

# Master en Pharmacie

## Travail Personnel de Recherche

### Contrôle de la qualité microbiologique (biocharge et pyrogénicité) des matières premières de qualité pharmaceutique

présenté à la

Faculté des sciences de  
L'Université de Genève

par

**Lara Bell**

Unité de recherche

Pharmacie centrale du CHUV

Directeur de l'unité

Prof. Farshid Sadeghipour

Responsables

Dr. Markoulina Berger  
Dr. Grégory Podilsky

Genève  
2017

# REMERCIEMENTS

En préambule à ce travail, je souhaiterais adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont aidée et qui m'ont apporté leur soutien tout au long de la réalisation de ce présent travail.

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur Farshid Sadeghipour occupant le poste de Pharmacien-chef à Lausanne à la pharmacie du CHUV, pour son aide précieuse et le temps qu'il m'a consacré.

Je remercie également la Docteure Markoulina Berger, Pharmacienne responsable de l'unité du Contrôle Qualité à la Pharmacie du CHUV, pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils qui m'ont permis d'avancer tout au long de mon travail. Je la remercie également pour les réponses qu'elle m'a apportées, ses encouragements et son soutien durant ce stage.

Je souhaite aussi remercier le Docteur Gregory Podilsky, Pharmacien responsable de l'unité de production, pour ses propositions relatives à mon projet.

Je remercie également Mme Christine Leblanc Bonnet-Eymard, Pharmacienne responsable des productions en séries pour son écoute et ses suggestions.

Je tenais à remercier de plus, la pharmacienne adjointe du Docteur Markoulina Berger, Mme Camille Fauchère, qui m'a donné de nombreuses pistes de recherche et idées pour progresser dans ce travail.

Je remercie également Mme Julie Thibaudeau, experte en microbiologie de l'unité du Contrôle qualité chez B.Braun Medical, pour ses réponses à mes questions et pour ses rendez-vous téléphoniques.

Je souhaite remercier aussi Mme May Arcin, Laborantine en chimie pour son aide et sa formation pour la partie microbiologie.

Je remercie de même tous les autres laborantins et apprentis du laboratoire du contrôle qualité pour leur aide pour les manipulations et leur participation pour favoriser mon intégration au sein de l'unité.

Mes remerciements se tournent également vers les membres de ma famille qui m'ont soutenue et incitée à donner le meilleur de moi-même.

# RÉSUMÉ

## INTRODUCTION

Beaucoup de matières premières employées à l'hôpital proviennent de Chine et d'Inde, pays dans lesquels les autorités réglementaires ne peuvent assurer des audits régulièrement, ni des contrôles suffisants.<sup>18,19</sup> Il paraît donc important de vérifier la qualité des matières premières utilisées pour la fabrication de préparations pharmaceutiques.

Le but de ce travail est d'évaluer la qualité microbiologique (endotoxines et biocharges) sur une sélection de matières premières utilisées pour des préparations injectables et/ou solutions orales et ainsi de vérifier l'absence d'endotoxines et germes pathogènes dans ces matières premières. L'applicabilité de la méthode utilisée pour évaluer la biocharge des matières premières a aussi été vérifiée pour 5 matières premières testées. (Benzoate de Sodium Atropine Sulfate, Sodium Thiosulfate, Lactate de Sodium et Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le taux d'endotoxines présentes dans les matières premières a été évalué par la méthode de colorimétrie cinétique avec l'appareil Endosafe<sup>®</sup>MCS de Charles River.<sup>16,17</sup>

La biocharge des différentes matières premières a été quantifiée par les méthodes de dénombrement de germes aérobies totaux, moisissures/levures et recherche germes spécifiés, par filtration (produits hydrosolubles) ou ensemencement direct (produits non hydrosolubles).<sup>21</sup>

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les matières premières sélectionnées présentent toutes des taux d'endotoxines et une biocharge respectant les normes établies par la Ph. Eur.<sup>21</sup> En effet, aucun lot de matière première testé ne présentait une quantité d'endotoxines supérieure aux limites exigées par la Ph.Eur. Certaines matières premières présentaient des faibles contaminations microbiennes mais aucun germe pathogène n'a été détecté.

La vérification de l'applicabilité de la méthode a permis de mettre en évidence que certaines matières premières analysées ont des propriétés physico-chimiques antimicrobiennes, notamment pour le Benzoate de Sodium et le Sodium Thiosulfate. Dans ce cas-ci, une neutralisation avant filtration de la matière première est indispensable.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus pour les endotoxines et la biocharge sont conformes aux normes exigées par la Ph.Eur.<sup>21</sup> Les matières premières sélectionnées peuvent être utilisées en toute sécurité au sein de l'hôpital pour la préparation de médicaments injectables et solutions orales. La reproductibilité de ces résultats entre les différents lots doit être évaluée par la suite.

# ABRÉVIATIONS

<i>A. brasiliensis</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CHUV	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CV	Coefficient de variation
CSE	Control standard Endotoxin
DGAT	Dénombrement des germes aérobies totaux
DMLT	Dénombrement des moisissures/levures totales
DMS	Dilution maximale significative
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GS	Gélose au sang
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	Intraveineuse
LAL	Lysat d'amoebocytes de limule
LPS	Lipopolysaccharide
McC	Mac Conkey
MCS	Multi-Cartridge System
Ph.Eur.	Pharmacopée Européenne
pNA	P-nitroaniline
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
PTS	Portable Test System
RVS	Rappaport-Vassiliadis
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TLR4	Toll-like receptor 4
TSA	Tryptone soya agar
TSB	Trypticase soy broth
UE	Unité d'endotoxine
UFC	Unité Formant Colonie
UI	Unité internationale
USP	United States Pharmacopeia

## TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le contrôle de qualité microbiologique des matières premières .....	1
1.2 Contexte du travail de recherche .....	2
1.3 Objectifs du travail de recherche.....	2
1.4 LES ENDOTOXINES.....	2
1.4.1 Étymologie et découverte des endotoxines .....	2
1.4.2 Présence des endotoxines .....	3
1.4.3 Structure chimique des endotoxines .....	3
1.4.4 Les symptômes et effets sur la santé .....	3
1.4.5 Méthodes de contrôle d'endotoxines.....	4
1.4.6 Limites en endotoxines autorisées .....	4
1.4.7 Dilution maximale significative .....	5
1.5 Facteurs d'interférences : activité inhibitrice et activatrice.....	5
1.6 CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE .....	6
1.6.1 Introduction .....	6
1.6.2 Recherche de germes aérobies totaux.....	6
1.6.3 Recherche de levures et moisissures.....	6
1.6.4 Recherche de germes spécifiés .....	6
1.7. Méthodes de contrôle microbiologique des produits non stériles .....	8
1.7.1 Filtration sur membrane .....	8
1.7.2 Méthode d'ensemencement.....	8
1.7.3 Méthode du nombre le plus probable .....	8
1.8 Limites fixées pour les critères d'acceptations .....	8
1.9 Validation des méthodes de dénombrement (applicabilité de la méthode) .....	9
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	10
2.1 Matériel.....	10
2.1.1 Produits : matières premières.....	10
2.1.2 Matériel nécessaire pour l'analyse des endotoxines .....	10
2.1.3 Matériel pour le contrôle microbiologique des produits non stériles.....	11
2.2 Méthode .....	11
2.3 Mode opératoire: contrôle microbiologique des produits non stériles .....	12
3. RÉSULTATS .....	13
3.1 Mesure du taux d'endotoxines par la méthode Endosafe®-MCS™ Charles River ...	13
3.2 Résultats contrôle microbiologique.....	15
3.2.1 Contrôle de la biocharge des différentes matières premières.....	15

3.2.2 Résultats d'identifications.....	17
3.2.3 Essais de fertilités des Salmonelles .....	18
3.3. Validation de la méthode de dénombrement en présence du produit.....	18
4. DISCUSSION.....	27
4.1 Mesure du taux d'endotoxines par la méthode Endosafe®-MCS™ Charles River.....	27
4.2 Contrôle de la biocharge des matières premières sélectionnées.....	28
4.3 Essais de fertilité.....	29
4.4 Validation de la méthode de dénombrement en présence du produit.....	29
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	34
6. BIBLIOGRAPHIE.....	35
7. ANNEXES.....	37

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 Le contrôle de qualité microbiologique des matières premières

Les Bonnes Pratiques de Fabrication ne sont pas harmonisées au niveau mondial. Or, actuellement les principaux fournisseurs des matières premières pharmaceutiques sont la Chine et l'Inde. La production hospitalière doit en effet, employer de nombreuses matières premières provenant de ces pays et leur qualité doit être conforme à la Pharmacopée Européenne.<sup>26,27</sup>

En milieu hospitalier, le contrôle microbiologique représente une exigence réglementaire au niveau des produits pharmaceutiques injectables, des produits utilisables en dialyse et du matériel chirurgical.<sup>22</sup>

Lorsqu'un médicament est administré par une voie jugée critique comme la voie intraveineuse, la préparation doit être dépourvue de pyrogènes pouvant engendrer de graves effets secondaires chez le patient.<sup>21</sup>

Les pyrogènes sont définis comme étant des substances pouvant provoquer une brusque élévation de la température.<sup>3</sup> Cette classe de pathogène est variée. Elle regroupe les molécules de nature virale, fongique et bactérienne, dont les endotoxines et lipopolysaccharides (LPS) qui nous intéressent plus particulièrement. Il s'agit de toxines contenues dans la membrane externe de bactéries Gram négatif, qui sont libérées uniquement au moment de la lyse bactérienne. L'exposition d'un patient à des doses extrêmement faibles en endotoxines peut avoir des conséquences graves, notamment en raison de l'activité des endotoxines sur le système immunitaire. Elles peuvent provoquer des fièvres élevées, une vasodilatation importante des vaisseaux, une coagulation intravasculaire ou un choc septique.<sup>11</sup> De plus, une atteinte des voies respiratoires est souvent signalée : les endotoxines peuvent induire un asthme ou l'aggraver<sup>1-9,14-15,32</sup>.

De surcroît, les endotoxines sont très résistantes aux procédés de stérilisation employés en routine tels que la stérilisation par la chaleur humide ou la filtration microbiologique.<sup>15</sup>

En raison des dangers potentiels des endotoxines pour le patient et de leur résistance aux procédés de stérilisation, la présence des endotoxines dans les produits pharmaceutiques notamment dans les préparations injectables doit impérativement être contrôlée.

Historiquement, le contrôle des pyrogènes se faisait de façon *in vivo* sur les lapins. Actuellement, les procédés d'analyse et de recherche d'endotoxines reposent sur l'utilisation du lysat d'amœbocytes de *Limule* (LAL test).<sup>2,7</sup> La source du réactif de LAL provient du sang d'un animal qui est le *Limulus polyphemus* communément appelé limule ou crabe en fer à cheval.<sup>2,5</sup> Ce second test est de plus en plus utilisé et repose sur le principe de la coagulation des endotoxines en présence du LAL<sup>13</sup>.

La Ph. Eur.<sup>21</sup> exige des analyses d'identités sur les matières premières mais peu concernant la qualité microbiologique. Toutefois, des tests de contrôle microbiologique (endotoxines et biocharges) sont nécessaires pour garantir la qualité des matières premières.

## 1.2 Contexte du travail de recherche

Le travail de recherche s'est effectué au sein de la pharmacie centrale du CHUV, dans les unités de contrôle qualité et production.

Le contrôle qualité doit évaluer la qualité microbiologique des matières premières pour pouvoir déterminer si ces dernières peuvent induire des contaminations dans les produits finis, surtout de qualité stérile.<sup>22</sup>

Au vue du nombre de matières premières utilisées par la pharmacie, il n'est pas possible dans le cadre de cette étude, d'évaluer la qualité microbiologique de l'ensemble des matières premières utilisées pour la fabrication de préparations pharmaceutiques au CHUV. Parmi toutes les matières premières utilisées à l'hôpital figurant dans la liste des PL (produits par lots), les choix suivants sont effectués :

- 1) Toutes les matières premières utilisées dans les préparations injectables ou par voie intrathécale (ex : Clonidine HCl) sont retenues (ex : Calcium Chlorure)
- 2) Toutes les matières premières avec mention apyrogène (ex : Sodium Chlorure) sont sélectionnées
- 3) Une matière première d'origine naturelle est testée (ex : Atropine Sulfate)
- 4) Les matières premières ayant des propriétés inhibitrices décrites dans la littérature sont retenues (ex : Benzoate de Sodium, Sodium Thiosulfate et Lactate de Sodium).<sup>23-26</sup>
- 5) Parmi les matières premières dédiées à une administration per os :
  - a) Une matière première stupéfiante est sélectionnée (ex : Morphine Chlorhydrate)
  - b) Une matière première connue pour être contaminée est retenue (ex : Calcium Hydrogénophosphate dihydraté)

## 1.3 Objectifs du travail de recherche

Le but de ce travail consiste à évaluer la qualité microbiologique des matières premières en respectant les différentes normes exigées par les Pharmacopées (surtout Ph. Eur. et USP)<sup>11,21</sup> et selon les prescriptions internes du laboratoire. Le contrôle de la qualité microbiologique comprend la recherche d'endotoxines et le contrôle de la biocharge des matières premières sélectionnées dans le cadre de cette étude.

## 1.4 LES ENDOTOXINES

### 1.4.1 Étymologie et découverte des endotoxines

Le terme endotoxine tient son origine de la racine étymologique grecque scindant ce mot en deux parties distinctes : endon (signifiant à l'intérieur) et toxicon (le poison).<sup>32</sup>

La découverte des endotoxines est apparue quelque peu après les postulats de Koch, à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle suite à l'étude du choléra (*Vibrio cholerae*), par le célèbre chercheur Richard Pfeiffer. En effet, dans ces travaux, il a été remarqué qu'il existe une substance pyrogène qui est libérée lors de la lyse du vibron provenant de la membrane externe de la bactérie.<sup>3</sup>

### 1.4.2 Présence des endotoxines

Les endotoxines sont retrouvées dans les parois des bactéries Gram négatif de nature lipopolysaccharidique (LPS) (par exemple : *E. coli*, *S. Typhi*, *Haemophilus influenzae*) et chez certaines algues ou plantes supérieures.<sup>3</sup> Elles peuvent se retrouver également dans l'air ambiant et sont susceptibles de contaminer les matières premières utilisées en production hospitalière.<sup>20</sup>

### 1.4.3 Structure chimique des endotoxines

Les endotoxines sont des LPS qui sont constitués de trois parties distinctes : la région du lipide A, le core et la répétition de l'antigène O, comme représenté dans la Figure 1 ci-dessous.<sup>9</sup>

Les parties du core et de la chaîne O (« Ohne Kapsel ») sont responsables de l'immunogénicité des pathogènes. La région du lipide A a pour fonction de fixer le LPS dans la partie externe de la membrane des bactéries. Elle est également responsable de la toxicité et de l'activité pro-inflammatoire. Les lipides A, sont alors reconnus par le système immunitaire et associé au TLR 4. Et ceci, par l'activation du complément induisant un composé le C3b responsable du processus d'opsonisation.<sup>1-3,8</sup>

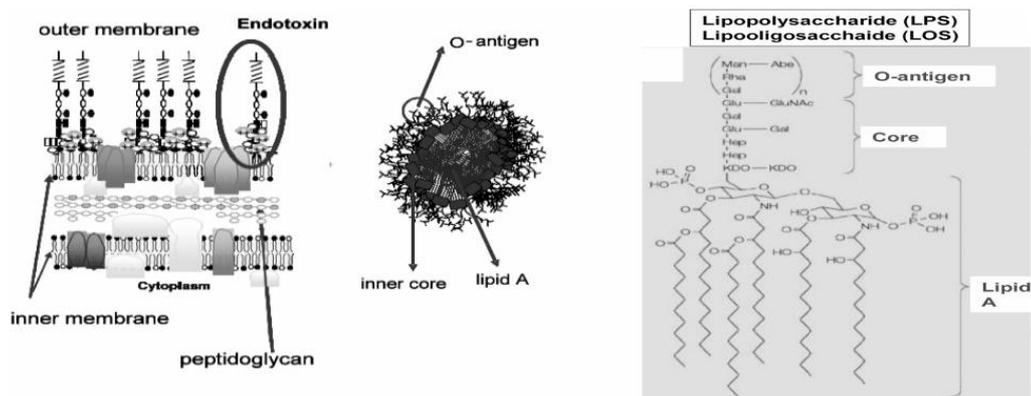


Figure 1 : Structure de la membrane des bactéries Gram négatif avec agrandissement de la partie de l'endotoxine (Lipide A, core et antigène O).<sup>9</sup>

### 1.4.4 Les symptômes et effets sur la santé

Les symptômes peuvent être divers, selon la quantité d'endotoxines présentes dans la préparation.

- 1) Si peu d'endotoxines sont contenues dans la préparation, une fièvre, une vasodilatation et une inflammation peuvent être provoquées. L'apparition de fièvre résulte d'une induction des cellules de Kupffer qui augmentent considérablement la sécrétion de pyrogènes endogènes tels que l'IL-1 et le TNF. Les neutrophiles quant à eux, sont responsables du phénomène de vasodilatation. La synthèse des anticorps est le résultat de l'activation des lymphocytes B en présence d'endotoxines. Il peut également y avoir l'apparition d'une inflammation due à l'activation du complément.

- 2) Si les endotoxines sont présentes en grande quantité, le choc septique et une coagulation intravasculaire peuvent apparaître. De plus, lors d'une présence accrue d'endotoxines dans les préparations injectables des symptômes de type *Systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) et des *Multiple organ dysfunction syndrom* (MODS) ou hépatobiliaires peuvent être observés.<sup>1-3,8,20</sup>

#### 1.4.5 Méthodes de contrôle d'endotoxines

Dans la monographie 2.6.14 « l'essai des endotoxines bactériennes », la Ph. Eur.<sup>21</sup> décrit trois méthodes permettant la détection ou la quantification des endotoxines:

- 1) La méthode de gélification (essai limite et essai semi-quantitatif) par l'apparition d'un gel.
- 2) Le turbidimétrie cinétique (cinétique ou en point final) qui mesure la décroissance de coagulogène dans le lysat par apparition d'une turbidité.
- 3) La méthode chromogénique : qui peut être en point final ou cinétique. C'est cette dernière qui a été utilisée durant ce travail (colorimétrie cinétique).

C'est une méthode quantitative qui mesure la coloration d'un composé jaune, le p-nitroanilide<sup>14</sup>. Cette coloration apparaît suite à la scission entre le substrat chromogénique et son peptide (rupture de la liaison 5-pep-pNa), cette réaction est présentée dans la Figure 2 ci-dessous. La p-nitroanilide est mesurée ensuite par photométrie entre 385 à 410 nm. Les courbes d'étalonnages sont réalisées à partir de solutions étalons.

Cette réaction est une réaction enzymatique et elle est liée à des conditions opératoires très précises (température 37°C, pH 7 et en présence des ions Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup>).<sup>1-3,7,8,20</sup>

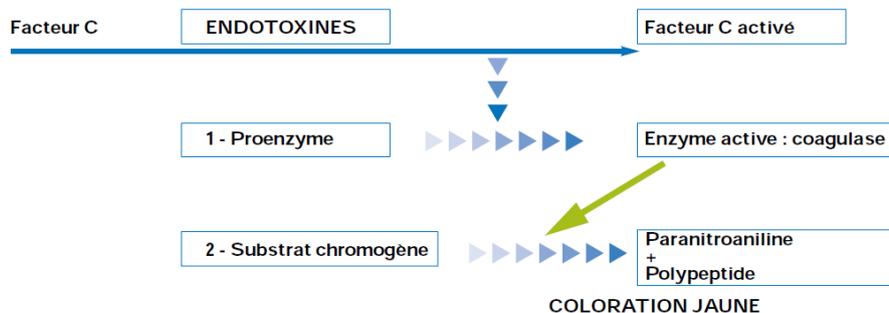


Figure 2 : Cascade de la réaction produite lors de la colorimétrie cinétique.<sup>20</sup>

#### 1.4.6 Limites en endotoxines autorisées

Afin de pouvoir valider la conformité des matières premières, la limite en endotoxines fixée ne doit pas être dépassée.

