

MARIE-CLAUDE GUAY

**DÉTECTION RAPIDE DE MICROORGANISMES DANS DES
PRODUITS PHARMACEUTIQUES À L'AIDE DE LA MÉTHODE
DEFT**

Mémoire
présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

JURY D'ÉVALUATION :
Richard Villemur, Ph.D.
François Lépine, Ph.D.
Michel Riverin, Ph.D., Pharm. (Sabex inc.)

Février 2000
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
SOMMAIRE.....	I
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Introduction.....	6
2. La dispersion.....	6
2.1 Les produits aqueux.....	7
2.2 Les produits solides.....	7
2.2.1 La dispersion des aliments.....	7
2.2.2 Les crèmes et les onguents.....	8
2.2.2 Les comprimés et les capsules.....	10
3. La filtration.....	14
3.1 Les filtres.....	15
4. La coloration.....	16
4.1 La fluorescence.....	16
4.2 Les fluorochromes.....	17
5. La visualisation.....	18
5.1 La microscopie épifluorescente.....	18
6. La corrélation.....	21
6.1 Industrie pharmaceutique.....	21
6.2 Industrie alimentaire.....	22
APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	24
1. Microorganismes.....	25
2. Milieux de culture et tampons.....	25
3. Courbe standard.....	26
4. La méthode DEFT.....	27
5. Les sirops Novahistex™ et Novahistine™.....	28
5.1 La méthode standard.....	28
5.2 Filtration des sirops pour la méthode DEFT.....	28
5.3 Témoins.....	28
6. La crème Topicort™.....	29
6.1 La méthode standard.....	29
6.2 Dispersion de la crème pour la méthode DEFT.....	29
6.3 Témoins.....	30

6.4	Préparation de l'isopropyl myristate (IPM).....	30
6.5	Détermination de la valeur D de l'IPM.....	31
7.	Les capsules Altace™	33
7.1	La méthode standard.....	33
7.2	Dispersion pour la méthode DEFT.....	33
7.3	Témoins.....	34
7.4	Détermination du pourcentage de digestion par les enzymes.....	34
RÉSULTATS.....		36
1.	Courbe standard	37
2.	Concordance entre la technique DEFT et la méthode standard par filtration.....	38
3.	Les sirops Novahistex™ DM, Novahistine™ DH, Novahistex™ DH Novahistex™ C et Novahistex™ DH Expectorant	40
4.	La crème Topicort™	43
5.	Les capsules Altace™	46
DISCUSSION		50
1.	Méthode DEFT	51
2.	Application de la méthode DEFT	53
2.1	Les solutions aqueuses.....	53
2.2	Les sirops Novahistex™ et Novahistine™.....	53
2.3	La crème Topicort™.....	54
2.4	La capsule Altace™.....	56
3.	Méthodes semi-automatisées et automatisées.....	59
3.1	Optomax System III.....	59
3.2	AMS 40-10 Image Analyzer.....	59
3.3	Bactoscan 8000.....	60
3.4	ChemScan.....	60
3.5	Méthode Ab-DEFT.....	61
CONCLUSION.....		63
REMERCIEMENTS.....		66
BIBLIOGRAPHIE		68

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Structure moléculaire de l'amylopectine (73 %)	11
Figure 2 : Structure moléculaire de l'amylose (27 %)	11
Figure 3: Diagramme de Jablonski illustrant les différentes étapes d'excitation d'un fluorochrome (source: Haugland, 1996)	16
Figure 4 : Acridine Orange (C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃)	18
Figure 5 : a) Schéma représentant le microscope à épifluorescence b) Schéma représentant la trajectoire des rayons lumineux (source : Olympus, 1982)	20
Figure 6: Régression linéaire de la courbe standard de la densité optique à 600 nm en fonction de la concentration cellulaire d'une culture pure d' <i>Escherichia coli</i>	37

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1: Détermination de la Valeur D calculée entre les temps 15 et 60 min, 0 et 60 min et 0 et 120 min à l'aide du nombre de bactéries énumérées dans les deux milieux de culture utilisés.	32
Tableau 2: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec du PBS.....	39
Tableau 3: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec le sirop Novahistex TM DM.	41
Tableau 4 : Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec les sirops narcotiques Novahistex TM et Novahistine TM	42
Tableau 5: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec la crème Topicort TM	45
Tableau 6: Résultats démontrant le pourcentage d'amidon digéré par les enzymes par rapport à un contrôle sans enzymes.	48
Tableau 7 : Comparaison entre la méthode DEFT avec la méthode standard dans Altace TM	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ab-DEFT	:	"Antibody-Direct Epifluorescent Filter Technique"
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
AO	:	Acridine Orange
ATCC	:	"American Type Culture Collection"
ARN	:	Acide RiboNucléique
BCECF	:	2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(an-6) carboxyfluorescein
BHI	:	Bouillon d'infusion de cœur de bœuf et cerveau de vache
BN	:	Bouillon Nutritif
C₁₂FDG	:	"Fluorescein di-β-galacto-pyranoside C ₁₂ fatty acid binding
CTC	:	"5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride"
DAPI	:	4,6-diamino-2-phenylindole
DEFT	:	"Direct Epifluorescent Filter Technique"
DEFT-MEM	:	"Direct Epifluorescent Filter Technique-Membrane"
°C	:	Degré Celsius
FITC	:	Isothiocyanate de fluorescéine
g	:	Gramme
g/L	:	Gramme par litre
HMRC	:	Hoechst Marion Roussel Canada
INT	:	"2(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride"
IPM	:	Isopropyl Myristate
KH₂PO₄	:	Phosphate dipotassique

L	:	Litre
M	:	Molaire
mM	:	Millimolaire
min	:	Minute
mL	:	Millilitre
μL	:	Microlitre
mm	:	Millimètre
mm²	:	Millimètre carré
mmHg	:	Millimètre de mercure
NaCl	:	Chlorure de sodium
nm	:	Nanomètre
PBS	:	"Phosphate Buffer Saline"
PVC	:	Chlorure de Polyvinyle
r²	:	Coefficient de corrélation
TSA	:	Gélose Tryptique Soja
TSB	:	Bouillon Tryptique Soja
UFC	:	Unité Formatrice de Colonies
USP	:	United States Pharmacopoeia
v/v	:	volume/volume
<	:	plus petit que
>	:	plus grand que

