

Introduction

Les bactéries ont été pendant longtemps responsables de maladies mais aussi d'une forte mortalité surtout chez les enfants et les personnes âgées. Cependant, on note que la découverte du premier antibiotique, la pénicilline, par **Flemming** en 1929 a entraîné une baisse considérable de cette mortalité.

Dès lors les premiers antibiotiques d'origine naturelle, ont vu leur efficacité améliorée par la mise au point de nouveaux antibiotiques produits par synthèse.

Des méthodes de dosage établies par les scientifiques permettent de vérifier l'efficacité des antibiotiques utilisés en thérapeutique.

Plusieurs méthodes de dosage sont utilisées mais la méthode de diffusion sur gélose reste de loin la méthode la plus accessible et la plus employée en pratique courante au niveau des laboratoires.

Ces méthodes de dosage doivent être constamment validées, cette validation de la méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique.

Notre travail consistait à faire une « validation des méthodes de contrôle microbiologique des médicaments antibiotiques » au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (**LNCM**). Ce laboratoire a plusieurs rôles notamment le dosage des médicaments pour assurer leur qualité ce qui permet d'aboutir à une meilleure efficacité du traitement.

Notre travail dans ce laboratoire avait deux objectifs principaux :

- d'une part doser les antibiotiques par une technique de diffusion sur gélose,
- d'autres parts valider cette technique par certains paramètres de la validation selon les possibilités que nous offre le laboratoire (reproductibilité et répétabilité).

Première partie : Etudes bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur les antibiotiques

1 - Rappels sur les bactéries

1 – 1 Historique - définition

Le monde vivant est constitué de trois règnes : le règne animal, le règne végétal et le règne des protistes.

Le règne des protistes proposés par **Haeckel** (1866) ont été subdivisés par **Chatton** (1937) en protistes supérieurs ou Eucaryotes (Algues, Protozoaires, champignons) et en protistes inférieurs ou protocaryotes (bactéries, Algues bleues) constitués d'un chromosome unique et dépourvu de membrane nucléaire.

Les bactéries ou *Schizomycetes* constituent le groupe le plus important et le plus diversifié des protistes protocaryotes.

Elles sont caractérisées par l'existence d'une paroi rigide le peptidoglycane qui conditionne les trois formes morphologiques fondamentales : sphériques (coques), cylindriques (bacilles), spiralées. Les bactéries se multiplient habituellement par scissiparité mais peuvent aussi présenter des recombinaisons génétiques partielles. Il faut cependant distinguer les protistes des virus.

1 – 2 Structure des bactéries

1 – 2 – 1 Moyens d'étude

L'étude des bactéries se fait selon plusieurs techniques et utilise soit :

- **Le microscope optique** : permet de faire :

Un état frais entre lame et lamelle qui renseigne sur la forme et la mobilité des bactéries ;

Un examen après fixation et coloration pour mieux apprécier leur morphologie.

Il existe de nombreuses colorations et la plus utilisée est la coloration de Gram.

- **Le microscope électronique** : utilisé que pour les travaux de recherche et permet l'étude fine de la bactérie.
- **Le fractionnement des bactéries** : distingué par différents moyens qui font intervenir des procédés physiques (utilisation de micro-billes), chimiques (utilisation antibiotiques et détergents) et physico-chimiques (centrifugation différentielle, filtration).

1 – 2 – 2 Anatomie des bactéries

1 – 2 – 2 – 1 Les enveloppes bactériennes

- **la capsule** : c'est le constituant le plus superficiel, elle joue un rôle dans la virulence de la bactérie et permet une classification antigénique des bactéries capsulées.
- **Le glycocalyx** : c'est un feutrage des fibres polysaccharidiques qui entoure les bactéries placées dans leur milieu naturel et qui leur permet d'adhérer à leur support. Il joue un rôle dans l'élaboration de la plaque dentaire par *Streptococcus mutans*.
- **La paroi** : c'est une enveloppe rigide qui assure la forme de la bactérie. Elle est absente chez les *Mycoplasmes*. Sa structure est différente selon qu'il s'agit de bactéries Gram (+) ou Gram (–) mais elles ont en commun le péptidoglycane, un polymère macromoléculaire entourant la bactérie.

La paroi des bactéries Gram (+) est relativement épaisse et constituée en majeure partie par le péptidoglycane. Les polysides responsables de la spécificité antigénique des bactéries sont branchés sur la paroi.

La paroi des bactéries Gram (-) possède une mince couche de péptidoglycane recouverte d'une couche tri-lamellaire appelée « enveloppe externe ». Cette couche contient des protéines, des lipides et le lipopolysaccharide. Ce dernier porte l'antigène O ou antigène de surface utilisé pour la classification de certaines espèces bactériennes. La perméabilité de la paroi à l'alcool explique le caractère Gram (-) des bactéries.

La paroi est douée de plusieurs fonctions surtout :

- **Dans la coloration de Gram**

La coloration de Gram est une coloration différentielle basée sur la perméabilité plus grande de la paroi des bactéries Gram (-) à l'alcool.

Elle consiste dans un premier temps à réaliser un complexe colorant soluble dans l'alcool (cristal-violet, lugol) qui colore en violet le cytoplasme de toutes les bactéries.

Dans un second temps, intervient la décoloration par l'alcool qui traverse bien la paroi des bactéries Gram (-) et dissout le complexe colorant. Chez les bactéries Gram (+), la paroi ne se laisse pas traverser.

Dans un troisième temps, on fait une contre coloration par la fushine. Seules les bactéries décolorées par l'alcool fixent la fushine et apparaîtront rouges : on les dit bactéries Gram (-).

A l'inverse les bactéries Gram (+) ont conservé la coloration du premier temps :

- **Dans la forme des bactéries**
- **Dans l'antigénicité**
- **Dans l'action des antibiotiques**
- **Membrane cytoplasmique** : située sous la paroi à son contact. L'adhésion n'est

pas toujours parfaite, elle délimite l'espace péri-plasmique. La membrane forme une barrière osmotique, contient des systèmes de transport et des enzymes. La cellule se divise par scissiparité.

1 – 2- 2 – 2 Les constituants internes

- **Le cytoplasme** : il est constitué d'une machinerie nécessaire aux synthèses protéiques et de nombreux ribosomes constitués de protéines et d'ARN. Il possède 2 sous-unités qui, chez les bactéries sont de 50S et 30S. On y retrouve aussi des granulations, formes de stockage des constituants.
- **Le noyau** : il est mis en évidence au microscope optique après coloration de Feulgen. En microscopie électronique on a une structure fibrillaire. Le chromosome bactérien est un filament d'ADN bicaténaire, circulaire nu, organisé en certain nombre de boucles stabilisées par un noyau d'ARN.
- **L'ADN extra-chromosomique** ou plasmide

1 – 2 – 2 – 3 Les appendices externes

- **Flagelle** assure la mobilité de la bactérie
- **Les pili ou fimbriae** existent chez de nombreuses bactéries Gram (-) et ne sont apparents qu'en microscopie électronique. Nous avons des pili communs qui interviennent dans la fixation de la bactérie et des pili sexuels qui interviennent dans la conjugaison bactérienne.

1 – 2 – 2 – 4 La spore

Certaines espèces de bactéries, dites sporulées, ont la propriété, quand elles sont placées dans des conditions d'environnement défavorables, de donner naissance à des spores qui vont pouvoir résister indéfiniment au froid et à la dessiccation. Quand des conditions favorables se manifestent de nouveau, la spore redonne des bactéries végétatives identiques à celles qui lui ont donné naissance.

La spore possède des constituants que l'on ne rencontre pas chez la bactérie en phase végétative et inversement. La sporulation représente donc un modèle intéressant pour approcher l'étude de la différenciation cellulaire.