Pour certaines matières premières, des limites fixes en endotoxines peuvent être retrouvées dans l'USP.<sup>10</sup> En revanche, si la valeur n'est pas référencée, un calcul doit être effectué en se basant sur la formule, illustrée ci-dessous (équation 1), issue de la monographie de la Ph. Eur apparaissant dans la monographie de la Ph.Eur. « 5.1.10 Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes » et « 2.6.14 Essai des endotoxines Bactériennes » :<sup>21</sup>

$$\frac{K}{M} \quad [Eq.1]$$

Où K est la dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle. Et, M la dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle.

Les valeurs de K selon les différentes voies d'administrations sont définies dans la monographie « 5.1.10 » de la Ph.Eur <sup>21</sup> qui spécifie les normes de K selon les différentes voies d'administrations et sont reprises dans le Tableau 1 ci-dessous :

**Tableau 1: « 5.1.10-1 » valeurs de K en fonction des voies d'administration<sup>21</sup>**

Voie d'administration	K
IV	5.0 UI d'entoxines par kilogramme de masse corporelle
IV pour produits radiopharmaceutiques	2.5 UI d'entoxines par kilogramme de masse corporelle
Intrathécale	0.2 UI d'entoxines par kilogramme de masse corporelle
Administration parentérale par mètre carré de surface corporelle	100 /m <sup>2</sup>

La limite maximale tolérée en endotoxines est de 2\*10<sup>5</sup> bactéries, ce qui correspond à 5 Unités d'endotoxines.

#### 1.4.7 Dilution maximale significative

Lors des analyses de dosage, il est important de prendre en considération le fait que la DMS ne soit pas dépassée afin de pouvoir déterminer correctement la teneur en endotoxines. Cette dernière est calculée en employant la formule décrite dans la Ph. Eur.<sup>21</sup> (monographie 2.6.14) USP (<85>)<sup>10</sup>, donnée dans l'équation 2 ci-dessous :

$$\frac{\text{Limite en Endotoxines x concentration de la solution à examiner}}{\lambda} \quad [Eq. 2]$$

Où λ équivaut à la concentration la plus basse dans la gamme d'étalonnage.

#### 1.5 Facteurs d'interférences : activité inhibitrice et activatrice

Lors de l'utilisation de la méthode de colorimétrie cinétique plusieurs facteurs d'interférences peuvent apparaître (pH, concentration ions bivalents élevée, solution lipidique, alcool, activité protéolytique, effets dus aux récipients) et fausser les résultats : présence de faux-positifs ou faux-négatifs. Les interférences les plus fréquentes sont celles d'un pH inadéquat qui peut être ajusté par dilution en séries (sans dépasser la DMS) en employant de l'eau « LAL » (eau apyrogène), pour être compris dans un intervalle de pH de 6.7 à 7.6. <sup>1-2</sup>

La Ph. Eur. exige un taux de recouvrement compris entre 50 et 200 %. Une activité est inhibitrice si son taux de recouvrement est inférieur à 50 % et activatrice s'il est supérieur à 200% <sup>1-3,7,8,20</sup>.

## 1.6 CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE

### 1.6.1 Introduction

En milieu hospitalier, le contrôle microbiologique est essentiel pour confirmer la validité des matières premières commandées auprès des différents fournisseurs.

L'essai du contrôle de la biocharge se fait en utilisant différents milieux de cultures propices à la prolifération des bactéries et champignons. La recherche des germes peut être soit d'ordre général, soit plus spécifique. Dans le premier cas, elle consiste en la recherche de DGAT et DMLT, réalisée en suivant la monographie du chapitre « 2.6.12 » de la Ph.Eur. Si des germes plus spécifiques doivent être identifiés alors la procédure suit la monographie « 2.6.13 » de la Ph.Eur.<sup>21</sup>

### 1.6.2 Recherche de germes aérobies totaux

Le milieu liquide TSB est employé pour mettre en évidence des germes aérobies totaux, des moisissures et des levures. Il est constitué d'hydrolysate de caséine et soja. Ce type de milieu apporte les éléments essentiels à la croissance des différents germes. La présence d'une croissance bactérienne est révélée lorsque le bouillon passe d'un aspect limpide à trouble.<sup>21</sup>

Le DGAT se détermine également grâce à l'utilisation de géloses TSA. Il s'agit de géloses non sélectives constituées de glucose (définissant le substrat). Ces géloses possèdent la propriété de n'avoir aucun indicateur coloré.<sup>12,21-22,</sup>

Les bouillons TSB et les géloses TSA doivent être incubés à 30-35°C pendant trois à cinq jours.<sup>21</sup>

L'anaérobiose de certaines bactéries a été évaluée dans les Bouillons Thioglycolate<sup>21</sup> et GENbag<sup>a</sup> bien que ceci ne soit pas exigé par la Ph. Eur. pour les produits non stériles.

### 1.6.3 Recherche de levures et moisissures

La gélose Sabouraud-Dextrose est employée pour la mise en évidence des moisissures et levures (DMLT).<sup>12,21-22</sup> Les géloses SDA doivent être incubées à 20-25°C pendant cinq à sept jours<sup>55</sup>.

### 1.6.4 Recherche de germes spécifiés

Afin de pouvoir identifier des germes spécifiés, des milieux sélectifs doivent être employés. Le Tableau 2 ci-après, présente les différents milieux permettant la mise en évidence de certains germes spécifiques :<sup>21</sup>

Tableau 2 : Milieux sélectifs permettant la recherche de germes spécifiés

Souches recherchées	Milieux sélectifs
<i>E. coli</i>	Milieu gélosé Mac Conkey
<i>P. aeruginosa</i>	Milieu gélosé Cétrimide
<i>S. aureus</i>	Milieu gélosé mannitol-sel
<i>C. albicans</i>	Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé
<i>S. enterica</i>	Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate

<sup>a</sup> GENbag-GENbox - Générateurs d'atmosphères pour bactéries exigeantes - bioMérieux Suisse [Internet]. [cité 28 mai 2017]. Disponible sur: [http://www.biomerieux.ch/servlet/srt/bio/switzerland/dynPage?doc=SWT\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_23](http://www.biomerieux.ch/servlet/srt/bio/switzerland/dynPage?doc=SWT_CLN_PRD_G_PRD_CLN_23)

- **Recherche de *S. aureus***

En 1942, Koch découvrit que la quantité minimale requise aux *S. aureus* pour croître est d'au moins 7.5 % de NaCl. La gélose Chapman contient principalement 75 g de chlorure de sodium ainsi qu'une quantité de 10 g de D-mannitol. Ces deux éléments sont essentiels à l'isolement sélectif des *S. aureus*.<sup>b</sup>

Pour satisfaire à l'essai de la Ph. Eur les géloses doivent être incubées à 30-35°C pendant 18-72 h<sup>55</sup>. Les résultats sont positifs si la présence de *S. aureus* est observée par la croissance de colonies jaunes ou blanches entourées d'une zone jaune.<sup>21</sup>

- **Recherche d'*E. coli***

La gélose Mac Conkey permet l'isolement des bactéries Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Ce type de milieu permet de faire la différenciation entre les bactéries fermentant le lactose ou le sucre.<sup>21,29</sup>

La détection d'*E. coli* se fait par la présence visuelle d'un halo rose sur les géloses Mac Conkey. Ce mécanisme est le résultat de la précipitation des sels biliaires présents dans les géloses dues à l'acidification du milieu sélectif. Les bactéries fermentant le sucre entraînent une baisse du pH importante, ce qui induit l'apparition de colonies de couleur oscillant entre le rose et le rouge.<sup>21,29</sup>

Les souches ne fermentant pas le lactose doivent utiliser les peptones (présent dans la gélose) pour croître, ce qui, à l'inverse des bactéries lacto-fermantes augmente le pH en l'alcalinisant. Les colonies sont alors blanches ou incolores.<sup>21,29</sup>

La Ph.Eur recommande la recherche d'*E. coli* par isolement sélectif sur gélose Mac Conkey. Les bactéries doivent tout d'abord être pré-enrichies dans un bouillon Mac Conkey. Le bouillon est positif si le milieu de culture devient trouble.<sup>21</sup>

- **Recherche de *Salmonelles***

Les Salmonelles ont la particularité de croître à des pH bas.

La recherche de Salmonelles s'effectue par l'emploi d'un bouillon sélectif d'enrichissement, nommé RSV ainsi que par l'isolement sur géloses XLD.<sup>21,30</sup>

- **Recherche de *P. aeruginosa***

La présence de *P. aeruginosa* dans les matières premières peut être mise en évidence par le milieu sélectif au Cétrimide. Ce type de bactérie sécrète de la pycocyanine, un pigment coloré bleu-vert non fluorescent. Le composé cétrimide a la propriété d'inhiber plusieurs bactéries différentes des *P. aeruginosa*. Le milieu contient une proportion importante de Sulfate de Potassium et du Chlorure de Magnésium favorisant la production de pycocyanine et fluorescéine. Pour la détection de fluorescéine une lumière ultraviolette est requise. Les résultats sont dit positifs si une couleur bleu-vert est détectée. Si aucun changement de couleur n'est observé alors la matière première est exempte de *P. aeruginosa*.<sup>c</sup>

---

<sup>b</sup> MANNITOL SALT AGAR (MSA) [Internet]. [cité 30 mai 2017]  
Disponible sur : [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/MannitolSaltAgar.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/MannitolSaltAgar.htm)

<sup>c</sup> CETRIMIDE SELECTIVE AGAR [Internet]. [cité 30 mai 2017]  
Disponible sur : <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/IFU1292.pdf>

## **1.7. Méthodes de contrôle microbiologique des produits non stériles**

La monographie 2.6.12 de la Ph.Eur. <sup>21</sup>présente trois méthodes pour assurer le contrôle microbiologique des produits non stériles. La première méthode consiste à procéder à une filtration sur membrane. La seconde se nomme méthode d'ensemencement qui peut être de deux types : en profondeur ou par étalement en surface. Le dernier procédé est celui du nombre le plus probable. La méthode de filtration est préférable car elle permet d'éliminer les interférences et est plus précise que la méthode d'ensemencement. La méthode du nombre le plus probable est moins utilisée pour des raisons de précisions cependant son emploi est recommandé pour les matières premières ayant peu de contamination microbienne. <sup>13,21,22</sup>

### **1.7.1 Filtration sur membrane**

Cette méthode permet d'obtenir des résultats fiables. Elle ne peut toutefois être employée que pour les produits hydrosolubles. Un isolement sélectif est possible grâce à cette technique de par l'utilisation d'une membrane poreuse de 0.45 µm. Cette dernière, assure une sélection bactérienne grâce à ses propriétés de rétention. <sup>13,21,22</sup>

### **1.7.2 Méthode d'ensemencement**

Cet essai est employé couramment, notamment pour tous les produits non hydrosolubles. Il consiste à introduire l'échantillon directement dans le milieu gélosé caractéristique de la méthode d'ensemencement en profondeur, ou d'étaler 0.1 mL de l'échantillon (méthode de l'étalement en surface). Les tests doivent être réalisés au moins à double pour les DGAT et DMLT. <sup>13,21,22</sup>

### **1.7.3 Méthode du nombre le plus probable**

La méthode du nombre le plus probable ne doit être utilisée que lorsque qu'aucune des deux méthodes mentionnées ci-dessus aux paragraphes 1.7.1 et 1.7.2 ne peut être employée. En effet, cette technique possède des biais analytiques en raison de l'inexactitude des résultats. Le principe de cet essai constitue à effectuer une série d'au minimum trois dilutions respectant un rapport de proportionnalité de 1/10 du produit.

Les tubes sont ensuite incubés pendant cinq jours à 30-35°C. Le nombre de tubes présentant une turbidité est ensuite évalué. <sup>13,21,22</sup>

## **1.8 Limites fixées pour les critères d'acceptations**

Le dénombrement des germes aérobies viables totaux, permet de faire une première sélection afin de détecter les germes tels que les moisissures, les bactéries mésophiles et les levures poussant en aérobiose.

Les limites fixées pour les critères d'acceptation s'établissent en considérant les facteurs suivants: la nature du produit utilisé, son utilisation, la voie d'administration et le type de patients visés (enfants, femmes enceintes, patients immunodéprimés). <sup>13,21,22</sup>

Les limites ont été fixées en tenant compte de ces différents facteurs et sont les suivantes :

- DGAT < 10<sup>2</sup> UFG/g ou UFC/mL
- DMLT < 10<sup>1</sup> UFC/g ou UFC/mL
- Les témoins de manipulations doivent être limpides et contenir 0 UFC/mL

### **1.9 Validation des méthodes de dénombrement (applicabilité de la méthode)**

Une validation des méthodes analytiques pour les contrôles microbiologiques est exigée dans les BPF et dans la Ph. Eur. <sup>21</sup>

Lors de la validation de la méthode, un essai, un témoin positif, un témoin négatif et un témoin de manipulation doivent être réalisés :

- L'essai est constitué du produit et de la souche bactérienne (contamination en présence du produit).
- Le témoin positif est constitué par la présence du diluant et de la souche. Il sert, dans ce cas-ci, à prouver que la manipulation s'est déroulée correctement et indique le nombre de bactéries présentes dans l'inoculum. Il permet aussi de détecter d'éventuelles propriétés inhibitrices ou activatrices du produit par comparaison à l'essai.
- Le témoin négatif, contient le produit. Il représente la biocharge initiale de la matière première étudiée.
- Le témoin de manipulation contient le diluant mais sans le produit. Il doit être effectué lors de chaque étape du processus de fabrication. Ce dernier subit les mêmes étapes que les échantillons testés et sert à certifier qu'aucun germe n'a été apporté par l'opérateur au cours des manipulations.

Dans le cas des matières premières possédant des propriétés antimicrobiennes, pour garantir la validité de la méthode, la matière première doit être neutralisée, en suivant la directive de la Ph. Eur. <sup>21</sup> par :

- i. Une filtration sur membrane
- ii. Changement du milieu de culture ou augmentation du volume de diluant
- iii. Avec des agents de neutralisations : exemple : neutralisation des ammoniums quaternaires par ajout de Lécithine
- iv. En combinant les méthodes citées précédemment

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Matériel

#### 2.1.1 Produits : matières premières

Le Tableau 3 présente les différentes matières premières qui ont été sélectionnées pour les analyses.

**Tableau 3 : Matières premières utilisées**

Produit	Fournisseur, ville (commune), pays
Atropine Sulfate PhEur	Hänseler AG, Herisau, Suisse
Sodium Benzoate PhEur	
Chlorure de Potassium PhEur	
Magnésium sulfate heptahydraté PhEur	
Sodium Bicarbonate PhEur	
Morphine Chlorhydrate (prélevée en salle 570 (zone stupéfiants) par un opérateur qualifié)	
Sodium Thiosulfate	
Phenobarbital	
Calcium hydrogénophosphate dihydraté	
Calcium Chlorure apyrogène	
Sodium Chlorure apyrogène	
Cuivre Gluconate USP	Pharmaserv AG, Stansstad, Suisse
Clonidine hydrochlorure PhEur	Fagron SA, Thiais, France
Hydrochlorothiazide	
Sodium Lactate 50 % PhEur 8.0	Caelo, Hilden, Allemagne

#### 2.1.2 Matériel nécessaire pour l'analyse des endotoxines

Le Tableau 4 ci-dessous regroupe le matériel et appareillage nécessaires pour l'analyse des endotoxines.

**Tableau 4 : Matériel et appareillage pour la recherche d'Endotoxines**

Matériel et appareillage	Fournisseur, ville (commune), pays
Balance analytique Metler Toledo XP204	Metler Toledo AG, Columbus, Etats-Unis
Tips embout avec filtre de 1000 µL	Socorex Isba SA, Ecublens, Suisse
Micropipettes	
Transferpette®	Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Allemagne
Réfrigérateur et congélateur	FORS Mediline AG, Studen, Suisse
Minuteur	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen Allemagne
Gants en nitrile Supreno®	Ansell HealthcareEurope nv, Brussels, Belgium
Tubes de centrifugeuse de 50 mL et 250 mL apyrogènes Falcon®	Corning Incorporated, Tewksbury, Etats-Unis
Vortex	VWR, Radnor, Etats-Unis
tubes apyrogène en verre	Lonza, Walkersville, USA
Cartouches Endosafe sensibilité 0.5-0.005 EU/mL, 1-0.01 EU/mL 5-0.05 EU/mL	Charles River Laboratories, Charleston, Etats-Unis
Appareil Endosafe MCS	

### 2.1.3 Matériel pour le contrôle microbiologique des produits non stériles

Le Tableau 5 suivant regroupe le matériel et l'appareillage nécessaire pour le contrôle microbiologique des produits non stériles.

**Tableau 5 : Matériel et appareillage utilisés pour le contrôle microbiologique, produits non stériles**

Matériel et appareillage	Fournisseur, ville (commune), pays
Pompe de filtration Miliflex	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Entonnoirs de filtration Miliflex 100	
Cassette de filtration pré-remplie Miliflex TSA+SDA	
Tampons peptones-sel	
Tampons peptones-sel + 0.1 % tween	
Bouillons : MacConkey, Thioglycolate, TSB, RSV	
Géloses : TSA, SDA et XLA (30 mL)	
Pincettes stériles	PharmaPlast ConvaTec Limited, Deeside, UK
Eau ppi pour le « sanitizing » de la pompe	Bichsel AG, Interlaken
Étaleurs et les oses stériles	VWR, Radnor, Etats-Unis
Les fluides A et D	BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France
Géloses : Chapman, au sang et Genbags	
Bioballs® : multishots mix kit 550 UFC for « Growth Promotion Testing » and for « Sterility Assurance Testing », souche de Salmonella Typhimurium de 30 UFC ainsi que le liquide de réhydratation « 14 days Re-Hydration fluid »	
Seringues Luer-Lock™ en polypropylène d'une capacité de 1, 5 et 10 mL	
Aiguilles Microlance 3 (1.1*40 mm)	
Gants stériles en latex Gammex®	Ansell Healthcare Europe nv, Brussels, Belgium
Gants en nitrile Supreno®	
Désinfectant liquide	ANIOSRUB 85 NPC, Lille-Hellemmes, France
Réfrigérateur et congélateur	Liebherr Med
Incubateur à 30-35°C	Binder
Incubateur à 42°C Heraeus	ThermoFischer Scientific, Waltham, Etats-Unis
Flux laminaire A	Gelaire ICN Biomedical, Seven Hills, Australie
Flux laminaire B	BioAir® EuroClone®, Siziano, Italie

### 2.2 Méthode

Les différentes analyses de dosage des endotoxines ont été effectuées par la méthode de colorimétrie cinétique au moyen du réactif de LAL, en respectant les exigences de la Ph. Eur. L'appareil de MCS/PTS Charles River<sup>16,17</sup> et le logiciel Endosafe® Endoscan-V ont été employés.

- Échantillonnage des matières premières

L'échantillonnage des matières premières a été préparé dans des Falcon apyrogènes au moyen de spatules apyrogènes (cf annexe 1). Les matières premières sélectionnées ont déjà été utilisées en production pour réaliser des préparations et de ce fait des prélèvements à plusieurs reprises ont déjà été effectués par les opérateurs dans des conditions respectant les règles d'hygiène. Pour les matières premières stériles et apyrogènes, les prélèvements ont été réalisés avec du matériel stérile et apyrogène.

