

# REVIEW ARTICLE

## LA STÉRILISATION DES SOLUTIONS INJECTABLES

PAR MARCEL GUILLOT, DOCTEUR ÈS SCIENCES

*Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Paris*

*Pharmacien de l'Hôpital Broussais*

LA préparation de liquides injectables stériles ne semblait pas poser, il y a une trentaine d'années, de problèmes scientifiques très difficiles. Mais à mesure que l'emploi en thérapeutique de substances chimiques de plus en plus fragiles s'est généralisé, il a fallu renoncer à employer dans tous les cas des méthodes de stérilisation par la chaleur considérées comme sûres. Il n'est donc pas sans intérêt de jeter un coup d'œil général sur l'évolution historique des interprétations théoriques de la stérilisation, et sur les modifications des techniques pratiques qui en ont résulté dans les quatre-vingts dernières années. Nous verrons ensuite quelles sont les positions officielles adoptées par les dernières Pharmacopées britannique, américaine et française, et comment la notion de stérilité des solutés injectables se présente à l'heure actuelle.

### I. THÉORIES GÉNÉRALES DE LA STÉRILISATION ET APPLICATION AU CAS DES SOLUTÉS.

1. *La chaleur*.—Les premiers chercheurs dans ce domaine avaient en vue, à la fois, un problème théorique très général : celui de l'origine de la vie, et un problème pratique : celui de la conservation des liquides riches en matières organiques, tels que les sucres de plantes (obtenus par pression de la plante fraîche), ou les infusions de plantes sèches. C'est au XVIII<sup>ème</sup> siècle qu'ont été faites les découvertes fondamentales, en particulier celle de Spallanzani<sup>1</sup>, qui établit le premier, d'une manière indiscutable, qu'une infusion végétale était rapidement envahie par de petits organismes vivants quand elle n'avait pas été chauffée, tandis que les êtres vivants n'apparaissaient pas quand l'ensemble du vase scellé contenant l'infusion avait été porté à la température de l'ébullition. Plus tard, le français Appert<sup>2</sup> généralisait cette conclusion en mettant au point un procédé de préparation de conserves alimentaires stérilisées par chauffage au voisinage de 100°C. Mais c'est seulement Pasteur qui a élucidé d'une manière complète le mécanisme de ce phénomène, au cours de ses recherches célèbres sur l'inexistence de la génération spontanée. Pasteur<sup>3</sup> a établi en effet plusieurs faits très importants : 1°) Un liquide organique porté à une température suffisante en vase clos, demeure ensuite indéfiniment limpide, aucun germe vivant ne se développant dans le milieu. 2°) S'il est mis en contact, après chauffage, avec de l'air, il y a contamination par des germes vivants existant en suspension dans l'atmosphère, mais cette contamination est évitée à la condition d'établir la communication avec l'air par l'intermédiaire d'un tube capillaire très long et recourbé. Ce n'est pas le contact de l'air qui provoque la contamination, mais le contact de germes en suspension dans l'air.

Une autre notion fondamentale est celle de la distinction entre les conditions de destruction par la chaleur des formes végétatives des bactéries (rapidement détruites au voisinage de 60°C.) et les spores bactériennes beaucoup plus résistantes, détruites seulement par un chauffage à l'autoclave aux environs de 120°C. C'est Tyndall<sup>4</sup> qui a constaté l'insuffisance du chauffage à l'ébullition, même prolongé, vis-à-vis de certaines spores. Il a également eu le mérite de montrer qu'on disposait d'un autre moyen pour les détruire. On peut en effet : ou bien maintenir pendant plusieurs heures la température aux environs de 100°C.—et la destruction peut alors être effectuée en une seule opération—ou bien effectuer cinq chauffages à 100°C. d'une minute par exemple chacun, avec des intervalles de 24 heures entre deux chauffages consécutifs, et l'effet obtenu est sensiblement le même.

Cette méthode de chauffage discontinu, qui a reçu le nom de "tyndallisation," pose l'un des problèmes les plus surprenants de la biologie. En effet, l'explication qu'avait donnée Tyndall lui-même de l'efficacité de la méthode—explication qui est devenue tout de suite classique et qui continue d'être admise par de nombreux auteurs, même aujourd'hui—était la suivante : Dans l'intervalle de deux chauffages, la spore bactérienne donnerait naissance à une forme végétative et deviendrait, à ce moment, vulnérable. Elle pourrait donc être facilement détruite lors d'un chauffage ultérieur. En répétant plusieurs fois l'opération, on finirait par détruire, au moment où elles prennent la forme végétative, toutes les bactéries issues de spores. C'est Duclaux<sup>5</sup> qui a mis en doute cette interprétation. Il a, en effet, maintenu à *la glacière* le liquide, dans l'intervalle de chauffages consécutifs. Il est évident que, dans ces conditions, aucun développement bactérien ne peut avoir lieu, et que les spores ne peuvent donner naissance à des formes végétatives. Cependant, d'après Duclaux, la tyndallisation reste efficace même dans ce cas. On serait donc conduit à admettre, comme l'a fait Duclaux, que c'est bien la *discontinuité* du chauffage qui, par un mécanisme entièrement inconnu, permet la destruction de la spore.

