

## INTRODUCTION

La PUI du Centre Hospitalier de Mayotte réalise des préparations hospitalières de collyres, à base d'excipients aqueux ou huileux. Ces collyres sont utilisés immédiatement après leur fabrication sur la foi d'une libération paramétrique, l'essai de stérilité prescrit par la pharmacopée européenne (PE) nécessitant jusqu'à 14 jours d'incubation. L'objectif de ce travail est de valider une technique rapide de contrôle de stérilité de ces collyres en utilisant la technologie Bactec® basée sur la Détection précoce de la Production de CO<sub>2</sub> (DPC) avec virage colorimétrique en cas de présence microbienne.

## MATERIEL ET METHODES

- Deux séries de préparations de collyres (9,9 mL/flacon, n=6/préparation) ont été réalisées dans des conditions aseptiques, sous hotte à flux laminaire, sans rajout de principes actifs : collyres aqueux (COA) à base de NaCl 0,9% et collyres huileux (COE) à base d'huile de ricin. L'expérimentation a été répétée en tout 3 fois.
- 6 microorganismes de référence ATCC recommandés par la PE ont été utilisés (billes déshydratées Bioball®, 550UFC/Unité): *Staphylococcus aureus* (G1), *Pseudomonas aeruginosa* (G2), *Clostridium sporogenes* (G3), *Bacillus subtilis* (G4), *Aspergillus brasiliensis* (G5) et *Candida albicans* (G6)
- Ces germes ont été mis en solution dans du NaCl 0,9%, ont été utilisés pour les études de validation. Les préparations ont été enrichies avec 100µL de chaque solution de germe de référence (concentration finale 1UFC/mL) et soumises à une homogénéisation par retournement pendant 1 minute.
- Des aliquots de 3mL de collyre (3UFC) ont été introduits dans 3 différents milieux DPC: BACTEC Peds (B1, milieu aérobique), BACTEC™ Plus Anaerobic (B2) et BACTEC Plastic Mycosis IC/F (B3, champignons filamenteux), puis mis en culture dans un incubateur BD Bactec Fx40 (figures 1 et 2). Des contrôles positifs et négatifs ont été utilisés dans chaque série d'expérimentations.
- Des aliquots identiques ont été mis en culture dans les milieux prescrits par la PE : bouillons Tryptone Soja (TSB) et au thioglycolate (TB). Pour les COE, des aliquots de 3mL ont bénéficié d'une filtration sur membrane 0,22µm (FM) puis transferts du filtre sur une gélose Count-tact®.
- Deux paramètres ont été évalués : détection ou non du germe (lecture sur 5 jours minimum) et temps pour obtenir un résultat positif (temps de détection ou TDD).

## RESULTATS ET DISCUSSION

- Les milieux B1 (Bactec PEDs) et B3 (Bactec Plastic Mycosis)° ont détecté tous les germes à l'exception de G3, germe anaérobie.
- G3 (*Clostridium sporogenes* anaérobie) a été difficilement détectable sur milieux conventionnels et par filtration stérilisante et a nécessité une incubation dans un générateur d'anaérobie. et en a été détecté facilement et rapidement avec le milieu B2 spécifiques aux anaérobies.

- Les milieux B1 et B3 ont permis de détecter, avec des célérités de détection différentes, tous les germes dans différentes matrices, à l'exception des germes anaérobies : nous retenons pour notre fonctionnement de routine, l'utilisation uniquement du milieu B1 pour détecter les germes aérobies et les champignons filamenteux tant avec les COA que les COE. Nous retenons le milieu B2 pour la recherche de germes anaérobies.
- La détection de tous les germes a été plus rapide avec la technique DPC, dans tous les cas <24h quelle que soit la matrice, avec des temps de détection allant de 7h02'±18' pour l'*Aspergillus* en milieux aqueux à 18h21'±29' pour le *Clostridium* en milieux huileux (cf tableau 1).
- Avec les techniques de référence de la pharmacopée européenne, la détection a nécessité entre 3 et 5 jours d'incubation pour avoir un résultat positif.

## CONCLUSION

La technologie Bactec® basée sur la détection précoce de la production de CO<sub>2</sub> a permis une détection rapide des germes de références présents dans les collyres, aqueux ou huileux, avec une limite de détection faible (1UFC/mL) et un faible nombre total d'UFC incubés (3 UFC).

Les performances de la technique sont meilleures que les techniques de référence de la pharmacopée européenne : rapide <24h, répétable, sensible et couvre l'ensemble des germes utilisés, ce qui permettra une libération sous 24h des préparations hospitalières de collyres.

		G1 <i>S. aureus</i>	G2 <i>P. aeruginosa</i>	G3 <i>C. sporogenes</i>	G4 <i>B. subtilis</i>	G5 <i>A. brasiliensis</i>	G6 <i>C. albicans</i>
BACTEC Peds	Aqueux	8h41	09h35	Négatif	7h58	21h56	12h31
	Huileux	9h17	10h55	Négatif	9h05	22h31	16h21
BACTEC™ Plus Anaerobic	Aqueux	8h47	10h32	17h16	Négatif	17h38	9h45
	Huileux	9h49	12h03	18h21	Négatif	19h35	13h45
BACTEC Plastic Mycosis IC/F	Aqueux	15h14	12h32	Négatif	7h51	7h02	7h19
	Huileux	18h21	12h48	Négatif	8h31	7h48	7h49

**Tableau 1 : Temps de détection moyen (n=3) de chacun des germes de références selon la nature de la matrice et le milieu de culture utilisé (écarts-types non affichés)**



**Figure 1: incubateur Bactec® FX 40**



**Figure 2: Milieux B1, B2 et B3 utilisés**