- Mise en solution des matières premières

La mise en solution des matières premières a été préparée en suivant le monde opératoire présenté dans l'annexe 2.

- Dilution des solutions mères

Les dilutions ont été effectuées, soit en employant un facteur 1 :10 ou 1 :100. La méthode est décrite plus précisément dans l'annexe 4.

- Mesure du pH

Le pH des échantillons a été mesuré à l'aide de bandelettes de pH. La mesure du pH permet d'avoir une orientation générale, quant à la dilution nécessaire de la matière première. En effet, si le produit pur se trouve à un pH relativement neutre, alors la matière première ne devra pas ou alors être très peu diluée, car il y a peu de risques d'interférences liées au pH.

- Dissolution des matières premières insolubles

Les matières premières insolubles ont été solubilisées par l'emploi de solutions standardisées d'acide chlorhydrique 0.1 M et de l'hydroxyde de sodium 0.1M, jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. L'absence d'endotoxines a été vérifiée au préalable dans ces solutions.

### 2.3 Mode opératoire: contrôle microbiologique des produits non stériles

Les protocoles suivis tenant compte des monographies « 2.6.12 », « 2.6.13 » et « 5.1.4 » de la Ph.Eur<sup>21</sup> lors de la réalisation des contrôles microbiologiques des matières premières à usage pharmaceutique se trouvent en annexes 6 et 7. Les essais de biocharges ont été réalisés sous un flux laminaire A. Le Tableau 6 ci-dessous récapitule la méthode employée pour le contrôle microbiologique de chaque matière première retenue dans le cadre de cette étude :

**Tableau 6 : Méthode par filtration sur membrane / ensemencement direct**

Méthode par filtration sur membrane	Méthode par dénombrement sur plaque par ensemencement direct
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Benzoate de Sodium</li> <li>- Chlorure de Potassium</li> <li>- Clonidine Hydrochlorure</li> <li>- Cuivre Gluconate</li> <li>- Hydrochlorothiazide</li> <li>- Lactate de Sodium</li> <li>- Morphine Chlorhydrate</li> <li>- Sodium Lactate</li> <li>- Sodium Bicarbonate</li> <li>- Sodium Thiosulfate</li> <li>- Sulfate de Magnésium heptahydraté</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atropine Sulfate</li> <li>- Calcium Hydrogénophosphate dihydraté</li> <li>- Hydrochlorothiazide</li> <li>- Phenobarbital</li> </ul>

Le choix de la méthode a été réfléchi en fonction des critères de solubilité des différentes matières premières. L'Hydrochlorothiazide a été testé par les deux méthodes afin de pouvoir déterminer laquelle était la plus appropriée pour ce type de substance. L'Atropine Sulfate à une concentration de 10 mg/mL est soluble dans un tampon peptone. Cependant, pour des raisons techniques, l'essai s'est fait par la méthode d'ensemencement direct.

- Essais de fertilité des milieux

La fertilité des milieux doit être testée selon les exigences de la Ph. Eur.<sup>21</sup> Ces essais de fertilité des milieux de cultures sont réalisés en routine par le laboratoire, à l'exception des milieux sélectifs à la recherche de Salmonelles, dont la fertilité a été testée dans le cadre de cette étude (cf. annexe 8).

## 3. RÉSULTATS

### 3.1 Mesure du taux d'endotoxines par la méthode Endosafe®-MCS™ Charles River

Les Tableaux 7 à 16, illustrés ci-dessous, résument les principaux résultats obtenus pour le taux d'endotoxines par la méthode MCS de Charles River.<sup>16,17</sup> Le calcul du taux moyen d'endotoxines (cf calcul détaillés en annexe 3), de l'écart-type, du CV (%) et de la variance y figure également. Les résultats détaillés ainsi que les essais à répétition pour justifier la répétabilité des analyses se trouvent en annexe 5.

**Tableau 7 : Principaux résultats obtenus pour l'Atropine Sulfate et le Benzoate de Sodium.**

	Atropine Sulfate			Benzoate de Sodium		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	55.60	55.60	55.60	0.03	0.03	0.03
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$1.00 \cdot 10^{-1}$	$1.00 \cdot 10^{-1}$	$1.00 \cdot 10^{-1}$	$5.00 \cdot 10^{-3}$	$5.00 \cdot 10^{-3}$	$5.00 \cdot 10^{-3}$
Ecart-type	$1.70 \cdot 10^{-17}$	$1.70 \cdot 10^{-17}$	$1.70 \cdot 10^{-17}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$1.70 \cdot 10^{-14}$	$1.70 \cdot 10^{-14}$	$1.70 \cdot 10^{-14}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$2.89 \cdot 10^{-34}$	$2.89 \cdot 10^{-34}$	$2.89 \cdot 10^{-34}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 8 : Principaux résultats obtenus pour le Calcium Chlorure et le Chlorure de Potassium. Sol =solution**

	Calcium Chlorure			Chlorure de Potassium		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	0.20	0.20	0.20	2.35	2.35	2.35
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$5.67 \cdot 10^{-3}$	$8.31 \cdot 10^{-3}$	$6.05 \cdot 10^{-3}$	$6.71 \cdot 10^{-4}$	$6.71 \cdot 10^{-4}$	$6.71 \cdot 10^{-4}$
Ecart-type	$0.00 \cdot 10^0$	$4.58 \cdot 10^{-3}$	$6.55 \cdot 10^{-4}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$0.00 \cdot 10^0$	$5.51 \cdot 10^1$	$1.08 \cdot 10^1$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$0.00 \cdot 10^0$	$2.10 \cdot 10^{-5}$	$4.29 \cdot 10^{-7}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 9 : Principaux résultats obtenus pour le Calcium Hydrogénophosphate dihydraté et la Clonidine**

	Calcium Hydro. Dihydraté			Clonidine Hydrochlorure		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	0.18	0.18	0.18	16.50	16.50	16.50
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$2.93 \cdot 10^{-3}$	$2.53 \cdot 10^{-3}$	$2.51 \cdot 10^{-2}$	$4.17 \cdot 10^{-2}$	$4.17 \cdot 10^{-2}$	$4.17 \cdot 10^{-2}$
Ecart-type	$4.16 \cdot 10^{-4}$	$6.11 \cdot 10^{-4}$	$1.09 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$1.42 \cdot 10^1$	$2.41 \cdot 10^1$	$4.34 \cdot 10^1$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$1.73 \cdot 10^{-7}$	$3.73 \cdot 10^{-7}$	$1.19 \cdot 10^{-4}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 10 : Principaux résultats obtenus pour le Cuivre Gluconate et le Lactate de Sodium**

	Cuivre gluconate			Lactate de Sodium		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	32.67	32.67	32.67	0.10	0.10	0.10
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$1.75 \cdot 10^0$	$1.75 \cdot 10^0$	$1.75 \cdot 10^0$	$3.90 \cdot 10^{-2}$	$3.90 \cdot 10^{-2}$	$3.90 \cdot 10^{-2}$
Ecart-type	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 11 : Principaux résultats obtenus pour l'Hydrochlorothiazide après neutralisation et le Lactate de Sodium**

	Hydrochlorothiazide (avant neutralisation)			Hydrochlorothiazide (après neutralisation)		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$1.00 \cdot 10^{-3}$	$1.07 \cdot 10^{-3}$	$1.40 \cdot 10^{-3}$	$2.93 \cdot 10^{-3}$	$1.55 \cdot 10^{-2}$	$1.48 \cdot 10^{-2}$
Ecart-type	$1.00 \cdot 10^{-3}$	$1.15 \cdot 10^{-4}$	$2.00 \cdot 10^{-4}$	$5.77 \cdot 10^{-4}$	$2.31 \cdot 10^{-4}$	$1.00 \cdot 10^{-3}$
CV %	$0.00 \cdot 10^0$	$1.08 \cdot 10^1$	$1.43 \cdot 10^1$	$1.97 \cdot 10^1$	$1.49 \cdot 10^0$	$6.76 \cdot 10^0$
Variance	$0.00 \cdot 10^0$	$1.33 \cdot 10^{-8}$	$4.00 \cdot 10^{-8}$	$3.33 \cdot 10^{-7}$	$5.33 \cdot 10^{-8}$	$1.00 \cdot 10^{-6}$

**Tableau 12 : Principaux résultats obtenus pour la Morphine Chlorhydrate et le Phenobarbital**

	Morphine Chlorhydrate			Phenobarbital		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	0.71	0.71	0.71	0.33	0.33	0.33
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$1.25 \cdot 10^{-1}$	$1.25 \cdot 10^{-1}$	$1.25 \cdot 10^{-1}$	$5.00 \cdot 10^{-3}$	$5.00 \cdot 10^{-3}$	$5.00 \cdot 10^{-3}$
Ecart-type	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 13 : Principaux résultats obtenus pour le Sodium Thiosulfate et le Bicarbonate de Sodium**

	Sodium Thiosulfate			Bicarbonate de Sodium		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$3.33 \cdot 10^{-3}$	$3.33 \cdot 10^{-3}$	$3.33 \cdot 10^{-3}$	$6.35 \cdot 10^{-3}$	$5.95 \cdot 10^{-3}$	$5.95 \cdot 10^{-3}$
Ecart-type	$5.31 \cdot 10^{-19}$	$5.31 \cdot 10^{-19}$	$5.31 \cdot 10^{-19}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$1.59 \cdot 10^{-14}$	$1.59 \cdot 10^{-14}$	$1.59 \cdot 10^{-14}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$2.82 \cdot 10^{-37}$	$2.82 \cdot 10^{-37}$	$2.82 \cdot 10^{-37}$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 14 : Principaux résultats obtenus pour le Sulfate de Magnésium 10% et 4.8 %**

	Sulfate de Magnésium 10 %			Sulfate de Magnésium 4.8 %		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	0.18	0.18	0.18	0.40	0.40	0.40
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$5.00 \cdot 10^{-4}$	$5.00 \cdot 10^{-4}$	$5.00 \cdot 10^{-4}$	$2.08 \cdot 10^{-4}$	$2.08 \cdot 10^{-4}$	$2.08 \cdot 10^{-4}$
Ecart-type	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
CV %	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$
Variance	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$	$0.00 \cdot 10^0$

**Tableau 15 : Résultats obtenus pour le Sodium Chlorure apyrogène 0.9 % et 10 %**

	Sodium Chlorure apyrogène 0.9 %			Sodium Chlorure apyrogène 10%		
	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 1	Solution 2	Solution 3
Limite en Endo. (EU/mg)	0.005	0.005	0.005	0.036	0.036	0.036
Taux moyen Endo. (EU/mg)	$1.670 \cdot 10^{-3}$	$5.560 \cdot 10^{-4}$	$2.190 \cdot 10^{-3}$	$5.000 \cdot 10^{-4}$	$5.000 \cdot 10^{-4}$	$5.000 \cdot 10^{-4}$
Ecart-type	$1.920 \cdot 10^{-4}$	$0.000 \cdot 10^0$	$9.450 \cdot 10^{-4}$	$0.000 \cdot 10^0$	$0.000 \cdot 10^0$	$0.000 \cdot 10^0$
CV %	$1.150 \cdot 10^1$	$0.000 \cdot 10^0$	$4.330 \cdot 10^1$	$0.000 \cdot 10^0$	$0.000 \cdot 10^0$	$0.000 \cdot 10^0$
Variance	$3.700 \cdot 10^{-8}$	$0.000 \cdot 10^0$	$8.930 \cdot 10^{-7}$	$0.000 \cdot 10^0$	$0.000 \cdot 10^0$	$0.000 \cdot 10^0$

**Tableau 16 : Résultats HCl 0.1 M et NaOH 0.1 M**

	HCl 0.1 M	NaOH 0.1 M
	Solution 1	Solution 1
Limite en Endotoxines (EU/mg)	0.25	0.25
Taux d'endotoxines (EU/mg)	$1.63 \cdot 10^{-1}$	$1.44 \cdot 10^{-1}$

### 3.2 Résultats contrôle microbiologique

#### 3.2.1 Contrôle de la biocharge des différentes matières premières

Les Tableaux 17 et 18, ci-dessous, présentent les différents résultats des témoins négatifs et de la biocharge obtenus lors du contrôle microbiologique des produits non stériles par la méthode de filtration. (Un exemple de conversion UFC/plaque en UFC/mL est présenté en annexe 10).

**Tableau 17 : Résultats des témoins négatifs obtenus par filtration sur milieux liquides et gélosés pour les matières premières. L= limpide, T = trouble et A. = absence**

	Milieux liquides Aspects			Milieux gélosés dénombrement en UFC				
	TSB	THIO	McC	TSA	SDA	McC	Chapman	Cétrimide
Clonidine HCl	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Cuivre Gluconate	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Chlorure de Potassium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Hydro-chlorothiazide	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Morphine Chlorhydrate	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Benzoate de sodium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Bicarbonate de Sodium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	A. <i>P.Aeru</i>
Lactate de Sodium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Sodium Thiosulfate	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/
Sulfate de Magnésium Heptahydraté	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S <i>.aureus</i>	/

**Tableau 18 : Résultats charge initiale des matières premières obtenus par filtration sur milieux liquides et gélosés pour les matières premières. L= limpide, T = trouble et A. = absence**

	Milieux liquides Aspects			Milieux gélosés dénombrement en UFC				
	TSB	THIO	McC	TSA	SDA	McC	Chapman	Cétrimide
Clonidine Hydrochlorure	L.	T.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Cuivre gluconate	L.	T.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Chlorure de Potassium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Hydrochlorothi azide	L.	T.	L.	1	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Morphine Chlorhydrate	T.	T.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Benzoate de Sodium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Bicarbonate de Sodium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S. aureus	A. P.Aeru
Lactate de Sodium	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S. aureus	/
Sodium Thiosulfate	L.	L.	L.	2	3	A. <i>E.coli</i>	A.S. aureus	/
Sulfate de Magnésium Heptahydraté	L.	L.	L.	1	0	A. <i>E.coli</i>	A.S. aureus	/

Les Tableaux 19-20, ci-dessous, présentent les différents résultats des témoins négatifs et de la biocharge obtenus pour le contrôle microbiologique des produits non stériles par la méthode d'ensemencement direct.

**Tableau 19 : Résultats des témoins négatifs obtenus par ensemencement direct sur milieux liquides et gélosés pour les matières premières. L= limpide, T = trouble et A. = absence**

	Milieux liquides Aspects			Milieux gélosés dénombrement moyen en UFC				
	TSB	THIO	McC	TSA	SDA	McC	Chapman	Cétrimide
Calcium Hydrogéo.	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Phenobarbital	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Hydro-chlorothiazide	L.	L.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/

**Tableau 20 : Résultats charge initiale des matières premières obtenus par ensemencement direct sur milieux liquides et gélosés pour les matières premières. L= limpide, T = trouble et A. = absence**

	Milieux liquides Aspects			Milieux gélosés dénombrement moyen en UFC				
	TSB	THIO	McC	TSA	SDA	McC	Chapman	Cétrimide
Calcium Hydrogéo.	T.	T.	L.	1	3.5	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Phenobarbital	T.	T.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/
Hydro-chlorothiazide	L.	T.	L.	0	0	A. <i>E.coli</i>	A.S .aureus	/

Ci-dessous, la Figure 3 illustre la turbidité du Calcium Hydrogénosphosphate Dihydraté en comparaison au témoin négatif en milieu Thioglycolate.



Figure 3 : Calcium Hydrogénosphosphate (témoin négatif à gauche) et (biocharge initiale à droite)

### 3.2.2 Résultats d'identifications

Ci-dessous, le Tableau 21 regroupe les différents résultats obtenus suite à une identification a posteriori. Les germes qui ne peuvent pas être identifiés par la méthode traditionnelle de Maldi-tof, doivent être analysés par séquençage du 16S de l'ARN ribosomique. Le principe de cette technique repose sur l'amplification des gènes 16S à l'aide de bibliothèques chimiques répertoriées.<sup>28</sup>

Tableau 21 : Résultats des tests d'identifications

Matière première	Milieux de cultures	Identifications	Pathogènes
Sodium Thiosulfate	Gélose TSA	Id.1 : <i>Bacillus circulans</i>	Germe non pathogène
	Gélose TSA	Id.2 : <i>Bacillus circulans</i>	Germe non pathogène
	Gélose SDA	Id. 1 : <i>Paenibacillus humicus</i>	Germe non pathogène
Sulfate Mg. Hep.	Gélose TSA	Id.1 : <i>S. aureus</i> à coagulase négative ( <i>S.hominis</i> )	Germe non pathogène
Hydrochlorothiazide	Gélose TSA	Id.1 : <i>Micrococcus luteus</i>	Germe non pathogène
Phenobarbital	Gélose TSA	Id.1 : <i>Baccillus gr. cereus</i>	Germe non pathogène
Cal. Hydro. dihydraté	Gélose SDA-1	Id.1 : <i>Penicillium spp.</i>	Germe non pathogène
	Gélose SDA -2	Id.1 : <i>Penicillium spp.</i>	Germe non pathogène
		Id.2 : Bacille Gram positif Identification par séquençage du 16S rDNA : <i>Paenibacillus sp. Probable chibensis</i>	Germe non pathogène
	Gélose TSA-2	Id.1 : Bacille Gram positif genre <i>Bacillus</i>	Germe non pathogène
	Gélose TSA-3	Id.1 : <i>Paenibacillus chibensis</i> <i>Penicillium spp.</i>	Germe non pathogène
	Gélose au sang	Id.1 : <i>Bacillus gr.cereus</i>	Germe non pathogène
	Gélose TSA-1	Id.1 : <i>Penicillium spp.</i>	Germe non pathogène
	Gélose SDA -2	Id. 1 : <i>Penicillium spp.</i>	Germe non pathogène
Gélose Chapman	Id. 1 : Bacille Gram positif	Germe non pathogène	

### 3.2.3 Essais de fertilités des Salmonelles

Les Tableaux 22 et 23, ci-dessous, présentent les résultats obtenus pour les essais de fertilités du bouillon RVS et géloses XLD.

**Tableau 22 : Résultats obtenus pour l'essai de fertilité du bouillon RVS**

Nom de la souche	Résultats	Spécifications	Conformité du test
<i>Salmonella typhimurium</i> Lot : 3821	Trouble	Croissance	Conforme
<i>Staphylococcus aureus</i> Lot : B 3487	Limpide	Absence de croissance	Conforme
Témoin négatif	Limpide	Absence de croissance	Conforme

**Tableau 23 : Résultats obtenus pour l'essai de fertilité de la gélose XLD**

Nom de la souche	Nombre de colonies	Taux de recouvrement (%)	Spécification	Conformité du test
<i>Salmonella typhimurium</i> Lot : 3821	27	86.26	Colonies roses claires avec centre noir	Conforme
Témoin négatif	0	0	Absence	Conforme

### 3.3. Validation de la méthode de dénombrement en présence du produit

Pour valider la méthode de dénombrement, il faut que le taux de recouvrement de bactéries inoculés soit compris entre 50 et 200 %.<sup>21</sup>

L'équation 3, ci-dessous permet de calculer le taux de recouvrement du témoin positif :

$$\text{Taux de recouvrement (essai)} = \frac{(\text{Valeur du témoin positif})}{(\text{Nbr UFC BioBall}^{\circledR} \text{ du fournisseur})} * 100 \quad [\text{Eq. 3}]$$

L'équation 4 ci-après, permet de calculer le taux de recouvrement (%) de l'essai :

$$\text{Taux de recouvrement (essai)} = \frac{(\text{Valeur de l'Essai} - \text{Valeur du témoin négatif})}{(\text{Nbr UFC BioBall}^{\circledR} \text{ du témoin positif})} * 100 \quad [\text{Eq. 4}]$$

Un exemple de calcul du taux de recouvrement est donné à titre d'exemple à l'annexe 11. Les Tableaux 24 à 26 ci-après regroupent le nombre moyen d'UFC retrouvés dans chaque aliquot de 100 µL des BioBall<sup>®</sup> Multishot-550 et single-shot. Ces valeurs sont tirées des différents certificats d'analyses publiées par le fournisseur des BioBall<sup>®</sup>.

