l'essai de stérilité. Néanmoins, si un fabricant souhaite utiliser la condition (d) comme critère unique d'invalidation d'un essai de stérilité, il peut être nécessaire de recourir à des techniques de typage sensibles pour démontrer qu'un microorganisme isolé à partir du produit examiné est identique à un microorganisme isolé à partir du matériel et/ou de l'environnement d'essai. En effet, si les techniques microbiologiques/biochimiques d'identification de routine permettent d'établir la non-identité de 2 isolats, elles ne sont pas toujours suffisamment sensibles ou fiables pour apporter la preuve absolue que 2 isolats proviennent de la même source. Il peut être nécessaire de recourir à des méthodes plus sensibles, par exemple un typage moléculaire basé sur le pourcentage d'homologie ARN/ADN, pour établir la parenté clonale et l'origine commune des microorganismes.

La présence d'endotoxines dans une substance ou un produit peut être masquée par l'existence de facteurs interférant dans la réaction entre les endotoxines, les réactifs et le lysat d'amœbocytes. De même, la capacité de détection des endotoxines peut être affectée par les conditions ou la durée de conservation. En conséquence, l'analyste qui souhaite introduire un essai des endotoxines bactériennes, ou remplacer l'essai des pyrogènes par un essai des endotoxines bactériennes, doit démontrer que l'essai peut être réalisé de façon satisfaisante sur la substance ou le produit considéré. Ceci peut nécessiter l'élimination d'éventuelles interférences par une procédure appropriée.

Comme indiqué dans le chapitre général 2.6.14. *Essai des endotoxines bactériennes*, il faut disposer d'informations sur les 2 aspects suivants pour que l'essai réalisé sur un échantillon puisse être considéré comme valide.

- L'aptitude à l'emploi du matériel utilisé pour l'essai doit être établie. Il faut s'assurer de l'absence d'endotoxines dans l'eau EEB (eau pour essai des endotoxines bactériennes) et dans les autres réactifs et consommables utilisés, et vérifier la sensibilité du lysat d'amœbocytes afin de confirmer la valeur déclarée par le fabricant.
- En raison du risque d'interférence de la substance ou du produit à examiner dans le résultat de l'essai, il faut déterminer la sensibilité du lysat d'amœbocytes en présence et en l'absence de la substance ou du produit à examiner. Il ne doit pas exister de différence entre les 2 valeurs obtenues pour la sensibilité.

Le chapitre général 2.6.14. *Essai des endotoxines bactériennes* indique des procédés permettant d'éliminer les facteurs d'interférence. Si une interférence est détectée, le contrôle doit être répété après mise en œuvre de ces procédés pour s'assurer que les facteurs d'interférence ont effectivement été neutralisés ou éliminés.

Le présent chapitre général expose les fondements des exigences spécifiées dans l'essai des endotoxines bactériennes, puis traite de la lecture et de l'interprétation des résultats.

Lorsque l'essai des pyrogènes sur lapin est prescrit dans une monographie de la Pharmacopée, son remplacement par un essai sur lysat d'amœbocytes ou par d'autres méthodes comme l'essai d'activation des monocytes ou un essai utilisant le réactif facteur C recombinant à la place du lysat d'amœbocytes constitue un cas de recours à une méthode alternative qui, comme indiqué dans les Prescriptions générales, nécessite d'apporter la démonstration que la méthode est appropriée pour la substance ou le produit considéré, et qu'elle donne un résultat cohérent avec celui obtenu par la méthode prescrite (voir également section 13).

Lorsque la monographie d'une substance ou d'un produit prescrit un essai des endotoxines bactériennes, elle peut prescrire la méthode à employer. L'utilisation d'une méthode autre que celle prescrite dans la monographie est considérée comme un cas de recours à une méthode alternative. Lorsqu'aucune méthode n'est prescrite, toutes les méthodes (A à F) décrites dans le chapitre général 2.6.14. *Essai des endotoxines bactériennes* peuvent être utilisées.