SOMMAIRE

La méthode DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) est une méthode de détection rapide des microorganismes. Lors de cette étude, nous avons voulu démontrer l'applicabilité de la méthode DEFT à des produits pharmaceutiques de différentes compositions. Le problème majeur lié à l'application de cette méthode était qu'elle reposait principalement sur la filtration de l'échantillon. Nous avons un type de produits liquides: les sirops Novahistex™ et Novahistine™; et deux produits solides: Topicort™ (une crème) et Altace™ (une capsule principalement composée d'amidon). Étant donné la nature des produits solides, nous avons eu à développer des méthodes de dispersion et d'extraction des produits afin de pouvoir visualiser les microorganismes en microscopie épifluorescente.

Les résultats obtenus à l'aide des nouvelles méthodes d'extraction et de dispersion développées ont permis l'application de la méthode DEFT aux trois produits à l'étude. En effet, une excellente corrélation a été obtenue entre la méthode DEFT et la méthode standard. Pour les sirops, nous avons obtenu des comptes normalisés variant de $1,5 \times 10^8$ à $3,5 \times 10^8$ UFC/mL pour la méthode standard, tandis que pour la méthode DEFT, les comptes normalisés variaient de $1,5 \times 10^8$ à $5,0 \times 10^8$ bactéries/mL. Pour les crèmes, nous avons obtenu des comptes normalisés variant de $1,5 \times 10^8$ à $7,0 \times 10^8$ bactéries/mL pour la méthode DEFT et des comptes variant entre $1,0 \times 10^8$ à $7,0 \times 10^8$ UFC/mL pour la méthode en gélose coulée standard ainsi qu'une faible perte de microorganismes occasionnée par la présence de l'isopropyl myristate (IPM) utilisée pour la dispersion. Alors que pour le contenu de la capsule Altace™ des comptes normalisés variant de $1,5 \times 10^8$ à $2,0 \times 10^8$ UFC/mL ont été obtenus à l'aide de la méthode standard, des comptes normalisés variant de $1,5 \times 10^8$ à $3,5 \times 10^8$ UFC/mL ont été obtenus pour la méthode DEFT. Malgré ces bonnes corrélations pour le contenu de la capsule Altace™, il ne faut pas négliger la perte occasionnée par le passage sur le pré-filtre. Cette perte n'étant pas quantifiable à cause de la diffusion de microorganismes dans les pré-filtres, elle n'a pas influencé les résultats puisque nous avons observé une bonne corrélation entre la méthode standard et la méthode DEFT.

INTRODUCTION

Les compagnies pharmaceutiques font de plus en plus face à des normes strictes de contrôle de la qualité de leurs matières premières et de leurs produits finis. Ceux-ci doivent avoir la bonne composition, une proportion précise d'ingrédients et être exempts de toute contamination chimiques et microbiennes. Par conséquent, un temps précieux est accordé aux différentes analyses sur tous les produits avant qu'ils soient libérés sur le marché.

Les produits pharmaceutiques peuvent être sujets à la contamination microbienne pendant leur fabrication et leur production ce qui peut occasionner une diminution ou une perte de l'efficacité du médicament et même causer des problèmes de santé graves. Ces contaminations peuvent provenir des matières premières qui entrent dans la composition du produit ou être introduites lors de la fabrication par des équipements contaminés, par les opérateurs, par l'air ou tout simplement par l'eau.

Dans l'industrie pharmaceutique, la détection bactérienne est effectuée de façon systématique pour tous les produits qui sont susceptibles de développer une croissance bactérienne. Cependant, ceci nécessite beaucoup de temps et d'argent, car les analyses sont de plus en plus nombreuses afin de respecter les normes gouvernementales. C'est donc dans cette optique que l'industrie s'oriente vers le principe du "Juste à temps", c'est-à-dire obtenir les résultats d'analyses de demain aujourd'hui sur tous les produits nécessitant une analyse microbiologique. Ces analyses se doivent d'être rapides, efficaces, reproductibles, sécuritaires, faciles et validables. Ce que l'on veut, c'est libérer les produits le plus rapidement possible sur le marché sans qu'il y ait trop de délais entre la production et la mise en marché. Cette libération plus rapide signifie une diminution du volume de produits à entreposer ce qui s'avère très bénéfique, car certains produits sont saisonniers. Ceci entraîne donc une diminution des frais d'entreposage en plus d'une économie d'espace. Contrairement aux tests de contrôle de la qualité pour les analyses chimiques et physico-chimiques, les tests de détection de microorganismes sont longs (2 à 14 jours). L'industrie fait donc face à des contraintes de productivité et de compétitivité car les produits doivent être acheminés sur le marché le plus rapidement

possible. L'attente des résultats des tests de contrôle de la qualité pour les microorganismes peut retarder de façon significative la libération des produits.

Les méthodes classiques de détection microbienne nécessitent la croissance des microorganismes sur des milieux nutritifs solides ou liquides. Si plusieurs microorganismes peuvent croître en 24 heures, certains autres peuvent facilement exiger plus d'une semaine. Pour remédier à ces temps d'attente, la meilleure stratégie est l'observation directe des microorganismes contenus dans les matières premières et dans les produits finis.

La méthode que nous avons privilégiée est l'observation directe de microorganismes en microscopie à épifluorescence, plus communément appelée la méthode DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique). Cette méthode a été abondamment utilisée dans le domaine alimentaire pour dénombrer les bactéries contenues dans l'eau et le lait par exemple. Elle commence à être utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la détection directe de microorganismes dans les fluides intraveineux et dans l'eau purifiée.

