

Évaluation de la stérilité microbienne des formes pharmaceutiques au laboratoire national de la sante : cas des injectables et des collyres.**Evaluation of microbial sterility of pharmaceutical forms at the national health laboratory: case of injectables and eye drops.**

Garango.D¹, Ag Baraïka. M.^{2,3}, Dembélé. S¹, Kodio.O¹, Guindo.I^{2,3}, Bougoudogo.F²

¹Laboratoire National de la Santé, Mali.

²Faculté de Pharmacie, USTTB, Mali.

³Institut National de Santé Publique, Mali.

***Auteur correspondant :** Dr Diénéba, Garango Laboratoire National de la Santé, Bamako MALI ; mail : garango_dieneba@yahoo.fr ; BP : E 4559, Tél : 00223 20224770, 66783991/77868071.

Résumé

Objectif : Cette étude visait à réaliser des contrôles microbiologiques des médicaments sous forme de solutions et de collyre au Laboratoire National de la Santé. **Méthodologie :** Les échantillons analysés ont été obtenus à partir de la Direction de la Pharmacie et du Médicament (DPM) et chez 4 grossistes pharmaceutiques du Mali. Les médicaments sous formes injectables et les collyres ophtalmiques ont été retenus pour l'étude. Nous avons effectué les tests de stérilité par la méthode d'inoculation directe décrite dans les pharmacopées pour la pratique au laboratoire. L'étude a été réalisée de janvier 2020 à décembre 2022. **Résultats :** Le paramètre microbiologique effectué sur les échantillons a été le test de stérilité. Un total de 369 échantillons de médicaments (356 formes injectables et 13 collyres ophtalmiques) a été analysé avec un taux de conformité de plus de 97%. Les catégories de médicaments analysés étaient en grande partie des Dénominations Communes Internationales (DCI). Les génériques de marque et les DCI ont représenté un taux de non-conformité respectivement de 1,4% et 2%. Tous les collyres ophtalmiques ont été conformes, soit 100%. **Conclusion :** Les tests de stérilité demeurent essentiels pour garantir la qualité des produits pharmaceutiques mais aussi la sécurité du traitement et la prévention des risques liés à la contamination microbienne. Les collyres ophtalmiques (en flacons ou unidoses) étaient plus conformes que les formes injectables, les génériques de marque étaient aussi plus conformes que les DCI.

Mots clés : Médicaments ; Milieux de culture microbienne ; Souches microbiennes ; Test de stérilité ; qualité microbiologique ; Mali.

Abstract

Objective: This study aimed to carry out microbiological controls of medicines in the form of solutions and eye drops at the National Health Laboratory. **Methodology:** The samples analyzed were obtained from the Directorate of Pharmacy and Medicines (DPM) and from 4 pharmaceutical wholesalers in Mali. Injectable forms drugs and ophthalmic eye drops were selected for the study. Sterility test were carried out using direct inoculation method described in the pharmacopoeias for laboratory practice. The study was carried out from January 2020 to December 2022. **Results:** The microbiological parameter performed on the samples was the sterility test. A total of 369 drug samples (356 injectable forms and 13 ophthalmic eye drops) were analyzed, with a compliance rate of other 97%. Most of the drugs categories analyzed were International Common Denomination (INNs). Branded generics and INNs had a non-compliance rate of 1.4% and 2% respectively. All ophthalmic eye drops were 100% compliant. **Conclusion:** Sterility testing remains essential to ensure the quality of pharmaceutical product but also the safety of treatments and the prevention of risks linked to microbial contamination. Ophthalmic eye drops (bottles or single doses) were more compliant than injectable forms and branded generics were also more compliant than INNs.

Keywords: Drugs; Microbial culture media; Microbial strains; Microbiological quality; Sterility test; Mali.