Parmi les propriétés les plus remarquables des spores, il faut citer la thermo-résistance. Les méthodes de stérilisation par la chaleur doivent donc tenir compte de cette propriété.

1 – 3 Croissance des bactéries

1 – 3 – 1 En milieu solide

Si on pose une cellule bactérienne à la surface d'une gélose nutritive, elle se multiplie et forme un amas visible à l'œil nu dès qu'elle contient un million (10^6) de bactéries ; ce qui correspond à vingt générations. Sur la gélose on a des colonies lisses (S), muqueuses (M) ou rugueuses (R)

1 – 3 – 2 En milieu liquide

Une population microbienne est définie par deux grandeurs habituellement mesurées par unité de volume de milieu, la densité microbienne et la concentration

cellulaire. L'accroissement de ces deux paramètres constitue le phénomène de la croissance.

La mesure de la croissance se fait par des méthodes :

- ✓ directes par numération totale
numération viable
- ✓ indirectes par détermination du poids sec
dosage de l'azote bactérien
mesure de l'activité enzymatique des bactéries
mesure optique par turbidimétrie

La mesure de la croissance permet de tracer une courbe de croissance avec plusieurs phases :

- latence
- accélération
- exponentielle
- ralentissement
- stationnaire
- déclin

2 - Rappels sur les antibiotiques

Le terme antibiotique signifie toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective envers le ou les micro-organismes visés et au contraire une toxicité suffisamment faible vis à vis de l'hôte humain, animal ou végétal pour qui son administration puisse être réalisée par voie générale.

Les antibiotiques sont caractérisés par :

- Une activité antibiotique ou antifongique
- Une toxicité sélective grâce à un mécanisme d'action spécifique.

- Une activité en milieu organique dans le sang et les tissus.
- Une bonne absorption et une bonne diffusion dans l'organisme

2 – 1 Classification des antibiotiques antibactériens :

2 – 1 – 1 Classification générale :

Tableau I : Classification générale des bactéries

Familles	Sites d'action Modes d'action	Origine
-----------------	--	----------------

<u>Béta-lactamines</u>			
Pénicillines	→	Paroi, bactéricide	→ <i>Penicillium</i> , semi-synthèse
Céphalosporines	→	Paroi, bactéricide	→ <i>Céphalosporium</i> , semi-synthèse
Céphamycines	→	Paroi, bactéricide	→ <i>Streptomyces</i> , semi-synthèse
<u>Aminosides</u>	→	Ribosomes bactéricide 30S	→ <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micromonospora</i>
<u>Chloramphénicol</u>	→	Ribosome bactéricide 50S	→ <i>Streptomyces</i> , synthèse
<u>Tétracyclines</u>	→	Ribosome bactériostatique 50S	→ <i>Streptomyces</i> semi-synthèse
<u>Macrolides–lincosamines</u>	→	Ribosome bactéricide 50S	→ <i>Streptomyces</i>
<u>Streptogramines</u>			
<u>Polypeptides</u>	→	Membrane cytoplasmique bactéricide	→ <i>Bacillus</i>
<u>Rifampicine</u>	→	RNA polymérase bactéricide	→ <i>Streptomyces</i> , <i>nocardia</i>
<u>Quinolones</u>	→	DNA gyrase, bactéricide	→ Synthèse
<u>Sulfamides</u>		Métabolisme folates	→ Synthèse
<u>Triméthoprime</u>	→	bactériostatique	
<u>Vanomycine</u>			
<u>Novobiocine</u>	→	Paroi, bactéricide	→ <i>Streptomyces</i>
<u>Fosfomycine</u>			
<u>Acide fusidique</u>			→ <i>Fusidium</i>
<u>Nitrofurance</u>	→	DNA, bactéricide	→ Synthèse

2 – 1 – 2 Classification des antibiotiques de notre étude

2 – 1 – 2 – 1 Les Bétalactamines

Ce sont des antibiotiques protidiques qui regroupent les antibiotiques bactéricides ayant un cycle béta-lactame. Nous avons :

- Pénicillines
- Céphalosporines

- Autres

2 – 1 – 2 – 1 – 1 Les pénicillines

Ils sont divisés en plusieurs groupes selon leur spectre antibactérien :

- **Pénicilline G**

Il est actif sur les bactéries Gram (+) (cocci et bacilles) à l'exception de *Staphylococcus* producteur de pénicillinase.

- **Pénicilline M**

Il a le même spectre que Pénicilline G mais il n'est pas inactivé par la pénicillinase des *Staphylococcus*.

- **Groupe à large spectre**

Il a le même spectre que la pénicilline G mais il est aussi actif sur les bacilles Gram (-) non producteur de pénicillinase. On a :

- Pénicilline A ou Aminopénicilline :

Nous avons l'ampicilline inactif sur le bacille pyocyanique.

- Carboxypénicilline, Ureidopénicilline, Apalcilline

Ils sont actifs sur le bacille pyocyanique.

- Amidinopénicilline

Nous avons le Mecillinam actif uniquement sur les germes Gram (-).

2 – 1 – 2 – 1 – 2 Les autres

Il s'agit des inhibiteurs des bêta-lactamases. Ils n'ont pas d'activité antibactérienne propre mais sont utilisés en association avec une autre bêta-lactamine en particulier avec un pénicilline à large spectre pour la protéger de l'action des bêta-lactamases : Acide clavulanique, Sulbactam

2 – 1 – 2 – 2 Aminosides ou oligosaccharides

Ce sont des antibiotiques osidiques, bactéricides à large spectre mais inactifs sur les *streptocoques* et les bactéries anaérobies strictes. Nous avons deux groupes selon la structure :

- Groupe Streptomycine ayant un noyau Streptidine
- Groupe Deoxystreptamine à noyau Deoxystreptamine qui comprend : Kanamycine, Tobramycine, Sisomycine, Netilmycine, Debikacine, Apramycine, Amikacine, Gentamicine.

2 – 1 – 2 – 3 Tétracyclines

Ce sont des antibiotiques à cycles condensés, bactériostatiques à large spectre. Ces produits diffèrent par leurs propriétés physiques et pharmacologiques.

2 – 1 – 2 – 4 Macrolides et apparentés

Ce sont des antibiotiques osidiques regroupant des antibiotiques à structure très différentes et un spectre limité aux cocci Gram (+) aux bacilles Gram (+) et aux anaérobies strictes.

Nous avons trois groupes :

- Macrolides vrais bactériostatiques : Erythromycine, Spiromycine.
- Lincosamine actif sur *Staphylocoques* et anaérobie (lincomycine).
- Synergistine (Streptogramine) bactéricide intense sur *Staphylocoques* (virgimycine).

2 – 1 – 2 – 5 Sulfamide et Triméthoprime

Ce sont des antibiotiques protidiques à large spectre et bactériostatiques, en association ils sont bactéricides.

2 – 2 Propriétés des antibiotiques de notre étude

2 – 2 – 1 Les Béta-lactamines

2 – 2 – 1 – 1 Mécanisme d'action (2)

Ils agissent sur la paroi bactérienne en inhibant la synthèse du peptidoglycane conduisant à un effet bactériostatique.

Le peptidoglycane est directement exposé chez les germes Gram (+) mais protégé chez les germes Gram (-) par une membrane lipidique supplémentaire empêchant l'action directe des antibiotiques.

2 – 2 – 1 – 2 Indications

Ils sont indiqués dans les infections sévères à bactéries Gram (+) ou Gram (-) (septicémie, méningite, endocardite) ; seuls ou en association.