2. MÉTHODE ET CRITÈRES D'ACCEPTATION

2-1. MÉTHODES ET PRÉCAUTIONS À PRENDRE

L'addition d'endotoxines à un lysat d'amœbocytes peut provoquer une turbidité, une précipitation ou une gélification. Initialement, seule la méthode de gélification était utilisée comme critère d'évaluation dans l'essai des endotoxines bactériennes de la Pharmacopée. L'avantage de cette méthode est sa simplicité, puisque la décision de déclarer le résultat de l'essai positif ou négatif repose sur la présence ou l'absence de gélification, visible à l'œil nu. Les méthodes quantitatives C, D, E et F, développées ultérieurement, nécessitent davantage d'instrumentation, mais sont plus faciles à automatiser pour les contrôles de routine portant sur un grand nombre d'échantillons d'une même substance ou d'un même produit.



01/2021:50110

5.1.10. RECOMMANDATIONS POUR LA RÉALISATION DE L'ESSAI DES ENDOTOXINES BACTÉRIENNES

1. INTRODUCTION

Les endotoxines issues de bactéries gram-négatives sont la cause la plus fréquente des réactions toxiques attribuées à la contamination de produits pharmaceutiques par des pyrogènes. Ces endotoxines, qui sont des lipopolysaccharides, ont pour caractéristique commune de posséder une activité pyrogène beaucoup plus élevée que celle des autres pyrogènes connus. Il existe en effet un petit nombre d'autres substances, de structure différente, ayant un effet pyrogène. Il est cependant souvent justifié d'interpréter l'absence d'endotoxines bactériennes dans une substance ou un produit comme équivalant à l'absence de pyrogènes, à condition que l'éventualité de la présence de pyrogènes non endotoxiniques puisse être exclue. L'essai d'activation des monocytes (2.6.30) constitue une méthode appropriée pour exclure la présence de pyrogènes non endotoxiniques dans des substances ou produits.

Les endotoxines peuvent être adsorbées sur la surface des tubes ou pipettes constitués de certains types de plastique ou de verre. Il peut alors y avoir interférence avec des substances relarguées par les plastiques. Le matériel utilisé doit donc être vérifié.

2-2. CONCENTRATION LIMITE EN ENDOTOXINES

La décision d'utiliser l'essai des endotoxines bactériennes sous forme d'essai limite implique premièrement qu'il faut définir une concentration limite en endotoxines pour la substance ou le produit à examiner, et deuxièmement que l'objectif de l'essai est de déterminer si la teneur en endotoxines de l'échantillon examiné est inférieure ou supérieure à la limite définie. Les méthodes quantitatives C, D, E et F permettent de déterminer la teneur en endotoxines de l'échantillon examiné mais, pour la conformité à la Pharmacopée et les contrôles de routine, la question finale est de savoir si cette teneur dépasse ou non une valeur limite.

La posologie de la substance ou du produit à examiner doit être prise en compte pour fixer la concentration limite en endotoxines. L'objectif est en effet d'avoir l'assurance que, tant que la teneur en endotoxines de la substance ou du produit reste inférieure à la limite définie, même la dose horaire maximale, administrée par la voie spécifiée, ne contiendra pas une quantité d'endotoxines suffisante pour entraîner un effet toxique.

Lorsque la teneur en endotoxines de la substance ou du produit est exactement égale à la concentration limite, il y a gélification ; il en va de même si la teneur en endotoxines est sensiblement plus élevée. Le résultat de l'essai est, dans les deux cas, considéré comme positif car il s'agit d'un essai tout ou rien et il est donc impossible de différencier une concentration exactement égale à la limite d'une concentration supérieure. Ce n'est qu'en l'absence de gélification qu'il est possible de conclure que la teneur en endotoxines est inférieure à la limite définie.