Les techniques de la stérilisation par la chaleur se sont précisées entre 1880 et 1900, et elles découlent directement des travaux précédents. 1°) Stérilisation par chauffage à l'autoclave après purge d'air pendant un temps qui dépend de la nature du liquide et de la température adoptée (en général : 110°, 115° ou 120°C.). Nous reviendrons plus loin sur ce point. 2°) Tyndallisation en trois opérations de 10 minutes à une heure chacune, avec 24 heures d'intervalle. La température adoptée dépend de la fragilité des substances existant en solution. La température minimum utilisable est de 56°C.; chaque fois qu'on le peut, on opère à 70° ou 80°C.

Précisons maintenant la relation entre durée de chauffage et température. Il est tout à fait important d'insister sur le fait qu'il n'existe pas une température critique mortelle caractérisant chaque espèce bactérienne. En réalité, le phénomène semble être soumis, au moins en première approximation, au calcul des probabilités, c'est-à-dire qu'à une certaine température, et dans un certain milieu chimique, une bactérie

déterminée, sous forme végétative, aurait une certaine *probabilité* d'être détruite, en un temps d'une seconde par exemple. Pour préciser les données numériques, on admettra donc que la destruction est totale quand il ne reste plus, en moyenne, qu'une bactérie par litre (ou par mètre cube) par exemple. La vérification de cette proportion moyenne de survie après stérilisation est en réalité *impossible*, et on admet couramment que la stérilisation est complète quand on a chauffé, par exemple 5 minutes à 60°C., une émulsion de *B. typhosum*<sup>14</sup>, tandis que pour le bacille thermophile, il faudrait envisager un chauffage de même durée à 150°C. Enfin, pour ce dernier germe, la variation du temps de chauffage nécessaire avec la température suit une loi différente<sup>15</sup>, comme

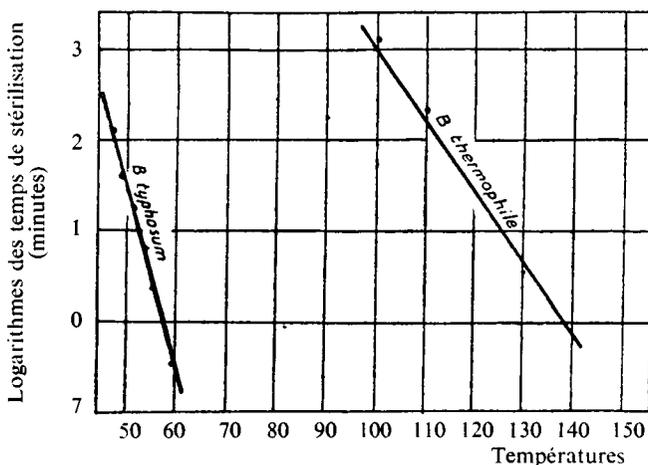


FIG. 1.—Relation entre la durée de stérilisation à l'autoclave et la température.

l'indique la Fig. 1, sur laquelle on voit que le temps de chauffage doit varier beaucoup plus quand on passe de 60° à 50°C. pour *B. typhosum*, que quand on passe de 140° à 130°C. pour le bacille thermophile. On a d'ailleurs trop souvent tendance à penser qu'une diminution de 10°C. dans la température de chauffage pourra être compensée par une légère augmentation de durée de stérilisation, alors qu'en réalité la durée doit être multipliée par 6 ou 7 aux environs de 115°C. pour des bactéries sporulées.

2. *Les rayonnements.*—Dans les plus anciens des travaux, on avait tendance à rechercher quelle était, pour une certaine culture et une certaine source de rayonnement, la durée d'irradiation qui amenait la mort de tous les organismes de la culture. On parlait donc de "dose létale" ou de "dose de stérilisation." Quand on a pu travailler dans des conditions rigoureuses, c'est-à-dire avec une source d'intensité constante fournissant un rayonnement monochromatique de longueur d'onde connue, et avec une culture d'organismes identiques les uns aux autres, en nombre connu, on a vu qu'en réalité, la mortalité de ces organismes était affaire de probabilité et qu'à chaque durée d'irradiation

correspondait une certaine probabilité de survie qui devenait très petite quand la durée devenait grande, mais qui n'était jamais nulle. Plus tard, quand la théorie des quanta s'est trouvée bien établie, on a admis que le rayonnement X utilisé ne pouvait être émis ou absorbé par n'importe quelle *molécule* chimique, que par quantités toujours égales, caractéristiques du rayonnement considéré. Chacun de ces *quanta* d'énergie électro-magnétique ondulatoire a pour valeur  $\frac{h \cdot c}{\lambda}$  ( $h$ , constante universelle de Planck;  $c$ , vitesse de la lumière;  $\lambda$ , longueur d'onde du rayonnement considéré). On s'est alors posé la question de savoir si les *organismes vivants* n'absorbaient pas, eux aussi, le rayonnement X par nombres entiers de quanta<sup>8</sup>. La démonstration a été faite par Holweck et Lacassagne<sup>9</sup>, sur des cultures de *Saccharomyces*. Ils ont comparé les courbes de mortalité obtenues, avec les différentes courbes calculées, en supposant que chaque levure était tuée quand elle avait absorbé soit 1, soit 2, soit 3, etc., soit  $n$  quanta (Fig. 2). Et ces auteurs ont trouvé que