Pénicilline G active sur *Streptocoques* (angines)

Pénicilline M active sur *Staphylocoque*

2 – 2 – 1 – 3 Caractères physico-chimiques (3)

L'ampicilline anhydre est une poudre cristalline blanche ou presque blanche, inodore ou presque.

Elle est très stable en milieu acide et est donc peu active par voie orale à cause de sa médiocre absorption digestive. Elle est plutôt utilisée sous forme injectable.

Le produit est conservé dans un récipient étanche à l'abri de la lumière et à une température ne dépassant pas 25°C. Même à l'abri de la lumière, l'ampicilline s'altère à l'air humide, d'autant plus vite que la température est plus élevée.

2 – 2 – 2 Les aminosides

2 – 2 – 2 – 1 Mécanisme d'action (5)

Les aminosides agissent sur la synthèse protéique en se fixant sur la fraction 30S du ribosome bactérien au niveau de protéines particulières. Il s'en suit une altération ou une inhibition complète de la synthèse protéique. La fixation au ribosome se traduit aussi par une augmentation du transfert à travers la membrane cytoplasmique qui se trouve désorganisée et dont le fonctionnement est altéré.

Cet effet et d'autres mécanismes encore imprécis expliquent l'action bactéricide de la plupart des aminosides.

2 – 2 – 2 – 2 Indications (5)

Ils sont indiqués dans les infections sévères à bactéries Gram (+) ou Gram (-) le plus souvent en association avec une Béta-lactamine en particulier dans les infections graves à *Streptocoques*, une quinolone ou une rifampicine.

2 – 2 – 2 – 3 Caractères physico-chimiques (3)

- **Amikacine** : C'est une poudre cristalline blanche presque inodore modérément soluble dans l'eau. Elle se conserve dans un récipient étanche.
- **Gentamicine sulfate** : La gentamicine est le sulfate des fractions C₁, C₂, C_{1a} de la gentamicine produite au cours de la croissance de *Micromonospora purpurea*. C'est une poudre blanche ou couleur crème inodore, soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'éthanol, éther R et chloroforme R. La poudre se conserve dans un récipient étanche à l'abri de la lumière.

2 – 2 – 3 Les Cyclines

2 – 2 – 3 – 1 Mécanisme d'action (5)

Les tétracyclines inhibent la phase d'élongation de la synthèse protéique en empêchant la fixation du complexe [aminoacide – tRNA] sur le complexe [RNAm – ribosome]. D'autres mécanismes d'action sont également possibles dont une altération de la membrane cytoplasmique.

2 – 2 – 3 – 2 Indication (5)

Les tétracyclines sont indiqués dans les infections locales (respiratoires, génito-urinaires...). Malgré leur spectre naturel très large [Gram(+) , Gram (-), *Mycoplasmes*, *Chlamydiae*] beaucoup de bactéries sont devenues peu sensibles (*Staphylocoques*, *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Streptocoques* α-hémolytiques).

2 – 2 – 3 – 3 Caractères physico-chimiques

Les chlorhydrates de tétracycline sont des cristaux jaunes ou poudres cristallines jaunes, inodores solubles dans environ 100 parties d'eau et 250 parties d'éthanol = 75g/LTS, pratiquement insoluble dans l'acétone, le chloroforme R et l'éther R.

Ils se conservent dans un récipient étanche à l'abri de la lumière. Même en l'absence de la lumière s'altère à l'air humide d'autant plus vite que la température est élevée. La poudre a un goût amer.

2 – 2 – 4 Les macrolides

2 – 2 – 4 – 1 Mécanismes d'action (5)

Les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S. Les grands macrolides (Spiramycine, Josamycine,...) inhibent les premières étapes de la synthèse protéique ce qui se traduit par un défaut de fixation des aminoacyl-tRNA. Les macrolides de petite taille (Erythromycine, Aleandomycine,...) agissent à un stade plus tardif en inhibant la translocation.

2 – 2 – 4 – 2 Indications (5)

Les macrolides vrais sont indiqués dans les infections localisées qui ne sont pas dues aux entérobactéries ou aux *Pseudomonas* : infections ORL (angines aiguës, otites,...), infections aiguës des voies respiratoires, infections en odontostomatologie, infections uro-génitales.

2 – 2 – 4 – 3 Caractères physico-chimiques (2 – 3)

L'Erythromycine est un mélange de substances produites par certaines souches de *Streptomyces erythreus*, constituées principalement d'érythromycine A et d'une petite quantité d'érythromycine B et C.

Ce sont des cristaux ou poudre blanche ou légèrement jaune, inodore ou presque. La poudre est soluble dans 100 partie d'eau mais moins soluble dans l'eau chaude, facilement dans l'éthanol = 750g/LTS, éther R, chloroforme R.

Elle se conserve dans un récipient étanche à l'abri de la lumière, l'érythromycine est légèrement hygroscopique.

2 – 2 – 5 Sulfaméthoxazole + Triméthoprime

2 – 2 – 5 – 1 Mécanismes d'action (5)

Ils agissent en inhibant la synthèse des folates et ont une action antimétabolite. L'acide folique nécessaire au métabolisme du DNA et certains acides aminés doivent être synthétisés par les bactéries car elles ne peuvent pas incorporer les folates exogènes.

Ils inhibent compétitivement la dihydroptérate synthétase dont le substrat normal est le PAB.

2 – 2 – 5 – 2 Indications Sulfaméthoxazole + Triméthoprime

Le cotrex est indiqué dans :

- les infections hautes ou basses, prostatites, orchites, épидидymites
- le traitement curatif et préventif de la pneumocystose
- en deuxième intention dans la typhoïde, les Salmonelloses, la gonococcie, le chancre mou, les otites

- indications potentielles dans les méningites à *Listeria monocytogenes*, la nocardiose, les infections à *Staphylocoques*.

2 – 2 – 5 – 3 Caractères physico-chimiques

- **Sulfaméthoxazole** : Poudre blanche cristalline ou blanc-jaunâtre, inodore. Elle est très peu soluble dans l'eau, soluble dans 50 parties d'éthanol = 750g/LTS et dans trois parties d'acétone R. Elle se conserve dans un récipient clos à l'abri de la lumière.

- **Triméthoprime** : Poudre blanche cristalline inodore ou presque, modérément soluble dans l'eau, soluble dans le méthanol R et dans le chloroforme R, pratiquement insoluble dans l'éther R. elle se conserve dans un récipient bien clos.

Remarque : L'activité et la qualité de ces antibiotiques sont déterminées par des méthodes de dosage validées par des paramètres ce qui permet d'avoir une assurance de la qualité des médicaments utilisés en thérapeutique.

Chapitre II : Méthodes de dosage des antibiotiques

1 – Nations d'asepsie et de stérilité

1 – 1 Asepsie

Il s'agit de tout mettre en œuvre pour éviter toute contamination du matériel à utiliser lors du prélèvement et au cours des manipulations.

Nous devons donc tuer les bactéries de l'environnement en nettoyant la salle de manipulation avec de l'alcool et des détergents.

Lors des manipulations il faut avoir une attitude correcte qui nous permet de travailler en milieu aseptique dans le cône de sécurité du bec bunsen.

1- 2 Stérilité

La stérilisation consiste à débarrasser de ces contaminants bactériens ou viraux tout le matériel et tout réactif à utiliser lors des manipulations. Au laboratoire de contrôle nous utilisons différents procédés de stérilisation.

1 – 2 – 1 Stérilisation par la chaleur sèche

1 – 2 – 1 – 1 Flamage direct au bec bunsen

Il consiste à faire passer 3 à 4 fois dans la flamme bleue du bec l'objet à stériliser. Il s'agit de pipette pasteur, anse de platine, pinces, orifice des tubes ou flacons. A 0,5cm du bout de la flamme bleue, la température est de 3500°C.