Pour les substances ou produits à l'état solide, la concentration limite en endotoxines par unité de masse ou par Unité Internationale (UI) de substance ou de produit doit être convertie en concentration par millilitre de solution à examiner, puisque l'essai ne peut être effectué que sur une solution. Le cas des substances ou produits existant déjà à l'état liquide (par exemple les préparations liquides pour perfusion) est envisagé plus loin.

2-3. CALCUL DE LA LIMITE EN ENDOTOXINES

La limite en endotoxines d'une substance active 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 est fonction du produit et de sa voie d'administration. Elle peut être spécifiée dans la monographie. Des valeurs de K sont proposées dans le tableau 5.1.10.-1.

Pour les autres voies d'administration, le critère d'acceptation est généralement établi à partir des résultats obtenus durant le développement de la préparation.

Tableau 5.1.10.-1

Voie d'administration	K
Intraveineuse	5,0 UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle
Intraveineuse pour produits radiopharmaceutiques	2,5 UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle
Intrathécale	0,2 UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle
Formulations parentérales par mètre carré de surface corporelle	100 UI d'endotoxines/m ²

2-4. ÉLÉMENTS À PRENDRE EN COMPTE POUR L'ÉTABLISSEMENT DE LA LIMITE EN ENDOTOXINES D'UNE SUBSTANCE OU D'UN PRODUIT SPÉCIFIQUE

La limite en endotoxines d'une substance ou d'un produit spécifique est établie sur la base des éléments suivants.

Valeur calculée de la limite en endotoxines. La limite en endotoxines est calculée comme décrit dans la section 2-3. Cette valeur représente une limite de sécurité à ne pas dépasser si le produit doit être administré à l'homme.

Limite prescrite dans une monographie spécifique. La limite spécifiée dans la monographie d'une substance reflète souvent le niveau que permet d'atteindre un environnement de production contrôlé. Elle peut donc être inférieure à la limite en endotoxines déterminée par le calcul. Un fabricant peut toutefois spécifier une limite plus stricte que celle indiquée dans la monographie.

Capacité du procédé. La capacité du procédé de production à réduire ou éliminer les endotoxines bactériennes peut conduire à un abaissement de la limite en endotoxines associée à ce procédé spécifique.

Précautions complémentaires. Des précautions sont prises en fonction de la population de patients considérée (usage pédiatrique, patients malnutris ou cachectiques, etc.), des exigences locales spécifiques (souhait de certains pays d'opérer avec une masse corporelle moyenne de 60 kg au lieu des 70 kg généralement utilisés en Europe) ou d'éventuelles marges de sécurité additionnelles exigées par l'Autorité compétente.

Formulation du produit. La limite fixée doit prendre en compte la charge théorique en endotoxines bactériennes apportée par les composants éventuellement utilisés pour la reconstitution et/ou dilution du produit (eau pour préparations injectables par exemple) ou par les matières premières utilisées.

2-5. DILUTION MAXIMALE SIGNIFICATIVE

Quelle dilution de la substance ou du produit utiliser dans l'essai pour pouvoir établir, avec un niveau d'assurance maximal, qu'un résultat négatif signifie que la teneur en endotoxines de la substance ou du produit est inférieure à la limite en endotoxines, et qu'un résultat positif signifie que le lysat a réagi à une concentration d'endotoxines au moins égale à la limite en endotoxines ? Cette dilution dépend à la fois de la limite en endotoxines et de la sensibilité du lysat : elle est appelée « dilution maximale significative (DMS) » et peut être calculée d'après l'expression suivante :

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

Concentration de la solution à examiner :

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

λ = 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.