**Tableau 24 : Nombre d'UFC moyen par aliquot de 100 µL des différentes souches testées de BioBall<sup>®</sup> Multishot-550 (Lot : B3889)**

BioBall <sup>®</sup> Multishot-550 : nom de la souche Lot : B3889	Nombre d'UFC moyen pour un aliquot de 100 µL
<i>S. aureus</i>	49.8
<i>P. aeruginosa</i>	45.7
<i>E. coli</i>	47.3
<i>C. albicans</i>	47.3
<i>B. subtilis</i>	46.9
<i>A. brasiliensis</i>	50.0

**Tableau 35 : Nombre d'UFC moyen par aliquot de 100 µL des différentes souches testées de BioBall® Multishot-550 (Lot : B3909)**

BioBall® Multishot-550 : nom de la souche Lot : B3909	Nombre d'UFC moyen pour un aliquot de 100 µL
<i>S. aureus</i>	52.0
<i>P. aeruginosa</i>	49.2
<i>C. albicans</i>	47.3
<i>B. subtilis</i>	46.9
<i>A. brasiliensis</i>	48.4

**Tableau 46 : Nombre d'UFC moyen par BioBall® single-shot des différentes souches testées**

BioBall® single-shot : nom de la souche	Nombre d'UFC moyen pour une BioBall®
<i>C. albicans</i> (Lot : B3638)	28.2
<i>A. brasiliensis</i> (Lot : B3635)	29.0
<i>S. aureus</i> (Lot : B3709)	30.0
<i>P. aeruginosa</i> (B 3754)	28.4
<i>B. subtilis</i> (B 3427)	28.6

NB : les tests effectués avec les BioBalls® de 30 UFC sont suivis d'un astérisque.

- **Validation de l'Atropine Sulfate par la méthode d'ensemencement direct**

Les Tableaux 27 à 30 ci-dessous, regroupent les principaux résultats obtenus pour le témoin positif, l'essai (contamination en présence du produit) et le témoin négatif lors de l'applicabilité de la méthode pour le dénombrement de germes aérobies totaux et moisissures et levures pour l'Atropine Sulfate.

Le témoin positif a été réalisé une fois pour l'Atropine Sulfate, le Calcium Hydrogénophosphate et le Calcium Hydrogénophosphate après décontamination au four à micro-ondes.

**Tableau 27 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le Témoin positif par la méthode d'ensemencement direct. T= trouble, L= limpide**

Témoin positif	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	52.00	50.00	53.00	26.00	45.00
Gélose TSA 2	32.00	22.00	23.00	42.00	50.00
Moyenne	42.00	36.00	38.00	34.00	47.50
Taux de recouvrement %	<b>84.38</b>	<b>78.77</b>	<b>81.02</b>	<b>71.88</b>	<b>95.00</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	40.00	41.00
Gélose SDA 2	/	/	/	40.00	31.00
Moyenne	/	/	/	40.00	36.00
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>84.57</b>	<b>72.00</b>
Bouillon TSB	T.	T.	T.	/	/

**Tableau 28 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour l'essai (contamination en présence du produit) de l'Atropine Sulfate par la méthode d'ensemencement direct. T=trouble, L= limpide**

<b>Essai : contamination en présence du produit</b>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	25.00	3.00	30.00	13.00	30.00
Gélose TSA 2	41.00	22.00	12.00	13.00	12.00
Moyenne	33.00	12.50	21.00	13.00	21.00
Taux de recouvrement %	<b>78.57</b>	<b>34.72</b>	<b>55.26</b>	<b>38.24</b>	<b>44.21</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	26.00	32.00
Gélose SDA 2	/	/	/	42.00	38.00
Moyenne	/	/	/	34.00	35.00
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>85.00</b>	<b>97.22</b>
Bouillon TSB	T.	L.	T.	/	/

**Tableau 29 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le témoin négatif, représentatif de la biocharge initiale de l'Atropine Sulfate par la méthode d'ensemencement direct**

	TSA 1	TSA 2	Moyenne	SDA 1	SDA 2	Moyenne	Bouillon TSB
<b>Témoin négatif : charge initiale</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	Limpide

**Tableau 30 : Recherche de germes spécifiés dans le témoin positif, l'essai et le témoin négatif de l'Atropine Sulfate . T=trouble, L=limpide**

	<b>Bouillons</b>		<b>Géloses</b>		
	McC	RVS	McC	Chapman	XLD
<b>Témoin positif</b>	T.	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>	Présence Salmonelles
<b>Essai : contamination en présence du produit</b>	T.	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>	Présence Salmonelles
<b>Témoin négatif : charge initiale du produit</b>	L.	L.	Absence <i>E. coli</i>	Absence <i>S. aureus</i>	Absence Salmonelles

- **Validation du Calcium Hydrogénophosphate avant et après décontamination par la méthode d'ensemencement direct**

Les résultats obtenus pour l'essai (contamination en présence du produit) du Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté sans décontamination et après décontamination sont regroupés dans un tableau comparatif, figurant ci-dessous 31 (Tableau 31).

Les résultats pour le témoin négatif et la recherche de germes spécifiés sont présentés dans les Tableaux 32 et 33, ci-après.

**Tableau 31 : Dénombrement de DGAT et DMLT du Calcium Hydrogenophosphate (essai) avant et après décontamination (micro-ondes) par la méthode d'ensemencement direct. T=trouble, L=limpide**

<b>Essai :</b> contamination en présence du produit	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	39.00	0.00	3.00	38.00	13.00
Gélose TSA 2	40.00	1.00	16.00	11.00	3.00
Moyenne	39.50	0.50	9.50	24.50	8.00
Taux de recouvrement %	<b>94.05</b>	<b>1.38</b>	<b>25.00</b>	<b>72.06</b>	<b>16.84</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	50	50
Gélose SDA 2	/	/	/	50	50
Moyenne	/	/	/	50	50
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>105.71</b>	<b>100.00</b>
Bouillon TSB	T.	L.	T.	/	/
<b>Essai :</b> contamination en présence du produit (décontaminé)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	19.00	10.00	6.00	19.00	16.00
Gélose TSA 2	11.00	11.00	9.00	12.00	20.00
Moyenne	15.00	10.50	7.50	15.50	18.00
Taux de recouvrement %	<b>35.71</b>	<b>29.17</b>	<b>19.74</b>	<b>45.59</b>	<b>37.89</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	9.00	50.00
Gélose SDA 2	/	/	/	25.00	23.00
Moyenne	/	/	/	17.00	36.50
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>42.50</b>	<b>101.39</b>
Bouillon TSB	T.	L.	T.	/	/

**Tableau 32 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le témoin négatif, représentatif de la biocharge initiale du Calcium Hydrogenophosphate avant et après micro-ondes par la méthode d'ensemencement direct**

	<b>Témoin négatif</b> charge initiale (avant décontamination)	<b>Témoin négatif</b> charge initiale (après décontamination)
Gélose TSA 1	2	0
Gélose TSA 2	0	0
Moyenne	<b>1</b>	<b>0</b>
Gélose SDA 1	0	0
Gélose SDA 2	1	0
Moyenne	<b>0.5</b>	<b>0</b>
Bouillon TSB	Limpide	Limpide

**Tableau 33 : Recherche de germes spécifiés pour l'essai (contamination du produit) et le témoin négatif (biocharge initiale) avant et après du Calcium Hydrogenophosphate Dihydraté. T=trouble, L=limpide**

	Bouillons	Géloses	
	McC	McC	Chapman
<b>Essai</b> : contamination en présence du produit (avant décontamination)	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>
<b>Témoin négatif</b> : charge initiale (avant décontamination)	L.	Absence <i>E. coli</i>	Absence <i>S. aureus</i>
<b>Essai</b> : contamination en présence du produit (après décontamination)	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>
<b>Témoin négatif</b> : charge initiale (avant décontamination)	L.	Absence <i>E. coli</i>	Absence <i>S. aureus</i>

Ci-dessous, la Figure 4 illustre la recherche de germes spécifiés (*S.aureus*) dans le Calcium Hydrogénosphosphate Dihydraté par la méthode de l'isolement sélectif.



**Figure 4 : Calcium Hydrogénosphosphate (contamination en présence du produit à gauche) et (témoin positif à droite)**

Ci-dessous, la Figure 5 illustre la recherche de germes spécifiés (*E.coli*) dans le Calcium Hydrogénosphosphate Dihydraté en milieu Mac Conkey.



**Figure 5 : Calcium Hydrogénosphosphate (témoin positif à gauche), (contamination en présence du produit au centre) et (biocharge initiale à droite).**

- **Validation du Lactate de sodium par la méthode de filtration**

Les Tableaux 34 à 37 ci-dessous, présentent les principaux résultats obtenus pour le témoin positif, l'essai et le témoin négatif représentatif de la charge initiale de la matière première lors de la validation de la méthode du lactate de sodium.

**Tableau 34 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le Témoin positif par la méthode de filtration. T=trouble, L= limpide**

Témoin positif	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	33.00	25.00	33.00	20.00 *	20.00*
Taux de recouvrement %	<b>66.27</b>	<b>50.81</b>	<b>70.36</b>	<b>70.92</b>	<b>68.97</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	17.00 *	17.00 *
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>56.74</b>	<b>58.62</b>
Bouillon TSB	T.	T.	T.	/	/

**Tableau 35 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour l'essai (contamination du produit) pour le Lactate de Sodium par la méthode de filtration. T= trouble, L = limpide**

Essai : contamination en présence du produit	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	92.00	22.00	44.00	37.00*	6.00*
Taux de recouvrement %	<b>278.78</b>	<b>88.00</b>	<b>133.33</b>	<b>185.00</b>	<b>30.00</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	31.00*	50.00*
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>182.35</b>	<b>294.11</b>
Bouillon TSB	T.	T.	T.	/	/

**Tableau 36 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le témoin négatif, représentatif de la biocharge initiale du Lactate de Sodium par la méthode d'ensemencement direct**

	TSA 1	SDA 1	Bouillon TSB
<b>Témoin négatif : charge initiale</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>Limpide</b>

**Tableau 37 : Recherche de germes spécifiés dans le Lactate de Sodium pour le témoin positif, l'essai (contamination en présence du produit) et le témoin négatif (biocharge initiale). T= trouble, L= limpide**

	Bouillons	Géloses	
	McC	McC	Chapman
<b>Témoin positif</b>	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>
<b>Essai : contamination en présence du produit</b>	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>
<b>Témoin négatif charge initiale produit</b>	L.	Absence <i>E. coli</i>	Absence <i>S. aureus</i>

- **Validation du Sodium Thiosulfate par la méthode de filtration**

Les Tableaux 38 à 40 ci-dessous présentent les principaux résultats obtenus pour le témoin positif, l'essai et le témoin négatif représentatif de la charge initiale de la matière première lors de la validation de la méthode du Sodium Thiosulfate.

**Tableau 38 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour l'essai (contamination du produit) pour le Sodium Thiosulfate par la méthode de filtration. L= limpide, T=trouble**

<b>Essai :</b> contamination en présence du produit	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	0.00	30.00	27.00	34.00*	25.00*
Taux de recouvrement %	<b>0.00</b>	<b>120.00</b>	<b>81.82</b>	<b>170.00</b>	<b>125.00</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	39.00*	19.00 *
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>229.41</b>	<b>111.76</b>
Bouillon TSB	L.	T.	T.	/	/

**Tableau 39 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le témoin négatif, représentatif de la biocharge initiale du Sodium Thiosulfate par la méthode de filtration**

<b>Témoin négatif : (charge initiale)</b>	
Gélose TSA 1	<b>1</b>
Gélose SDA 1	<b>0</b>
Bouillon TSB	Limpide

**Tableau 40 : Recherche de germes spécifiés dans le Sodium Thiosulfate pour le témoin positif, l'essai (contamination en présence du produit) et le témoin négatif (biocharge initiale). T= trouble, L= limpide**

	<b>Bouillons</b>	<b>Géloses</b>	
	McC	McC	Chapman
<b>Essai :</b> contamination en présence du produit	T.	Présence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>
<b>Témoin négatif :</b> charge initiale	L.	Absence <i>E. coli</i>	Absence <i>S. aureus</i>

- **Validation du Benzoate de Sodium par la méthode de filtration avant et après neutralisations**

Les Tableaux 41 à 43 ci-dessous présentent les principaux résultats obtenus pour le témoin positif, le témoin négatif (avant et après neutralisation) représentatif de la charge initiale de la matière première et la recherche de germes spécifiés lors de la validation de la méthode du Benzoate de Sodium.

L'essai (contamination en présence du produit) figure dans le Tableau 44 comparant l'efficacité de neutralisation du Benzoate de Sodium par l'emploi Fluide A ou le Fluide D.

**Tableau 41 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le témoin positif (diluant = fluide D) pour le Benzoate de Sodium par la méthode de filtration. T= trouble, L = limpide**

Témoin positif : Fluide D	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	27.00*	24.00*	16.00*	20.00 *	24.00*
Taux de recouvrement %	<b>90.00</b>	<b>84.51</b>	<b>55.94</b>	<b>70.92</b>	<b>82.76</b>
Gélose SDA 1	/	/	/	20.00*	25.00*
Taux de recouvrement %	/	/	/	<b>70.92</b>	<b>86.21</b>
Bouillon TSB	T.	T.	T.	/	/

**Tableau 42 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour le témoin négatif, représentatif de la biocharge initiale du Benzoate de Sodium par la méthode de filtration**

	Témoin négatif : charge initiale (avant neutralisation)	Témoin négatif : charge initiale (après neutralisation)
Gélose TSA	0	0
Gélose SDA	0	0
Bouillon TSB	Limpide	Limpide

**Tableau 43 : Recherche de germes spécifiés dans le Benzoate de Sodium pour le témoin positif, l'essai (contamination en présence du produit) et le témoin négatif (biocharge initiale). T= trouble, L = limpide**

	Bouillons	Géloses	
	McC	McC	Chapman
<b>Essai</b> : contamination en présence de produit	L.	Absence <i>E. coli</i>	Présence <i>S. aureus</i>
<b>Témoin négatif</b> : charge initiale	L.	Absence <i>E. coli</i>	Absence <i>S. aureus</i>

**Tableau 44 : Dénombrement de DGAT et DMLT pour l'essai (contamination du produit) pour le Benzoate de Sodium avant et après neutralisation par la méthode de filtration. T= trouble, L = limpide**

<b>Essai</b> : contamination en présence du produit ( <b>fluide A</b> )	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	17.00	0.00	18.00	7.00 *	18.00 *
Taux de recouvrement %	51.52%	0.00	54.55	35.00	90.00
Gélose SDA 1	/	/	/	4.00 *	13.00 *
Taux de recouvrement %	/	/	/	23.53	76.47
Bouillon TSB	T.	T.	T.	/	/
<b>Essai</b> : contamination en présence du produit ( <b>fluide D</b> )	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Gélose TSA 1	40.00*	12.00*	14.00*	7.00*	21.00*
Taux de recouvrement %	148.15	50.00	87.50	35.00	87.50
Gélose SDA 1	/	/	/	2.00*	16.00*
Taux de recouvrement %	/	/	/	10.00	64.00
Bouillon TSB	T.	T.	T.	/	/

Ci-dessous, la Figure 6 illustre la croissance de *C. albicans* (témoin positif) sur gélose SDA par la méthode de filtration après neutralisation du Fluide D.



**Figure 6 : Témoin positif inoculé avec 30 UFC de *C. albicans* sur gélose SDA**

Ci-dessous, la Figure 7 illustre la croissance de *S.aureus* (témoin positif) sur gélose TSA.



**Figure 7 : Témoin positif inoculé avec le *S. aureus* sur gélose TSA**

Ci-dessous, la Figure 8 illustre la croissance de *S.aureus* (témoin positif) sur gélose TSA.



**Figure 8 : Essai (contamination en présence du produit) avec inoculation de *P.aeruginosa* sur gélose TSA par méthode de filtration du Sodium Benzoate (neutralisé par le Fluide D)**

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Mesure du taux d'endotoxines par la méthode Endosafe®-MCS™ Charles River

Les limites en endotoxines (EU/mg) pour certaines matières premières figurent dans l'USP.<sup>10</sup> Celles qui ne sont pas référencées doivent être calculées en fonction de la voie d'administration et de la dose journalière du patient. Cette limite dépend aussi du poids du patient (70 kg pour les adultes et 35 kg pour les enfants).

1. Les limites les plus basses fixées en endotoxines pour les matières premières étudiées sont les suivantes : Sodium Chlorure apyrogène 0.9 % (0.005 EU/mg) et 10 % (0.036 EU/mg). Le Sodium Thiosulfate (0.03 EU/mg), le Bicarbonate de Sodium (0.04 EU/mg) et le Benzoate de Sodium (0.03 EU/mg).
2. Les limites les plus hautes en endotoxines pour les matières premières étudiées sont les suivantes : Atropine Sulfate (55.60 EU/mg), Clonidine (16.50 EU/mg), Cuivre Gluconate à (32.67 EU/mg). La limite en endotoxines calculée pour la Clonidine est élevée, bien que le produit soit administré par voie intrathécale<sup>d</sup> mais la dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène (K) est basse avec pour valeur 0.2 UI par rapport à 5.0 UI pour la voie intraveineuse. Ceci exige des précautions particulières pour ce type de matière première.

Lors du contrôle du taux d'endotoxines, trois solutions ont été préparées. La répétition des prélèvements au sein de la même solution de matière première permettent de valider la répétabilité des résultats.

Parmi les matières premières étudiées, aucune n'excédait le seuil acceptable d'endotoxines. De ce fait, toutes les matières premières s'avèrent être conformes et ne présentent pas de danger potentiel pour le patient. Cependant, ces résultats ont été obtenus pour un lot donné de chaque matière première. Il faudrait effectuer de nouveaux tests d'endotoxines si les matières premières venaient à être commandées auprès d'autres fournisseurs car les résultats d'endotoxines pourraient varier.

Les critères opératoires à prendre en considération lors de l'analyse des endotoxines pour obtenir de bons résultats sont les suivants :

- L'eau « LAL » et les solutions à analyser doivent être préparées à température ambiante
- Une agitation au vortex est obligatoire pour éviter la sédimentation des endotoxines

L'avantage principal de la méthode MCS de Charles River est la rapidité du temps d'analyse (environ 15 min). Cette méthode permet aussi de limiter les erreurs opérationnelles, souvent rencontrées lors des tests préliminaires effectués dans la méthode traditionnelle du test de « LAL ». La méthode de Charles River possède également la particularité de répondre aux exigences éthiques en limitant l'emploi d'animaux.<sup>16,17</sup>

---

<sup>d</sup> USP Endotoxin Limits for Common Injectables [Internet]. [cité 28 février]  
Disponible sur : <http://www.bcis.gr/bcis/pdf/EndotoxinLimits.pdf>

L'apparition de facteurs d'interférence indique la limite principale de la méthode pour la recherche d'endotoxines dans les matières premières. Les facteurs d'interférence peuvent être corrigés par un ajustement de pH et de dilutions en série dans la majorité des cas.<sup>2</sup>

Un autre problème rencontré avec ce type de méthodes est que seule une partie des pyrogènes est détectable. Les germes pathogènes comme le *S. aureus* et le *P. aeruginosa* peuvent se trouver dans les matières premières hospitalière ont des toxines de nature non endotoxiniques. La présence de ce type de toxines est alors observée lors du contrôle de biocharges des matières premières.<sup>27</sup>

C'est pourquoi le contrôle des endotoxines et le contrôle de la biocharge est nécessaire pour établir la qualité microbiologique des matières premières.

