



Évaluation d'une nouvelle méthode pour l'essai de stérilité des préparations pharmaceutiques



N. Widmer*, A. Pannatier*, D.S. Blanc**

*Service de Pharmacie, ** Division autonome de médecine préventive hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne

Introduction

Dans notre hôpital, les contrôles microbiologiques des préparations pharmaceutiques stériles produites par la pharmacie se basent sur l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne^[1]. Avant 2000, une méthode en circuit ouvert était utilisée, puis, dès l'année 2000, une méthode développée par H. Ing du service de pharmacie des Hôpitaux Universitaires de Genève a été adoptée (méthode « Ing »). Cette méthode permet d'opérer en circuit fermé, de filtrer le milieu de culture avant inoculation et d'utiliser du matériel bon marché (trousse de perfusion, filtres à usage unique).

Le présent travail avait pour but:

- l'évaluation préliminaire de cette méthode;
- l'évaluation de la performance en terme d'incidence de faux positifs sur les préparations stériles filtrables.

Matériel et méthodes

L'essai selon la méthode « Ing » s'effectue sous un flux laminaire horizontal avec du matériel stérile. À l'aide d'une trousse de perfusion et d'une pompe péristaltique, la moitié de la solution médicamenteuse est filtrée au travers d'un filtre Millipore Millipak-HA de 0.45 µm et l'autre moitié est filtrée sur un second filtre identique (figure 1).

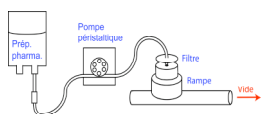


Figure 1 - Système de filtration

Ensuite, après avoir connecté une seringue stérile sur le filtre, ce dernier est rincé à l'aide de 2 fois 10 ml de NaCl 0.9% stérile. 20 ml de milieu de culture sont enfin aspirés dans la seringue au travers du filtre.

Au terme de l'essai, on dispose donc de deux seringues avec filtre, remplies chacune avec l'un des deux milieux suivants :

- Thioglycolate (THIO) : croissance anaérobie
 - Tryptic Soy Broth (TSB) : croissance aérobie
- Ces deux seringues sont ensuite incubées durant 14 jours à 35°C (figure 2).

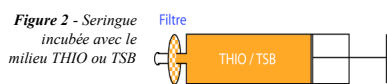


Figure 2 - Seringue incubée avec le milieu THIO ou TSB

Pour des volumes supérieurs à 40 ml, la Pharmacopée^[1] autorise de prélever dans une seringue un volume de 20 ml pour l'essai de stérilité. Cette opération se fait à la pharmacie sous flux laminaire. À cette seringue sera connecté directement le filtre. Cette procédure réduit le risque de contamination.

L'ancienne méthode consistait en la filtration de la préparation sous flux laminaire dans un système ouvert, suivie de la mise en culture des filtres sur des géloses nutritives, incubées durant 7 jours en atmosphères aérobie et anaérobie^[2].

1. Validation de la méthode

La validation a été effectuée en analysant des flexs de NaCl 0.9% préalablement inoculés avec 10-100 CFU de 6 souches microbiennes décrites dans la Pharmacopée^[1] pour le test de validation (Chap. 2.6.1). L'évaluation a également fait intervenir l'analyse d'un flex de NaCl 0.9% non inoculé (contrôle négatif).

2. Évaluation de la performance

Lorsqu'une croissance dans un essai de stérilité est observée (*positif*), une contamination en cours d'essai est postulée. Un deuxième essai de stérilité est effectué sur le même lot. Si ce second essai est stérile, le premier est considéré comme un *faux positif*. Des statistiques ont été établies à partir des résultats des essais de routine effectués au laboratoire sur des périodes d'environ 2 ans avec l'ancienne méthode et de 3 ans avec la méthode « Ing ». Il a ainsi été possible d'évaluer le taux de faux positifs imputable à chaque méthode et de comparer ces deux taux à l'aide du test statistique de Fisher.

Résultats et discussion

1. Validation de la méthode

Les résultats de la validation de la méthode « Ing » sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1 - Validation de la méthode « Ing »

Souche	Contrôle CFU	Jours d'incubation avant TSB positif	Jours d'incubation avant THIO positif	Contrôle de croissance
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	1	2	Sta. aur.
<i>Bacillus subtilis</i>	12	1	1	Bac. sub.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	2	2	Pse. aer.
<i>Clavibacterium sporogenes</i>	46	CS (2)	2	Clu. spo.
<i>Candida albicans</i>	4	2	2	Can. alb.
<i>Aspergillus niger</i>	33	2	2	Asp. nig.
Contrôle négatif	-	CS (7)	CS (7)	-

Légende : CS = culture stérile

Les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus selon la Pharmacopée. La méthode est donc validée et a été implantée dans le laboratoire pour les analyses de routine en février 2000.

2. Évaluation de la performance

Le tableau 2 présente le récapitulatif des résultats des essais de stérilité effectués sur une période de 4.5 ans, ainsi que l'incidence de faux positifs.

Tableau 2 - Incidence des faux positifs

	Ancienne méthode	Méthode « Ing »
Nbr d'essais	1085	1440
Nbr faux positifs	17 (1.57 %)	3 (0.21 %)

La méthode « Ing » se caractérise donc par un taux de faux positifs significativement plus bas que celui de l'ancienne méthode ($p < 0.0001$ selon test de Fisher).

Enfin, on peut encore signaler que le nombre de vrais résultats positifs (croissance microbienne confirmée) demeure toujours très faible, voire nul, avec les préparations de notre hôpital.

Conclusions

• La méthode « Ing » constitue une technique bien adaptée à l'essai de stérilité, suffisamment sensible, et conforme aux recommandations de la Pharmacopée Européenne^[1].

• En maintenant le produit analysé dans un espace clos, la méthode « Ing » permet de diminuer les risques de contamination susceptibles de se produire au cours de l'essai de stérilité. Elle engendre par là une diminution significative du nombre de faux positifs.

Références

[1] Pharmacopée Européenne. 4e Éd. 2002. Strasbourg.

[2] G. Pappalardo et al. Trois ans de contrôle de stérilité des injectables au CHUV. *Swiss Med* 1988; 10(3a): 27.

Remerciements

À H. Ing pour nous avoir présenté et autorisé à appliquer sa méthode.

À G. Podilsky pour l'élaboration du protocole de validation.