Lorsque la DMS ne correspond pas à un nombre entier, il est admis, pour des raisons pratiques, d'utiliser en routine un nombre entier inférieur à la DMS (autrement dit, de préparer une solution de la substance ou du produit moins diluée que ne l'indique la DMS). Dans ce cas, un résultat d'essai négatif indique que la teneur en endotoxines de la substance ou du produit est inférieure à la limite spécifiée. En revanche, le résultat de l'essai peut être positif si la teneur en endotoxines de la substance ou du produit, bien qu'inférieure à la limite, est suffisamment élevée pour que la réaction avec le lysat entraîne la gélification. Il convient donc, lorsqu'un essai ainsi conduit avec un facteur de dilution « pratique » a donné un résultat positif, de diluer la substance ou le produit à la DMS et de répéter l'essai. En cas de doute ou de litige, il faut également utiliser la DMS.

Ceci souligne l'importance de la confirmation de la sensibilité du lysat.

Exemple

Soit un essai portant sur une solution de phénytoïne sodique à 50 mg/mL, à injecter par voie intraveineuse. Il s'agit de déterminer la DMS, étant donné la valeur prise par les variables suivantes :

M = dose humaine maximale = 15 mg par kilogramme de masse corporelle,

c = 50 mg/mL,

K = 5 UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle,

λ = 0,4 UI d'endotoxines par millilitre.

$$DMS = \frac{5 \times 50}{15} \times \frac{1}{0,4} = 41,67$$

Pour les analyses de routine de ce produit, il peut être plus pratique de prélever 1 mL de solution à examiner et de compléter à 20 mL (DMS/2 arrondi au nombre entier immédiatement inférieur). Toutefois, si l'essai donne un résultat positif, il faudra compléter 1 mL de solution à 41,67 mL et répéter l'essai. Il faudra également préparer une dilution au 1/41,67 si l'essai est effectué pour régler un litige.

3. ÉVALUATION DU RISQUE

Comme indiqué dans la section 1 de ce chapitre général, il est souvent justifié d'interpréter l'absence d'endotoxines bactériennes dans une substance ou un produit comme équivalant à l'absence de pyrogènes, à condition que l'éventualité de la présence de pyrogènes non endotoxiques puisse être exclue. Pour exclure cette éventualité, il est recommandé de recourir à l'essai d'activation des monocytes (2.6.30), soit à la libération soit lors du développement du procédé de production. Toute modification du procédé susceptible d'influer sur la qualité du produit, en termes de pyrogénicité, doit donner lieu à une répétition de l'essai d'activation des monocytes. De telles modifications peuvent concerner, par exemple, les matières premières, le site de production ou les paramètres de production utilisés.

La décision d'utiliser l'essai des endotoxines bactériennes comme seul essai de pyrogénicité doit être prise après une évaluation soignée du risque de présence de pyrogènes non endotoxiques dans la substance ou le produit. Cette évaluation du risque doit prendre en compte tout facteur susceptible d'entraîner la présence de pyrogènes non détectés par l'essai des endotoxines bactériennes. Les aspects ci-après font partie des facteurs à prendre en considération, sans en constituer une liste exhaustive.

Procédé de production (synthèse chimique, fermentation, méthode biotechnologique). Dans le cas des produits de fermentation, il convient de prendre en considération la

nature du système d'expression (procaryote ou eucaryote) et, s'il s'agit d'un système procaryote, le type de bactéries utilisées (gram-positives ou gram-négatives). De même, pour les milieux de culture, l'origine (synthétique, animale ou végétale) des composants est un facteur à prendre en considération.

Biocharge. Il convient de prendre en considération la contamination des substances actives, excipients ou matières premières utilisés pour la production de médicaments par des bactéries gram-positives et des champignons, ainsi que l'origine (synthétique, animale ou végétale) des matières premières utilisées. La qualité de l'eau joue également un rôle important dans l'évaluation globale.

Capabilité du procédé. Il est nécessaire de vérifier si le processus comporte en aval des étapes d'élimination des endotoxines.

Sécurité. L'évaluation du risque doit prendre en compte la population cible et la voie d'administration (intraveineuse ou intrathécale, par exemple).