La méthode DEFT s'applique en plusieurs étapes. La première étape consiste à la dispersion du produit, s'il y a lieu. La seconde étape est la filtration du produit sur un filtre qui retient les microorganismes. Viens ensuite l'étape de la coloration des microorganismes à l'aide d'un fluorochrome. Finalement, il faut procéder à l'examen de la membrane en microscopie épifluorescente. Chaque étape possède une problématique qui varie selon le produit analysé. Ainsi, la méthode DEFT est facilement applicable pour des échantillons aqueux comme l'eau, les solutés et les sirops. Il en est tout autrement pour les crèmes, les gels, les onguents, les comprimés et les capsules où la matière se disperse plus difficilement et peut facilement provoquer le blocage du filtre rendant ainsi la méthode totalement inutilisable.

Le principal objectif de mon projet de recherche a été de trouver les conditions optimales qui permettent d'utiliser la méthode DEFT avec des produits pharmaceutiques.

Trois produits typiques ont servi de modèle à notre étude: la capsule Altace™ (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine), la crème Topicort™ (corticostéroïde topique à action anti-inflammatoire, antiprurigineuse et vasoconstrictrice) et les sirops Novahistex™ et Novahistine™ constitués d'une gamme de sirop partant de simples antitussifs, à des décongestionnants et à des expectorants puissants avec ou sans codéine. Des protocoles de dispersion ont été établis afin de permettre une filtration adéquate des produits et une coloration avec les fluorochromes. Nous avons aussi pu faire la corrélation entre la méthode DEFT et la méthode standard à l'aide de cultures en géloses nutritives.

Les expériences ont été réalisées à la compagnie Hoechst Marion Roussel Canada (HMRC) et avaient pour but l'application éventuelle de la technique DEFT à des produits pharmaceutiques fabriqués par cette même compagnie. Comme mentionné ci-haut, différentes formes posologiques ont été utilisées. Il est d'abord important de noter qu'il n'existait aucune méthode de filtration directe d'un échantillon pour la technique DEFT utilisant des crèmes, des capsules ou des sirops.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

La méthode DEFT, telle qu'on la connaît aujourd'hui, a été développée par Graham L. Pettipher au début des années 1980 au National Institute for Research in Dairying de Reading en Grande-Bretagne afin d'effectuer des comptes totaux de microorganismes dans le lait cru (Pettipher *et al.*, 1980). Cette méthode rapide supprime toutes les incubations préalables à l'analyse et les résultats sont disponibles en moins de 30 minutes suite à l'échantillonnage. De plus, elle nécessite peu de matériel et elle est peu coûteuse (Pettipher *et al.*, 1980, 1981, 1982a; Holah *et al.*, 1988; Rodrigues et Kroll, 1988; Wirtanen *et al.*, 1995 et Vivengis *et al.*, 1996). Par la suite, d'autres chercheurs ont adapté la méthode DEFT à une variété d'aliments et à certains produits pharmaceutiques tels les fluides intraveineux (Denyer et Ward, 1983; Denyer et Lynn, 1987; Esteban *et al.*, 1992)

La méthode DEFT comporte quatre principales étapes: (1) la dispersion du produit en une solution pouvant être filtrée, (2) la filtration, (3) la coloration des microorganismes à l'aide d'un fluorochrome et (4) l'observation de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Dans cette revue bibliographique, ces quatre étapes seront détaillées. Toutefois, comme il y a peu de documentation sur la méthode DEFT appliquée à des produits pharmaceutiques, nous avons quand même relevé certains passages concernant cette méthode utilisée dans l'industrie alimentaire. En soi, la problématique des produits alimentaires et des produits pharmaceutiques est semblable.

2. La dispersion

Les produits pharmaceutiques sont constitués de différentes matières premières pour former des produits que l'on retrouve sous forme de comprimés, de capsules, de solutés, de sirops, de crèmes ou d'onguents. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour arriver à obtenir une dispersion plus efficace du produit afin de réussir une bonne préparation des produits et une filtration convenable. Certaines de ces méthodes utilisent des moyens mécaniques tels le stomacher, la pré-filtration, l'homogénéisation, la

décantation et la centrifugation. D'autres utilisent des moyens chimiques tels des solvants organiques, des surfactants ou des moyens biochimiques comme des enzymes.

2.1 Les produits aqueux

Les produits aqueux, les solutés ou les sirops, ne requièrent généralement aucune préparation ou extraction étant donné la nature du produit qui est facilement filtrable. Dans l'industrie alimentaire, le lait est un des produits aqueux soumis à la méthode DEFT pour détecter la présence de microorganismes. Dans certains cas, un traitement avec de la trypsine et du Triton X-100 a été nécessaire afin de lyser les cellules somatiques et disperser les globules de gras (Pettipher *et al.*, 1980, 1981, 1982a; Fernandez-Astorga *et al.*, 1996).

2.2 Les produits solides

Les produits solides peuvent être difficiles à disperser et à dissoudre dans l'eau rendant ainsi l'application de la méthode DEFT complexe compte tenu de la présence de débris ou de particules insolubles qui bloquent les filtres et qu'il faut éliminer.

2.2.1 La dispersion des aliments

Dans l'industrie alimentaire, plusieurs méthodes chimiques et mécaniques de dispersion ont été mises au point afin de disperser les corps gras et les aliments rendant les échantillons plus faciles à filtrer. Étant donné la teneur en gras de certains aliments, un traitement enzymatique ou un ajout de surfactant doit être effectué. Par exemple, pour des aliments comme le lactosérum et la crème glacée, un traitement avec de la trypsine et du Triton X-100 a été utilisé afin de disperser les globules de gras. Par la suite, les échantillons ont été dilués afin d'être bien filtrés (Pettipher *et al.*, 1981). Pour les aliments solides comme les viandes, Vivengis *et al.* (1996) ont effectué une extraction au n-hexane avant la pré-filtration; le n-hexane a par la suite été éliminé par évaporation.

Celui-ci a permis d'éliminer la matière grasse des viandes pour faciliter la filtration permettant ainsi un bon recouvrement bactérien.

