

EVALUATION D'UN ECHANTILLON DE VACCIN (INFANRIX) VIA UN MICROSCOPE A BALAYAGE ELECTRONIQUE ET MICRO ANALYSE À RAYON X

A. INTRODUCTION

NANODIAGNOSTICS SRL est une société de conseil dans le domaine de la médecine, de la biologie, de l'industrie, de l'environnement et de l'écologie. Son activité principale est de détecter des micro et nano particules inorganiques dans n'importe quel milieu (tissus biologiques, nourritures, drogues, cosmétiques, échantillons environnementales, vêtements etc) via un système innovant de microscope à balayage électronique environnementale. L'enquête a été effectuée principalement par le moyen de l'ESEM (FEG: pistolet à émission de champ) ou du FEG avec des protocoles appropriés conformément au type de substrat.

Cette analyse offre la possibilité d'observer des échantillons biologiques dans le mode wet, dans des conditions normales d'hydratation, dans un environnement pressurisé sans avoir besoin de les déshydrater ou de leur faire subir un électro-conductif à travers un revêtement de carbone, ou de métaux comme l'or ou le palladium, une procédure qui est normalement nécessaire avec les balayage des microscopes électronique.

En appliquant des protocoles appropriés pour être adaptés à chaque type d'observation, cette fonction permet de vérifier les échantillons biologiques, y compris les cellules vivantes, sans porter atteinte à leur intégrité, et de répéter le test à chaque fois que l'on souhaite.

L'objectif principal de l'étude est la détection de micro inorganique et de la matière de nano-particules, dans le cas où il devrait y avoir une quelconque dans l'échantillon, et ceci est réalisé sans la nécessité d'un processus de l'échantillon.

Une microsonde à rayons X d'un (système de dispersion d'énergie, EDAX, USA) EDS complète l'enquête, que le spectre ainsi obtenu montre la composition élémentaire chimique de la matière particulaire. En fait, il mesure la caractéristique de l'énergie de chaque élément constituant les particules dans l'échantillon, et est retourné sous forme de rayons X après que l'échantillon a été frappé par le faisceau d'électrons émis par la FEG-ESEM.

Ainsi, grâce à une telle analyse intégrée, les micro et nano-particules inorganiques sont photographiés, mesurés et chimiquement caractérisés, de manière non destructrice, non invasive, de manière reproductible, la seule exception étant les fluides, qui sont souvent difficiles à récupérer dans leur forme liquide après un certain temps.

L'enquête peut être effectuée sur des échantillons d'origine biologique comme les biopsies, les autopsies et les fluides organiques, mais il est tout aussi possible sur de nombreux autres types de matériaux tels que, par exemple, des échantillons de l'environnement, de la nourriture, les médicaments ou les cosmétiques. Comme l'objet principal de l'enquête est inorganique et non biodégradable, il n'y a pas de difficulté particulière dans la détection de telles matières particulières soit en eau douce ou dans les échantillons archivés.

2. MATERIELS

Un paquet entier de vaccin INFANRIX par GlaxoSmithKline Biologicals S.A., distribué en France, a été envoyé au laboratoire (lot A21CC421A - date d'expiration 04/2017) pour les analyses ultrastructural. Le paquet contenait une seringue pré-déposé avec de l'eau injectable, un flacon contenant le vaccin sous forme de poudre et deux aiguilles stériles. La poudre de vaccin se

compose de 10 microg "Neisseria meningitidis" oligosaccharides. Qui a été conjugué avec 15 microgrammes de protéine CRM197 adsorbé sur phosphate d'aluminium (Al₃ + 0125 mg) en présence de sérum physiologique.

L'échantillon a été envoyé par l'UNACS et était encodé au laboratoire comme STD 1225.

3. CONDITIONS D'ESSAIS

L'échantillon scellé a été conservé dans un réfrigérateur à 4°C au laboratoire jusqu'à la préparation. Après vérification de l'intégrité de l'emballage, le paquet a été ouvert dans une hotte à flux laminaire. L'aiguille a été relié à la seringue avec des gants sans talc et la seringue a été horizontalement secoué par les instructions pour l'utilisation avant l'administration.