Stabilité des endotoxines détectables. La capacité de détection des endotoxines peut être affectée par leur interaction avec certains composants, les conditions ou la durée de conservation, la température et la manipulation des échantillons à examiner. Ce facteur est à prendre en compte, et il convient d'établir, pour la conservation, la manipulation et le mélange des échantillons, des procédures assurant la stabilité de la teneur en endotoxines détectables.

4. PRÉPARATION DE RÉFÉRENCE

L'étalon d'endotoxine PBR a été établi comme préparation de référence. Il a été titré par rapport à l'étalon international d'endotoxine de l'OMS, et son activité est exprimée en Unités Internationales d'endotoxine par flacon. L'Unité Internationale d'endotoxine est définie comme l'activité spécifique d'une masse donnée de l'étalon international.

Pour les essais de routine, il est admis d'utiliser une autre préparation d'endotoxines, à condition qu'elle ait été étalonnée par rapport à l'étalon international d'endotoxine ou à la PBR, et que son activité soit exprimée en Unités Internationales d'endotoxine.

NOTE : 1 Unité Internationale (UI) d'endotoxine équivaut à 1 Unité d'Endotoxine (UE).

5. EAU EEB

L'eau EEB est de l'eau stérile exempte d'endotoxines bactériennes en quantité détectable. Elle est normalement disponible dans le commerce et certifiée.

Il est indiqué dans le chapitre général 2.6.14. *Essai des endotoxines bactériennes* que des méthodes autres que la triple distillation peuvent être utilisées pour préparer l'eau EEB. L'osmose inverse a été employée avec de bons résultats. Certains analystes peuvent préférer procéder à plus de 3 distillations. Toutefois, quelle que soit la méthode utilisée, le produit résultant doit être exempt d'endotoxines bactériennes détectables.

6. pH DU MÉLANGE

Dans l'essai des endotoxines bactériennes, la gélification est optimale lorsque le pH du mélange est de 6,0-8,0. Cependant, l'addition du lysat à l'échantillon peut conduire à une baisse du pH.

7. VALIDATION DU LYSAT

Il est important de préparer les solutions du lysat suivant les instructions du fabricant.

Pour les méthodes de gélification A et B, les facteurs de dilution extrêmes donnant un résultat positif sont convertis en logarithmes. En effet, si l'on trace la courbe de distribution de fréquence des valeurs logarithmiques, elle est beaucoup plus proche d'une courbe normale que la distribution de fréquence des facteurs de dilution eux-mêmes, et même si

proche qu'il est acceptable d'utiliser une loi normale comme modèle mathématique et de calculer les limites de confiance à l'aide du test *t* de Student.

8. RECHERCHE PRÉLIMINAIRE DES FACTEURS D'INTERFÉRENCE

Il existe des substances ou produits qui ne peuvent pas être directement soumis à l'essai des endotoxines bactériennes parce qu'ils ne sont pas miscibles aux réactifs, que leur pH ne peut pas être ajusté à 6,0-8,0, ou qu'ils inhibent ou activent la réaction enzymatique (par exemple : les β -D-glucanes).

Il est donc nécessaire d'effectuer une recherche préliminaire des facteurs d'interférence. Si l'existence de tels facteurs est mise en évidence, il faut démontrer que la méthode employée pour les éliminer est efficace, et qu'elle n'affecte pas les endotoxines bactériennes éventuellement présentes.

L'objectif de cette recherche préliminaire est de tester l'hypothèse nulle suivante : la sensibilité du lysat en présence de la substance ou du produit à examiner ne diffère pas significativement de la sensibilité du lysat en leur absence. Les méthodes A et B utilisent à cet effet un critère simple : l'hypothèse nulle est acceptée lorsque la sensibilité du lysat en présence du produit n'est pas inférieure à 0,5 fois ni supérieure à 2 fois la sensibilité du lysat seul.

La recherche des facteurs d'interférence, dans les essais de gélication A et B, exige l'emploi d'un échantillon ne contenant pas d'endotoxines détectables. Ceci pose un problème théorique lorsqu'il s'agit de contrôler un produit entièrement nouveau. Une approche différente a donc été adoptée pour les méthodes quantitatives C, D, E et F.