Dans le futur, différents lots devraient être testés avec deux méthodes en parallèle (Charles River /Lonza) afin de comparer l'efficacité de chacune de ces méthodes.

#### **4.2 Contrôle de la biocharge des matières premières sélectionnées**

Le contrôle de la biocharge des matières premières non stériles est indispensable pour assurer l'absence de germes pathogènes qui peuvent être un danger potentiel pour le patient.<sup>13</sup> Une attention particulière doit être portée sur les matières premières pouvant être administrées par la suite à des patients à risque comme les immunodéprimés ou les enfants.

De manière générale, les résultats obtenus pour l'étude microbiologique des matières premières non stériles sont conformes, car aucun résultat ne s'écartait des limites fixées par la Ph. Eur.<sup>21</sup> Les plaques qui présentaient des résultats positifs ont toutes été identifiées<sup>28</sup> afin de pouvoir déceler l'éventuelle présence de germes pathogènes. Tous les tests d'identifications ont pu confirmer l'absence de germes pathogènes au sein des matières premières. L'interprétation et l'analyse s'est basée sur la liste tirée « de la Directive 2000/54/CE », qui regroupent les germes considérés comme pathogènes.

Les résultats les plus intéressants sont discutés ci-dessous :

L'Hydrochlorothiazide est une matière première employée dans la préparation d'une suspension orale employée couramment en pédiatrie. Les exigences de la Ph. Eur.<sup>21</sup> (monographie 5.1.4) demandent au maximum  $10^2$  DGAT,  $10^1$  DMLT et une absence d'*E.coli* pour ce type de préparation. Les résultats expérimentaux obtenus pour cette matière première sont les suivants : absence d'*E.coli*, une colonie sur gélose TSA ( $< 10^2$  DGAT) et aucune sur gélose SDA ( $< 10^1$  DMLT). Ces résultats respectent les exigences microbiologiques requises par la Ph. Eur. et sont donc conformes.

Le Sodium Bicarbonate est une matière première employée pour la fabrication de solution à usage buccal. La Ph. Eur. exige pour ce type de préparation une absence de germes spécifiés tels que le *P.aeruginosa*, le *S. aureus* et le *C. albicans* et un nombre de DGAT inférieur à  $10^2$  et DMLT  $< 10^1$ . Les résultats expérimentaux démontrent une absence de tout germe pathogène, dont le *P.aeruginosa*, dans cette matière première, ce qui est important notamment pour les patients immunodéprimés. En effet, la présence éventuelle de *P. aeruginosa* peut être source d'un réel danger, car elle peut induire de nombreuses infections (des pneumonies, des méningites...) qui peuvent être fatales chez les patients immunodéprimés.<sup>27</sup>

Le Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté était la matière première contenant le plus de germes. En effet, une colonie a été retrouvée sur chaque gélose de TSA et plusieurs colonies sur les deux géloses SDA (2 et 5 colonies). La biocharge élevée de cette matière première est liée à son mode de fabrication, dont la contamination intrinsèque est inévitable. Les tests d'identifications ont confirmé l'absence de germes pathogènes. Ces valeurs respectent les normes exigées par la Ph. Eur., ce qui signifie que la biocharge de cette matière première est conforme. Toutefois, étant donné que le Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté est susceptible d'être administré en néonatalogie ou en pédiatrie, des exigences plus strictes devraient être fixées pour cette matière première afin d'éviter tout risque de contamination pour le patient.<sup>21</sup> Des mesures ont déjà été mises en place par le Laboratoire pour la prise en charge de cette matière première suite à la découverte de la forte contamination de la biocharge ayant impliqué le rejet de plusieurs lots.

Suite à cela, des modifications ont dû être apportées au processus de fabrication pour valider les lots : une décontamination préalable de la matière première par un passage aux micro-ondes pendant 10 minutes est alors réalisée pour pallier à ce problème.

Ainsi, les lots des matières premières sélectionnées sont tous conformes et ne présentent pas de danger réel pour le patient. Comme certaines matières premières étaient parfois contaminées, des contrôles de routines de la biocharge devraient être effectués. De plus, il faudra aussi évaluer la reproductibilité de ces résultats en cas de changement de fournisseurs ou de lots.

#### **4.3 Essais de fertilité**

Lors de la réception d'un nouveau lot de milieu de culture, l'essai de fertilité doit être impérativement entrepris. C'est pourquoi, l'Atropine Sulfate requérant une recherche de Salmonelles, les milieux d'enrichissement ainsi que les géloses propices à la croissance de ces dernières ont dû être testés.<sup>21</sup>

La gélose XLD étant un milieu sélectif aux Salmonelles, le contrôle s'effectue en inoculant une souche dont le milieu permet la croissance et une autre qui est inhibée par le milieu étudié. Un nombre de 27 colonies roses claires avec centre noir ont été observées sur les géloses. Le taux de recouvrement calculé était de 86.26 %, ce qui est conforme aux normes exigées par la Ph.Eur. De plus, pour le test du témoin négatif, aucune croissance n'a été observée. Les géloses XLD sont considérées comme conformes.

Concernant les bouillons RVS, ces derniers deviennent troubles lors de l'ajout de Salmonelles, mais restent limpides en présence de *S. aureus*. Ce résultat est expliqué par le fait que le *S. aureus* possède des propriétés inhibitrices du milieu RVS.<sup>30</sup> Les bouillons sont donc conformes et peuvent être employés pour la validation de la méthode.

#### **4.4 Validation de la méthode de dénombrement en présence du produit**

Le but de cette étape est de pouvoir prouver l'applicabilité de la méthode employée pour le dénombrement de germes aérobies mésophiles totaux, moisissures/levures et germes spécifiés.<sup>21</sup>

La validation s'est effectuée sur seulement cinq matières premières parmi toutes celles testées en se basant sur les critères suivants :

- Matières premières inhibitrices : Lactate de Sodium, Sodium Thiosulfate et Benzoate de Sodium
- Matière première d'origine naturelle : Atropine Sulfate

- Matière première ayant une biocharge initiale plus élevée : Calcium Hydrogénophosphate dihydraté

Pour les autres matières premières testées lors de ce travail, les résultats peuvent être extrapolés en supposant que les matières premières, dont les propriétés physico-chimiques se rapprochent des matières premières validées dans cette étude, se comportent de la même manière.

Deux méthodes d'analyses décrites dans la Ph.Eur.<sup>21</sup> ont été testées : celle de l'ensemencement direct (Atropine Sulfate et Calcium Hydrogénophosphate dihydraté) et celle de la filtration (Lactate de Sodium, Sodium Thiosulfate et Benzoate de Sodium). L'efficacité de chacune des deux méthodes a été évaluée.

- **Validation de l'Atropine Sulfate par la méthode d'ensemencement direct**

La monographie « 5.1.4 » de la Ph. Eur.<sup>21</sup> exige pour les matières premières d'origine naturelle administrées par voie orale, une absence de Salmonelles, d'*E.coli*, de *S.aureus* et bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires.

Les résultats expérimentaux obtenus pour la validation de l'Atropine Sulfate par la méthode d'ensemencement direct sont les suivants :

- 1) Les taux de recouvrement obtenus pour les témoins positifs (tampon peptone-sel + tween 0.1 % avec la souche bactérienne inoculée) sont de : 84.38 % (*S. aureus*), 78.77 % (*P. aeruginosa*), 81.02 % (*B. subtilis*), 71.88 % (*C. albicans*) et 95.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 84.57 % (*C. albicans*) et 72.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Les taux de recouvrement sont conformes car ils sont compris entre 50 et 200%.
- 2) Les taux de recouvrement obtenus pour les essais (contamination en présence de l'Atropine Sulfate) sont de : 78.57 % (*S. aureus*), 34.72 % (*P. aeruginosa*), 55.26 % (*B. subtilis*), 38.24 % (*C. albicans*) et 44.21 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 85.00 % (*C. albicans*) et 97.22 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT.
  - a. L'Atropine Sulfate exerce un potentiel inhibiteur sur le *P. aeruginosa* (< 50 %) activité inhibitrice confirmée par la limpidité du bouillon TSB. Une recherche de *P. aeruginosa* par isolement sur gélose Cétrimide aurait pu être effectuée, afin de confirmer l'activité potentiellement inhibitrice de l'Atropine Sulfate sur le *P. aeruginosa*, car il s'agit d'une gélose spécifique à ce germe.
  - b. Les résultats obtenus pour le *C. albicans* et l'*A.brasiliensis* sur les géloses TSA laissaient penser à une inhibition de la croissance de ces germes. Les taux de recouvrement obtenus sur la gélose SDA sélective pour le *C. albicans* et de l'*A. brasiliensis* ont permis de prouver l'absence d'inhibition de la croissance de ces champignons et moisissures.
- 3) La biocharge initiale de l'Atropine Sulfate est nulle et dépourvue de germes pathogènes.

- **Validation du Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté**

Les résultats expérimentaux obtenus pour la validation du Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté (comparatif avant et après passage aux micro-ondes) par la méthode d'ensemencement direct sont les suivants :

- 1) La biocharge initiale du Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté obtenue est de :
  - a. Avant décontamination : une moyenne d'une colonie sur gélose TSA et 0.5 sur gélose SDA. Le bouillon TSB est limpide.
  - b. Après décontamination : aucune colonie n'est retrouvée ni sur gélose TSA ni sur gélose SDA. Le bouillon TSB est limpide.

2) Les taux de recouvrement obtenus pour les essais (contamination en présence du Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté) sont de :

- a. Avant décontamination : 94.05 % (*S. aureus*), 1.38 % (*P. aeruginosa*), 25.00 % (*B. subtilis*), 72.06 % (*C. albicans*) et 16.84 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 105.71 % (*C. albicans*) et 100.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Une inhibition du Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté pour le *P. aeruginosa* et le *B. subtilis* sont observées.
- b. Après décontamination : 35.71 % (*S. aureus*), 29.17 % (*P. aeruginosa*), 19.74 % (*B. subtilis*), 45.59 % (*C. albicans*) et 37.89 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 42.50 % (*C. albicans*) et 101.39 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT.

Une diminution des taux de recouvrement de tous les germes sauf pour l'*A. brasiliensis* est observée suite à la décontamination de la matière première aux micro-ondes. Les germes présents initialement dans la biocharge étant éliminés par le processus de décontamination aux micro-ondes, seuls les germes inoculés sont retrouvés dans l'essai de la matière première décontaminée aux micro-ondes,

Malgré cela, les taux de recouvrement retrouvés sont inférieurs aux normes exigées par la Ph Eur. Cela pourrait être expliqués par une potentielle activité inhibitrice du produit testé ou par des erreurs opératoires. Le Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté étant insoluble en solution aqueuse, il se pourrait que lors de l'inoculation de la souche de *P. aeruginosa*, celle-ci ait sédimenté au fond du flacon. Lors du prélèvement, une mauvaise homogénéisation de la poudre sédimentée pourrait fausser les résultats.

Une répétition des manipulations aurait dû être effectuée pour exclure les erreurs opératoires. Faute de temps, cela n'a pas pu être réalisé.

- **Validation du Lactate de Sodium par la méthode de filtration**

Les résultats expérimentaux obtenus pour la validation du Lactate de Sodium par la méthode de filtration sont les suivants :

- 1) Les taux de recouvrement obtenus pour les témoins positifs (tampon peptone avec la souche bactérienne inoculée) sont de : 66.27 % (*S. aureus*), 50.81 % (*P. aeruginosa*), 70.36 % (*B. subtilis*), 70.92 % (*C. albicans*) et 68.97 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 56.74 % (*C. albicans*) et 58.62 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Les taux de recouvrement sont conformes car ils sont compris entre 50 et 200%.

- 2) Les taux de recouvrement obtenus pour les essais (contamination en présence de Lactate de Sodium) sont de : 278.78 % (*S. aureus*), 88.00 % (*P. aeruginosa*), 133.33 % (*B. subtilis*), 185.00 % (*C. albicans*) et 30.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 182.35 % (*C. albicans*) et 294.11 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Et, une présence d'*E.coli*.
- a. Le Lactate de Sodium possède une propriété activatrice pour le *S. aureus*. Or, dans la littérature le Lactate de Sodium à une concentration de 5% exerce une inhibition sur le *S. aureus* et les Salmonelles qui peut être expliqué par le fait que ces bactéries produisent du Lactate à l'exception des *E. Coli* qui ne sont pas inhibées.<sup>26</sup> Le résultat obtenu dans le cadre de cette étude est en contradiction avec les résultats retrouvés dans la littérature. Cela pourrait être expliqué soit par la variation de température (hausse) dans l'un des incubateurs ayant boosté la croissance du *S. aureus*, soit à des erreurs de manipulation, notamment au niveau du volume inoculé. D'autre part, les concentrations en Lactate de Sodium utilisées dans le cas présent diffèrent de celles retrouvées dans la littérature (50 % contre 5 %), ce qui peut induire une variation des résultats.

L'action activatrice du Lactate de Sodium sur le *S.aureus* ne peut être confirmée par ces résultats. L'analyse devra être répétée en changeant le milieu testé : le milieu TAT<sup>e</sup> constitué de Tryptone, Azolectine et Tween pourrait être testé. Ce milieu est susceptible de neutraliser l'effet antimicrobien du Lactate de Sodium par la présence de Tween et de la Lécithine.

#### • Validation du Sodium Thiosulfate par la méthode de filtration

Les résultats expérimentaux obtenus pour la validation du Sodium Thiosulfate par la méthode de filtration sont les suivants :

- 1) Les taux de recouvrement obtenus pour les essais (contamination en présence de Sodium Thiosulfate) sont de : 0.00 % (*S. aureus*), 120.00 % (*P. aeruginosa*), 81.82 % (*B. subtilis*), 170.00 % (*C. albicans*) et 125.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 229.41 % (*C. albicans*) et 111.76 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Le Sodium Thiosulfate exerce une activité inhibitrice sur le *S.aureus*. La littérature cite une activité inhibitrice du Sodium Thiosulfate sur plusieurs variétés de *S. aureus* et de *Micrococcus*. Cette inhibition est dépendante du pH du milieu : lorsque le pH est bas, l'effet inhibiteur du Sodium Thiosulfate est plus important. En revanche, lorsque le pH est plus alcalin, l'effet inhibiteur du Sodium Thiosulfate est atténué. L'utilisation du tampon peptone contenant du Tween aurait pu peut-être permettre d'éliminer l'inhibition du *S. aureus*, car le Tween est connu pour ses propriétés neutralisantes.<sup>25</sup>
- 2) La biocharge initiale du Sodium Thiosulfate est d'une colonie sur gélose TSA et zéro colonie sur SDA. Il peut être conclu que le Sodium Thiosulfate possède une petite contamination initiale de sa biocharge.

---

<sup>e</sup> TAT BROTH MEDIA [Internet]. [cité 05 2017]

Disponible sur : [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/TATBroth.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/TATBroth.html)

- **Validation du Benzoate de Sodium par filtration**

Les résultats expérimentaux obtenus pour la validation du Benzoate de Sodium avant et après neutralisation sont les suivants :

- 1) Les taux de recouvrement obtenus pour les essais (contamination en présence de Benzoate de Sodium avant neutralisation) sont de : 51.52 % (*S. aureus*), 0.00 % (*P. aeruginosa*), 54.55 % (*B. subtilis*), 35.00 % (*C. albicans*) et 90.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 23.53 % (*C. albicans*) et 76.64 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Il est remarqué que le Benzoate de Sodium inhibe fortement le *P.aeruginosa* et le *C. albicans*. Une limpidité du bouillon TSB et l'absence d'*E.coli* est aussi observée. L'effet inhibiteur du Benzoate de sodium est confirmé par l'étude faite par *Stanojevic*<sup>24</sup>, qui démontre une activité inhibitrice de cette matière première. En effet, dans cette étude, les résultats indiquent que la CMI requise pour l'inhibition de *P. aeruginosa* et *E.coli* est de 5 mg/mL et 2.5 mg/ mL pour le *C.albicans*. Afin de pallier à cette inhibition, un autre fluide de rinçage que le fluide A (composé de Meat peptone) devrait être utilisé. Parmi les fluides de rinçage existants, le choix s'est porté sur le Fluide D (composé de Meat peptone et polysorbate 80), car il est connu pour neutraliser l'activité inhibitrice des antimicrobiens.<sup>f</sup>
- 2) Suite à l'utilisation du Fluide D, les taux de recouvrement obtenus pour les essais (contamination en présence de Benzoate de Sodium après neutralisation) sont de : 148.15 % (*S. aureus*), 50.00 % (*P. aeruginosa*), 87.50 % (*B. subtilis*), 35.00 % (*C. albicans*) et 87.50 % (*A. brasiliensis*) pour le DGAT, 10.00 % (*C. albicans*) et 64.00 % (*A. brasiliensis*) pour le DMLT. Ces résultats confirment que l'utilisation du Fluide D permet de neutraliser l'effet inhibiteur de la matière première pour le *P.aeruginosa*, car le taux de recouvrement est désormais conforme. Toutefois, l'utilisation du Fluide D ne permet pas d'éliminer l'inhibition du *C.albicans*. Des investigations supplémentaires pour éliminer cette inhibition devraient être entreprises.

---

<sup>f</sup> USP RINSING AND DILUTING FLUIDS [Internet]. [cité 06.2017]  
[https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/Fluids-RinsingDilutingUSP.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Fluids-RinsingDilutingUSP.htm)

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En premier lieu, l'objectif de ce travail était d'évaluer la quantité d'endotoxines présentes dans une liste de matières premières établies. Le choix des matières premières s'est basé sur les différentes utilisations à l'hôpital des matières premières (voies d'administration) et leurs propriétés physico-chimiques.

Lors de l'étude des endotoxines, chaque lot a été analysé trois fois afin de pouvoir assurer la répétabilité des résultats. Aucun lot ne présentait une quantité d'endotoxines non autorisée par les limites exigées par la Ph.Eur. Donc, selon les résultats obtenus la Pharmacie du CHUV peut employer en toute sécurité les matières premières étudiées pour la fabrication de préparations injectables ou solutions orales.

En second lieu, l'objectif de ce projet était de contrôler la biocharge des matières premières pour s'assurer l'absence de germes pathogènes. Cette étude a permis de mettre en évidence que certaines matières premières présentaient des faibles contaminations microbiennes mais aucun germe pathogène n'a été détecté. En s'appuyant sur les résultats obtenus, la Pharmacie du CHUV pourrait employer les matières premières étudiées en toute sécurité, sauf pour le Calcium Hydrogénophosphate dihydraté. Pour ce dernier, elle doit favoriser la décontamination microbienne de cette matière première par passage au four à micro-ondes pendant dix minutes avant son emploi.

En troisième lieu, une validation des méthodes employées a été effectuée afin de vérifier l'applicabilité de la méthode employée pour les contrôles microbiologiques. Les résultats obtenus ont démontrés que certaines matières premières analysées ont des propriétés physico-chimiques antimicrobiennes. Dans ce cas-ci, une neutralisation avant filtration de la matière première est indispensable. La méthode par filtration est préférée à chaque fois que cela est possible car elle permet d'affiner la justesse des résultats. Cependant, la validation n'a été effectuée seulement pour 5 matières premières. Toutes les validations des autres matières premières n'ont pas été effectuées. L'applicabilité de la méthode pour les autres matières premières ne peut donc être confirmée. Il faudrait à terme valider la méthode utilisée pour évaluer la biocharge des matières premières afin de garantir l'absence de facteurs d'interférences (inhibition/ activation).