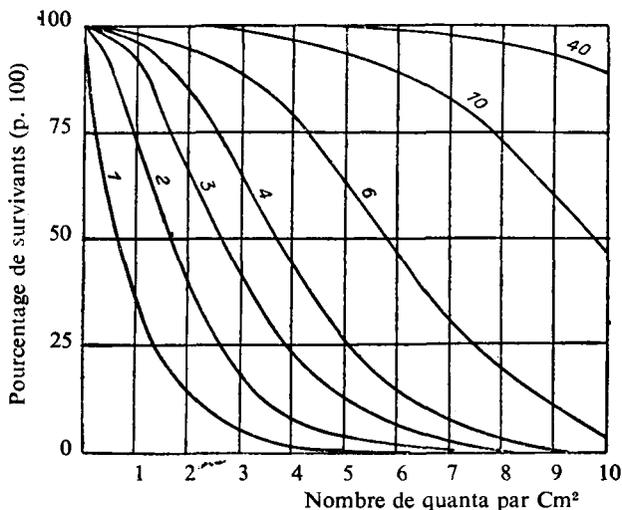


FIG. 2.—Courbes de survie calculées par F. Holweck. (Pourcentage de survivants en fonction du nombre de quanta de rayonnement irradiant 1 cm<sup>2</sup> de culture.)

l'allure des courbes était bien celle que faisait prévoir le calcul et qu'on pouvait, rien que d'après la forme de la courbe expérimentale, dire combien de quanta étaient nécessaires pour tuer chaque individu. Sans entrer dans le détail du mode d'action de ces photons sur la matière vivante, disons que des expériences analogues ont été faites avec des rayonnements X de longueur d'onde plus grande (rayons X mous), puis avec des rayons ultra-violet. A mesure que la longueur d'onde augmentait, des rayons X durs aux ultra-violet (ou, ce qui revient au même, à mesure que l'énergie du quantum diminuait), le nombre de ces quanta nécessaires pour tuer un organisme augmentait aussi. Egal à trois ou quatre pour des rayons X moyens, ce nombre atteint trente à quarante pour les rayons ultra-violet. Ce qui se traduit, quand on

regarde la famille des courbes de survie calculées mathématiquement, par le passage d'une courbe très rapidement décroissante, dès son départ, à une courbe qui présente un palier initial considérable. Si les deux courbes sont ramenées à la même échelle relative, il est facile de les distinguer l'une de l'autre au premier coup d'œil (Fig. 3). Dans le cas de la courbe des rayons X, dès le début de l'irradiation un assez grand nombre d'organismes sont tués. Au contraire, dans le cas de la courbe des rayons ultra-violet, au début de l'irradiation aucun organisme ne semble d'abord touché et il continue d'en être ainsi jusqu'au moment où, brusquement, sans que les conditions d'irradiation aient été modifiées, une mortalité considérable, et comme contagieuse, apparaît. Cela tient à ce que, dans le premier cas, pour que trois quanta soient venus frapper

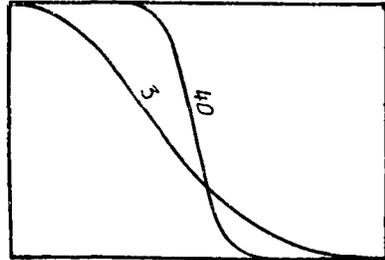


FIG. 3.—Comparaison des courbes de survie correspondant aux rayons ultra-violet (courbe 40) et aux rayons X (courbe 3) ramenés à la même échelle relative.

une même cellule de levure, il ne fallait pas un temps bien long. Tandis que, dans le deuxième cas, pour que la première cellule soit tuée, il faut qu'elle ait eu le temps d'être bombardée quarante fois. Pendant un certain laps de temps, la culture contient des cellules ayant reçu des nombres variables de quanta. Tant qu'aucune n'en a reçu quarante, toutes survivent. Mais dès que ce nombre est atteint pour une d'elles, il a de très grandes chances de l'être pour les autres, presque aussitôt. Et c'est pourquoi la chute de la courbe, après le palier, est brusque.

Les expériences faites en substituant la chaleur agissant par rayons infra-rouges (de longueur d'onde bien plus grande encore que celle des ultra-violet) n'ont pas donné de résultats aussi clairs. Cependant, des physiciens ont été tentés de penser que, puisque les quanta infra-rouges avaient une énergie encore plus petite que celle des quanta ultra-violet, il en faudrait beaucoup plus de quarante pour tuer un même organisme. On devait s'attendre à une courbe, à palier initial encore plus long, à chute très brusque. Cette notion, étendue au cas de la stérilisation des bactéries par la chaleur, paraît, à première vue, très séduisante: dès qu'on aura dépassé la dose correspondant à la fin du palier, on verra le pourcentage de survie tomber très rapidement, pour une légère augmentation de la durée de chauffage, à des valeurs infiniment faibles. Comme, d'autre part, les courbes de mortalité obtenues—au moins dans certains cas—par action d'antiseptiques sur des bactéries semblent se rapprocher plutôt des courbes des types 3 à 10, on est tenté de dire qu'on a compris pourquoi la stérilisation par la chaleur est meilleure que celles obtenues par les rayons X, les antiseptiques ou même les rayons ultra-violet: la *décroissance* de la probabilité de survie, au delà d'une dose minimum indispensable, serait plus rapide avec la chaleur qu'avec tous les autres modes de stérilisation.

