

DELALOYE Valia<sup>1</sup>, PANNATIER André<sup>1</sup>, BLANC Dominique<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Service de Pharmacie, <sup>2</sup>Division autonome de médecine préventive hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne

## Introduction

La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) propose deux procédés pour l'essai de stérilité des pommades et des crèmes : la *filtration sur membrane* après dilution dans une solution de myristate d'isopropyle ou l'*ensemencement direct* du milieu nutritif après émulsion et dilution. Des essais préliminaires nous ont montré la difficulté d'émulsionner certains produits hydrophobes tels que la vaseline, même en les chauffant à 40°C ou en doublant la quantité de myristate. De ce fait, l'ensemencement direct dans les bouillons de culture reste l'une des seules alternatives pour l'essai de stérilité.

## Objectif

Valider l'essai de stérilité de produits hydrophobes par ensemencement direct, sans émulsion préalable.

## Méthode

Les 5 souches de micro-organismes utilisées dans ce travail sont celles décrites dans la Ph. Eur. (4<sup>ème</sup> édition, ch. 2.6.1, p.129-131) pour le test de validation (Tableau 1).

Deux grammes de vaseline stérile ont été inoculés avec 100 µl de suspension contenant 20-200 CFU (colony forming unit) d'une souche microbienne (Figure 1). L'incorporation a été faite par trituration à l'aide d'une spatule stérile, sous flux laminaire. La moitié de la vaseline a ensuite été introduite dans le milieu liquide THIO (anaérobie) et l'autre moitié dans le milieu liquide TSB (aérobie). Après incubation (Tableau 1), si une turbidité était visible, 10 µl de liquide étaient alors repiqués sur milieu gélosé pour identification. Les manipulations ont été effectuées en duplicat, pour déterminer la reproductibilité du test.

Tableau 1 : souches des divers micro-organismes testés

| souche ATCC | espèce                        | incubation  |         |
|-------------|-------------------------------|-------------|---------|
|             |                               | température | durée   |
| 6538        | <i>Staphylococcus aureus</i>  | 35 °C       | 3 jours |
| 6633        | <i>Bacillus subtilis</i>      |             | 3 jours |
| 9027        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |             | 3 jours |
| 19404       | <i>Clostridium sporogenes</i> |             | 3 jours |
| 10231       | <i>Candida albicans</i>       |             | 5 jours |

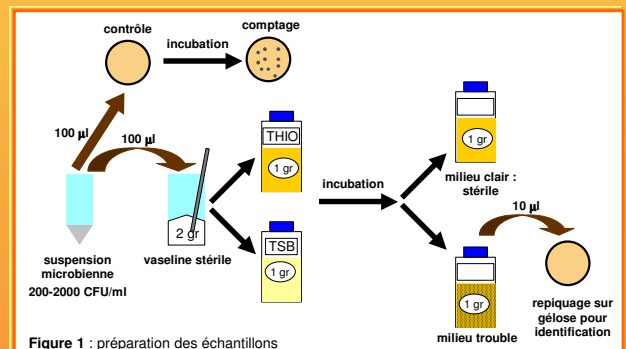


Figure 1 : préparation des échantillons

## Résultats

Les contrôles ont montré que les inocula utilisés avaient tous entre 20 et 200 CFU (correspondant à 10-100 CFU par gramme de vaseline), à l'exception du premier essai avec *B. subtilis*, qui ne contenait que 1 CFU. Les résultats obtenus avec cette suspension n'ont donc pas été utilisés.

Parmi les 18 flacons inoculés restants, seuls cinq ont révélé une croissance, 3 avec *P. aeruginosa* et 2 avec *C. albicans* (Tableau 2).

Tableau 2 : résultats de croissance des divers micro-organismes testés dans les milieux THIO et TSB, ainsi que les contrôles quantitatifs

| milieu de culture      |          | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. sporogenes</i> | <i>C. albicans</i> |
|------------------------|----------|------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> essai  | THIO     | —                | —                  | +                    | —                    | —                  |
|                        | TSB      | —                | —                  | +                    | —                    | +                  |
|                        | contrôle | 45 CFU           | 1 CFU              | 86 CFU               | 162 CFU              | 26 CFU             |
| 2 <sup>ème</sup> essai | THIO     | —                | —                  | +                    | —                    | +                  |
|                        | TSB      | —                | —                  | —                    | —                    | —                  |
|                        | contrôle | 41 CFU           | 26 CFU             | 96 CFU               | 110 CFU              | 80 CFU             |

— : pas de croissance

+

: croissance

■ : test non valide car inocula < 20 CFU

## Discussion et conclusions

Les résultats obtenus montrent que l'ensemencement direct de produits non filtrables dans des milieux de culture liquide, sans émulsion ni dilution, ne permet pas de détecter de façon reproductible une contamination microbienne. Cette méthode n'est donc pas adaptée pour l'essai de stérilité de produits hydrophobes.

Nos essais préliminaires ayant montré que l'émulsion d'un produit hydrophobe est quasiment impraticable, une alternative envisageable serait la libération paramétrique des lots après validation de la méthode de stérilisation. Cette approche nécessite des procédures spécifiques à chaque établissement, inscrites dans une démarche qualité.