1 – 2 – 1 – 2 Stérilisateur à air chaud

On l'appelle four pasteur ou poupinel. Il s'agit d'une enceinte métallique hermétiquement fermée dans laquelle est maintenue au moyen d'une résistance électrique une circulation d'air chaud pouvant atteindre 180°C. Cette température maintenue pendant 30mn suffit à tuer les bactéries, les virus et même les formes sporulées des bactéries. On l'utilise pour stériliser la verrerie. Avant la stérilisation le matériel est lavé, séché puis emballé par unité ou par lot avec du papier kraft ou du papier aluminium. Les tubes et flacons sont bouchés avec du coton cardé.

1 – 2 – 2 Stérilisation par la chaleur humide

- **Autoclavage** : L'appareil utilisé est l'autoclave et permet d'entretenir de la vapeur d'eau en chauffant l'eau en surpression à la température de 121°C. dans ces conditions toutes bactéries sont tuées au bout de 15mn. Le matériel stérilisé est : milieux de culture, verrerie, produit biologique à détruire, tampons, embouts etc....

1 – 2 – 3 Utilisation des radiations UV

Très courant pour désinfecter les locaux mais leur efficacité est contestée pour les formes sporulées. On stérilise les pipettes, les boites de pétri.

1 – 2 – 4 Autres formes de stérilisation

l'ébullition : elle n'est efficace que pour la destruction des formes végétatives, les spores résistent.

La tyndalisation : Réservée pour la stérilisation des substances non autoclavables.

La stérilisation par filtration : elle utilise comme filtre une paroi poreuse ou une membrane filtrante.

Produits antiseptiques

Gaz toxiques : comme oxyde d'éthylène pour stériliser les sacs en plastique.

2 - Dosages micro biologiques

Les méthodes de dosages micro biologiques permettent d'analyser le spectre d'activité antibactérienne d'une substance, mais également de quantifier cet antibiotique : diffusion sur gélose et turbidimétrie.

2 – 1 Diffusion sur gélose

Elle consiste à faire diffuser un antibiotique sur un milieu gélosé contenant une souche bactérienne sensible à cet antibiotique. La méthode des disques consiste à déposer des volumes identiques représentant plusieurs dilutions de la substance sur des rondelles de papier buvard. Ces disques sont mis en contact d'une surface gélosée contenant 10^6 à 10^7 cellules souches indicatrices ou de spores. Pendant l'incubation, l'antibiotique diffuse dans la gélose de façon radiaire à partir de son point d'application. Après 15 à 48 heures à la température optimale de croissance du micro-organisme, on mesure les diamètres d'inhibition qui apparaissent sous l'aspect de zones claires. L'équation de la relation entre le logarithme de la concentration de l'antibiotique et le diamètre des zones d'inhibition est établie dans le domaine de la linéarité, et éventuellement reporté sur du papier semi-logarithmique.

La zone de linéarité, au sein de laquelle la détermination peut s'effectuer, est définie. L'équation permet de déterminer la concentration de la solution

d'antibiotique en fonction du diamètre de la zone d'inhibition et du facteur de dilution.

2 – 2 Turbidimétrie (milieu liquide)

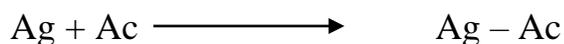
Elle consiste à incuber des tubes calibrés contenant à la fois le milieu de culture inoculé avec une bactérie sensible et les solutions de l'antibiotique à doser (ou de la solution standard).

Après la période d'incubation, l'effet de l'antibiotique sur la croissance bactérienne est mesuré par le changement de la turbidité de la culture. L'absorbance est mesurée à 530nm. Les valeurs obtenues avec des solutions standards permettent d'établir l'équation entre l'absorbance et la concentration en antibiotique. Le domaine de linéarité est une droite de référence.

3 - Autres méthodes de dosage (5)

3 – 1 Dosages immunologiques

Elles sont basées sur la réaction entre un antigène (Ag) et un anticorps (Ac) conduisant à un complexe antigène-anticorps.



Parmi ces méthodes nous avons l'ELISA et l'EMIT.

3 – 2 Caractérisations physico-chimiques

Elles font intervenir des phases préliminaires pour déterminer la stabilité, la solubilité et le caractère ionique du produit à doser. Ensuite, nous avons l'extraction du principe actif par des solvants organiques qui utilise :

- **La purification par chromatographie** qui utilise la chromatographie d'adsorption, la gel-filtration ou la chromatographie de partage.
- **La chromatographie analytique** avec la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide haute performance (HPLC)
- **Spectrométrie**

Remarque : la qualité et l'efficacité de ces méthodes de dosage peuvent être validées par certains paramètres.

4 - Paramètres de la validation

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives du fait que les prescriptions particulières d'une méthode analytique en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies. La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel il sera employé. En effet la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des méthodes, la comparaison des exigences aux valeurs des caractéristiques de la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité.

Ainsi la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique : (reproductibilité,

répétabilité, précision, exactitude, spécificité, linéarité et domaine d'utilisation, sensibilité, limite de détection) et d'en préciser les limites de validité.

La validation peut se décomposer en différents modules correspondant à l'évaluation de chacune de ses caractéristiques :

- Linéarité et domaine d'utilisation
- Répétabilité et reproductibilité
- Limite de détection
- Précision
- Exactitude
- Sensibilité

4 – 1 Linéarité ou domaine d'analyse

Evaluation de la limite haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte observée et la dilution effectuée.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. Il faut analyser chaque dilution en triple, répéter l'essai, le cas échéant, dans d'autres conditions de temps.

4 – 2 Limite de détection

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart-type de précision, mesuré sur le blanc. Si le nombre de valeur = 30, la valeur de 3 est retenue pour k.

$$LD = S \times k$$

LD = limite de détection

S = écart-type

k = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

4 – 3 Précision

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

4 – 4 Répétabilité et reproductibilité

Evaluation de la dispersion des résultats obtenus à partir des aliquotes d'un même spécimen distribuées dans une même série d'analyse (répétabilité), ou dans des séries différentes (reproductibilité).

4 – 4 – 1 Répétabilité

La mesure de la variation des résultats obtenus au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. Il faut calculer les variances de chaque série de mesure, puis la variance intra-série et l'écart-type (S) en utilisant les formules :

$$V = \frac{V_1 (n_1 - 1) + V_2 (n_2 - 1) + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}$$

$$S = \sqrt{V}$$

4 – 4 – 2 Reproductibilité

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans des laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser.

La comparaison des résultats par différents analystes, avec un matériel différent, à des dates différentes, peut aussi fournir des informations précises à cet égard.

Calculer la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules :

$$\mathbf{m} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$\mathbf{S} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - m)^2}{n - 1}}$$

x_i = chaque valeur

n = nombre total de valeurs

S = écart-type

m = moyenne

4 – 5 Spécificité

C'est l'aptitude d'une méthode à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

La sélectivité (ou l'absence de la sélectivité) peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison des résultats obtenus en l'absence de ces substances.

4 – 6 Sensibilité

C'est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage. On doit éviter de donner à ce terme un sens plus général englobant la limite de détection et / ou de dosage.

4 – 7 Exactitude et justesse

Evaluation de l'exactitude d'une méthode B par rapport à une méthode A reconnue pour sa fiabilité (technique de référence), avec des spécimens de contrôle.

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée.

Remarque : Toutes ces caractéristiques ne sont pas toujours applicables à toutes les méthodes d'essai ni à tous les produits à analyser.

Dans tous les cas, chacune des caractéristiques de performance applicable à la méthode analytique doit faire l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales.