INTRODUCTION

Les tests microbiologiques et en l'occurrence les tests de stérilité sont des étapes cruciales dans l'assurance qualité des produits pharmaceutiques [1]. La stérilité des produits sous formes injectables et des collyres ophtalmiques est essentielle en raison de leur administration dans les milieux sensibles, non seulement pour protéger la santé des patients, mais aussi pour répondre aux normes rigoureuses de l'industrie pharmaceutique et des autorités sanitaires [1]. Ces médicaments nécessitent une attention particulière afin de prévenir les risques d'infections graves et de garantir leur sécurité et leur efficacité. La contamination de ces produits pharmaceutiques par des micro-organismes indésirables constitue un risque majeur car elle peut avoir un impact sur la qualité des produits et la sécurité des patients. Les processus et procédures réglementaires comprennent diverses méthodes de contrôle de qualité décrites dans les Pharmacopées [1]. Actuellement, les tests de dénombrement microbien et la recherche de germes spécifiques d'une part, les tests de stérilité et la recherche d'endotoxine d'autre part sont recommandés selon que le produit pharmaceutique soit non-stérile ou stérile [2,3]. En Pologne une étude réalisée sur la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques non stériles a révélé la présence de microorganismes (champignons et microbes aérobies) dépassant les limites acceptables [4]. En Asie des études réalisées sur le contrôle de qualité microbiologique de certaines préparations couramment utilisées au Pakistan et au Bangladesh ont révélé une contamination microbienne dans toutes les formes galéniques à l'exception des crèmes et des gélules, tandis que les sirops étaient hautement contaminés. [5,6]. D'autres études ont fait état d'une contamination en Tanzani de produits pharmaceutiques distribués aux patients dans un hôpital tertiaire public. Dans cette étude, les contaminants prédominants étaient les genres *Klebsiella*, *Bacillus* et *Candida* [7]. Une contamination des produits au-delà des limites acceptables a également été rapportée dans des études menées ailleurs en Afrique notamment au Nigeria, en Égypte et au Ghana [8-10]. La qualité microbiologique des produits pharmaceutiques doit être évaluée comme une étape importante du contrôle de qualité, en particulier dans les pays en développement, où les conditions climatiques peuvent favoriser la

prolifération des micro-organismes dans les produits médicaux. Cette qualité microbiologique a été moins étudiée au Mali. C'est ainsi que nous nous sommes proposées de mener cette étude dont l'objectif principal était de réaliser des contrôles microbiologiques des médicaments par l'étude de la stérilité microbienne de ces derniers par des techniques appropriées.

MATERIEL ET METHODES

❖ Lieux, type et période de l'étude

C'est une étude prospective réalisée de janvier 2020 à décembre 2022 au Laboratoire National de la Santé. Les échantillons analysés ont été obtenus avec la Direction de la Pharmacie et du Médicament et 4 grossistes pharmaceutiques exerçant au Mali.

❖ Echantillon

Les échantillons étaient les préparations pharmaceutiques à usage parentérale et les collyres ophtalmiques. Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal. Ce sont des préparations injectables (petit volume), préparations injectables pour perfusion (grand volume), préparations à usage parentéral à diluer, poudres à usage parentéral et implants. Parmi les préparations injectables, différentes voies d'administration peuvent être utilisées : intraveineuse, intramusculaire, intradermique, sous cutanée, intra-artérielle et intraoculaire [11-13].

Les collyres ophtalmiques sont des solutions ou suspensions stériles, aqueuses ou huileuses contenant un ou plusieurs principes actifs et destinés à l'instillation oculaire. Les récipients se présentent en uni dose ou multi dose. Ces solutions doivent être non seulement stériles, mais aussi apyrogènes [14,15].

❖ Réactifs de microbiologie

Souches de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19404 et *Candida albicans* ATCC 10231.

Milieux de culture : les milieux utilisés étaient le bouillon thioglycollate (THIO) pour la recherche des bactéries aérobies et anaérobies et le bouillon trypticase soja (TSB) pour la recherche des bactéries aérobies, des levures et des moisissures.

Environnement de culture : laboratoire de microbiologie avec un poste de sécurité microbiologique (PSM Bio II ADVANCE) et incubateur de marque MEMMERT

❖ Échantillonnage

Grossistes : 4 grossistes pharmaceutiques du Mali ont été sélectionnés au hasard et codifiés de G1 à G4.