Il est à noter que les méthodes D et E, qui utilisent un peptide chromogène, nécessitent l'emploi de réactifs absents des méthodes A, B, C et F ; l'extrapolation à la méthode D ou E des résultats obtenus pour les méthodes A, B, C ou F quant à l'absence de facteurs d'interférence n'est donc pas admissible sans la réalisation d'essais supplémentaires.

9. ÉLIMINATION DES FACTEURS D'INTERFÉRENCE

Les procédés employés pour éliminer les facteurs d'interférence ne doivent entraîner ni augmentation ni diminution (par exemple par adsorption) de la teneur en endotoxines de la substance ou du produit à examiner. Le meilleur moyen de vérifier que cette condition est satisfaite est d'appliquer ces procédés à un échantillon « dopé » de la substance ou du produit à examiner, c'est-à-dire auquel a été ajoutée une quantité connue d'endotoxines, puis de mesurer le recouvrement des endotoxines après application de la procédure d'élimination des facteurs d'interférence.

Méthodes C et D. Si la nature du produit à examiner entraîne une interférence ne pouvant être éliminée par les moyens classiques (par exemple dilution ou centrifugation), il est possible d'établir la courbe d'étalonnage avec le même type de substance ou produit rendu exempt d'endotoxines par un traitement approprié ou par dilution. L'essai des endotoxines bactériennes est alors réalisé par rapport à cette courbe d'étalonnage.

L'ultrafiltration sur membrane filtrante asymétrique en triacétate de cellulose s'est avérée appropriée dans la plupart des cas. Elle nécessite une validation convenable des filtres, car la présence de dérivés de la cellulose (β -D-glucanes) peut, dans certaines circonstances, conduire à l'obtention de résultats faussement positifs.

Une autre option possible pour éliminer les facteurs d'interférence consiste à procéder en 2 étapes : 1) les endotoxines contenues dans l'échantillon produisant une interférence sont fixées sur une phase solide ; 2) après élimination de la substance responsable de l'interférence (par exemple par lavage), la détection des endotoxines peut se poursuivre normalement dans les conditions d'essai appropriées.

10. RÔLE DES TÉMOINS

Le rôle du témoin composé d'eau EEB et de la préparation de référence d'endotoxine à concentration double de la sensibilité déclarée du lysat, est de permettre de vérifier l'activité du lysat au moment et dans les conditions de l'essai (méthodes A et B). Le rôle du témoin négatif est de permettre de vérifier l'absence d'endotoxines à concentration détectable dans l'eau EEB.

Le témoin positif, qui contient le produit à examiner à la concentration utilisée dans l'essai, sert à démontrer l'absence de facteurs d'inhibition au moment et dans les conditions de l'essai.

11. LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il peut arriver que de très faibles quantités d'endotoxines bactériennes, présentes dans l'eau EEB ou dans tout autre réactif ou matériel auquel le lysat est exposé au cours de l'essai, ne soient pas détectées si elles sont inférieures à la limite de sensibilité du lysat. Elles peuvent cependant s'ajouter aux endotoxines présentes dans la solution de la substance ou du produit à examiner de sorte que la quantité totale d'endotoxines présentes devient juste supérieure à la limite de sensibilité et que l'essai donne un résultat positif.

Il est possible de réduire ce risque en contrôlant l'eau EEB et les autres réactifs et matériels utilisés avec le lysat le plus sensible dont on dispose, ou tout au moins avec un lysat plus sensible que celui utilisé pour l'essai du produit. Même ainsi, toutefois, le risque d'obtenir un résultat « faussement positif » n'est pas totalement éliminé.