Deuxième partie : Expérimentation au laboratoire

Chapitre I : Matériels et méthodes

1- Cadre de l'étude :

Notre étude a été réalisée au laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) chargé du contrôle de la qualité des médicaments. Le laboratoire comporte plusieurs sections :

- Physico-chimique
- Micro-biologique
- Vaccins
- Toxicologique

Il fonctionne sous la direction d'un pharmacien chef qui est un Docteur d'Etat en Pharmacie et aidé dans sa lourde tâche par des pharmaciens, des techniciens et d'un gestionnaire.

2- Réactifs et matériels

2 – 1 Souches tests

Nous avons travaillé avec différentes souches de bactéries tests qui nous ont permis de déterminer l'activité des antibiotiques de notre étude.

2 – 1 – 1 *Escherichia coli*

Encore appelés colibacilles, ce sont des bacilles Gram (-) généralement mobiles, certaines souches sont parfois capsulées. Ils appartiennent au groupe des entérobactéries et constituent des hôtes normaux de l'intestin. Ils sont responsables de la majorité des infections du tractus urinaire, de la méningite du nourrisson et des infections intestinales surtout liées au péril fécal.

2 – 1 – 1 – 1 Isolement

Nous avons ensemencé en stries la souche de bactérie sur le milieu de culture coulé en boîte de pétri à l'aide d'une anse de platine. Nous avons travaillé en respectant les conditions d'asepsie et de stérilité puis nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

2 – 1 – 1 – 2 Identification

Escherichia coli se présente sous forme de colonies moyennes lisses à bords réguliers, transparentes et non pigmentées.

Etat frais : bacilles mobiles péritriches

Gram : bacilles Gram (-).

2 – 1 – 2 *Staphylococcus aureus*

Les *Staphylocoques* appartiennent à la famille des Micrococcacées et au genre *Staphylococcus*. Ce dernier est caractérisé par son mode de groupement grappe de raisin.

Ce sont des cocci Gram (+), ils sont présent dans l'environnement et vivent très fréquemment à l'état de commensal sur la peau et les muqueuses des organes animaux et humains. Ce sont aussi des germes pathogènes donc responsables de maladies

2 – 1 – 1 – 1 Isolement

Nous avons ensemencé sur gélose en strie avec une anse de platine et nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

2 – 1 – 1 – 2 Identification

Etat frais : grosses colonies d'orées groupées en grappe de raisin.

Gram : cocci Gram (+)

2 – 2 Milieux de culture

Nous avons travaillé avec des milieux adaptés à chaque antibiotique et qui varient donc avec l'antibiotique à doser.

Les milieux de culture se définissent comme des supports nutritifs stériles, permettant aux bactéries qui sont à leur contact d'y trouver les éléments nécessaires à leur croissance. Ces éléments sont des sources de carbone, d'azote, d'énergie et d'oligo-éléments.

2 – 2 – 1 Compositions

2 – 2 – 1 – 1 Antibiotic Medium₁ (AM₁)

- Peptone pancréatique de caséine	4g
- Peptone bactérienne	6g
- Extrait de levure	3g
- Extrait de viande de bœuf	1,5g
- Glucose	1g
- Agar	1,5g
- Eau	1000ml
- pH	6,6

Remarque : Pour la préparation du milieu AM₁ nous avons pesé 3,05g de poudre pour 100ml d'eau distillée. Puis avant stérilisation nous avons ramené le pH à 6,6 par addition de NaOH 10N ou HCl 0,1N.

2 – 2 – 1 – 2 Antibiotic Medium₂ (AM₂)

- Extrait de viande de bœuf	1,5g
- Extrait de levure	6g
- Aga	1,5g
- Eau	1000 ml
- pH	6,6

Remarque : Pour la préparation du milieu AM₂ nous avons pesé 2,55g de poudre pour 100ml d'eau distillée.

2 – 2 – 1 – 3 Antibiotic Medium₁₁ (AM₁₁)

Il a la même composition que le milieu AM₁ mais son pH final est de 8,3.

2 – 2 – 1 – 4 Muller Hinton (MH)

- Infusion de viande de bœuf	300g
- Biocase	17,5g
- Amidon	1,5g
- Gélose	17g
- Eau	1000ml
- pH	7,3

Remarque : Pour la préparation nous avons pesé 3,5g de poudre pour 100ml d'eau distillée et le pH est ramené à 7,3.

2 – 2 – 1 – 5 Gélose pour entretien des souches (GES)

- Peptone trypsine de caséine	15g
- Peptone de soja	5g
- Chlorure de sodium	5g
- Agar-agar en poudre	12 – 18g
- Eau	1000ml
- pH	4,2 \pm 0,2 à 20°C

Remarque : Après préparation, la gélose est coulée en pente dans des tubes stériles et les tubes sont conservés au réfrigérateur 4°C.

2 – 2 – 2 Préparation

Nous avons :

- pesé la poudre prête à l'emploi
- dissout la poudre dans 100ml d'eau distillée
- homogénéisé le mélange avec un agitateur magnétique
- chauffé-le tout au bec bunsen dans une casserole
- versé le milieu dans un flacon stérile adapté
- vérifié le pH avec un pH-mètre
- stérilisé à l'autoclave 121°C pendant 15mn
- conservé au réfrigérateur 4°C

2 – 3 Solvants et diluants

2 – 3 – 1 Compositions

2 – 3 – 1 – 1 Tampon₁ pH 6

1g phosphate di-potassique }
4g phosphate mono-potassique } pour 500ml eau distillée

2 – 3 – 1 – 2 Tampon₃ pH 7 - Tampon₃ pH 8

8,365g phosphate di-potassique }
0,262g phosphate mono-potassique } 500 ml eau distillée

Ajuster les pH à 7 ou 8 selon les besoins par addition de soude 10N ou HCl 0,1N.

2 – 3 – 1 – 3 Tampon₄ pH 4,5

6,8g phosphate monopotassique pour 500ml eau distillée.

2 – 3 – 1 – 4 Autres...

- Eau distillée stérile
- Eau physiologique stérile
- Méthanol
- HCl 0,01N – HCl 0,1N
- NaOH 10N
- Ether de pétrole

2 – 3 – 2 Préparation

Nous avons :

- dissout les cristaux dans 500ml d'eau distillée
- mélangé avec l'agitateur magnétique
- vérifié le pH et stérilisé à l'autoclave 121°C pendant 15mn

2 – 4 Substances de référence (voir tableau II)

Ce sont des antibiotiques de référence avec lesquels nous avons préparé des solutions 10 fois plus concentrées que la plus forte concentration prévue dans la gamme d'étalonnage. Nous avons fait une dilution au 1/10^e, puis 1/2 en 1/2 avec un diluant adapté au pH de l'antibiotique. Nous avons travaillé avec 5 concentrations correspondant à 5 dilutions.

2 – 5 Antibiotiques à doser (voir tableau III)

Nous avons travaillé avec des échantillons présentés sous différentes formes à savoir : gélule, comprimé, sirop, pommade, injectable etc...