Taille et échantillonnage des collyres et préparations pharmaceutiques :

La taille de nos échantillons à analyser a été déterminée par la formule de Schwartz selon laquelle : $n = t^2 (1-p)/c^2 = (1,96 \times 1,96) \times 0,4(1-0,4) / (0,5 \times 0,5) = 368,79$

où **n**= taille de l'échantillon nominal pour l'obtention des résultats significatifs ; **t**= niveau de confiance (la valeur de niveau de confiance de 95% sera 1,96 et **p**= 4% (proportion estimée de la population qui représente la caractérisation [16].

Ainsi un total de 369 échantillons de médicaments a été analysés. Les échantillons ont été prélevés au hasard chez les grossistes pharmaceutiques, 10 unités d'un même lot pour les médicaments formes injectables et 5 flacons d'un même lot pour les collyres ophtalmiques.

❖ Méthodes microbiologiques

Tests de stérilité :

Les tests de stérilité ont été réalisés selon le chapitre « 71 » de la pharmacopée américaine [USP « 71 »]. Les tests ont été effectués par la méthode d'inoculation directe. Nous avons d'abord confirmé la stérilité des milieux de culture avant le test.

Tests d'aptitudes de la croissance microbienne :

Pour les tests d'aptitudes de la croissance microbienne et la validation de la méthode, nous avons utilisé 3 souches microbiennes de référence sus mentionnées. Les milieux de culture utilisés étaient le bouillon thioglycollate (THIO) pour la recherche des bactéries aérobies et anaérobies et le bouillon trypticase soja (TSB) pour la recherche des bactéries aérobies et des levures et des moisissures.

Condition de culture :

Introduction directe de l'échantillon dans le bouillon THIO et incubation à 30 °C pendant 14 jours,

Introduction directe de l'échantillon dans le bouillon TSB et incubation à 25 °C pendant 14 jours.

Nous avons incubé des témoins THIO et TSB dans les mêmes conditions que les échantillons. Les cultures huileuses ont été agitées doucement chaque jour sauf pour les milieux de détection des bactéries anaérobies stricts afin de maintenir les conditions d'anaérobiose [17,18].

Après 14 jours d'incubation, nous avons procédé à la lecture des cultures à l'œil nu en commençant par les contrôles négatifs puis les cultures des échantillons. Les cultures huileuses ont été agitées doucement chaque jour sauf pour les milieux de détection des bactéries anaérobies stricts afin de maintenir les conditions d'anaérobiose. La lecture consistait à détecter une turbidité dans les cultures, effet de la croissance microbienne. L'observation macroscopique est essentielle pour la détection d'une prolifération microbienne à savoir un trouble, un dépôt ou une voile. S'il n'y a aucune manifestation de croissance microbienne le produit à examiner satisfait à l'essai de stérilité. S'il existe une preuve de prolifération microbienne, le produit ne satisfait pas l'essai de stérilité, dans ce cas procéder à des isollements et une identification du germe en cause et refaire l'essai.

❖ Critères de validation

- Les milieux ne doivent présenter aucun développement microbien
- La croissance des micro-organismes ensemencés doit être précoce et abondante.
- La croissance microbienne doit être précoce et abondante, en présence et en absence de produit à examiner donc ce dernier ne possède pas un effet antimicrobien.

❖ Critères de conformité et de reprise de test

Critères de conformité

- Absence de bactéries aérobies
- Absence de bactéries anaérobies
- Absence de levures et moisissures

Critères de reprise de test

Première répétition de l'essai

Le nombre de d'échantillons choisis à examiner est le même que celui indiqué pour le premier essai. Si aucune manifestation microbienne n'est décelée le produit est conforme. S'il y a une prolifération une deuxième répétition de l'essai s'impose.

Deuxième répétition

- Prélever un nombre d'échantillon double que celui qui a été utilisé dans le premier essai et première répétition de l'essai.
- S'il n'y a aucune prolifération microbienne le produit est conforme.

S'il y a une prolifération le produit est déclaré non conforme.