12. MISE EN OEUVRE DES MÉTHODES DÉCRITES DANS LA PH. EUR.

Comme indiqué dans les Prescriptions générales, les méthodes d'essai figurant dans les monographies et les chapitres généraux ont été validées selon la pratique scientifique d'usage et les recommandations usuelles sur la validation analytique. Les méthodes décrites dans les chapitres généraux 2.6.14. *Essai des endotoxines bactériennes*, 2.6.30. *Essai d'activation des monocytes* et 2.6.32. *Essai des endotoxines bactériennes par la méthode du facteur C recombinant* ne nécessitent donc pas une revalidation portant sur la méthode en soi, mais sont à valider au regard de leur utilisation pour une substance ou un produit spécifique, dans un environnement analytique spécifique.

La méthode d'essai et les matériels et réactifs utilisés doivent être validés comme décrit pour l'essai concerné.

Il convient de vérifier l'absence de facteurs d'interférence (et, si nécessaire, le procédé d'élimination employé) sur des échantillons provenant d'au moins 3 lots de fabrication.

Comme indiqué dans le chapitre général 2.6.30. *Essai d'activation des monocytes*, l'essai d'activation des monocytes est, en premier lieu, destiné à remplacer l'essai des pyrogènes sur le lapin. Des lignes directrices sont données dans le chapitre général 2.6.30. *Essai d'activation des monocytes* sur le choix de la méthode (A, B ou C) à utiliser et sur les modalités de validation de l'essai d'activation des monocytes.

13. REMPLACEMENT D'UNE MÉTHODE PRESCRITE DANS UNE MONOGRAPHIE

13-1. REMPLACEMENT PAR UNE AUTRE MÉTHODE DÉCRITE DANS LA PH. EUR.

Le remplacement d'une méthode prescrite dans une monographie par une autre méthode décrite dans la Ph. Eur. est à considérer comme un cas de recours à une méthode alternative pouvant se substituer à un essai de pharmacopée sous les conditions décrites dans les Prescriptions générales. L'analyste doit démontrer que l'essai peut être réalisé de façon satisfaisante sur la substance ou le produit considérés.

La méthode alternative ne nécessite donc pas une revalidation portant sur la méthode en soi, mais est à valider au regard de son utilisation pour une substance ou un produit spécifique, dans un environnement analytique spécifique, et de son équivalence à la méthode prescrite.

13-2. REMPLACEMENT PAR UNE MÉTHODE NON DÉCRITE DANS LA PH. EUR.

Le remplacement d'une méthode prescrite dans une monographie par une méthode non décrite dans la Ph. Eur. est à considérer comme un cas de recours à une méthode alternative pouvant se substituer à un essai de pharmacopée sous les conditions décrites dans les Prescriptions générales.



07/2017:50111

5.1.11. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ BACTÉRICIDE, FONGICIDE OU LEVURICIDE DES MÉDICAMENTS À VISÉE ANTISEPTIQUE

Ce chapitre général décrit un essai pouvant être utilisé pour la détermination de l'activité antimicrobienne des médicaments à visée antiseptique miscibles à l'eau et destinés à être administrés par contact direct avec la peau ou les muqueuses. L'étendue de l'essai est fonction de l'activité antimicrobienne déclarée du produit.

L'essai permet de déterminer si un produit présente une activité bactéricide, fongicide ou levuricide et s'il satisfait à une spécification correspondante préétablie.

L'essai ne peut ni remplacer ni confirmer l'évaluation de l'efficacité clinique du produit.

1. PRINCIPE

L'activité antimicrobienne est déterminée par mise en contact du produit antiseptique à examiner avec des suspensions de microorganismes de référence (bactéries, germes fongiques ou levures, séparément), pendant un temps défini égal à 5 min pour l'activité bactéricide et 15 min pour l'activité fongicide ou levuricide, en maintenant le mélange à 33 ± 1 °C. Des temps de contact additionnels peuvent être testés selon l'usage déclaré du médicament à visée antiseptique. A la fin du temps de contact, un échantillon du mélange est prélevé et son activité antimicrobienne est immédiatement stoppée par une méthode validée. 2 méthodes sont disponibles à cet effet : dilution-neutralisation ou filtration sur membrane.