Tout en poursuivant avec les moyens mécaniques, Pettipher et Rodrigues (1982c) ont effectué d'autres études sur les aliments. Ces études ont porté sur des échantillons de viandes cuites, de légumes congelés, de poissons et d'autres types d'aliments. Tous ces aliments ont été placés dans un stomacher afin de bien déloger les bactéries de la matière. Ensuite, une pré-filtration a été effectuée sur un filtre de nylon de 5,0 μm . Cette pré-filtration a servi à enlever toutes les particules grossières. Quant à Abgrall et Bourgeois (1989), ils ont dénombré la flore totale du jambon cru, du bœuf haché et de la chair de poisson cru. Ces aliments ont aussi été traités à l'aide du stomacher, suivi d'une décantation puis d'une pré-filtration et un traitement enzymatique à l'aide de trypsine pour digérer les protéines. Les résultats ont démontré que les différents traitements appliqués ne réduisaient pas le nombre de bactéries.

Pour leur part, Rodrigues et Kroll (1988) ont utilisé l'homogénéisation d'une variété d'aliments frais ou congelés dans de l'eau peptoné suivi d'une pré-filtration sur un filtre de nylon. La méthode a consisté à filtrer l'échantillon, suivi d'une incubation de quelques heures du filtre afin qu'il y ait formation de microcolonies. Les microorganismes ont ensuite été traités à l'acridine orange et observés au microscope à épifluorescence. Selon ces mêmes chercheurs, la formation de microcolonies a amélioré la coloration et a rendu la lecture en épifluorescence plus facile.

2.2.2 Les crèmes et les onguents

Les crèmes et les onguents sont composés d'ingrédients fortement hydrophobes dont certains sont des agents actifs et d'autres des agents de conservation. La dispersion de telles substances dans une phase aqueuse peut être difficile, voire impossible. La détection de microorganismes dans ces produits est généralement effectuée par une méthode qui consiste en une dispersion de la crème ou de l'onguent dans un tampon phosphate avec Tween 80 afin de libérer les bactéries de la matière. Cette dispersion est

suivie d'un étalement sur gélose nutritive (United States Pharmacopoeia, 1995). En vue d'améliorer les méthodes standards utilisées dans la dispersion des composantes hydrophobes, comme la vaseline, une homogénéisation a été pratiquée avec un tampon phosphate contenant du Tween 80. Une étape de préchauffage a été rendu nécessaire parce que la difficulté majeure des crèmes et des onguents repose sur la séparation des microorganismes de la phase lipidique. Comme les lipides sont ramollis par la chaleur, une meilleure dispersion de l'échantillon a été obtenue ainsi qu'un meilleur recouvrement (Buhlman, 1968; Walsh et Allwood, 1973). Pour ce qui est des résultats obtenus avec des crèmes et des onguents avec cette méthode, il a été démontré par Walsh et Allwood (1973) que les résultats obtenus avec les onguents sont reproductibles contrairement aux crèmes qui sont imprévisibles, car les résultats varient en fonction de la température du tampon utilisé et de la grosseur de l'échantillon. De plus, plus un échantillon est volumineux plus le recouvrement est difficile en raison de la présence d'une grande quantité de particules hydrophobes et semi-solides à la surface du filtre (Walsh et Allwood, 1973).

Comme les tampons ne permettaient pas une dispersion totale des composantes hydrophobes contenues dans les crèmes ainsi qu'une bonne filtration, des solvants tels l'isopropyl myristate (IPM) (Sokolski et Chidester, 1964; Bowman, 1969; Tsuji et Robertson, 1970; Tsuji *et al.*, 1970; Allwood et Hambleton, 1972; Bowman *et al.*, 1972; Diding *et al.*, 1973; Robertson, 1974; Tsuji et Robertson, 1973; Hart et Ratansi, 1975; Placencia *et al.*, 1982; Ringertz et Ringertz, 1982; Brown *et al.*, 1986; USP, 1995) et le n-hexane (White *et al.*, 1968; Allwood et Hambleton, 1972; Hart et Ratansi, 1975; Vivengis *et al.*, 1996) ont été utilisés pour permettre une dispersion efficace des onguents et des crèmes. L'IPM est un solvant organique recommandé par le USP (United States Pharmacopoeia) pour les tests de stérilité dans des produits pharmaceutiques. Il est utilisé chaud ou non afin d'effectuer des dispersions d'onguent à base de gelée de pétrole ou de crème. Une des premières équipes à utiliser cette méthode a été Sokolski et Chidester (1964) pour des tests de stérilité. Ils ont utilisé l'IPM chaud pour disperser des échantillons d'onguents afin d'extraire les microorganismes de la matière hydrophobe. Par la suite, il y a eu filtration de l'échantillon d'où ils ont obtenu un meilleur

recouvrement qu'avec la méthode standard. Grâce à cette méthode, les microorganismes sont concentrés sur le filtre et les agents antimicrobiens ainsi que la gelée de pétrole sont éliminés par le simple rinçage du filtre. Contrairement à la méthode standard en gélose coulée ou par étalement, où les agents de conservation et les ingrédients actifs sont toujours présents. Ces derniers peuvent provoquer un effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes (Tsuji *et al.*, 1970; Brown *et al.*, 1986).

Quant au n-hexane, il a été utilisé afin de disperser les composantes lipidiques des crèmes et des onguents par Allwood et Hambleton (1972). En effet, ils ont effectué des études comparatives de solvants et d'émulsifiants pour la dispersion des crèmes ou des onguents. Ils ont comparé l'IPM, le n-hexane, le Tween et le polyéthylène glycol pour conclure que l'IPM donne 100% de recouvrement bactérien dans des onguents et des crèmes. Par la suite, Hart et Ratansi (1975) ont appuyé les études précédentes en comparant les mêmes solvants pour démontrer que: 1) le n-hexane est plus toxique pour les bactéries, 2) l'IPM et le Tween donne un bon recouvrement bactérien, et 3) les huiles comme celles de paraffine enveloppent les bactéries empêchant ainsi un bon recouvrement.