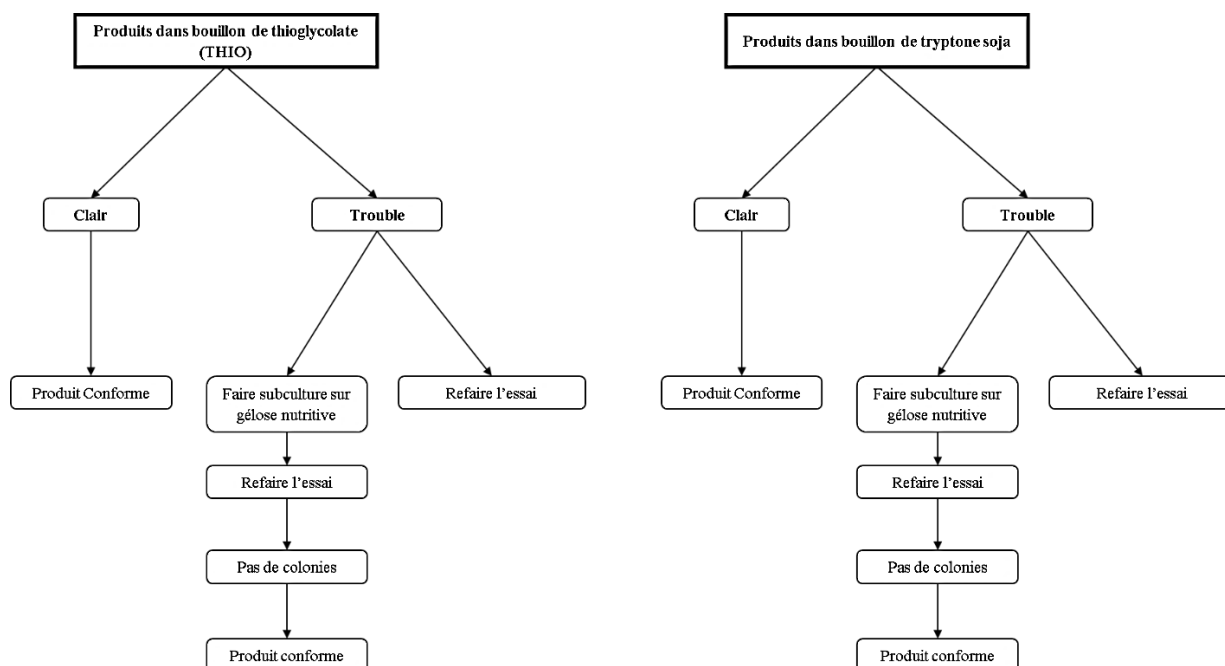


Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'essai de stérilité

RESULTATS

L'étude a été réalisée de janvier 2020 à décembre 2022 au Laboratoire National de la Santé. Les analyses ont été effectuées sur les échantillons collectés auprès de quatre grossistes pharmaceutiques et de la DPM. La grande majorité des échantillons provenait de l'Inde (Tableau I).

Tableau I : Nombre d'échantillons selon les pays de provenance (G)

Pays de provenance	Nombre d'échantillons	Pourcentage (%)
Inde	204	55,28
Chine	45	12,20
Mali	36	9,76
Allemagne	15	4,06
France	12	3,25
Ghana	09	2,44
Autres*	48	13,01
Total	369	100

*Autres : Togo (4), Tunisie (3), Suisse (2), Malawi (3), Ladví (4), Grèce (1), Espagne (1), Egypte (1), Émirats Arabes Unis (4), Grande Bretagne (2), Néant 23.

Les médicaments sous forme injectable étaient au nombre de 356 contre 13 collyres ophtalmiques. Sur les 369 échantillons de médicaments analysés le taux de conformité a été de 97,8 % (Tableau III).

La grande majorité des échantillons était ceux du grossiste G4 soit 79,40 %. (Tableau II). Les collyres ophtalmiques ont été conformes à 100% (Tableau III). Le taux de conformité des génériques de marque était supérieur à celui des produits sous Dénominations Communes

Internationales (DCI). Le taux de conformité des échantillons était supérieur à 97% chez tous les grossistes (Tableau II).