Dans ce cas-ci, une neutralisation avant filtration de la matière première est indispensable. De surcroît, l'efficacité de la méthode par filtration devrait être préférée à chaque fois que cela est possible. Elle permet d'affiner la justesse des résultats.

Pour la mesure du taux d'endotoxine, l'alternative qui pourrait être envisagée est l'utilisation de la méthode Lonza qui présente l'avantage principal d'avoir une meilleure sensibilité par rapport à la méthode Charles River<sup>1-8,40-42</sup>. La comparaison des deux méthodes devra être faite afin de pouvoir déterminer quelle est la méthode la plus adaptée au contrôle qualité des matières premières examinées en routine.

Pour les contrôles microbiologiques des produits non stériles, le laboratoire de Contrôle Qualité pourrait par la suite envisager l'emploi de la méthode microbiologique alternative. Ces méthodes présentent l'avantage d'être plus rapides et moins lourdes par leur automatisation par rapport aux méthodes traditionnelles. L'exemple de l'emploi de la bioluminescence pourrait être cité pour améliorer l'efficacité des analyses.<sup>31</sup>

## 6. BIBLIOGRAPHIE

1. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Reviews*. **1995**;8(2):268–292.
2. FUSSELIER. Le test LAL, Guide pratique de la recherche et du dosage des endotoxines à l'aide du lysat d'amœbocytes de limule, rapport d'une commission SFSTP. S.T.P. Pharma pratiques, **1991**, vol.1
3. CHABY. Des endotoxines aux lipopolysaccharides. Lavoisier; **2010**. p.8-16
4. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: A brief review. *Virulence*. 1 janv **2014**;5(1):213.
5. Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* mai 1956;98(5):32551.
6. Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh.* 31 mars **1968**;19(1):18697.
7. Park C-Y, Jung S-H, Bak J-P, Lee S-S, Rhee D-K. Comparison of the rabbit pyrogen test and *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals*. 1 sept **2005**;33(3):14551.
8. Wang X, Quinn PJ. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Springer Science & Business Media; **2010**. p.419
9. Giannini TL, Teghanemt A, Zhang D, Esparza G, Yu L, Weiss J. Purified monomeric ligand MD-2 complexes reveal molecular and structural requirements for activation and antagonism of TLR4 by Gram-negative bacterial endotoxins. *Immunol Res*. **2014** Aug;59(0):3–11.
10. Pharmacopeia, U.S., *Chapters <85> Bacterial endotoxins test* T.U.S.P.t.N. 27, Editor. **2009**, United Book Press: Rockville.
11. Netgen. Traitement du choc septique par épuration extracorporelle de l'endotoxine circulante [Internet]. *Revue Médicale Suisse*. [cited 2017 Mar 15]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2013/RMS-N-410/Traitement-du-choc-septique-par-epuration-extracorporelle-de-l-endotoxine-circulante#B4>
12. Bühlmann X. Method for microbiological testing of nonsterile pharmaceuticals. *Applied microbiology*. **1968**;16(12):1919–1923.
13. Ratajczak M, Kubicka MM, Kamińska D, Sawicka P, Długaszewska J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2015** Jul;23(3):303–7.
14. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annual review of biochemistry*. **1990**;59(1):129–170.
15. Williams KL. *Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*. CRC Press; **2007**. 441
16. Gee AP, Sumstad D, Stanson J, Watson P, Proctor J, Kadidlo D, et al. A multicenter comparison study between the Endosafe® PTS™ rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. *Cytotherapy*. **2008**;10(4):427–435.
17. Charles River Laboratories Receives FDA Approval for Sale and Marketing of First Portable Endotoxin Test System, the Endosafe-PTS(TM); Breakthrough One-Button Technology Revolutionizes Endotoxin Detection. *Business Wire*. **2006**;1.
18. Trivalle C. Médicaments et ruptures de stock : il n'y a plus de laboratoire au numéro que vous avez demandé ! *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie*. **2014** Apr;14(80):61–2.
19. Astier A. Pour une stricte qualité des matières premières à usage pharmaceutique. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. **2008** Mar;66(2):69–70.
20. Échantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Étude bibliographique - Article de revue - INRS [Internet]. [cité 27 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ND%202170>
21. *Pharmacopée Européenne*. 9.0 ed; **2017**
22. BENATTIA FK. La qualité microbiologique des médicaments. [Internet]. **2014** [cité 15 juin 2017]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/5223>
23. THE SIGNIFICANCE OF SODIUM CHLORIDE IN STUDIES OF STAPHYLOCOCCI' GEORGE H. CHAPMAN Clinical Research Laboratory, 604 Fifth Avenue, Neo York 20, N. Y. Received for publication March 22, **1945**
24. Stanojevic D, Comic L, Stefanovic O, Solujic-Sukdolak S. Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulg J Agric Sci J*. **2009**;15(4):307–11.
25. Kayser A, van der Ploeg G. Growth Inhibition of Staphylococci by Sodium Thiosulphate. *Journal of Applied Bacteriology*. 1 août **1965**;28(2):286- 93.

26. Antimicrobial activity of sodium lactate - ScienceDirect [Internet]. [cité 10 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000209090017C?showall%3Dtrue%26via%3Dihub>
27. Gouvernement du Canada A de la santé publique du C. *P. aeruginosa* spp. - Fiches techniques santé-sécurité: agents pathogènes - Agence de la santé publique du Canada [Internet]. 2012 [cité 10 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/P.aeruginosa-spp-fra.php>
28. SÉQUENÇAGE DU GÈNE DE L'ARNr 16S: GATC Biotech [Internet]. [cité 10 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.gatc-biotech.com/fr/expertise/sequencage-cible/sequencage-du-gene-de-larnr-16s.html>
29. MacConkey Liquid Media [Internet]. [cité 10 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.teknova.com/category-s/503.htm>
30. Vassiliadis P. The Rappaport—Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. *Journal of Applied Bacteriology*. 1 févr 1983;54(1):6976.
31. PETAT (E.) et col, 1996, Les méthodes alternatives de contrôle microbiologique. Présentation des principales techniques rapides. Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma
32. Une injection d'endotoxine bactérienne comme facteur déclenchant d'un asthme éosinophilique - ScienceDirect [Internet]. [cité 16 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0761842515002284>

## 7. ANNEXES

ANNEXE 1 : Calculs pour la préparation des solutions aqueuses de matières premières

ANNEXE 2 : Mise en solution des matières premières

ANNEXE 3 : Calcul de la limite en Endotoxine et la dilution maximale significative

ANNEXE 4 : Dilutions des solutions mères

ANNEXE 5 : Résultats détaillés méthode MCS Charles River Endosafe®

ANNEXE 6 : Protocole contrôle microbiologique des produits non stériles et hydrosolubles

ANNEXE 7 : Protocole contrôle microbiologique produits non stériles et non filtrables

ANNEXE 8 : Protocole essai de fertilité

ANNEXE 9 : Validation de la méthode de dénombrement en présence de produit pour les germes aérobies totaux et les moisissures et levures

ANNEXE 10 : Exemple de calcul de conversion du nombre UFC/plaque en UFC/mL

ANNEXE 11 : Exemple de calcul du taux de recouvrement pour le témoin positif et l'essai (contamination en présence du produit)

## ANNEXE 1 : Calculs pour la préparation des solutions aqueuses de matières premières

### Exemples de calcul pour une matière première se trouvant sous forme de poudre :

- **Benzoate de sodium (100 mg/mL) :**

Formule de la concentration massique

$$C_m = \frac{m_{\text{soluté}}}{v_{\text{solution}}} \quad m_{\text{soluté}} = C_m * v_{\text{solution}}$$

Où  $C_m$  est la concentration massique en  $\frac{g}{L}$  ou  $\frac{mg}{mL}$

$m_{\text{soluté}}$  = masse du soluté en g ou mg

$v_{\text{solution}}$  = volume de la solution en L ou mL

Sachant que la concentration du produit fini est de  $100 \frac{mg}{mL}$

$$m_{\text{soluté}} = C_m * v_{\text{solution}}$$

$$v_{\text{solution}} = 100 \text{ mL}$$

$$m = 100 \frac{mg}{mL} * 100 \text{ mL} = 10'0000 \text{ mg}$$

**<=> 10.00 g, masse à peser pour une solution (Lot N°1)**

Autres exemples de calcul :

- **Cuivre Gluconate (2.86 mg/ mL)**

$$m_{\text{soluté}} = C_m * v_{\text{solution}}$$

$$v_{\text{solution}} = 100 \text{ mL}$$

Sachant que la concentration du produit fini de Cuivre est de  $0.40 \frac{mg}{mL}$ , la correspondance en cuivre gluconate est de :

$$63.546 \frac{g}{mol} \Rightarrow 0.40 \frac{mg}{mL}$$

$$453,841 \frac{g}{mol} \Rightarrow x \frac{mg}{mL}$$

$$x = \frac{\left( 0.40 \frac{mg}{mL} * 453.841 \frac{g}{mol} \right)}{63.546 \frac{g}{mol}} = 2.86 \frac{mg}{mL}$$

$$m = 2.86 \frac{mg}{mL} * 100 \text{ mL} = 286 \text{ mg}$$

<=> 0.286 g, masse à peser pour une solution (Lot N°1)

**Exemples de calcul pour une matière première liquide :**

- **Lactate de Sodium 50 % (1.283 mol/L)**

Sachant que la concentration du produit fini est à :  $1283 \frac{mmol}{L} = 1.283 \frac{mol}{L}$

$$C_m = C_n * MM$$

Où  $C_m$  est la concentration massique en  $\frac{g}{L}$  ou  $\frac{mg}{mL}$

$C_n$  est la concentration molaire en  $\frac{mol}{L}$

$MM$  est la masse molaire en  $\frac{g}{mol}$

$$C_m = 1.283 \frac{mol}{L} * 112.06 \frac{g}{mol} = 143.77 \frac{g}{L}$$

Formule de la dilution :  $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$

Où  $C_1$  correspond à la concentration initiale

$V_1$  au volume initial

$C_2$  à la concentration finale

$V_2$  au volume final

Sachant que

$$C_1 = 50 \% \Leftrightarrow 500 \frac{g}{L}$$

$$C_2 = 143.77 \frac{g}{L}$$

$$V_1 = x$$

$$V_2 = 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{143.77 \frac{g}{L} * 100 \text{ mL}}{500 \frac{g}{L}} = 28.75 \text{ mL}$$

Formule de la densité :  $\rho = \frac{m}{V}$        $m = \rho * V$

$$\rho \text{ à } 20^\circ\text{C}^g = 1.28 \frac{g}{\text{cm}^3} = 1.28 \frac{g}{\text{mL}}$$

---

<sup>g</sup> Caelo Natrium lacticum solutum 50 % [Internet]. [cité 27 février 2017]  
Disponible sur : <https://internet-apotheke-freiburg.de/shop/natrium-lacticum-2275965>

$$m = 28.75 \text{ mL} * 1.28 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = \mathbf{36.8 \text{ g}}$$
, masse à peser pour une solution (Lot N°1)

## **ANNEXE 2 : Mise en solution des matières premières**

- **Benzoate de Sodium Ph. Eur.**

- I. Placer un Falcon apyrogène de 250 mL sur une balance analytique
- II. Tarer la balance analytique
- III. Peser 10.00 g de calcium chlorure en utilisant une spatule stérile (autoclavées) ou spatule apyrogène
- IV. Add 100 mg d'eau ppi
- V. Impression du ticket de pesée
- VI. Impression des étiquettes pour chaque lot
- VII. Répéter l'opération deux fois en suivant le même procédé, pour avoir trois lots différents pour chaque matière première

### ANNEXE 3 : Calcul de la limite en Endotoxine et la dilution maximale significative

La majorité des limites en endotoxines sont spécifiées dans les monographies de la Ph. Eur.<sup>21</sup> Cependant il se peut, qu'aucune limite ne soit trouvée dans la littérature pour certaines matières premières, il est alors possible de la déterminer par calcul.

#### Exemples de calcul

- **Benzoate de Sodium**

La dose maximale recommandée pour le sodium Benzoate est de 12 g/j, elle a été déterminée à l'aide de la plateforme du référentiel des médicaments (REFMED).<sup>h</sup>

#### Calcul de la limite selon l'équation 1 :

Sachant que K en iv =  $5.0 \frac{UI}{Kg}$  ce qui correspond à  $5.0 \frac{EU}{Kg}$  (car EU = IU)

$$M = \frac{12000(mg)}{70(kg)} = 171.43 \frac{(mg)}{(kg)}$$

$$\text{Limite en Endotoxines : } \frac{\left( 5.0 \frac{(EU)}{(Kg)} \right)}{\left( 171.43 \frac{(mg)}{(Kg)} \right)} = 0.03 \frac{(EU)}{(mg)}$$

#### Calcul de la DMS selon l'équation 2 :

$$\text{DMS} = \frac{\left( 0.03 \frac{EU}{mg} \times 100.0 \frac{mg}{mL} \right)}{\left( 0.01 \frac{EU}{mL} \right)} = 300$$

Autres exemple :

- **Bicarbonate de Sodium**

Dose maximale :  $1.5 \frac{mmol}{kg}$

$$\Leftrightarrow 0.0015 \frac{mol}{kg}$$

$$n = \frac{m}{MM} \quad \Leftrightarrow \quad m = n * MM$$

<sup>h</sup> REFMED [Internet]. [cité 27 février 2017]  
Disponible sur : <https://refmed-consult.intranet.chuv/>

où  $n$  = nombre de mole en mol,  $m$  = masse en g et  $MM$  = masse molaire en  $\frac{g}{mol}$

$$m = 0.0015 \frac{mol}{kg} * 84.007 \frac{g}{mol} = 0.126 \frac{g}{Kg}$$

$$\Leftrightarrow 126 \frac{mg}{Kg}$$

$$\text{Limite en Endotoxines : } \frac{\left( 5.0 \frac{EU}{Kg} \right)}{\left( 126 \frac{mg}{Kg} \right)} = 0.04 \frac{(EU)}{(mg)}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left( 0.04 \frac{EU}{mg} * 84 \frac{mg}{mL} \right)}{\left( 0.005 \frac{EU}{mL} \right)} = 672$$

Autres exemples :

- **Sulfate de Magnésium Hepathydraté (100 mg/mL)**

Dose maximale : 1g sur une durée de 1-2h00 donc dose maximale totale = 2 g

$$M = \frac{2000mg}{70Kg} = 28.57 \frac{mg}{Kg}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left( 5.00 \frac{EU}{Kg} \right)}{\left( 28.57 \frac{mg}{Kg} \right)} = 0.18 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left( 0.18 \frac{EU}{mg} * 100 \frac{mg}{mL} \right)}{\left( 0.01 \frac{EU}{mL} \right)} = 1800$$

- **Sulfate de Magnésium Hepathydraté (48.00 mg/mL)**

$$100 \frac{mg}{mL} \Rightarrow 2g$$

$$48 \frac{mg}{mL} \Rightarrow x$$

$$x = \frac{\left(2g * 48 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(100 \frac{mg}{mL}\right)} = 0.96g \Leftrightarrow 960mg$$

$$M = \frac{960mg}{70Kg} = 13.71 \frac{mg}{Kg}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left(5.00 \frac{EU}{Kg}\right)}{\left(13.71 \frac{mg}{Kg}\right)} = 0.4 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(0.4 \frac{EU}{mg} * 48 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.05 \frac{EU}{mL}\right)} = 350.4$$

- **Sodium Chlorure 0.9 % apyrogène<sup>i</sup> :**

$$5 \frac{EU}{Kg} \Leftrightarrow 0.005 \frac{EU}{mg}$$

- **Sodium Chlorure 10 % apyrogène :**

$$9 \frac{mg}{mL} \Rightarrow 0.005 \frac{EU}{mg}$$

$$100 \frac{mg}{mL} \Rightarrow x$$

$$x = \frac{\left(0.005 \frac{EU}{mg} * 100 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(9 \frac{mg}{mL}\right)}$$

$$x = 0.055 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{Dose maximale : } 2 \frac{mmol}{Kg} \Leftrightarrow 0.002 \frac{mol}{L}$$

$$m = n * MM$$

---

<sup>i</sup> Simplified Endotoxin Test Method for Compounded Sterile Products [Internet]. [cité 27 février 2017] [http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc\\_en\\_r\\_simplified\\_endotoxin\\_test\\_method\\_for\\_compo.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc_en_r_simplified_endotoxin_test_method_for_compo.aspx)

$$m = 0.002 \frac{\text{mol}}{\text{kg}} * 74.55 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.1491 \frac{\text{g}}{\text{Kg}}$$

$$\frac{149.1 \text{mg}}{70 \text{Kg}} = 2.13 \frac{\text{mg}}{\text{Kg}}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left( 5.00 \frac{\text{EU}}{\text{Kg}} \right)}{\left( 2.13 \frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right)} = 2.35 \frac{\text{EU}}{\text{mg}}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left( 0.03 \frac{\text{EU}}{\text{mg}} * 74.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{\left( 0.005 \frac{\text{EU}}{\text{mL}} \right)} = 447$$

- **Chlorure de Calcium :**

Dose maximale : 441 mg de calcium chlorure pendant 3 min  
Dose maximale: 441 mg \* 3 min = 1323 mg

$$M = \frac{1323 \text{mg}}{70 \text{Kg}} = 18.9 \frac{\text{mg}}{\text{Kg}}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left( 5.00 \frac{\text{EU}}{\text{Kg}} \right)}{\left( 18.9 \frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right)} = 0.26 \frac{\text{EU}}{\text{mg}}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left( 0.26 \frac{\text{EU}}{\text{mg}} * 88.20 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}{\left( 0.005 \frac{\text{EU}}{\text{mL}} \right)} = 4586.4$$

- **Cuivre gluconate**

Dose maximale :  $1.5 \frac{\text{mg}}{\text{j}}$  pour le Cuivre<sup>j</sup>

$$63.546 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \Rightarrow 1.5 \frac{\text{mg}}{\text{j}}$$

$$453.841 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \Rightarrow x$$

<sup>j</sup> UpToDate® [Internet]. [cité 28 février 2017]  
<https://www.uptodate.com/contents/search>

$$x = \frac{\left(1.5 \frac{mg}{j} * 453.841 \frac{g}{mol}\right)}{63.546 \frac{g}{mol}} = 10.71 \frac{mg}{j} \text{ pour le Cuivre gluconate}$$

$$M = \frac{10.71 mg}{70 Kg} = 0.153 \frac{mg}{Kg}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left(5.00 \frac{EU}{Kg}\right)}{\left(0.153 \frac{mg}{Kg}\right)} = 32.67 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(32.67 \frac{EU}{mg} * 2.86 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.05 \frac{EU}{mL}\right)} = 1868.724$$

- **Atropine Sulfate**

$$\text{Limite en endotoxines : } 55.6 \frac{EU}{mg}^k$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(55.6 \frac{EU}{mg} * 0.5 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.05 \frac{EU}{mL}\right)} = 556$$

- **Clonidine Hydrochlorure**

$$\text{Limite en endotoxines }^h : 16.5 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(16.5 \frac{EU}{mg} * 1.2 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 3960$$