2.2.2 Les comprimés et les capsules

Les comprimés et les capsules sont composés de différents ingrédients actifs qui peuvent être plus ou moins solubles dans l'eau, causant ainsi le blocage des filtres. Tel est le cas des capsules d'Altace™ qui sont principalement composées d'amidon pré-gélatinisé et dont l'ingrédient actif est le ramipril.

L'amidon est un polysaccharide hétérogène insoluble dans l'eau et composé de deux polymères de haut poids moléculaire: l'amylopectine (Figure 1) et l'amylose (Figure 2). Par exemple, l'amidon de maïs est composé d'environ 27 % d'amylose et 73 % d'amylopectine (Merck index, 1989). Ces deux molécules, l'amylose et l'amylopectine, possèdent des propriétés physiques différentes. L'amylose est linéaire; elle est constituée de lien α -D-(1,4)-glycosidique et, en solution, la chaîne adopte une

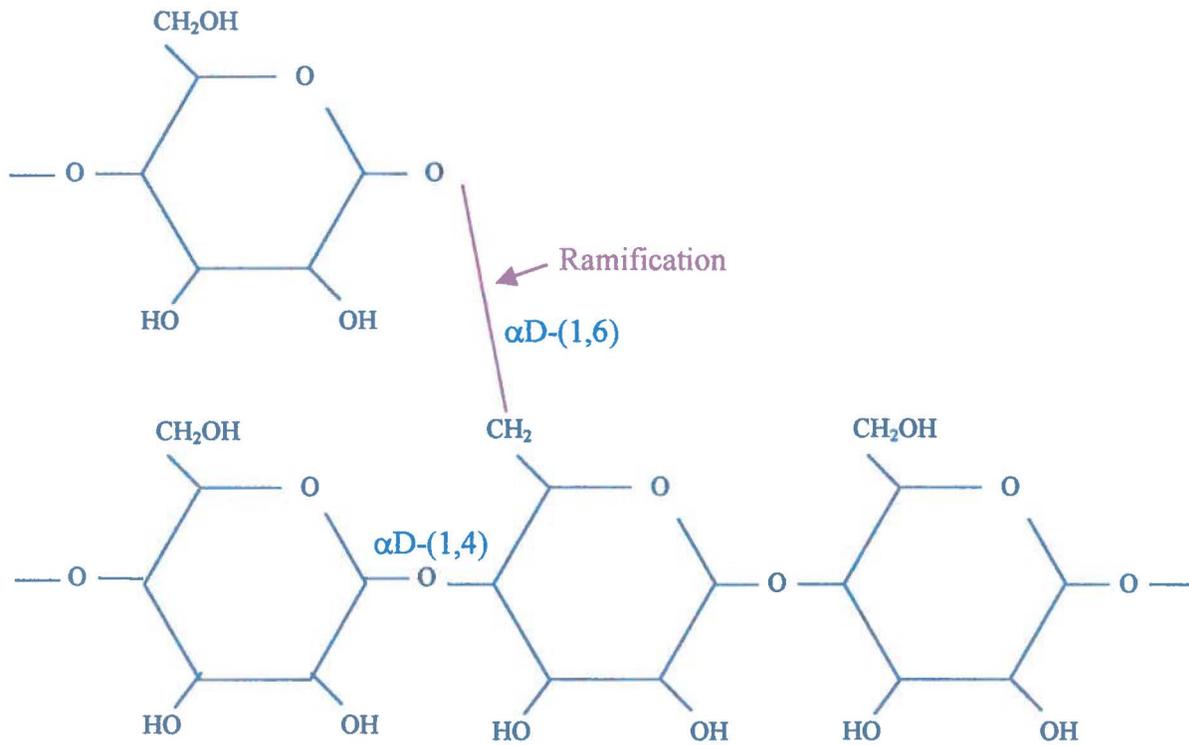


Figure 1: Structure moléculaire de l'amylopectine (73 %)

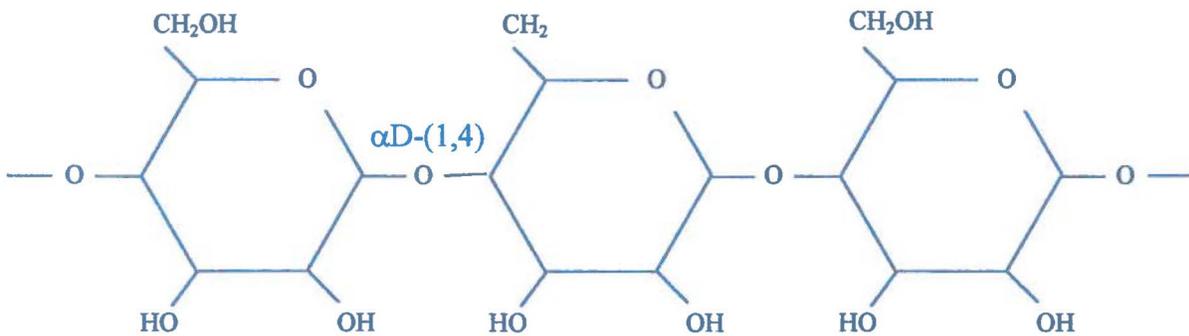


Figure 2: Structure moléculaire de l'amylose (27 %)

forme hélicoïdale (Hart, 1987; Merck index, 1989). Quant à l'amylopectine, c'est une molécule ramifiée où la majorité des liens sont de type α -D-(1,4)-glycosidique alors que 4% sont de type α -D-(1,6) glycosidique. Cette structure très ramifiée a pour conséquence de faire gonfler les grains d'amidon et de former des structures colloïdales dans l'eau (Hart, 1987; Merck index, 1989).