Mais, l'examen des résultats expérimentaux contredit tout de suite ces hypothèses séduisantes :

Examinons, par exemple, les résultats d'une expérience de Eijkmann<sup>16</sup> faite sur une émulsion de *Bact. coli* dans le sérum physiologique, à la température de 52°C. (Fig. 4). Dès le début du chauffage, on voit le

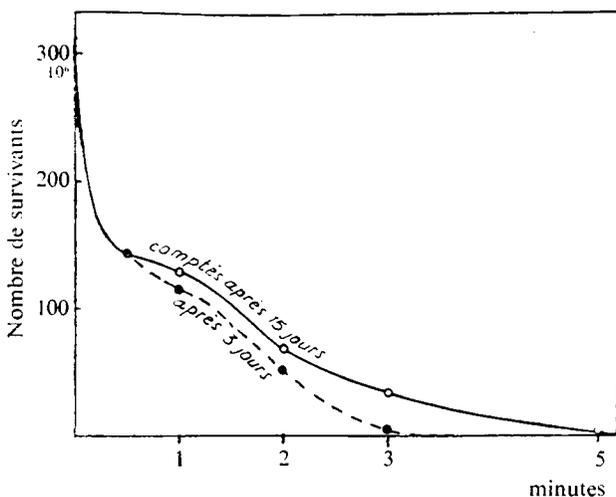


FIG. 4.—Influence de la durée de chauffage sur le nombre de *Bact. coli* survivants (d'après Eijkmann) ( $t = 52^\circ$ ).

nombre des bactéries vivantes diminuer considérablement : 50 p. 100 sont tuées en moins d'une demi-minute. Et, pour que 50 p. 100 des survivants disparaissent encore, il faut continuer l'irradiation plus d'une minute. Ainsi, au lieu d'un palier initial, c'est le contraire qu'on observe : la décroissance de la courbe, à son début, est plus rapide même que celle d'une courbe exponentielle simple qui correspondrait à  $n = 1$  (un quantum absorbé par bactérie). La théorie précédente est donc en défaut.

Enfin, un dernier fait expérimental important vient compliquer les expériences d'Eijkmann : il évalue d'abord les bactéries survivantes après trois jours d'incubation à 37°C. Mais si on prolonge cette incubation quinze jours à 37°C., on voit de nouvelles colonies apparaître tardivement, auxquelles correspond une courbe qui présente la même allure que la précédente, mais se prolonge plus loin. Or, initialement, tous les germes de la culture se développaient à 37°C. en moins de trois jours. C'est le chauffage qui a transformé certains d'entre eux en germes à développement très lent. Et, de plus, ces germes sont les plus résistants à la chaleur, puisqu'ils subsistent seuls, à la fin de l'expérience, quand les autres sont déjà pratiquement tous tués. Il nous faut conclure non seulement que la population microbienne en expérience était initialement hétérogène, mais qu'une nouvelle hétérogénéité, à laquelle correspond une plus grande résistance à la chaleur, a été provoquée par le chauffage.

Ainsi, l'étude de l'action stérilisante des rayonnements sur les bactéries

a seulement permis de mieux comprendre la complexité de la stérilisation par la chaleur. On voit qu'avant que la stérilisation ne devienne une opération mathématiquement interprétable, de nombreux travaux restent à faire.

3. *Les antiseptiques.*—Ici encore, la notion de probabilité va intervenir. Pendant longtemps, on a pensé qu'à une certaine concentration, un antiseptique tuait *tous* les germes présents dans une solution, quels que soient leur nombre et leur nature. On sait maintenant que le processus est moins simple :

1) la résistance des germes dépend de l'*espèce* bactérienne et, de plus, n'est pas la même pour les formes végétatives et les spores;

2) le résultat obtenu est fonction du *nombre* de germes présents initialement par ml.;

3) il est fonction aussi de la *durée* de contact;

4) toutes les constantes physico-chimiques de la solution interviennent : *pH*, pression osmotique, potentiel d'oxydo-réduction, etc.

Enfin, après un contact prolongé avec des solutions peu concentrées, le germe peut devenir *résistant* à l'antiseptique, ce qui complique beaucoup les choses.

Un grand progrès a été accompli le jour où l'on a distingué le pouvoir antigénétique, ou *bactériostatique*, d'un antiseptique, qui est la propriété d'empêcher le *développement* des germes de la solution, et le pouvoir *antibiotique*, qui correspond à la *mort* des germes, et non pas seulement à l'arrêt de leur reproduction. En général, cette distinction correspond à des concentrations différentes de la même substance. Mais il peut arriver qu'une substance faiblement antiseptique ne possède qu'une action bactériostatique, même à concentration élevée. Dans le cas où un liquide aura subi l'une de ces deux actions, si, par dilution, on rend négligeable l'action de l'antiseptique, on verra la croissance des bactéries se déclencher s'il y a eu seulement action bactériostatique, tandis que la stérilisation restera efficace s'il y a eu action antibiotique. Comme dans le cas de la température, on aura à considérer une relation entre la concentration et le temps de contact nécessaire, pour une bactérie déterminée, et ces chiffres varieront considérablement d'une bactérie à l'autre; ils varieront plus encore dans leur ensemble, quand on passera d'un antiseptique à un autre. Si l'on suppose que l'action antiseptique est due à la rencontre d'une ou plusieurs molécules de la substance active avec la bactérie, l'interprétation mathématique du phénomène est tout à fait analogue à celle de l'interaction d'un certain nombre de quanta de rayonnement avec une bactérie. On retombe par conséquent sur le problème étudié par Holweck, et le comportement d'un antiseptique vis-à-vis d'une culture homogène d'un germe déterminé devra être représenté par une courbe de survie de forme caractéristique, dont la seule vue permettra de savoir quel est le nombre de molécules nécessaires, en moyenne, pour que l'action se manifeste. Toutefois, pour les raisons déjà exposées plus haut en ce qui concerne les rayonnements, des études expérimentales de ce genre sont très difficiles et n'ont été qu'ébauchées jusqu'ici.