- **Lactate de Sodium**

$$\text{Limite en endotoxines }^{15} : 0.1 \frac{EU}{mg}$$

<sup>k</sup> USP Endotoxin Limits for Common Injectables [Internet]. [cité 28 février]  
Disponible sur : <http://www.bcis.gr/bcis/pdf/EndotoxinLimits.pdf>

$$\text{DMS} : \frac{\left(0.1 \frac{EU}{mg} * 143.77 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 2875.4$$

- **Sodium Thiosulfate**

Limite en endotoxines :  $0.03 \frac{EU}{mg}$  <sup>1</sup>

$$\text{DMS} : \frac{\left(0.03 \frac{EU}{mg} * 150 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 900$$

- **Morphine Chlorhydrate**

La dose maximale par jour est de<sup>m</sup> : 20 mg/j

$$M = \frac{20mg}{70Kg} = 0.28 \frac{mg}{Kg}$$

Limite en endotoxines :  $\frac{\left(0.2 \frac{EU}{Kg}\right)}{\left(0.28 \frac{mg}{Kg}\right)} = 0.71 \frac{EU}{mg}$

$$\text{DMS} : \frac{\left(0.71 \frac{EU}{mg} * 4 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 568$$

- **Hydrochlorothiazide**

Administré par voie orale le dosage pédiatrique est de : 100 mg/j (dans ce cas-ci la situation d'une administration par voie IV est simulée)

Sachant que le poids moyen d'un enfant est de 30 Kg environ

$$M = \frac{100mg}{35Kg} = 2.86 \frac{mg}{Kg}$$

---

<sup>1</sup> USP Endotoxin Limits for Common Injectables [Internet]. [cité 28 février]

Disponible sur : <http://www.bcis.gr/bcis/pdf/EndotoxinLimits.pdf>

<sup>m</sup> Simplified Endotoxin Test Method for Compounded Sterile Products [Internet]. [cité 28 février]

Disponible sur : [http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc\\_en\\_r\\_simplified\\_endotoxin\\_test\\_method\\_for\\_compo.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/qc_en_r_simplified_endotoxin_test_method_for_compo.aspx)

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left(5 \frac{EU}{Kg}\right)}{\left(2.86 \frac{mg}{Kg}\right)} = 1.75 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(0.71 \frac{EU}{mg} * 5 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 710$$

- **Phenobarbital**

$$M^n = 15 \frac{mg}{Kg}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left(5 \frac{EU}{Kg}\right)}{\left(15 \frac{mg}{Kg}\right)} = 0.33 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(0.33 \frac{EU}{mg} * 10 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 660$$

- **Calcium hydrogenophosphate**

$$M = \frac{2000mg}{70Kg} = 2.86 \frac{mg}{Kg}$$

$$\text{Limite en endotoxines : } \frac{\left(5 \frac{EU}{Kg}\right)}{\left(28.75 \frac{mg}{Kg}\right)} = 0.17 \frac{EU}{mg}$$

$$\text{DMS : } \frac{\left(0.17 \frac{EU}{mg} * 5 \frac{mg}{mL}\right)}{\left(0.005 \frac{EU}{mL}\right)} = 170$$

---

<sup>n</sup> UpToDate® [Internet]. [cité 28 février 2017]  
<https://www.uptodate.com/contents/search>

## **ANNEXE 4 : Dilutions des solutions mères**

Préparation d'une dilution **1 :10** => pour 1 échantillon

- I. Prélever 0.1 mL, soit 100 µL de la solution mère avec une micropipette munis de tips stériles
- II. Placer ce volume dans un tube apyrogène
- III. Compléter avec 900 µL d'eau de type « LAL »
- IV. Vortexer l'échantillon pendant 1 min
- V. Prélever 4\* 25 µL à placer dans les différents puits de la cartouche
- VI. Répéter l'opération pour 3 essais par lots, soit 9 essais par matières premières

Préparation d'une dilution **1 :100** => pour 1 échantillon

- I. Prélever 100 µL de la solution préparée au point III-IV
- II. Insérer ce volume dans un tube apyrogène
- III. Compléter avec 900 µL d'eau de type « LAL »
- IV. Vortexer l'échantillon pendant 1 min
- V. Prélever 4 \*25 µL à placer dans les différents puits
- VI. Répéter l'opération pour 3 essais par lots, soit 9 essais par matières premières

## ANNEXE 5 : Résultats détaillés méthode MCS Charles River Endosafe®

- Benzoate de Sodium (100 mg/mL)

Tableau A : Résultats détaillés endotoxines pour le Benzoate de Sodium. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite Endo.	Rec.	CV spike
1	A	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
	B	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
	C	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
2	A	1 :100	0.03	V.	<0.01	V.	V.
	B	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
	C	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
3	A	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
	B	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.
	C	1 :100	0.03	V.	<0.005	V.	V.

- Sulfate de magnésium heptahydraté (48 mg/mL)

Tableau B : Résultats détaillés endotoxines pour le Sulfate de magnésium (48 mg/mL). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite Endo	Rec.	CV spike
1	A	1 :1	0.4	V.	<0.005	V.	V.
	B	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.
	C	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.
2	A	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.
	B	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.
	C	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.
3	A	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.
	B	1 :1	0.4	V.	<0.00208	V.	V.
	C	1 :1	0.4	V.	<0.000208	V.	V.

- Sulfate de magnésium heptahydraté (100 mg/mL)

Tableau C : Résultats détaillés endotoxines pour le Sulfate de magnésium (100 mg/mL). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :10	0.18	V.	<0.0005	V.	V.
	B	1 :10	0.18	V.	<0.0005	V.	V.
	C	1 :10	0.18	V.	<0.0005	V.	V.
2	A	1 :10	0.18	V.	<0.0005	V.	V.
	B	1 :10	0.18	V.	<0.0005	V.	V.
	C	1 :10	0.18	V.	<0.0005	V.	V.
3	A	1 :10	0.18	V.	<0.005	V.	V.
	B	1 :10	0.18	V.	<0.005	V.	V.
	C	1 :10	0.18	V.	<0.005	V.	V.

- **Sodium bicarbonate (84 mg/mL)**

**Tableau D : Résultats détaillés endotoxines pour le Sulfate de magnésium (100 mg/mL). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :100	V.	<0.007143	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
2	A	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
3	A	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.005952	V.	V.	V.

- **Sodium thiosulfate (150 mg/mL)**

**Tableau E : Résultats détaillés endotoxines pour le Sodium Thiosulfate (100 mg/mL). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
2	A	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
3	A	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.003333	V.	V.	V.

- **Chlorure de potassium (74.5 mg/mL)**

**Tableau F : Résultats détaillés endotoxines pour le Sodium Thiosulfate (100 mg/mL). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
2	A	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
3	A	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.000671	V.	V.	V.

- **Cuivre gluconate (2.86 mg/mL)**

**Tableau G : Résultats détaillés endotoxines pour le Cuivre Gluconates. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
2	A	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
3	A	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<1.748252	V.	V.	V.

- **Clonidine Hydrochlorure (1.20 mg/mL)**

**Tableau H : Résultats détaillés endotoxines pour la Clonidine Hydrochlorure. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
2	A	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
3	A	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.041667	V.	V.	V.

- **Sodium lactate (1.283 mol/L)**

**Tableau I : Résultats détaillés endotoxines pour le Sodium Lactate. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
	B	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
	C	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
2	A	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
	B	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
	C	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
3	A	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
	B	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.
	C	0.1283	0.1	<0.038971	V.	V.	V.

- **Calcium Chlorure (88.20 mg/mL)**

**Tableau J : Résultats détaillés endotoxines pour le Calcium Chlorure. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :100	V.	<0.005669	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.005669	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	<0.005669	V.	V.	V.
2	A	1 :100	V.	<0.005669	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	<0.013605	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	0.005669	V.	V.	V.
3	A	1 :100	V.	0.005669	V.	V.	V.
	B	1 :100	V.	0.005669	V.	V.	V.
	C	1 :100	V.	0.006803	V.	V.	V.

- **Sodium Chlorure apyrogène (0.9 %)**

**Tableau K : Résultats détaillés endotoxines pour le Sodium apyrogène (0.9 %). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :1	V.	0.001889	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	0.001556	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	0.001556	V.	V.	V.
2	A	1 :1	V.	<0.000556	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	<0.000556	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	<0.000556	V.	V.	V.
3	A	1 :1	V.	0.003111	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	0.002222	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	0.001222	V.	V.	V.

- **Sodium Chlorure apyrogène (10 %)**

**Tableau L: Résultats détaillés endotoxines pour le Sodium Chlorure apyrogène (10%). E. = endotoxines, Rec. = recouvrement**

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
2	A	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
3	A	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.
	B	1 :10	V.	<0.0007	V.	V.	V.
	C	1 :10	V.	<0.0005	V.	V.	V.

- Atropine Sulfate (0.5 mg/mL)

Tableau M: Résultats détaillés endotoxines pour l'Atropine Sulfate. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
2	A	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
3	A	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	<0.1	V.	V.	V.

- Hydrochlorothiazide avant et après neutralisation (5 mg/mL)

Tableau N: Résultats détaillés endotoxines pour l'Hydrochlorothiazide. E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :1	V.	<0.001	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	<0.001	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	<0.001	V.	V.	V.
2	A	1 :1	V.	<0.001	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	<0.0012	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	<0.001	V.	V.	V.
3	A	1 :1	V.	<0.0014	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	0.0016	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	0.0012	V.	V.	V.
Solution (neut.)	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike
1	A	1 :1	V.	0.0036	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	0.0026	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	0.0026	V.	V.	V.
2	A	1 :1	V.	0.0152	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	0.0156	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	0.0156	V.	V.	V.
3	A	1 :1	V.	0.0138	V.	V.	V.
	B	1 :1	V.	0.0148	V.	V.	V.
	C	1 :1	V.	0.0158	V.	V.	V.

- Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté

Tableau O : Résultats détaillés endotoxines pour le Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté . E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike	
1	A	1 :1	0.18	V.	0.0026	V.	V.	V.
	B	1 :1	0.18	V.	0.0034	V.	V.	V.
	C	1 :1	0.18	V.	0.0028	V.	V.	V.
2	A	1 :1	0.18	V.	0.002	V.	V.	V.
	B	1 :1	0.18	V.	0.0024	V.	V.	V.
	C	1 :1	0.18	V.	0.0032	V.	V.	V.
3	A	1 :1	0.18	V.	0.0222	V.	V.	V.
	B	1 :1	0.18	V.	0.016	V.	V.	V.
	C	1 :1	0.18	V.	0.0372	V.	V.	V.

- Phenobarbital (après neutralisation)

Tableau O : Résultats détaillés endotoxines pour le Calcium Hydrogénophosphate Dihydraté . E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.	CV spike	
1	A	1 :1	0.5	V.	0.0014	V.	V.	V.
	B	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
	C	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
2	A	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
	B	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
	C	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
3	A	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
	B	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.
	C	1 :1	0.5	V.	<0.005	V.	V.	V.

- HCl 0.1 M et NaOH 0.1 M

Tableau P : Résultats détaillés endotoxines pour l'Acide Chlorhydrique et l'Hydroxyde de Sodium . E. = endotoxines, Rec. = recouvrement

Solution	Essai	Dilution	Limite E. EU/mg	CV ECH	Taux E. Eu/mg	Limite E.	Rec.
1	HCl	0.25	V.	0.163	V.	V.	V.
	NaOH	0.25	V.	0.144	V.	V.	V.

## ANNEXE 6 : Protocole contrôle microbiologique des produits non stériles et hydrosolubles

**Objet :** cette instruction définit la méthodologie pour le contrôle microbiologique des matières premières (produits non stériles) en se basant sur la **Pharmacopée Européenne 9.0** :  
**monographies** : « 2.6.12 », « 2.6.13 », « 5.1.4 » et « 5.1.8 ».

### Etape 1 : Dénombrement sur plaque par filtration DGAT et DMLT

-Toutes les étapes doivent être effectuées sous flux laminaire A, selon les BPF.

**Tableau Q : Matériel nécessaire pour la filtration**

<b>Matériel nécessaire pour la filtration</b>	
<b>Milieux de culture</b>	<b>2</b> Bouillons Trypticase Soja ( <b>TSB</b> ) 100mL <b>2</b> Bouillons Thioglycolate 100 mL <b>2</b> Géloses sabouraud-dextrose ( <b>SDA</b> ) milliflex (stockage à 2-8°C, au frigo) <b>2</b> Géloses trypticase soja ( <b>TSA</b> ) milliflex (stockage à 2-8°C, au frigo) <b>2</b> géloses trypticase soja ( <b>TSA</b> ) 30mL
<b>Tampons/fluides</b>	<b>2</b> Tampons peptone-sel stérile selon EP pH 7.00 100 mL pour la dilution et le témoin négatif <b>1</b> Flacon de fluide A 300mL <b>1</b> Flacon de 500 mL d'eau stérile (pour le rinçage de la pompe) <b>100 mL</b> de solution de javel à 250 ppm (pour le nettoyage de la pompe)
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	La pompe millipore déjà en place sous le flux A. <b>2</b> Seringue stérile de 10 mL (ou <b>1</b> Seringue stérile de 20 mL) <b>2</b> aiguilles (ou 1 si seringue de 20 mL) <b>5</b> Unités de filtration entonnoir Milliflex stérile de 100 mL Bouteille pour récupération des déchets liquides <b>Plusieurs</b> Lingettes alcoolisées <b>2</b> Pincettes stériles <b>1</b> Tête de pompe autoclavée ≤ 1 mois <b>1</b> paire de gants stériles <b>1</b> Paquet de Cotons secs stériles et distributeur d'alcool 70/30 stérile

### Mode opératoire étape 1 :

- I. Préparation de la solution S1 (dilution du produit 1/10) :**  
10 g de matière première (ou 10 mL s'il s'agit d'un liquide) ont été introduit dans 100 mL de tampon peptone-sel selon EP pH 7.00. Puis la solution a été agitée (S1).
- II. Préparation du Témoin négatif :**  
10 mL de tampon peptone-sel selon EP pH 7.00 ont été prélevé et transféré dans 100 mL de TSB. Le même procédé a été suivi pour le bouillon THIO.
- III. Préparation de l'Echantillon :**  
10 mL de la solution S1 ont été prélevé et transféré dans 100 mL de TSB. Le même procédé a été suivi pour le bouillon THIO.
- IV. Filtration sur pompe de l'échantillon :**
  - a.** La pompe a été allumée en mode manuel avec l'indication du volume actif

- b. Un filtre, puis un entonnoir Miliflex 100 ont été placés sur la pompe
- c. 10 mL de fluide A ont été filtrés
- d. 40 mL de la solution S1 a été filtrée
- e. La membrane a été transférée sur une gélose TSA Miliflex
- f. Les étapes a-d ont été répétées, puis la membrane a été transférée sur une gélose SAB Miliflex

**V. Filtration du Témoin négatif :**

- a. Un filtre, puis un entonnoir Miliflex 100 ont été placés sur la pompe
- b. 40 mL de tampon peptone-sel selon EP pH 7.00 a été filtré
- c. 40 mL de fluide A ont été filtrés
- d. La membrane a été transférée sur une gélose TSA Miliflex
- e. Les étapes a-c ont été répétées, puis la membrane a été transférée sur une gélose SAB Miliflex

**VI. Témoin de manipulation :**

Les empreintes de gants ont été prélevées sur milieu TSA afin d'écartier toute potentielle contamination éventuelle pouvant provenir de l'opérateur

**VI. Sanitizing de la pompe :**

La désinfection de la pompe doit être effectuée à chaque fin de session de travail.

**VII. Incubation des milieux :**

Les milieux ont été incubés selon les conditions suivantes :

Bouillon THIO : 30-35°C durant maximum 3 jours

Bouillon TSB : 30-35°C durant 18-24h00

Gélose TSA : 30-35°C durant 3 à 5 jours

Gélose SDA : 20-25°C durant 5 à 7 jours

Empreintes gants : 20-25°C durant 3 jours et 30-35°C durant 2 jours

**Etape 2 : Recherche de germes spécifiés**

**Tableau R : Matériel nécessaire pour la recherche de germes spécifiés**

<b>Matériel nécessaire pour la recherche de germes spécifiés</b>	
<b>Milieux de culture</b>	Bouillon TSB étape 1 bouillon Mac Conkey gélose Mac Conkey Bouillon Rappaport-Vassiliadis gélose Chapman gélose Xylose-lysine-désoxycholate 10ses stérile
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	seringues de 3 mL et aiguilles paire de gants stériles Cotons secs stériles et distributeur d'alcool

## **Mode opératoire :**

- **Recherche d'*E.coli* :**

- I. Le bouillon TSB a été homogénéisé (mélangé 4 à 5 fois)
- II. 1 mL de bouillon TSB a été prélevé puis transféré dans 100 mL de bouillon Mac Conkey
- III. Le bouillon Mac Conkey a été incubé pendant 24-48H à 42-44°C
- IV. Le bouillon Mac Conkey a été homogénéisé (mélangé 4 à 5 fois)
- V. Le bouillon Mac Conkey a été repiqué sur une gélose Mac Conkey
- VI. La gélose Mac Conkey a été incubée pendant 18-72 H à 30-35°C

- **Recherche de *S.aureus* :**

- I. Le bouillon TSB a été homogénéisé (mélangé 4 à 5 fois)
- II. Le bouillon TSB a été repiqué sur gélose Chapman
- III. La gélose Chapman a été incubée pendant 18-72 H à 30-35°C

- **Recherche de Salmonelles (produit naturel) :**

- I. 0.1 mL de Bouillon TSB a été transféré dans 10 mL de bouillon Rappaport-Vassiliadis
- II. Le bouillon Rappaport-Vassiliadis a été incubé pendant 18-24 H à 30-35°C
- III. Le bouillon a été repiqué sur gélose xylose-lysine-désoxycholate
- IV. La gélose a été incubée pendant 18-48h00 à 30-35°C

## ANNEXE 7 : Protocole contrôle microbiologique produits non stériles et non filtrables

Tableau S : Matériel nécessaire pour les produits non stériles et non filtrables

<b>MATERIEL</b>	
<b>Milieux de culture</b>	2 Bouillons <b>TSB</b> 100 mL 2 Bouillons <b>THIO</b> 100 mL
<b>Tampons/fluides</b>	3 géloses <b>SDA</b> 30 mL 5 géloses <b>TSA</b> 30 mL 1 tampon peptone-sel + <b>tween 0.1%</b> 90 mL
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	1 paire de gants stériles 2 seringues stériles de 20 mL 1 seringue stérile de 10 mL 1 seringue stérile de 3 mL 4 aiguilles 2 étaleurs stériles

### Mode opératoire ensemencement direct :

#### **I. Témoins négatifs :**

- a. 10 mL de tampon peptone-sel + tween 0.1 % ont été introduit dans 100 mL de TSB. Le même procédé a été suivi pour le bouillon THIO.
- b. 2 mL de tampon peptone-sel + tween 0.1 % ont été prélevé puis versé sur une gélose TSA et une gélose SDA et étalé au moyen d'un étaleur sur les différents milieux.

#### **III. Echantillons :**

- a. 10 g de matière première ont été introduits dans 100 mL dans le tampon pepton-sel + tween 0.1 % stérile (selon EP pH 7.00), solution S1.
- b. Si la matière première n'est présente qu'en trop petite quantité la prise d'échantillon peut être réduite à 1/100. Par exemple, le pot d'Atropine Sulfate pesant en tout 5 g, 0.1 g ont été introduits dans 10 mL de tampon pepton-sel+ tween 0.1% stérile (selon EP pH 7.00). Si la quantité le permet il serait préférable d'introduire 0.2 g dans 20 mL de tampon pepton-sel+ tween 0.1 % stérile (selon EP pH 7.00).
- c. 10 mL de la solution S1 ont été introduits dans 100 mL de tampon TSB. Puis le même procédé a été suivi pour le bouillon THIO. Si le lot est présent en petite quantité, 1 mL ont été introduits dans 9 mL de TSB. La même opération a été répétée pour le bouillon THIO.
- d. 5 mL de la solution S1 ont été prélevés et puis répartis à l'aide d'un étaleur à raison de 1 mL sur chaque gélose : 3 géloses TSA et 2 géloses SDA.
- e. Les géloses ont ensuite été laissées reposées pendant 10 min puis refermées.
- f. Les empreintes de gants ont été prélevées sur gélose TSA.