Ensuite, une goutte d'environ 20 microlitres de liquide a été déposé sur un filtre de nitrocellulose (Millipore, le type HAWG, 0,45 micron) monté sur un disque de carbone, adhérente à la fusée d'aluminium pour l'observation au microscope électronique. Ainsi préparé, l'échantillon a été inséré dans un récipient propre et spécifique, étanche et laissé sécher à la température ambiante à l'intérieur de la hotte à flux laminaire, où l'ensemble des opérations avaient été effectuées.

Après environ 24 heures, l'échantillon a été introduit dans la chambre au microscope électronique pour l'analyse. Toutes les procédures ont été réalisées dans un environnement protégé contre la pollution de l'environnement et avec des instruments propres.

4. TYPE D'ANALYSE EFFECTUEE

L'étude au microscope électronique a été conçu pour déterminer la présence des composants inorganiques déclarés dans la solution de vaccin et d'étudier la présence de corps étrangers possibles. L'utilisation de la technique a été développée au sein du projet européen appelé Nanopathology (QLRT-2002-05-147) utilisant un microscope électronique à balayage environnemental FEG-ESEM Quanta 200, par la FEI (Pays-Bas), qui permet d'observer des micro solides et des nanoparticules dans l'échantillon enquête. La spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie réalisée grâce à une analyse EDAX (Etats-Unis), l'instrument permet d'évaluer la composition élémentaire des particules détectées (1,2).

5. RESULTATS

Les analyses en microscopie électronique de l'échantillon a montré la présence de particules avec des compositions chimiques différentes (voir tableau).

Les résultats chimiques et morphologiques sont présentés dans les tableaux qui suivent.

Les pics du spectre sans indication de l'élément chimique auquel elles se rapportent sont les pics secondaires d'un élément déjà rapporté à son sommet primaire.

Remarque: la liste des éléments indiqués dans le tableau se fait en fonction de leur degré de représentativité, à partir de la plus haute dans le spectre EDS.

Le tableau contient toutes les analyses les plus significatives réalisées sur l'échantillon. Le produit contient des sels d'aluminium qui créent des précipités. L'identification d'autres corps étrangers dans les précipités d'aluminium a été particulièrement difficile.

Image 1 Le faible grossissement (60x) montre l'image de la surface du filtre de nitrocellulose sur laquelle la goutte de vaccin a été déposé.

Image 2 Le milieu grossissement (400x) photo montre une section de l'échantillon où les cristaux et précipités sont visibles.

Image 3 Une partie de l'échantillon est affichée à fort grossissement (1486x). Un débris de 50 microns est visible. L'analyse EDS montre sa composition: Aluminium, oxygène, chlore, sodium, carbone, soufre. Le filtre est complètement recouverte par les sels d'aluminium-phosphate comprenant du chlorure de sodium.

Image 4 Une section à fort grossissement (19594x) de l'échantillon est représenté où les particules en cluster d'oxygène, de tungstène, aluminium, phosphore, sodium, chlore, calcium, carbone, soufre et de fer sont visibles. La taille du groupe est d'environ 3 microns. Ceci est un corps étranger composé de tungstène-calcium-fer ne faisant pas partie de la composition du vaccin, ou de la composition des médicaments.

Image 5 Les images montrent l'image précédente à plus fort grossissement (38236x) où 5 particules (0,3-1,5 microns) sont visibles. Les débris sont composés d'oxygène, de tungstène, aluminium, Phosphore, sodium, chlore, calcium, carbone, soufre, fer.

Image 6 L'image (6971x) montre un amas de particules 4-microns. La composition est de l'oxygène, d'aluminium, de tungstène, le Phosphore, le chlore, le sodium, le calcium, le soufre, le fer. Qualitativement identique à celle de l'analyse 5.

Image 7 Les images montrent une autre zone de la goutte de vaccin (10582x) dans laquelle un faisceau de particules de 4microns est visible. La composition qualitative est l'oxygène, l'aluminium, le tungstène, le phosphore, le chlore, le calcium, le sodium, le soufre, le fer est le même que ceux de l'analyse 5 et 6.