En industrie, l'amidon se retrouve sous deux formes: native ou pré-gélatinisé. Lorsqu'il est sous forme native, l'amidon est difficilement hydrolysé par les enzymes alors que celui qui a subi un traitement de gélatinisation est facilement hydrolysé par des amylases de différentes origines (Hollo et Hoschke, 1993; Rogalski *et al.*, 1996). La gélatinisation est un traitement à chaleur élevée suivi d'un séchage où l'amidon prend une forme cristalline (Pomeranz, 1991). De plus, une relation existe entre le degré de gélatinisation et le taux d'hydrolyse enzymatique, car plus le degré de gélatinisation est élevé plus le taux d'hydrolyse est élevé (Holm *et al.*, 1988). Par contre, certaines particules d'amidon peuvent être résistantes aux enzymes et celles-ci peuvent être éliminées lors d'une incubation à des températures élevées (Würsh et Koellreutter, 1992).

Pour les capsules et les comprimés, peu d'études ont portées sur les méthodes microbiologiques menant à une dissolution efficace. En fait, une méthode de référence a été suggérée par USP qui propose une homogénéisation et une dissolution des capsules dans un tampon phosphate pH 7,2 ainsi que l'inoculation en géloses coulées (United States Pharmacopoeia, 1995).

Afin de dissoudre complètement l'amidon une hydrolyse doit être appliquée. Celle-ci peut être réalisée en utilisant différents types d'enzymes: les α -amylases (Boyer *et al.*, 1960; Allen et Spradlin, 1974; Fogarty *et al.*, 1979; Takeda *et al.*, 1983; Dessaux *et al.*, 1988; Krishnakumari et Thayumanavan, 1995), les β -amylases (Takasaki, 1976; Hyun et Zeikus, 1985), les amyloglucosidases (glucoamylases) (Pazur et Ando, 1959; Hyun et Zeikus, 1985) et les pullulanases (Abdullah *et al.*, 1966; Nakamura *et al.*, 1975; Hyun et Zeikus, 1985). Les effets de ces enzymes sont divisés en deux groupes: les endoenzymes et les exoenzymes. Les endoenzymes coupent les liens à l'intérieur de la

molécule d'amidon alors que les exoenzymes hydrolysent les liens à partir des extrémités non-réduites de la molécule (Vihinen et Mäntsälä, 1989).

Les α -amylases (EC 3.2.1.1) sont des endoenzymes qui hydrolysent les liens α -D-(1,4)-glycosidique. (Vihinen et Mäntsälä, 1989). Les produits de l'hydrolyse de l'amidon par cette enzyme sont des dextrines et un mélange d'oligomères contenant des glucoses (Vihinen et Mäntsälä, 1989). Les β -amylases (EC 3.2.1.2) hydrolysent les liens α -D-(1,4)-glycosidique et ne peuvent surpasser les liens α -D-(1,6)-glycosidique. C'est une exoamylase qui libère des molécules de maltose. Les amyloglucosidases (EC 3.2.1.3) hydrolysent les liens α -D-(1,4)-glycosidique et les liens α -D-(1,6)-glycosidique. C'est une exoenzyme qui est capable d'hydrolyser les liens α -D-(1,4)-glycosidique de l'extrémité non-réduite de l'amylose, de l'amylopectine et du glycogène. De plus, elle enlève les unités de glucose de l'extrémité non-réduite au bout de la molécule. Par contre, l'hydrolyse des liens α -D-(1,6)-glycosidique s'effectue relativement lentement (Manjunath *et al.*, 1983). Les pullulanases (EC 3.2.1.4) hydrolysent seulement les liens α -D-(1,6)-glycosidique. Ce sont des enzymes qui coupent les ramifications de la molécule d'amidon.

Généralement, la dégradation de l'amidon nécessite la présence de plusieurs enzymes, car peu d'enzymes possèdent les caractéristiques pour dégrader tout l'amidon à elles seules (Vihinen et Mäntsälä, 1989). Les α -amylases et les glucoamylases sont souvent utilisées de concert afin d'obtenir une hydrolyse complète de l'amidon (Bodnar *et al.*, 1972; Solomon, 1978; Pepler et Reed, 1987). Un ratio 1:4 α -amylases et glucoamylases a donné un résultat optimal d'hydrolyse (Rogalski *et al.*, 1996). L'application de ces enzymes est nécessaire dans les procédés de fermentation, pour la production de glucose, de maltose (Rogalski *et al.*, 1996) et de biomolécules d'importance industrielle (Fiedurek, 1991). Une combinaison de pullulanases, de β -amylases et de glucoamylases est communément utilisée en industrie pour la production de maltose et glucose (Svensson *et al.*, 1982; Yamashita *et al.*, 1997).

Une autre façon de solubiliser l'amidon consiste en une hydrolyse acide. Elle a été effectuée par Betancur et Chel (1997) et par Biliaderis (1981) avec de l'acide chlorhydrique (HCl) pendant 3 à 6 heures.

Finalement, il est possible de combiner ces deux façons d'hydrolyser l'amidon par la digestion enzymatique suivie d'une hydrolyse acide. C'est ce qu'ont réalisé Englyst et Cummings (1988). Ils ont effectué une digestion enzymatique de l'amidon à l'aide d' α -amylases et de pullulanases. Par la suite, ils ont appliqué une hydrolyse acide afin de dissoudre les polysaccharides ne contenant pas d'amidon dans un bain d'eau bouillante pendant 1 heure afin d'obtenir une dissolution complète de l'amidon.

3. La filtration

L'étape de la filtration consiste à faire passer un échantillon liquide à travers un filtre qui laisse passer la solution tout en retenant les microorganismes. La filtration a été mise au point pour des analyses microbiologiques d'eau potable par Clark et Kabler (1952), d'eaux naturelles et de surface par Goetz *et al.*, (1952), d'eaux industrielles et d'égouts par Buch (1953), d'eaux de piscine par Favero et Drake (1964), pour les aliments par Winter *et al.* (1971), pour le lait par Graves et Schipper (1966) et pour la bière par Nobile (1967). Ces analyses requéraient parfois une pré-filtration lorsqu'il y avait présence de grosses particules pouvant bloquer les pores des filtres. Toutefois, ces pré-filtres pouvaient retenir une certaine quantité de bactéries provenant d'aliments malgré les rinçages (Entis *et al.*, 1982; Pettipher *et al.*, 1989). Sabbour et El-Zanfaly (1987) ont observé que la dispersion et la filtration donnent de bons résultats comparativement à l'étalement où il y a un plus grand risque d'erreur surtout lorsque le mélange de l'échantillon est incomplet ou lorsque l'étalement n'est pas bien effectué. Un dernier facteur pouvant affecter l'efficacité de la filtration réside dans la pression sous vide qui doit se situer entre 15 et 25 mmHg afin de ne pas altérer l'intégrité du filtre et des microorganismes (Shaw et Farr, 1989; Kepner et Pratt, 1994; Wirtanen *et al.*, 1995).