Nous voyons donc que les mécanismes d'action d'agents stérilisants

100°C. trois fois, à 24 heures d'intervalle. Dans le cas des solutés fragiles, le chauffage discontinu est effectué une heure à 58 ou 60°C., et répété cinq à six fois à 24 heures d'intervalle (biiodure de mercure, ergotine). La solution d'ergotinine devait être préparée aseptiquement et non stérilisée, en raison de la fragilité de l'alcaloïde. Seule, la solution isotonique de chlorure de sodium était stérilisée à l'autoclave (à 120°C. pendant 30 minutes).

Au Codex français de 1937, encore en vigueur, on adopte deux techniques de stérilisation<sup>18</sup>; soit le chauffage discontinu à 70°C. pour tous les solutés de médicaments altérables (alcaloïdes, salicylate de sodium, novocaïne-adréraline, etc.), soit stérilisation à l'autoclave à 110°C. pendant 20 minutes pour tous les solutés peu fragiles. Le soluté d'apomorphine est exceptionnellement stérilisé 30 minutes à 100°C. et la solution injectable de gélatine, deux fois 15 minutes à l'autoclave à 115°C. (en raison de la possibilité d'existence de spores de tétanos dans la gélatine). La filtration à la bougie n'est préconisée que pour la stérilisation des solutés injectables opothérapiques, mais le Codex recommande de tyndalliser après remplissage des ampoules.

En Angleterre<sup>19</sup> les injections hypodermiques ont fait leur apparition à la Pharmacopée britannique de 1885. On se contentait de dissoudre à douce chaleur, et de filtrer, en employant l'eau camphrée, comme solvant, dans le cas de l'apomorphine et de l'ergotine, et de l'eau additionnée d'ammoniaque et d'acide acétique dans le cas du chlorhydrate de morphine. Au Codex britannique de 1934, figurent des solutés injectables de digitaline et de thiosinamine-salicylate de soude, qui sont stérilisés, soit par tyndallisation, soit par filtration, et des solutés de morphine, strychnine, quinine-uréthane, morrhuate de sodium et peptone qui sont stérilisables au choix, soit à l'autoclave, soit par tyndallisation, soit par filtration.<sup>20</sup> Ce codex ne manifestait donc pas de préférence nette pour un procédé plutôt que l'autre. C'est déjà ce que faisait la Pharmacopée britannique de 1932, qui laissait le choix généralement entre plusieurs des trois mêmes méthodes. La Pharmacopée britannique de 1932 indique la manière de préparer d'urgence des solutés injectables<sup>21</sup>: la solution doit être additionnée d'un bactériostatique, à une dose équivalant à 0.5 pour cent de phénol; elle est ensuite mise en récipient stérile, et stérilisée par chauffage à 80°C. pendant 30 minutes, une seule fois. L'étiquette doit porter l'indication "A mettre en lieu frais et à utiliser dans les quatre jours." Dans le cas d'une solution pour injection intraveineuse, on supprime l'addition de bactériostatique: on opère aseptiquement, et stérilise simplement à la température de l'ébullition pendant 15 minutes.

Le nombre des solutés injectables inscrits à la Pharmacopée britannique de 1948 est devenu beaucoup plus considérable<sup>22</sup>. Les procédés de stérilisation sont variés: stérilisation à l'autoclave à 115 ou 116°C. pendant 30 minutes pour tous les composés peu altérables par la chaleur: autoclave ou filtration pour les tartrates doubles, le glucose, la caféine, etc.; chauffage à 100°C. pendant 30 minutes pour l'oxychlorure de bismuth; chauffage à 98 ou 100°C. pendant 30 minutes en présence d'un bactéricide, ou filtration, pour les alcaloïdes; filtration seule pour les

solutés très altérables (aneurine, héparine, iodoxyl, mersaly). La tyndallisation a été abandonnée. L'abandon de la tyndallisation, et les autres modifications apportées aux techniques de stérilisation de la Pharmacopée britannique de 1932 à 1948, ont été la conclusion d'un grand nombre de travaux effectués surtout en Angleterre et aussi en Hollande et aux Etats-Unis. Ces travaux ont eu pour but : 1. de préciser la valeur du chauffage à 100°C. en vapeur fluente. La méthode a été reconnue impuissante à détruire les spores de divers anaérobies (*B. botulinus*, *B. tetanus*, *B. sporogenes*)<sup>23,24</sup>. 2. En ce qui concerne la tyndallisation, la plupart des bactériologistes modernes admettent l'interprétation de Tyndall et pensent que la méthode ne peut être efficace que si dans l'intervalle des chauffages les spores peuvent redonner des formes végétatives. Il en résulte que si ces spores sont dans un milieu non favorable à la croissance bactérienne—comme c'est souvent le cas des solutions pour injection—la spore risque de rester non transformée d'un chauffage à l'autre, et la méthode devient alors inefficace d'après de nombreux expérimentateurs (Hillen<sup>25</sup>, Coulthard<sup>26,27</sup>, Davis<sup>28,29</sup>). Il semble, en particulier, que la méthode soit impuissante à stériliser les préparations huileuses contaminées (O'Brien et Parish<sup>30</sup>).