Tableau II : Nombre d'échantillons selon les grossistes (G)

Site de prélèvement	Nombre d'échantillons	Pourcentage (%)
G 4	293	79,4
G 1	33	8,9
G 2	23	6,2
G 5	12	3,3
G 3	8	2,2
Total	369	100

Tableau III : Taux de conformité selon les formes galéniques

Formes galéniques	Nombre d'éch analysés	Nombre d'éch conformes	Taux de conformité (%)
Médicaments injectables	356	348	97,8
Collyres ophtalmiques	13	13	100
Total	369	361	97,8

Tableau IV : Taux de non-conformité des échantillons selon les catégories de médicaments

Catégories de médicaments	Nombre d'éch analysés	Nombre d'éch non conforme	Taux de non-conformité (%)
DCI	361	7	1,9
Générique de marque	68	1	1,4
Total	369	8	2

DISCUSSION

Les pharmacopées attestent la stérilité des médicaments sous formes injectables et des collyres ophtalmiques à 100% [17,18]. Dans notre étude, le test de stérilité a été réalisé sur deux formes galéniques, les formes injectables et les collyres ophtalmiques avec un taux de conformité de plus de 97%. La stérilité des collyres ophtalmiques a été prouvée à 100%. Les études réalisées par Ould *et al* en 2009 et par Benattia en 2012 en Algérie ont révélé que les produits sous formes injectables étaient tous conformes (aucune croissance microbienne). Les études faites par Mersellab *et al* en 2015 en Algérie sur une solution injectable « Clofenal 75 mg/3mL » ont été aussi conformes au test de stérilité [1, 19-20]. Cette différence observée entre notre étude et les études réalisées dans d'autres pays pourrait s'expliquer par l'environnement dans lequel le test a été réalisé. Une autre étude réalisée par Salem *et al.* en Egypte sur la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques non stériles a révélé que sur 182 échantillons testés, (17,03 %) et (19,23 %) avaient respectivement dépassé les limites maximales acceptables du nombre total de microbes aérobies et du nombre total de levures et de moisissures [9]. Les médicaments analysés au cours de notre étude étaient en grande partie des DCI avec un taux de non-conformité de 2%. Les génériques de marque avaient aussi fait l'objet d'étude et étaient plus conformes que les DCI (Tableau V).

CONCLUSION

La conformité microbiologique des médicaments sous forme de solutions injectables et des collyres ophtalmiques a été évaluée au cours de cette étude. Les tests de stérilité, conformément aux normes internationales permettent de prévenir les risques d'infections graves et de complications liées à la contamination microbienne. Le taux de conformité obtenu au cours de cette étude est en faveur de la protection de la population car les produits testés répondent aux exigences

de qualité et de sécurité, indispensables à leur efficacité thérapeutique et leur innocuité. Il conviendrait d'étendre cette étude au dénombrement et à la recherche de germes spécifiques d'une gamme plus large de médicaments s'assurer de leur qualité et innocuité.

Conflit d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Remerciements

Nous remercions tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, plus particulièrement les grossistes pharmaceutiques (publics et privés), mais aussi la Direction de la Pharmacie et du Médicament, le Laboratoire National de la Santé et l'Institut National de Santé Publique.

REFERENCES

1. Benattia FK, Kajima J, Bendiabdallah D, Bedjaoui L, Arrar Z, Chikh D. La qualité microbiologique des médicaments [mémoire de fin d'études]. Oran (Algérie) : Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Faculté des Technologies, Département de chimie ; 2012 [consulté le 30 nov 2020]. Disponible sur : http://dSPACE.univtlemcen.dz/bitstream/112/5223/1/La_qualite_microbiologique_des_medicaments
2. United States Pharmacopeia (USP 2024). PPT : Microbiological tests, chapitre <61>, Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Tests [en ligne]. [Consulté le 3 mars 2023]. Disponible sur : <https://www.uspnf.com>
3. Sallade E, Grimes D, Jeng L, MacEwan MR. Antimicrobial effectiveness testing of resorbable electrospun fiber matrix per United States Pharmacopeia (USP) <51>. *Cureus*. 2023;15(12):e50055.doi:10.7759/cureus.50055 [consulté le 30 janv 2022].le 30 janvier 2022.
4. Ratajczak M, Kubicka MM, Kamińska D, Sawicka P, Długaszewska J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharm J*. 2015; 23(3):303-7.
5. Noor R, Zerine N, Das KK. Microbiological quality of pharmaceutical products in Bangladesh: current research perspective. *Asian Pac J Trop Dis*. 2015 ;5(4):264-70.
6. Rauf A, Erum A, Noreen S, Shujaat J, Ashraf M, Afreen S. Microbiological quality control of some non-sterile preparations commonly used in Pakistan. *Pak J Pharm Sci*. 2018 ;31:1237-42.