Ces médicaments ont été recueillis à la pharmacie IB (Initiative de Bamako) et centrale de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

Tableau II : Substances de référence

Substances de références	Laboratoires	N° Lot	Conservation
Sulfaméthoxazole	Sigma chomical compagny	114H0160	Température ambiante ou dessiccateur
Erythromycine	Sigma	84H0453	Dessiccateur
Sulfate Amikacine	Bristol Myers (BMS) Squibb	SL021	Réfrigérateur 4°C
Triméthoprim	Sigma	114H0139	Réfrigérateur 4°C
Amoxicilline	Sigma	29F0730	Réfrigérateur 4°C
Tétracycline	Sigma	74h0385	Réfrigérateur 4°C
Ampicilline sodique	BMS	9M14078	Réfrigérateur 4°C
Gentamicine sulfate	European pharmacopoeia	3C	Réfrigérateur 4°C

Tableau III : Antibiotiques à doser

Familles antibiotiques	DCI	Noms commerciaux	Formes	Doses (mg)
Béta – lactamines	Amoxicilline	Amoxicilline R	Gélule	500
		Penamox	Sirop	250
		Amoxicilline R	Injectable	1000
	Ampicilline	Ampicilline R	Injectable	1000
Cyclines	Tétracycline	Tétracycline R	Gélule	250
		Adiocyline	Pommade	3%
		Métacycline	Pommade	1%
	Amikacine	Amiklin	Injectable	250
	Gentamicine	Gentamicine R	Injectable	80
Sulméthoxazole + Triméthoprime	Cotrimoxazole	Cotrex	Comprimé	400 + 80
			Sirop	200 + 40
Macrolides	Erythromycine	Ericyn	Comprimé	500

2 – 6 Matériels :

- Four micro-onde
- Hotte à flux laminaire
- Autoclave
- Réfrigérateur 4°C
- Congélateur -70°C

- Incubateur
- Etuve
- Balance de précision
- Bain-marie
- Mortiers – pilons
- ReadBiotic
- Pied à coulisse
- Tubes à essai
- Tubes Mac farland 0,5
- Tubes à hémolyse
- Tubes coniques
- Flacons en verre
- Pissette
- Spatules
- Papier kraft
- Papier aluminium
- Goupillons
- Bec bunsen
- Anse en platine – anse en plastic
- Boites de pétri
- Disques non imprégnés
- Pinceaux
- Herlenmeyers
- Fioles
- Becher
- Agitateur magnétique aimant
- Vortex
- Pipette en verre
- Pipette à usage unique
- Pipette pasteur
- Pipette-aide
- Bouteille de gaz et allume-gaz
- Gants stériles – gants d'examen
- Portoirs pour tubes
- Casserole

3 - Dosage par diffusion sur gélose

3 – 1 Principe

Le dosage consiste à déterminer la sensibilité d'une souche de bactérie à un antibiotique déterminé lorsque cette souche est soumise à différentes dilutions de l'antibiotique.

Le dosage utilise la méthode de diffusion sur gélose qui consiste à comparer le diamètre d'inhibition obtenu avec l'échantillon à doser disposé à la surface d'une géloseensemencée d'une bactérie sensible, au diamètre d'une gamme de concentration connue de la substance de référence.

L'activité du médicament par rapport à l'étalon est déduite de cette comparaison.

3 – 2 Mode opératoire

3 – 2 – 1 Préparation suspension de germes

Nous avons mis une colonie de germes dans 5ml d'eau physiologique et nous avons comparé le trouble avec le tube de Mac-farland 0,5. La suspension de germes est préparée extemporanément.

3 – 2 – 2 Préparation gamme de dilution

- Etalon

$$m \text{ (mg)} = \frac{C \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times V \text{ (ml)}}{T \text{ (}\mu\text{g/mg)}}$$

Nous avons fait des dilutions de la solution mère pour avoir une gamme d'étalonnage.

- Antibiotique à doser

Nous avons fait les mêmes dilutions pour avoir une même gamme que l'étalon.

3 – 3 Titrage

Nous avons :

- régénéré le milieu de culture et mis en surfusion entre 45 et 50°C.
- préparé 0,1ml de suspension de germes avec 100ml de milieu de culture
- coulé sur 3 à 5 boites de pétri stériles
- laissé solidifier à la température ambiante
- déposé les disques stériles à l'aide d'une pince stérile
- chargé les disques avec 15µl de chaque dilution
- laissé diffuser 2 heures à la température ambiante
- incubé à 37°C pendant 24 heures .
-

3 – 4 Lecture et expression des résultats

▪ Mesure de la dose réelle (DR)

$$DR = \frac{D \times DT}{E}$$

DR = dose réelle

DT = dose mentionnée sur la forme pharmaceutique

D = moyenne diamètres inhibition échantillon

E = moyenne diamètres inhibition étalon

- **Mesure de l'activité : (A)**

$$\left. \begin{array}{l} DT = 100\% \\ DR = A\% \end{array} \right\} \frac{DT}{DR} = \frac{100}{A} \quad \boxed{A\% = \frac{DR}{DT} \times 100}$$

- **Traçage de la droite de concordance**

4 - Applications aux antibiotiques de notre étude

4 – 1 Tests de stérilité

4 – 1 – 1 Milieux de culture

Nous avons préparé les milieux de culture aseptiquement, stérilisés puis coulés dans des boîtes de pétri stériles. Après séchage à la température du laboratoire sous la flamme du bec bunsen, nous avons incubé les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

4 – 1 – 2 Tampons

Nous avons travaillé avec des milieux de culture dont la stérilité a été vérifiée. Sur ces milieux coulés en boîtes de pétri, nous avons ensemencé les tampons stérilisés en stries et nous avons incubé à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

4 – 2 Tests d'efficacité

Nous avons fait des tests préliminaires avec les milieux et tampon stériles ainsi qu'avec les substances de référence.

Nous avons :

- régénéré le milieu de culture et laissé en surfusion entre 45 et 50°C.
- préparé la suspension de germes avec le milieu de culture
- coulé sur 3 à 5 boîtes de pétri et laissé sécher à la température du laboratoire.
- déposé les disques stériles avec une pince stérile
- chargé les disques 15µl de chaque dilution de la substance de référence
- laissé diffuser 2 heures à la température ambiante
- incubé à l'étuve 37°C pendant 24 heures

4 – 3 Dosage des bêta-lactamines

4 – 3 – 1 Ampicilline

Présentation : poudre pour suspension injectable flacon 1g

Laboratoire : Bristol Meyer Squibb

Fabrication : 01/2000

Expiration : 02/2004

4 – 3 – 1 – 1 Réactifs

Souche test : *Escherichia coli* ATCC 25922

Solvant : Tampon₃ pH 7

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : AM₂

Eau physiologique stérile

4 – 3 – 1 – 2 Mode opératoire

- **Préparation suspension de germes**

Elle se fait extemporanément, nous avons travaillé avec 5ml d'eau distillée stérile et nous avons comparé le trouble avec le tube de Mac farland 0,5

- **Préparation gamme de dilution :**

- Etalon :

$$m \text{ (mg)} = \frac{C \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times V \text{ (ml)}}{T \text{ (}\mu\text{g/mg)}}$$

$$m = 13,5$$

$$C = 1200$$

$$V = 10$$

$$T = 890$$

Nous avons pesé 13,5mg de poudre d'ampicilline référence que nous avons dissout dans 10ml de tampon. Nous avons fait une dilution au 1/10^{ème} puis 1/2 en 1/2 pour avoir la gamme [60 – 30 – 15 – 7,5 – 3,75]µg/ml

- Antibiotiques à doser

Nous avons pesé 13,5mg d'ampicilline et nous avons fait une dilution au 1/10^{ème} puis ½ en ½ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4 – 3 – 2 Amoxicilline

Tableau IV : Formes d'Amoxicilline dosées

Antiseptiques	Formes	Laboratoire	Fabrication	Expiration
Amoxicilline	Gélules 500mg	Ipca	11/2002	10/2005
	Sirop 250mg	Smithkline Becham (SKB)	07/2007	16/2005
	Injectable 1g	Bristol Myers Squibb (BMS)	01/2000	0/2004

4 – 3 – 2 – 1 Réactifs

Souche test : *Escherichia coli* ATCC 25922

Solvant : tampon₁ pH 6

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : AM₂

4 – 3 – 2 – 2 Mode opératoire

Préparation gamme de dilution :

- Etalon :

$$C = 12800 \mu\text{g/ml}$$

$$V = 5\text{ml}$$

$$T = 870 \mu\text{g/mg}$$

$$m = 73,56\text{mg}$$

Nous avons pesé 73,56 mg de substance de référence que nous avons dissout dans 5ml de solvant.

Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$, au $1/8^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir une gamme :
[80 – 40 – 20 – 10 – 5] $\mu\text{g/ml}$

- Antibiotiques à doser

Nous avons pesé :

73,56mg de poudre d'amoxicilline gélule et injectable ;

147,12mg de poudre pour suspension buvable que nous avons dissout dans 5ml de solvant (sirop et gélule) et dans 10ml de solvant (injectable).

Nous avons fait des dilutions au $1/10^e$, au $1/8^e$, puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4 – 4 Dosage des cyclines

Tableau V : Formes tétracyclines dosées

Antibiotiques	Formes	Laboratoires	Fabrication	Expiration
Tétracyclines	Gélule 250mg		09/2001	08/2004
	Pommade dermique 3%	Société arabe de médicaments RAE	04/2002	01/2005
	Pommade ophtalmique 1%	BDH industrie LTD	05/2001	04/2004

4 – 4 – 1 Tétracycline gélule 250mg

4 – 4 – 1 – 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon₄ pH 4,5

Diluant : tampon₄ pH 4,5

Milieu : AM₁

4 – 4 – 1 – 2 Mode opératoire

Préparation gamme de dilution

- Etalon

C = 1600µg/ml

T = 1009µg/mg

V = 10ml

m = 15,86mg

Nous avons pesé 15,86 mg de poudre de tétracycline référence que nous avons dissout dans 10ml de solvant. Ensuite nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la gamme [80 – 40 – 20 - 10 – 5] $\mu\text{g/ml}$

- Antibiotiques à doser :

Nous avons dissout 15,86 mg de poudre de tétracycline gélule dans 10ml de solvant et nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4 – 4- 2 Tétracyclines pommades

4 – 4 – 2 – 1 Principe

Le dosage de la tétracycline pommade est basé sur l'extraction par un mélange éther de pétrole / HCl 0,01N. L'extrait obtenu après avoir subi différentes dilutions est mis en contact avec une suspension bactérienne (*Staphylococcus aureus*). Après incubation les diamètres d'inhibition sont calculés en vue de déterminer le titre.

4 – 4 – 2 – 2 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : éther de pétrole

Diluant : HCl 0,01N

Milieu : AM₁

4 – 4 – 2 – 3 Mode opératoire

- Extraction

Nous avons :

- dissout 1g de pommade dans 50ml d'éther de pétrole
- laissé le mélange dans le bêcher jusqu'à dissolution complète de la graisse
- transvasé le contenu dans l'ampoule à décanter et ajouté successivement 20ml de HCl 0,01N par ajout de 5ml.
- mélangé, laissé décanter et fait des extractions successives pour avoir la solution mère.

- Dilution :

A partir de la solution mère (20ml) nous avons fait des dilutions successives.

- Pommade 3%

Dans 20ml de solvant nous avons 30mg de principe actif.

Dans 1ml —————→ 1500µg de tétracycline

Nous avons fait une dilution au 1/10^e puis ½ en ½ pour avoir la gamme [75 – 37,5 – 18,75 – 9,375 – 4,687]µg/ml.

- Pommade 1%

Dans 20ml de solvant nous avons 10mg de principe actif

Dans 1ml —————→ 1000µg de tétracycline

Nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis ½ en ½ pour avoir la gamme [50 – 25 – 12,5 – 6,75 – 3,125] µg/ml.

4 – 5 Dosage des aminosides

4 – 5 – 1 Amikacine

Forme : poudre amiklin injectable 250mg

Laboratoire : Bristol Myers squibb

Fabrication : 01/2000

Expiration : 07/2004

4 – 5 – 1 – 1 Réactifs

Souche test : *Escherichia coli* ATCC 25922

Solvant : eau distillée stérile

Diluant : eau distillée stérile

Milieu : AM₁₁

4 – 5 – 1 – 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution :

- Etalon

C = 1600µg/ml

T = 750µg/mg

V = 10ml

m = 21,3mg

Nous avons dissout 21,3mg de poudre d'amikacine référence dans 10ml solvant.

Nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir une gamme

[80 – 40 – 20 – 10 – 5].

- Antibiotique à doser

Nous avons dissout 21,3mg poudre amikacine 250mg dans 10ml solvant. Nous

avons fait des dilutions au 1/10^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir la même gamme que

l'étalon.

4 – 5 – 2 Gentamicine

Forme : Sulfate gentamicine injectable 80mg/2ml (solution)

Laboratoire : Holden

Fabrication : 09/2001

Expiration : 09/2004

Lot : WBL 692/01/01

4 – 5 – 2 – 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon₃ pH 8

Diluant : tampon₃ pH 8

Milieu : AM₁₁

4 – 5 – 2 – 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution

$$C = 1600\mu\text{g/ml}$$

$$T = 16500$$

$$V = 10\text{ml}$$

$$m = 0,97\text{mg}$$

Nous avons dissout 0,97mg dans 10ml de solvant et nous avons fait des dilutions au $1/10^e$ puis $1/2$ en $1/2$ pour avoir la gamme [80 – 40 – 20 – 10 – 5]μg/ml

- Antibiotique à doser

Nous avons mélangé 2ml de gentamicine (80mg) avec 8ml de solvant. Nous avons fait une dilution au 1/100^e puis ½ en ½ pour avoir la gamme [80 – 40 – 20 –10 – 5]µg/ml.

4 – 6 Dosage macrolides (Erythromycine)

Forme : comprimé 500mg

Laboratoire : Maneesh pharmaceuticals PVT . LTD

Fabrication : 05/2001

Expiration : 04/2004

4 – 6 – 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : tampon₃ pH 8

Diluant : tampon₃ pH 8

Milieu : AM1

4 –6 – 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution :

- Etalon

C = 1000µg/ml

V = 10ml

T = 952µg/mg

m = 10,5mg

Nous avons dissout 10,5mg de poudre d'Erythromycine référence dans 10ml de solvant. Nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis ½ en ½ pour avoir la gamme [50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125]µg/ml.

- Antibiotique à doser

Nous avons dissout un comprimé d'Erythromycine 500mg dans 10ml de solvant. Nous avons fait des dilutions au 1/10^e puis ½ en ½ pour avoir la même gamme que l'étalon.

4 – 7 Dosage Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (Cotrex)

Tableau VI : Formes cotrex dosées

Antibiotique	Formes	Laboratoires	Fabrication	Expiration
Cotrimoxazole	Comprimé 400 + 80mg	Smithkline Beecham (SKB)	01/2001	05/2004
	Sirop 200 + 40mg	Smithkline Beecham (SKB)	01/2002	12/2004

4 – 7 – 1 Réactifs

Souche test : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Solvant : méthanol

Diluant : méthanol

Milieu : MH

4 – 7 – 2 Mode opératoire

- Préparation gamme de dilution

- Etalon

$$\left. \begin{array}{l} C_1 = 7600\mu\text{g/ml (Sulfaméthoxazole)} \\ C_2 = 15200 \mu\text{g/ml (Triméthoprime)} \end{array} \right\} C = 91200\mu\text{g/ml}$$
$$V = v_1 + v_2 = 20\text{ml}$$

$$\left. \begin{array}{l} m_1 = 76\text{mg} \\ m_2 = 15,2\text{mg} \end{array} \right\} \Rightarrow m = 91,2\text{mg}$$

Nous avons dissout 76mg sulfaméthoxazole dans 10ml solvant et 15,2mg triméthoprime dans 10ml solvant.