3. La méthode qui, au contraire, s'est révélée comme la meilleure est le chauffage avec addition d'un bactéricide. Une température de 98 à 100°C. pendant 30 minutes est alors suffisante<sup>31,32</sup>. Les produits qui ont été trouvés les plus efficaces sont le chlorocresol (0.25 pour cent) et le nitrate phénylmercurique (0.002 pour cent)<sup>33</sup>. Cette méthode est la plus employée depuis de nombreuses années en Angleterre. Par contre, les pharmaciens français paraissent avoir conservé la conviction de l'efficacité de la tyndallisation, bien qu'à vrai dire cette opinion repose seulement sur une expérience empirique.

Mais nous voyons, de plus, apparaître à la Pharmacopée britannique de 1948, deux types de préparations injectables particuliers :

1) Les solutions injectables de certaines substances biologiques préparées aseptiquement dans l'industrie sont inscrites à la Pharmacopée, sans qu'on précise leur mode de stérilisation. C'est le cas de la solution d'insuline, d'insuline-protamine-zinc, et de suramine.

2) Les solutions de substances qui ne peuvent pas être conservées à l'état dissous, même en solution stérile à basse température. Dans ce cas, on prépare, dans des conditions aussi proches que possible de l'aseptie, le composé cristallisé pur. On le répartit en flacons stériles, en atmosphère privée de bactéries (voir plus haut) et on scelle les flacons avec une capsule de caoutchouc à sertissage métallique, ce matériel ayant été stérilisé au préalable. Au moment de l'emploi, on introduit, avec une seringue, le volume convenable du solvant choisi stérile (en général, eau distillée ou solution isotonique de chlorure de sodium) et l'injection est faite aussitôt. Cette technique était utilisée dès avant la guerre, dans le cas des composés arsenicaux antisiphilitiques; elle s'est généralisée depuis (pénicilline, streptomycine, acétylcholine, etc. . .). Ce mode de conditionnement a l'avantage de permettre des prélèvements successifs à la seringue.

A la Pharmacopée britannique, figurent 10 solutés injectables préparés de cette manière. Le Codex britannique de 1949<sup>34</sup> prescrit d'ajouter, dans ce cas, un bactériostatique au produit cristallisé, de manière que si des prélèvements successifs de solutions doivent être pratiqués, on soit à l'abri d'un risque de contamination. On a le choix entre cinq bactériostatiques dont les plus puissants sont les dérivés phénylmercuriques, agissant à 0,001 pour cent.

On recommande d'utiliser, comme solvant, de l'eau fraîchement distillée, et stérilisée aussitôt après.

D'autre part, le même Codex britannique de 1949 donne des indications précises sur la technique à utiliser pour la stérilisation par filtration des solutés injectables. On utilise la porcelaine poreuse, le verre fritté ou l'asbeste. Mais quel que soit le filtre choisi, il est nécessaire d'effectuer d'abord un *essai d'efficacité de filtration* par la technique suivante: On dilue 4 ml. d'une culture de 48 heures de *chromobacterium prodigiosum* sur bouillon nutritif, dans 100 ml. de même bouillon nutritif neuf. On dispose le filtre à essayer dans un ensemble clos qui sera stérilisé en *entier*. On filtre la suspension bactérienne, sous pression au moins égale à 400 mm. de mercure. On recueille aseptiquement 50 ml. de filtrat, en vase stérile. On scelle, à l'abri des bactéries de l'air, et on porte à 37°C. pendant cinq jours. Aucune culture ne doit apparaître. Pour l'emploi, le filtre (répondant à cet essai) doit être fixé à une fiole à filtration, munie d'un filtre pour rentrée d'air, et d'un dispositif permettant la répartition en ampoules du liquide filtré, à l'intérieur de l'appareil stérilisé, de façon qu'aucune contamination ne soit possible *après* filtration.

Il semble que la tendance moderne soit de généraliser dans l'industrie l'emploi de la filtration pour tous les solutés limpides. Cette technique exige des installations très soignées et un contrôle très rigoureux. En effet, il est indispensable d'effectuer alors *toujours* le contrôle bactériologique de la stérilité du soluté.

L'édition 1947 de la Pharmacopée américaine<sup>35</sup> préconise, de préférence, la stérilisation à l'autoclave à 115.5°C. pendant 30 minutes, ou 121.5°C. pendant 20 minutes, ou 126.5°C. pendant 15 minutes. (Remarquons que ces chiffres sont en désaccord complet avec ceux que nous indiquions plus haut sur la relation température-durée.) Dans le cas où la substance ne peut pas supporter une température de 115°C. on admet l'utilisation du chauffage à 100°C. pendant 30 minutes au moins, mais avec addition d'un bactériostatique. Enfin, le chauffage discontinu est admis dans le cas des solutions de substances fragiles. On opère à 60° ou 80°C. en répétant l'opération quatre à sept fois. Mais la Pharmacopée américaine exige alors l'addition d'un bactériostatique à une concentration suffisante, pour empêcher la croissance de *tous* les micro-organismes dans la solution, et cette pharmacopée ajoute que "ce procédé n'est pas une méthode sûre de stérilisation," et que "la filtration doit être appliquée à sa place chaque fois qu'il est possible."