7. Myemba D, Bwire G, Sangeda R. Microbiological quality of selected local and imported non-sterile pharmaceutical products in Dar es Salaam, Tanzania. *Infect Drug Resist.* 2022;15:2021-34.
8. Adeshina GO, Ajayi S, Onaolapo JA. Microbiological quality of some commercially available paediatric antimalarial and cough preparations in Ilorin, Nigeria. *Niger J Pharm Sci.* 2009 ;8(1):109-17.
9. Salem NMA, Elbarrawy MA, Azzam NFAEM. Microbiological quality of non-sterile pharmaceuticals in Egypt. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* 2021 ;10(1):38.
10. Frimpong G, Ofori-Kwakye K, Kuntworbe N, Buabeng KO, Osei YA, Boakye-Gyasi ME, et al. Quality assessment of some essential children's medicines sold in licensed outlets in Ashanti Region, Ghana. *J Trop Med.* 2018.
11. Organisation mondiale de la Santé (OMS). Liste modèle des médicaments essentiels [en ligne]. Genève : OMS ; 2020 [consulté le 27 févr 2020]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news/item/>
12. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Pharmacopée européenne, monographie « Préparations parentérales ». Vol. 1. Strasbourg : EDQM ; 2011. p. 790-3.
13. Boudier Y. Qualification d'un système de production et de distribution d'eau pour préparations injectables [mémoire de master]. Toulouse : Université Toulouse III Paul Sabatier ; 2014 [consulté le 30 sept 2022].
14. Bencherchali S. Les formes pharmaceutiques, module de pharmacologie [en ligne]. 2006 [consulté le 20 mars 2020]. Disponible sur : <https://studylibfr.com>
15. Castella I, Bouchoud L, Kastli L, Zoe L, Bonnabry P. Évaluation du niveau d'asepsie lors de la reconstitution et de la préparation de médicaments injectables en unité de soins. Genève : Université de Lausanne, École de pharmacie ; 2011 [consulté le 20 avr 2021].
16. Giezendanner FD. Taille d'un échantillon aléatoire et marge d'erreur – Ici et là [en ligne]. 2012 [consulté le 2 août 2019]. Disponible sur : https://icietla-ge.ch/voir/IMG/pdf/taille-d_un-echantillon-aleatoire-et-marge-d_erreur-cms-spip.pdf
17. United States Pharmacopeia (USP 2024). PPT : Microbiological tests, chapitre 71, Sterility Tests [en ligne]. [consulté le 10 mars 2020]. Disponible sur : <https://www.uspnf.com>
18. Pharmacopée européenne 11.0. Chapitre 2.6.1 : Stérilité. Strasbourg : EDQM ; 2020. p. 221-30 [consulté le 10 mars 2020]. Disponible sur : <https://www.edqm.eu>
19. Ould Bah ML, Tahiri N. Le contrôle de la qualité des médicaments : les solutés injectables (Prixicam 20 mg, Saidal-Algérie) [mémoire de fin d'études]. Jijel (Algérie) : Université de Jijel, Faculté des Sciences Exactes et SNV, Département de biologie moléculaire et cellulaire ; s.d. [consulté le 15 mai 2021]. Disponible sur : <https://theses-algerie.com>
20. Mersellab, M. S, Angoud, H., Bouras, H., Guetarni, H., Mahi, M., Mostefa, S. F. Contrôle physico chimique, microbiologique et toxicologique d'une solution injectable clofenal 75mg/3 mL. Université de Djilali Département de biologie, Bounama, Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre. 2014. <https://fr.scrib.com/document/memoire> Consulté le 24 mai 2021.