3.1 Les filtres

L'efficacité de la méthode DEFT réside en grande partie dans les caractéristiques des filtres. Avant les années 60, des filtres en acétate de cellulose noir ou blanc étaient utilisés. La lecture de ces filtres au microscope était difficile, car la surface de ceux-ci était irrégulière (Pettipher, 1980, 1983b et 1983c).

Au cours des années 1960, des filtres de polycarbonate ont été développés (Fleischer, *et al.*, 1964). Ceux-ci ont permis de retenir les microorganismes à la surface du filtre grâce à des pores de formes cylindriques uniformes et non emprisonnés dans les fibres des filtres, comme c'était le cas avec les filtres d'acétate de cellulose (Hobbie *et al.*, 1977; Pettipher *et al.*, 1989). En effet, les pores du filtre de polycarbonate sont pratiqués avec un laser tandis que le filtre standard est constitué de fibres d'ester de cellulose empilées. L'efficacité de la filtration est la même pour les deux types de filtres qui ont la même porosité (Carter, 1996). Auparavant, les filtres de polycarbonate étaient transparents ce qui rendait la lecture au microscope à épifluorescence plus difficile, car les rayons émis par la lampe à vapeur de mercure n'étaient pas réfléchis par le filtre générant alors un problème d'auto-fluorescence. Pour réduire ce phénomène, un traitement préliminaire a dû être appliqué aux filtres. Celui-ci a consisté en l'application d'agents colorants noirs, tels l'Irgalan Black (Hobbie *et al.*, 1977) ou le Dylon® (Jones et Simon, 1975) afin d'augmenter l'opacité des filtres de polycarbonate.

Présentement, plusieurs sortes de filtres de polycarbonate noirs existent sur le marché. Le filtre de type Nucléopore ayant une porosité variant de 0,22 μm à 6,0 μm est majoritairement utilisé comparé aux autres filtres de polycarbonate disponibles (Korgaonkar et Ranade, 1965; Hobbie *et al.*, 1977; Pettipher, 1983c; Rodrigues et Kroll, 1990; Sjöberg *et al.*, 1990; Kepner et Pratt, 1994; Sierra *et al.*, 1997). Pour la rétention de bactéries, des filtres de 0,22 μm et 0,45 μm sont utilisés. Ceux de 0,45 μm sont favorisés au profit de ceux de 0,22 μm . Avec ces derniers, les produits sont très difficiles à filtrer, car les pores sont obstrués plus facilement. De plus, une étude effectuée par Jeffrey Carter de la compagnie Millipore au Massachussets démontre qu'un filtre de 0,45 μm retient *Pseudomonas diminuta* aussi bien qu'un filtre de 0,22 μm . De plus, le filtre de

0,45 μm permet une filtration de l'échantillon plus rapide et une meilleure diffusion des nutriments lorsqu'il est incubé sur une gélose nutritive (Carter, 1996).

4. La coloration

La coloration des microorganismes à l'aide de fluorochromes est importante afin de permettre la visualisation en microscopie épifluorescente.

4.1 La fluorescence

Le principe de base de la fluorescence repose sur 3 étapes importantes: l'excitation des molécules, l'état d'excitation et l'émission d'énergie sous forme de lumière (Haugland, 1996).

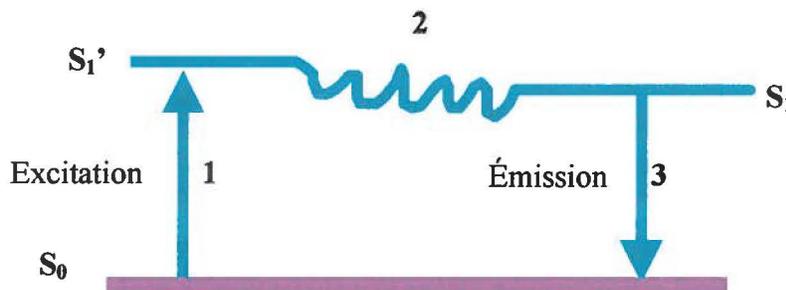


Figure 3: Diagramme de Jablonski illustrant les différentes étapes d'excitation d'un fluorochrome (source: Haugland, 1996).

Premièrement, la molécule absorbe de l'énergie provenant d'une source externe, une lampe à vapeur de mercure par exemple. Ainsi, les photons qui étaient au repos S_0 atteignent l'état d'excitation S_1' (Figure 3). Cet état d'excitation est d'une durée limitée, car les électrons sont instables parce qu'ils changent d'orbitale ce qui leur donne un degré d'énergie plus bas. Il y a alors passage de l'état S_1' à S_1 . La dernière étape est caractérisée par le retour à l'état de repos S_0 où il y a émission d'énergie sous forme de photons. À cause de l'énergie dissipée au cours de la phase d'excitation, l'énergie des

photons est plus basse, donc de longueur d'onde plus longue que la longueur d'onde de l'excitation.

4.2 Les fluorochromes

Il y a un grand nombre de fluorochromes disponibles ayant chacun leurs spécificités (McFeters *et al.*, 1995; Molecular Probe Europe BV, 1998). Certains lient les acides nucléiques tels l'acridine orange, le 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), le bisbenzimidazole, le bromure d'éthidium ainsi que la trousse BacLight™ comprenant l'iodure de propidium et le Syto 9. D'autres sont influencés par le potentiel membranaire tels la rhodamine 123 et le merocyanine. Certains sont des indicateurs de pH intracellulaire comme le 2,7-bis-(2-carboxyethyl)-5-(an-6)carboxyfluorescein (BCECF). Des fluorochromes ont été développés afin de déterminer l'activité physiologique des microorganismes comme le 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) et le 2(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT). Il y a aussi des fluorochromes qui détectent l'activité enzymatique des microorganismes soit la fluorescein di- β -galacto-pyranoside liant le C₁₂ de la chaîne d'acides gras (ImaGene Green C₁₂FDG) (McFeters *et al.*, 1995).