Il nous faut faire une mention à part de l'évolution des techniques de stérilisation des solutés huileux. Il semble bien qu'on ait eu tendance à

admettre primitivement que ces solutés étaient *plus faciles* à stériliser que les solutés aqueux, tandis qu'on est maintenant d'avis contraire. En effet, au Formulaire des Hôpitaux militaires français de 1909, on prescrit de stériliser les solutions huileuses injectables par chauffage discontinu à 58° ou 60°C. pendant une heure, six fois de suite. Au Supplément du Codex français de 1926<sup>36</sup>, on stérilise à 105° pendant dix minutes, alors qu'au Codex français de 1937 on stérilise à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes. Enfin, les Pharmacopées britanniques de 1932 à 1948 exigent chaque fois qu'elle est possible une stérilisation à 150° pendant une heure<sup>37,38</sup>. Cela s'accorde avec les conclusions d'un grand nombre de travaux sur la nécessité d'une stérilisation en présence d'eau, pour obtenir la destruction rapide, à température relativement peu élevée, des formes végétatives bactériennes. Si les solutions huileuses sont rigoureusement anhydres, il est très certain qu'un chauffage à 150° est en effet nécessaire.

A cette question se rattache une difficulté pratique très importante : On admet facilement qu'un grand nombre de médicaments existant dans les solutés injectables ont par eux-mêmes une action antibiotique ou bactériostatique non négligeable, ce qui rend plus rapide la stérilisation par chauffage. On est même, dans certains cas, dispensé, de ce fait, d'ajouter un bactériostatique à la solution. Mais on pense moins souvent au cas de substances qui, au contraire, *protègent* la bactérie vis-à-vis de la stérilisation. Ces substances paraissent être surtout de nature lipidique, bien que jusqu'ici on ait à leur sujet des indications empiriques plutôt que des conclusions certaines d'expériences de laboratoire. On a rarement à examiner ce problème dans le cas de solutés injectables limpides, mais plus souvent dans le cas de solutés troubles ou d'émulsions constituées par des extraits de tissus ou de liquides biologiques. J'ai eu, pour ma part, à examiner une préparation contenant un extrait aqueux de rate tenant en suspension des lipides. Le produit avait été préparé presque aseptiquement et on se proposait ensuite de le stériliser. L'expérience a montré qu'un chauffage discontinu à 80° était *quelquefois* suffisant et *quelquefois* insuffisant, ce qui tenait au nombre inégal de germes bactériens existant initialement dans les divers lots de fabrication. Mais une stérilisation de 20 minutes à 100° pratiquée sur le même produit donnait des résultats également inconstants, et même une stérilisation à l'autoclave de 120° pendant 10 minutes, des résultats encore inconstants. La numération des bactéries avant et après stérilisation montrait qu'il y avait bien cependant *diminution* du nombre de germes après chaque chauffage, mais que cette diminution était très lente, par suite d'une protection manifeste des germes. Dans des cas de ce genre, seule l'addition d'un bactériostatique peut donner une sécurité relative.

### III.

#### CONTRÔLE BACTÉRIOLOGIQUE DE LA STÉRILITÉ DES SOLUTÉS INJECTABLES

Ce qui a été exposé plus haut, de l'importance de la notion de probabilité en matière de stérilisation, fait comprendre qu'en cas de stérilisation insuffisante, le contrôle d'une ampoule ne pourra jamais suffire à prouver

la stérilité de tout un lot d'ampoules. Il faut au moins que l'essai porte sur une dizaine d'ampoules du même lot. Encore, la sécurité obtenue ne sera-t-elle pas très grande. C'est là une difficulté grave et qui a beaucoup embarrassé les techniciens chargés d'une expertise. Il existe d'ailleurs plusieurs autres difficultés supplémentaires :

1) Il est nécessaire de compter *tous* les germes présents, et pour cela les milieux nutritifs utilisés doivent permettre la croissance de *n'importe quel* germe;

2) Comme il est prescrit dans beaucoup de cas d'ajouter un bactériostatique aux liquides injectables, il faut que le contrôle de stérilité soit effectué dans des conditions où l'action du bactériostatique est négligeable.

Pour répondre à ces exigences, les prescriptions de la Pharmacopée britannique de 1948 sont les suivantes :

a) Emploi de milieux assez nutritifs pour permettre la croissance d'un seul germe (ou d'un très petit nombre de germes);

b) Essai avec un milieu neutre favorable aux aérobies et avec un autre milieu favorable aux anaérobies (Déjà la pharmacopée de 1932 prescrivait d'utiliser ces deux types de milieux);

c) On peut aussi employer un milieu unique additionné d'une substance qui abaisse le potentiel d'oxydo-réduction à un niveau suffisant pour permettre la croissance des anaérobies;

d) Dilution du soluté dans le milieu à un taux d'au moins 1 p. 100 de manière à réduire la concentration en bactériostatique éventuel à moins de 1/10.000.

La Pharmacopée américaine de 1947 prescrit l'emploi d'un liquide de culture dont il donne la formule :

l-cystine .....	0,05
ClNa .....	2,5
Glucose .....	1,1
Extrait aqueux de levure de bière .....	5.
Peptone pancréatique de caséine .....	15.
Thioglycollate de sodium .....	0,5
Eau distillée .....	1.000.

Les quantités de prises d'essai à ensemercer sont précisées, ainsi que la durée de séjour à l'étuve.

En ce qui concerne l'interprétation, la Pharmacopée anglaise depuis 1932 demande qu'on examine les tubes après 5 jours de séjour à l'étuve à 37°C. Si aucun tube n'a cultivé, l'essai est négatif. Si on a obtenu *une* culture, on recommence l'essai avec le même nombre de tubes. Si on obtient encore *une* culture, on recommence une troisième fois. Si les trois essais ont donné chacun au moins une culture, ou encore si le *même* germe a été retrouvé dans *plus d'un* essai, le lot est rejeté. On voit donc qu'il est admis que la présence d'une culture isolée est insuffisante pour porter un jugement sur l'ensemble. La Pharmacopée américaine demande que pour les lots importants d'ampoules, on fasse porter l'essai sur 3 p. 100 du nombre total avec un maximum de 10, et elle demande de rejeter *tout lot ayant donné des cultures* après 7 jours de séjour à 37°C. Dans le cas où le soluté injectable rend le milieu trouble, on doit, après 7

## LA STÉRILISATION DES SOLUTIONS INJECTABLES

jours de culture, réensemencer sur un nouveau milieu et lire le résultat après 3 jours de séjour à l'étuve, au moins.