Image 8 L'image montre à fort grossissement (10103x) une partie de l'échantillon où un débris est visible. Les spectres EDS montre la composition chimique des débris (obtenu par soustraction du signal de substrat) et celle du substrat (008std). Les débris se composent de tungstène, de calcium, de fer, de calcium. Le substrat (gouttelette de vaccin) contient de l'oxygène-aluminium-chlore-Phosphore-Sodium-silicium et du soufre.

Image 9 Un fort grossissement (40000x) de l'image d'un débris de Tungsten. Un groupe de 0,3-1,8- micron de particules est visible dont la composition qualitative est la même que la première analyse, 5, 6 et 7. Les particules sont principalement composés de Tungsten.

Image 10 L'image montre en outre des débris métalliques principalement composé de tungstène (5287x). Une section de l'échantillon à fort grossissement (5287x), est montré où quelques particules peuvent être vus en groupe.

6 DISCUSSION ET CONCLUSION

L'échantillon de vaccin Infanrix contrôlé contient un nombre pertinent de particules solides inorganiques. Nous avons identifié 3 compositions différentes: acier inoxydable (fer-chrome-nickel-manganèse-silicone), le titane, et du tungstène le plus souvent. La composition est obtenu en soustrayant l'arrière-plan de l'aluminium-Phosphore-sodium-chlore et Tungsten-Calcium-Sulfur-Fer. Les particules détectées sont micron et submicronique et nanométrique, et certains ont une morphologie carrée. Ils pourraient être le résultat d'un processus technologique(ou nanotechnologique). Leur agrégation est typique des nanoparticules, un phénomène dû à leur haute énergie de surface. La présence de ces particules ne figure pas parmi les ingrédients indiqués dans la fiche de données et, en tout cas, on ne sait pas pourquoi ils sont là. A en juger par leur composition, ils ne sont pas solubles non plus dans l'eau et dans les graisses ne sont pas biodégradables et ne sont pas compatibles avec l'organisme humain.

En ce qui concerne la pathogénicité concerné, leur caractéristique la plus importante est leur petite taille, souvent inférieure à un micron. Il est un fait bien connu que, plus la particule est petite, plus elle est capable de pénétrer les tissus et même les noyaux des cellules où ils peuvent interférer avec l'ADN. En plus d'être des corps étrangers à l'histologie humaine et, de ce fait, les facteurs de réactions inflammatoires de déclenchement (réactions chroniques, étant elles non biodégradables), en raison de leur petite taille, le rapport entre la surface et le volume extérieur est très élevée et, en conséquence, leur réactivité est particulièrement élevée.

En dehors de quelques particules de composition différente (par exemple, une avec une présence très élevée de titane), la grande majorité d'entre eux est composé d'oxygène, de tungstène, d'aluminium, de calcium, de chlore, de sodium, le phosphore, le carbone et le fer.

Bien que la présence d'oxygène, d'aluminium, de calcium, chlore, sodium, phosphore et le carbone pourrait trouver une explication (certainement pas sous la forme de particule) en tant que composants légitimes du vaccin, la présence de titane, d'acier inoxydable et de tungstène est un casse-tête. Le Tungsten, en particulier, a été détecté avec une fréquence très élevée.

Il convient de souligner que la pathogénicité des micro, et, surtout, des nanoparticules est seulement partiellement dépendante de la dose et la composition. Les références montrent l'impact des nanoparticules sur le corps humain et les cellules (4-28). Entre autres facteurs, leur capacité d'induire une réaction indésirable à l'organisme est liée à leur taille, leur forme et le tissu ou l'organe auquel le flux sanguin les a porté, une variable effectivement impossible à prédire.

L'Organisation mondiale de la Santé définit la matière particulaire moyenne de 2,5 microns ou moins en tant que « classe 1 cancérigène », à savoir qu'ils peuvent induire le cancer (51).

En fait, il est impossible de prédire où le flux sanguin portera ces particules. Ainsi, leurs effets indésirables possibles dépendent de la cible qu'ils ont frappé et de la dilution à laquelle ils ont frappé. Lorsque la dilution est suffisamment élevé, les effets ne sont très souvent pas cliniquement visible.