## ANNEXE 8 : Protocole essai de fertilité

Tableau T : Matériel nécessaire pour l'essai de fertilité

Matériel utilisé pour l'essai de fertilité	
Milieux de culture	2 géloses Xylose-lysine-désoxycholate 3 Bouillon Rappaport-Vassiliadis 2 Bioballs de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium ou <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Abony 1 Bioball de <i>Staphylococcus aureus</i>
Matériel usuel de laboratoire	1 Micropipette de 100 µL Tips 2 étaleurs NaCl 0.9 %

### Mode opératoire pour l'essai de fertilité :

L'essai de fertilité s'est effectué sous un PSM de type II, il doit être allumé 30 min avant son utilisation.

#### **I. Témoins négatifs**

- a. 100 µL d'eau stérile ou solution saline de 0.9% a été déposée sur une gélose Xylose-lysine-désoxycholate puis répartie au moyen d'un étaleur.
- b. Le bouillon Rappaport-Vassiliadis a été ouvert pendant 10 secondes puis refermé au bout de quelques instants.

#### **II. Bouillon Rappaport-Vassiliadis**

- a. *Pour tester la fertilité du milieu* : une bioball de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium ou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Abony a été introduite dans un bouillon Rappaport-Vassiliadis
- b. *Pour tester l'inhibition du milieu* : une bioball de *Staphylococcus aureus* a été introduite dans un bouillon Rappaport-Vassiliadis.
- c. Les bouillons ont été incubés en respectant les normes suivantes :
  - Pour *Salmonella Typhimurium* pendant 16-18 H à 30-35°C
  - Pour *Staphylococcus aureus* pendant 24-28 H à 30-35°C

#### **III. Gélose Xylose-lysine-désoychole**

- a. *Pour tester la fertilité et l'indication du milieu* : une bioball de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium ou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Abony a été déposée sur une gélose de Xylose-lysine-désoychole puis répartie au moyen d'un étaleur.
- b. Les géloses ont été incubées en respectant les conditions suivantes :
  - Gélose de xylose-lysine-désoychole : incubation à 30-35°C pendant 16-18H

## ANNEXE 9 : Validation de la méthode de dénombrement en présence de produit pour les germes aérobies totaux et les moisissures et levures

Le protocole a été établi en se référant à la monographie « 2.6.12 » de la Ph.Eur 9.0

L'étape de doit se faire entièrement sous flux laminaire de type PSM II.

Tableau U : Définitions

Définitions
<p><b>Témoin positif : diluant et la souche</b>  <b>Témoin négatif représentatif de la charge initiale: juste le produit, soit la matière première</b>  <b>Essai : le produit, soit la matière première et la souche</b></p> <p><b>Témoin négatif bouillon : Ouvrir le bouillon approprié puis les refermer après quelques instants</b>  <b>Témoin négatif gélose : Déposer sur une gélose appropriée une quantité de 100 µL d'eau stérile ou solution saline de 0.9 %, puis la répartir au moyen d'un étaleur</b></p>

La Ph. Eur. définit les différents milieux de cultures et conditions d'incubations pour les souches à tester lors de l'applicabilité de la méthode de dénombrement des germes aérobies totaux et moisissures et levures, retrouvé dans le Tableau V ci-dessous.

Tableau V: Conditions opératoires à respecter pour les différents microorganismes

<b>Applicabilité de la méthode de dénombrement en présence du produit</b>			
Microorganismes	Germes aérobies totaux		Moisissures et levures
	Gélose TSA	Bouillon TSB	Géloses SDA
<b><i>S. aureus</i></b> NCTC 10788 (ATCC 6538)	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 3 jours	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 3 jours	/
<b><i>P. aeruginosa</i></b> NCTC 12924 (ATCC 9027)	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 3 jours	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 3 jours	/
<b><i>B. subtilis</i></b> NCTC 10400 (ATCC 6633)	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 3 jours	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 3 jours	/
<b><i>C. albicans</i></b> NCPF 3179 (ATCC 10231)	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 5 jours	/	≤ 100 UFC à 20-25°C pendant ≤ 5 jours
<b><i>A. brasiliensis</i></b> NCPF 2275 (ATCC 16404)	≤ 100 UFC à 30-35°C pendant ≤ 5 jours	/	≤ 100 UFC à 20-25°C pendant ≤ 5 jours

## Mode opératoire pour les matières premières Hydrosolubles :

Tableau W : Matériel utilisé pour la méthode des matières premières filtrables

<b>Matériel utilisé pour la de la méthode des matières premières filtrables</b>	
<b>Milieux de culture</b>	2 géloses TSA miliflex 7 géloses SDA miliflex 6 bouillons TSB
<b>Tampons/fluides</b>	2 flacons de fluide A 300 mL 3 tampons peptone-sel selon EP pH 7.00 1 flacon de 500 mL d'eau stérile 1 flacon d'eau de Javel
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	Une tête de pompe autoclave $\leq$ 1 mois 1 Paquet de Cotons secs stériles et distributeur d'alcool 70/30 stérile 13 Unités de filtration entonnoir Milliflex stérile de 100 mL 3 seringues de 20 mL avec aiguilles Bouteille pour récupération des déchets liquides Plusieurs lingettes alcoolisées 1 paire de gants non stérile

Cette méthode s'applique aux matières premières filtrables, comme par exemple le Benzoate de Sodium, le Lactate de Sodium et le Sodium Thiosulfate.

### **I. Préparation de l'Essai**

- 10 g de matière première (ou 10 mL s'il s'agit d'un liquide) ont été introduits dans un tampon peptone –sel selon EP pH 7.00
- La solution a été bien agitée
- La solution a été aliquoter en cinq fois 20 mL et insérées dans chacun des tubes Falcon de 50 mL.

### **II . Préparation du Témoin négatif (représentatif de la charge initiale du produit)**

- 10 g de matière première (ou 10 mL s'il s'agit d'un liquide) ont été introduits dans un tampon peptone –sel selon EP pH 7.00
- La solution a été bien agitée
- La solution a été aliquoter en cinq fois 20 mL et insérées dans chacun des tubes Falcon de 50 mL.

### **III. Préparation du Témoin positif**

- Le tampon peptone-sel a été aliquoter en cinq fois 20 mL dans des tubes Falcon de 50 mL

### **IV . Inoculation des souches**

- Les souche ont été inoculées dans les Essais et les Témoins positifs en suivant les instructions présentées dans le Tableau V

### **V. Filtration sur membrane du Témoin négatif**

- Un filtre, puis un entonnoir Miliflex 100 ont été placés sur la pompe
- 10 mL de Fluide A a été filtré pour mouiller la membrane
- 10 mL du témoin négatif
- La membrane a été rincée en filtrant 40 mL de Fluide A
- La membrane a été transférée sur une gélose TSA Miliflex
- L'entonnoir ainsi que le filtré ont été enlevés
- Les étapes a-d ont été répétée puis la membrane a été transférée sur gélose SDA Miliflex

### **VI. Filtration sur membrane du Témoin positif**

- Un filtre, puis un entonnoir Miliflex 100 ont été placés sur la pompe
- 10 mL de Fluide A a été filtré pour mouiller la membrane

- c. 10 mL du Témoin positif
- d. La membrane a été rincée en filtrant 40 mL de Fluide A
- e. La membrane a été transférée sur une gélose TSA Miliflex
- f. L'entonnoir ainsi que le filtré ont été enlevés
- g. Les étapes a-d ont été répétées puis la membrane a été transférée sur gélose SDA Miliflex
- h. Les différentes étapes ont été répétées pour chacune des souches testées.

#### VII. Filtration sur membrane de l'Essai

- a. Un filtre, puis un entonnoir Miliflex 100 ont été placés sur la pompe
- b. 10 mL de Fluide A a été filtré pour mouiller la membrane
- c. 10 mL de l'Essai
- d. La membrane a été rincée en filtrant 40 mL de Fluide A
- e. La membrane a été transférée sur une gélose TSA Miliflex
- f. L'entonnoir ainsi que le filtré ont été enlevés
- g. Les étapes a-d ont été répétées puis la membrane a été transférée sur gélose SDA Miliflex
- h. Les différentes étapes ont été répétées pour chacune des souches testées.

#### VII. Interprétations des résultats

L'activité est inhibitrice si selon la Ph.Eur. le taux de recouvrement de l'Essai est réduit de plus d'un facteur deux par rapport au Témoin positif.

Dans ce cas-ci, l'activité inhibitrice de la matière première peut être neutralisée par les modifications suivantes :

- 1) Soit augmenter le volume du diluant ou celui du milieu de culture
- 2) En employant des agents neutralisants en respectant les directives ci-dessous :  
Si la substance interférente est de nature phénolique, alcool, aldéhydes et sorbate, neutraliser ces dernières par une dilution. Pour les autres types se référer : « au tableau 2.6.12-2- *Agents usuels de neutralisation des substances interférentes* » de la monographie 2.6.12 de la Ph.Eur
- 3) Une filtration sur membrane
- 4) Un mélange des solutions proposées ci-dessus

#### **Mode opératoire pour les matières premières non filtrables:**

Tableau X : Matériel utilisé pour la méthode des matières premières non filtrables

<b>Matériel utilisé pour la méthode des matières premières non filtrables</b>	
<b>Milieus de culture</b>	18 géloses TSA de 30 mL 10 géloses SDA de 30 mL 6 bouillons TSB
<b>Tampons/fluides</b>	3 tampons petpone-tween 0.1 %
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	14 seringues stériles de 3 mL avec aiguilles 14 étaleurs stériles 6 seringues stériles de 10 mL avec aiguilles

Cette méthode s'applique aux matières premières non filtrables, comme par exemple le Calcium Hydrogenophosphate dihydraté."

## I. Préparation de l'Essai

- a. 10 g de matière première (ou 10 mL s'il s'agit d'un liquide) ont été introduits dans un tampon peptone –sel +tween 0.1 % selon EP pH 7.00
- b. La solution a été bien agitée
- c. La solution a été aliquotée en cinq fois 20 mL et insérées dans chacun des tubes Falcon de 50 mL.
- d. Si la matière première a présente en trop petite quantité, le mode opératoire est le suivant : 0.1 g de matière première a été introduits dans 10 mL de tampon peptone-sel +tween 0.1 % stérile (selon EP pH 7.00) ou de préférence si c'est possible 0.2 g dans 20 mL de tampon peptone peptone-sel +tween 0.1 % stérile (selon EP pH 7.00).

## II . Préparation du Témoin négatif (représentatif de la charge initiale du produit)

- a. 10 g de matière première (ou 10 mL s'il s'agit d'un liquide) ont été introduits dans un tampon peptone –sel +tween 0.1 % selon EP pH 7.00
- b. La solution a été bien agitée
- c. La solution a été aliquotée en cinq fois 20 mL et insérées dans chacun des tubes Falcon de 50 mL.

## III. Préparation du Témoin positif

- a. Le tampon peptone-sel + tween 0.1 % a été aliquotée en cinq fois 20 mL dans des tubes Falcon de 50 mL

## IV . Inoculation des souches

- a. Les souche ont été inoculées dans les Essais et les Témoins positifs en suivant les instructions présentées dans le Tableau V

## V. Ensemencement direct de l'Essai

- a. 1 mL de l'Essai a été étalée sur une gélose de TSA
- b. L'opération a été répétée pour chacune des souches
- c. La même opération a été suivie pour les géloses SDA
- d. Les géloses sont incubées en respectant les normes établie dans le Tableau V

## VI. Interprétations des résultats

L'activité est inhibitrice si selon la Ph.Eur. le taux de recouvrement de l'Essai est réduit de plus d'un facteur deux par rapport au Témoin positif.

Dans ce cas-ci, l'activité inhibitrice de la matière première peut être neutralisée par les modifications suivantes :

- 1) Soit augmenter le volume du diluant ou celui du milieu de culture
- 2) En employant des agents neutralisants en respectant les directives ci- dessous :  
Si la substance interférente est de nature phénolique, alcool, aldéhydes et sorbate, neutraliser ces dernières par une dilution. Pour les autres types se référer : « au tableau 2.6.12-2- *Agents usuels de neutralisation des substances interférentes* » de la monographie 2.6.12 de la Ph.Eur<sup>55</sup>
- 3) Une filtration sur membrane
- 4) Un mélange des solutions proposées ci-dessus

## **Etape 7 : Applicabilité de la méthode pour la recherche de microorganismes spécifiques**

Le protocole a été établi en se référant à la monographie « 2.6.13 » de la Ph.Eur 9.0

L'étape doit se faire entièrement sous flux laminaire de type PSM II.

La souche de référence doit être ajoutée au moment du mélange dans le milieu prescrit et le nombre d'UFC de la souche ne doit pas excéder 100 UFC. Incuber les préparations pendant la durée minimale prescrite pour l'essai.

**Tableau Y : matériel utilisé pour la recherche de germes spécifiques ; *E.coli*, *S.aureus*, *P. aeruginosa* et Salmonelles**

<b>Matériel utilisé pour la recherche de germes spécifiques : <i>E.coli</i></b>	
<b>Milieus de culture</b>	3 géloses Mac Conkey
	3 bouillons TSB
	3 bouillons Mac Conkey
<b>Tampons/fluides</b>	3 tampons petpone-tween 0.1 %
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	14 seringues stériles de 3 mL avec aiguilles 14 étaleurs stériles 6 seringues stériles de 10 mL avec aiguilles

<b>Matériel utilisé pour la recherche de germes spécifiques : <i>S.aureus</i></b>	
<b>Milieus de culture</b>	3 géloses Chapman
	3 bouillons TSB
<b>Tampons/fluides</b>	3 tampons petpone-tween 0.1 %
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	14 seringues stériles de 3 mL avec aiguilles 14 étaleurs stériles 6 seringues stériles de 10 mL avec aiguilles

<b>Matériel utilisé pour la recherche de germes spécifiques : <i>P. aeruginosa</i></b>	
<b>Milieus de culture</b>	3 géloses Cétrimide
	3 bouillons TSB
<b>Tampons/fluides</b>	3 tampons petpone-tween 0.1 %
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	14 seringues stériles de 3 mL avec aiguilles 14 étaleurs stériles 6 seringues stériles de 10 mL avec aiguilles

<b>Matériel utilisé pour la recherche de germes spécifiques : Salmonelles</b>	
<b>Milieus de culture</b>	3 géloses Cétrimide
	3 bouillons TSB
<b>Tampons/fluides</b>	3 tampons petpone-tween 0.1 %
<b>Matériel usuel de laboratoire</b>	14 seringues stériles de 3 mL avec aiguilles 14 étaleurs stériles 6 seringues stériles de 10 mL avec aiguilles

- **Recherche d'*E.coli***

- I. 10 mL de l'Essai contenant la souche d'*E.coli* NCTC 12923 (ATCC 12923) a été transféré dans 100 mL de bouillon TSB
- II. Le bouillon TSB a été incubé pendant 18H à 30-35°C
- III. Puis 1mL de bouillon TSB a été ensemencé dans un bouillon Mac Conkey
- IV. Le bouillon Mac Conkey a été incubé pendant 18H à 30-35°C
- V. Les mêmes opérations ont été répétées pour le Témoin positif et le Témoin négatif (ne contenant pas la souche)

- **Recherche de *S. aureus***

- I. 10 mL de l'Essai contenant une souche de *S.aureus* NCTC 10788 (ATCC 6538) a été transféré dans 100 mL de bouillon TSB
- II. Le bouillon a été incubé pendant 18H à 30-35°C
- III. Le bouillon a ensuite été repiqué sur gélose Chapman
- IV. La gélose Chapman a été incubée pendant 18H à 30-35°C
- V. Les mêmes opérations ont été répétées pour le Témoin positif et le Témoin négatif (ne contenant pas la souche)

- **Recherche de *P.aeruginosa***

- I. 10 mL de l'Essai contenant une souche de *P. aeruginosa* NCTC 12924 (ATCC 9027) a été transféré dans 100 mL de bouillon TSB
- II. Le bouillon a été incubé pendant 18H à 30-35°C
- III. Le bouillon a ensuite été repiqué sur gélose Cétrimide pendant 18H à 30-35°C
- IV. Les mêmes opérations ont été répétées pour le Témoin positif et le Témoin négatif (ne contenant pas la souche)

- **Recherche de Salmonelles**

- I. 10 mL de l'Essai (d'au moins 10 g) contenant une souche de *Salmonella enterica* Typhimurium NCTC 12023 a été transféré dans 100 mL de bouillon TSB
- II. Le bouillon a été incubé pendant 18H à 30-35°C
- III. 0.1 mL a été transféré dans 9 mL de bouillon Rappaport-Vassiliadis
- IV. Le bouillon a été incubé pendant 18H à 30-35°C
- V. Les mêmes opérations ont été répétées pour le Témoin positif et le Témoin négatif (ne contenant pas la souche)
- VI. Le bouillon Rappaport-Vassiliadis a été repiqué sur une gélose XLD et incubée pendant 18H à 30-35°C

## ANNEXE 10 : Exemple de calcul de conversion du nombre UFC/plaque en UFC/mL

Si le nombre de colonies trouvées pour le sodium Thiosulfate pour les géloses SDA est de 3 UFC/plaque pour les convertir en UFC/mL, il faut effectuer le calcul suivant :

Sachant que 40 mL de la solution S1 a été filtrée, alors :

$$\begin{array}{l} 2 \text{ UFC} \rightarrow 40 \text{ mL} \\ X \rightarrow 100 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = \frac{(100\text{mL} * 3\text{UFC})}{(40\text{mL})} = 7.5\text{UFC}$$

Etant donné que 10 g de Matière première ont été mise dans 100 mL de TSB, il y a alors 7.5 UFC dans 10 g

$$\Rightarrow 0.75 \text{ UFC/g}$$

## ANNEXE 11 : Exemple de calcul du taux de recouvrement pour le témoin positif et l'essai (contamination en présence du produit)

Par exemple pour l'Atropine Sulfate, le nombre de colonies de *S. aureus* comptés sur gélose TSA pour le témoin positif est de : 40 colonies et la valeur du BioBall® est de 49.8.

Le taux de recouvrement pour le témoin positif se calcul en employant la formule ci-dessous :

Calcul du taux de recouvrement équation 3 et 4 :

$$\text{Taux de recouvrement (essai)} = \frac{(\text{Valeur du témoin positif})}{(\text{Nbr UFC BioBall}^{\circledR} \text{ du fournisseur})} * 100$$

Taux de recouvrement du témoin positif (*S.aureus*) :

$$\frac{40.00}{49.80} * 100 = 80.32 \%$$

Le taux de recouvrement pour l'essai contamination en présence du produit est calculé en employant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux de recouvrement (essai)} = \frac{(\text{Valeur de l'Essai} - \text{Valeur du témoin négatif})}{(\text{Nbr UFC BioBall}^{\circledR} \text{ du témoin positif})} * 100$$

Taux de recouvrement de l'essai (contamination en présence du produit) pour *S.aureus* :

$$\frac{(78.57 - 0.00)}{(49.40)} * 100 = 157.77 \%$$