Le contrôle de liquides injectables stériles est plus difficile encore dans le cas d'un liquide biologique prélevé aseptiquement, mais non stérilisé. C'est le cas du plasma humain<sup>34</sup> dont le contrôle est effectué par les Américains d'une manière très rigoureuse. (Cet essai ne figure pas à la Pharmacopée américaine.) L'essai étant pratiqué comme il a été dit plus haut, si plusieurs tubes correspondant à un même lot donnent des cultures, et que le même germe *non pathogène* apparaisse dans *deux* de ces tubes, le lot entier est à rejeter. Mais si les germes sont différents et qu'un nouvel essai de contrôle portant sur le même nombre de tubes soit négatif, le lot est utilisable. Par contre, si un seul tube donne *une* culture d'un germe *pathogène*, le lot entier est à rejeter.

Cette distinction entre germes pathogène et non pathogène paraît très judicieuse, et il est probable que c'est ce dernier type de contrôle qui est le meilleur, mais il a l'inconvénient de ne pouvoir être pratiqué que par un bactériologiste très expérimenté, et dans un laboratoire spécialisé.

### CONCLUSIONS

1. On voit que, dans l'état actuel de nos connaissances scientifiques, il n'est pas possible d'affirmer qu'un procédé de stérilisation de solutés injectables donne une sécurité *absolue*, quel que soit l'état bactériologique initial du soluté.

2. La tendance moderne est de préférer au procédé par chauffage le procédé par filtration, à condition qu'il soit pratiqué avec des précautions très rigoureuses et qu'on ajoute aux solutés un bactériostatique.

3. Mais alors le contrôle bactériologique de la stérilité doit être effectué, et son interprétation pose des problèmes extrêmement délicats.

### BIBLIOGRAPHIE

1. Spallanzani, *Observations et expériences faites sur les animalcules des infusions*, Genève, 1777, Ed. franç., Gauthier-Villars, Paris, 1920, 12.
2. Appert, *L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales*, Patris, Paris, 1810.
3. Pasteur, *Œuvres complètes*, 2, Masson, Paris, 1933.
4. Tyndall, *Les microbes* Ed. franç., F. Savy, édit., Paris, 1882, 230.
5. Duclaux, *Traité de Microbiologie*, G. Masson édit., Paris, 1, 1897, 290.
6. Chick, *J. Hyg., Camb.*, 1910, 10, 237.
7. Bigelow et Esty, *J. infect. Dis.*, 1920, 27, 602.
8. Holweck, *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1928, 186, 1318.
9. Holweck et Lacassagne, *Radiophysologie et Radiothérapie*, 1934, 3, 215.
10. Eijkmann, *Biochem. Z.*, 1908, 11, 12.
11. Chamberland, *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1884, 99, 247.
12. Bourquelot et Galippe, *C.R. Soc. Biol.*, 1885, 11, 120.
13. Luckiesh, *Elect. World. N.Y.*, 1945, 124, 90; 109.
14. Mudd et Thalheimer, *Blood substitutes and blood transfusion*, C. Thomas édit., Springfield, Ill., 1942.
15. Adrian, *J. Pharm. Chim.*, 1872, 16, 288.
16. *Codex medicamentarius gallicus*, 1908.
17. *Formulaire Pharmaceutique des Hôpitaux militaires*, Paris, Lavauzelle, 1909.
18. *Codex medicamentarius gallicus*, 1937, 2,
19. *The British Pharmacopœia*, 1885.
20. *The British Pharmaceutical Codex*, 1934.
21. *The British Pharmacopœia*, 1932.

MARCEL GUILLOT

22. *The British Pharmacopæia*, 1948.
23. Esty et Meyer, *J. inf. Dis.*, 1922, **31**, 650.
24. Baumgartner et Wallace, *Food Manufacture*, 1936, **11**, 10.
25. Hillen, *Pharm. Weekbl.*, 1924, **61**, 1245.
26. Coulthard, *Pharm. J.*, 1933, **130**, 266.
27. Coulthard, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1935, **8**, 98.
28. Davis, *ibid.*, 1935, **8**, 361; 1934, **7**, 379.
29. Davis, *ibid.*, 1940, **13**, 14.
30. O'Brien et Parish, *ibid.*, 1935, **8**, 94.
31. Coulthard, *Pharm. J.*, 1939, **142**, 81.
32. Davis, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1948, **21**, 32.
33. Berry, Jensen et Siller, *ibid.*, 1938, **11**, 729.
34. *The British Pharmaceutical Codex*, 1949.
35. *The Pharmacopæia of the United States*, xiii, 1947.
36. *Codex medicamentarius gallicus, nouveau supplément*, 1926.
37. Wood et Tulley, *Pharm. J.*, 1945, **154**, 237.
38. Coulthard, *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1935, **8**, 90.
39. Lesure et Lavagne, *Les médicaments injectables*, 5ème ed., Le François (Paris), 1942.