Nous avons fait des dilutions au 1/100^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir la gamme [38/7,6 -19/3,8 – 9,5/1,9 – 4,75/0,95 – 2,365/0,475]μg/ml.

- Antibiotique à doser

- Pour les comprimés nous avons dissout 91,2mg de poudre dans 20ml de méthanol, nous avons fait des dilutions au 1/100^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir même la gamme qu l'étalon.
- Pour le sirop nous avons mélangé 1ml de suspension avec 10ml de méthanol. Nous avons fait des dilutions au 1/100^e, au 1/10^e puis 1/2 en 1/2 pour avoir la même gamme que l'étalon.

4 – 8 Validation des méthodes de dosage

4 – 8 – 1 Répatabilité

Nous avons réalisé les tests de répétabilité en faisant chaque dosage plusieurs fois (au moins 6) dans un court instant. Nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

4 – 8 – 2 Reproductibilité

Nous avons réalisé les tests de répétabilité en effectuant chaque test au moins trois fois sur trois semaines, soit un test par semaine. Au bout de trois semaines nous avons comparé les résultats obtenus pour chaque test. Nous avons travaillé en changeant de techniciens et de matériels ; tous les appareils utilisés sont calibrés et les tests sont différés dans le temps. Nous avons incubé à 37°C pendant 24 heures.

RESULTATS

1 - Résultats des tests préliminaires

1 – 1 Tests de stérilité

1 – 1 – 1 Milieux de culture

Après 24 heures d'incubation à l'étuve 37°C nous n'avons constaté aucune pousse de bactéries sur les milieux de culture.

Nous pouvons donc conclure que les milieux étaient stériles.

1 – 1 – 2 Tampons

Même constat, aucune pousse après 24 heures d'incubation, les tampons étaient stériles.

1 – 2 Tests efficacité

1 – 2 – 1 Erythromycine référence

Tableau I: Diamètre inhibition érythromycine référence

Dilutions ($\mu\text{g/ml}$)	1/2 (50)	1/4 (25)	1/8 (12,5)	1/16 (6, 25)	1/32 (3,125)
Diamètres (nm)					

1 – 2 – 2 Ampicilline référence

Tableau II : Diamètre inhibition ampicilline référence

Dilutions ($\mu\text{g/}$)	1/2 (60)	1/2 (30)	1/8 (15)	1/16 (7,5)	1/32 (3,75)
Diamètres inhibition	20	17	15,5	12	09

1 – 2 – 4 Les autres références

Tableau III : Diamètre inhibition des autres références

Dilutions (mg/ml)		1/2 (80)	1/4 (40)	1/8 (20)	1/16 (10)	1/32 (5)
Diamètres Inhibition (mm)	Amoxicillline	20	19	18	14	10
	Tétracycline	26	24	22	18	16
	Amikacine	23	21	20	16	13
	Gentamicine					

1 – 2 – 3 Sulfaméthoxazoles et Triméthoprime

Tableau IV : Diamètre inhibition sulfaméthoxazole et triméthoprime référence

Dilutions ($\mu\text{g/ml}$)	1/2 (38/7,6)	1/4 (19/3,8)	1/8 (9,5/1,1,9)	1/16 (4,75/0,95)	1/32 (2,375/0,475)
Diamètres inhibition (mm)					

1 – 3 Résultats des dosages

1 – 3 – 1 Ampicilline

Tableau V : Diamètres inhibitions ampicilline

Dilution	($\mu\text{g/ml}$)	1/2 (60)	1/4 (30)	1/8 (15)	1/16 (7,5)	1/32 (3,75)
Diamètres	Référence	20	17	15,5	12	09
Inhibition (mm)	Échantillons	19	17	15	11,5	08

- Détermination moyenne diamètres inhibition

E = moyenne diamètres inhibitions référence

D = moyenne diamètres inhibitions échantillon

$$E = \frac{\sum E_i}{5} = \frac{20+17+15,5+12+9}{5} = 14,7$$

E = 14,7mm

$$\sum D_i \quad 19 + 17 + 15 + 11 + 8$$



$$D = \frac{\quad}{5} = \frac{\quad}{5} = 14,1 \quad D = 14,1\text{mm}$$

- **Détermination dose réelle**

$DR = \frac{D}{E} \times DT$

DR = dose réelle

DT = dose mentionnée sur la forme pharmaceutique

$$DR = \frac{14,1}{14,7} \times 1000 = 959,18$$

$DR = 959,18\text{mg}$

- **Détermination activité**

$$A\% = \frac{DR}{DT} \times 100 = \frac{959,18}{1000} \times 100 = 95,92$$

$A = 95,92\%$

- **Traçage de la droite de concordance**

1 – 3 – 2 Résultats des autres dosages :

Tableau VI : Diamètres d'inhibition

Dilutions ($\mu\text{g/ml}$)			1/2 (80)	1/4 (40)	1/8 (20)	1/16 (10)	1/32 (05)
Diamètres Inhibition (mm)	Amoxicilline	Référence	20	19	18	14	10
		Gélule	21	20	19	15	11
		Sirop	19	18	17	15	10
		Injectable	19	17	16	12	08
	Tétracycline	Référence	26	24	22	18	16
		Gélule	25	23	20	18	14
		Pommade 1%	25	22	20	15	10
		Pommade 3%	25	23	21	16	12
	Amikacine	Référence	23	21	20	16	13
		Amiklin	23	21	19	15	14
	Gentamicine						

1-3-2-1 Calcul des doses réelles et des activités :**Tableau VII** : doses réelles et activités

Antibiotiques à doser		E (mm)	D (mm)	DR (mg)	A (%)
Ampicilline	Référence	14,7			
	Injectable		14,1	959,18	95,92
Amoxicilline	Référence	16,2			
	Gélule		17,2	530,9	106,2
	Sirop		15,8	243,8	97,53
	Injectable		14,4	888,9	88,89
Tétracycline	Référence	21,2			
	Gélule		20	235,8	94,32
	Pommade 1%		18,4	0,87	87
	Pommade 3%		19,4	2,75	91,67
Amikacine	Référence	18,6			
	Injectable		18,4	247,3	98,92
Gentamicine	Référence				
	Injectable				
Erythromycine	Référence				
	Comprimé				
Cotrex	Référence				
	Comprimé				
	Sirop				

1 –3-3 Répétabilité :

Tableau VIII : Diamètre inhibition ampicilline

Dilutions	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
(µg/ml)	(60)	(30)	(15)	(7,5)	(3,75)
Diamètres	20 – 19 – 18	17 – 19 – 17	15,5 – 16 – 14	12 – 12 – 11	9 – 9 8
inhibition	19 – 20 - 20	14 – 15 -15	14 – 15 - 15	12 – 13 - 12	9 – 10 - 9
(mm)					

Tableau IX : Diamètre inhibition des autres antibiotiques

Dilutions (µg/ml)		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
		(80)	(40)	(20)	(10)	(5)
Diamètres	Amoxi	20 – 19– 19	19-17 –19	18-18-17	14-12-13	10-11-10
		cilline	18 – 20 - 19	18-17-18	18-17-18	14-14-14
	Tétra	26 – 25 –24	24-23-24	22-22-23	18-19-18	16-15-14
		cycline	26 – 26 - 25	24-24-24	22-21-22	18-18-19
	Ami	23 – 23 –22	21-20-21	20-19-20	16-17-16	13-13-13
kacine		23 – 22 - 23	22-21-20	20-20-20	16-17-15	14-13-12
Genta						
micine						