La procédure fait l'objet d'une validation visant à vérifier sa capacité à mettre en évidence la réduction requise du nombre de microorganismes viables, au moyen de contrôles appropriés.

2. MICROORGANISMES DE RÉFÉRENCE ET CONDITIONS DE CULTURE

Préparez des suspensions standardisées stables des souches de référence comme indiqué dans la section 2-1. Les cultures sont effectuées selon un système de lot de semence tel que les microorganismes viables utilisés pour l'inoculation n'aient pas subi plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire d'origine. Cultivez séparément chacune des souches de référence comme indiqué dans le tableau 5.1.11.-1.

Les solutions et milieux recommandés sont décrits dans le chapitre général 2.6.13. De l'eau purifiée est utilisée. Tous les réactifs sont stériles préalablement à leur emploi.

La détermination de l'activité bactéricide, fongicide ou levuricide est effectuée avec les souches prescrites dans le tableau 5.1.11.-1. En plus de ces microorganismes, il peut être nécessaire d'utiliser d'autres souches bactériennes ou fongiques représentatives de l'indication du médicament à visée antiseptique considéré.

L'essai est effectué séparément pour chaque souche. Les dénombrements sont effectués en double et la moyenne arithmétique des résultats est calculée et exprimée en UFC/mL.

Tableau 5.1.11.-1. – *Microorganismes de référence et conditions de culture*

Souches pour la détermination de l'activité bactéricide	
<i>Staphylococcus aureus</i>	par exemple ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC 13276
<i>Enterococcus hirae</i>	par exemple ATCC 10541, NCIMB 8192, CIP 58.55, DSM 3320
<i>Escherichia coli</i>	par exemple NCIMB 10083, CIP 54.117, NCTC 10538, DSM 11250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	par exemple ATCC 15442, NCIMB 8626, CIP 103467, NBRC 13275
Conditions de culture	
Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja ou milieu liquide aux peptones de caséine et de soja – pour la préparation des souches de référence : 30-35 °C, 18-24 h, au moins 2 repiquages – pour l'essai du produit et la validation de l'essai : 30-35 °C, ≤ 3 jours	nombre d'UFC dans la suspension d'essai : 1-5 × 10 ⁸ UFC/mL
Souche pour la détermination de l'activité levuricide	
<i>Candida albicans</i>	par exemple ATCC 10231, NCPF 3179, CIP 48.72, NBRC 1594
Conditions de culture	
Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou milieu liquide Sabouraud dextrosé – pour la préparation des souches de référence : 20-25 °C, 2-3 jours, au moins 2 repiquages – pour l'essai du produit et la validation de l'essai : 20-25 °C, ≤ 5 jours	nombre d'UFC dans la suspension d'essai : 1-5 × 10 ⁷ UFC/mL
Souches pour la détermination de l'activité fongicide	
<i>Candida albicans</i>	par exemple ATCC 10231, NCPF 3179, CIP 48.72, NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	par exemple ATCC 16404, IMI 149007, CIP 1431.83, NBRC 9455
Conditions de culture	
Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé ou milieu liquide Sabouraud dextrosé - pour la préparation des suspensions d'essai de <i>C. albicans</i> : 20-25 °C, 2-3 jours - pour la préparation de la suspension d'essai de spores d' <i>A. brasiliensis</i> : 20-25 °C, au moins 5 jours (jusqu'à sporulation satisfaisante) - pour l'essai du produit et la validation de l'essai : 20-25 °C, ≤ 5 jours pour <i>C. albicans</i> et <i>A. brasiliensis</i>	nombre d'UFC dans la suspension d'essai : 1-5 × 10 ⁷ UFC/mL

2-1. PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'ESSAI

Pour récolter les microorganismes, utilisez un volume suffisant d'une solution contenant 9 g/L de chlorure de sodium R (pour les bactéries et pour *C. albicans*) ou 9 g/L de chlorure de