Le développement des comptes directs par microscopie épifluorescente a eu lieu entre les années 1940 et 1970. Pendant ce temps, le consensus général était que l'acridine orange était le meilleur fluorochrome pour effectuer des comptes bactériens. Des travaux effectués par Strugger au cours des années 1940 avec des bactéries du sol et ceux de Jannasch, au cours des années 1950 et 1960, avec des bactéries planctoniques ont démontré l'efficacité de l'acridine orange. De plus entre les années 1940 et 1980, 90% des comptes directs de bactéries par microscopie épifluorescente ont été effectués à l'aide de l'acridine orange (Kepner et Pratt, 1994).

La famille des acridines est caractérisée par une structure aromatique planaire qui démontre une forte préférence pour les acides nucléiques (Figure 4) (Francisco *et al.*, 1973; Lillie, 1977; Neidle *et al.*, 1988; Kapuscinski *et al.*, 1990; Voet et Voet 1990).

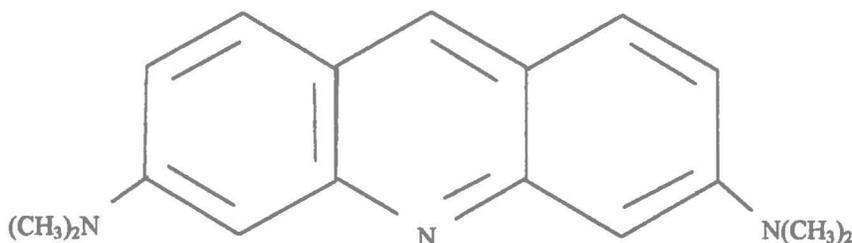


Figure 4 : Acridine Orange (C₁₇H₂₀ClN₃)

L'acridine orange a la spécificité de se lier aux cellules mortes et vivantes en donnant une coloration différentielle. Cette différence d'intensité lumineuse est due au fait que l'acridine s'intercale entre les brins d'ADN. En ce qui concerne l'ARN, pour lequel elle a plus d'affinité, ce sont plutôt des interactions électrostatiques qui lient l'acridine orange à cet acide nucléique (Lillie, 1977; Bruno *et al.*, 1996). Comme les bactéries vivantes ont un contenu plus riche en ARN, l'acridine se lie plus spécifiquement. Pour ce qui est des bactéries mortes, qui ont un contenu en ADN, l'acridine se lie de façon moins spécifique. L'acridine orange liée à l'ARN est excitée à 460 nm et émet à 650 nm ce qui donne une coloration rouge-orange et lorsqu'elle est liée à l'ADN, elle est excitée à 500 nm et émet à 526 nm pour donner une coloration verte. Malgré le fait que l'acridine orange soit le fluorochrome le plus utilisé, il présente un désavantage considérable, car il lie les particules de matière organique (McFeters *et al.*, 1991). Une étude menée par Pettipher *et al.* (1983a) a démontré que la sensibilité est augmentée de 5 fois lorsqu'il y a ajout de tampons citrate pH 3,0 et pH 6,6 rendant la coloration avec l'acridine orange plus facile pour les bactéries que pour les débris.

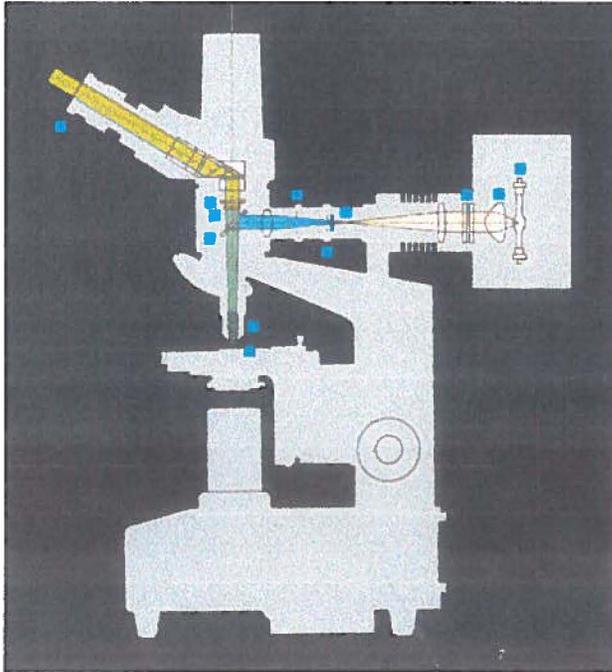
5. La visualisation

5.1 La microscopie épifluorescente

Le principe de base de la microscopie épifluorescente repose sur la source lumineuse. Par exemple, une lampe à vapeur de mercure se caractérise par sa

luminescence très élevée et sa grande stabilité. Cette lampe émet des rayons ultraviolets et visibles qui sont interceptés par un filtre d'excitation (Figure 6 a et b). Celui-ci ne laisse passer que la fréquence d'excitation appropriée. De cette façon, un meilleur contraste de fluorescence est obtenu en éliminant les autres longueurs d'ondes non désirées ce qui a pour effet de réduire l'auto-fluorescence. Le faisceau d'excitation est réfléchi par un filtre dichromatique et focalisé sur échantillon par la lentille de l'objectif ce qui excite les molécules fluorescentes. Cette fluorescence est ensuite focalisée par la lentille de l'objectif et traverse le filtre dichromatique sans être réfléchi. Un filtre d'arrêt bloque toute la lumière résiduelle ayant la longueur d'onde d'excitation. (Olympus, 1982; Holz, 1985).

a)



b)

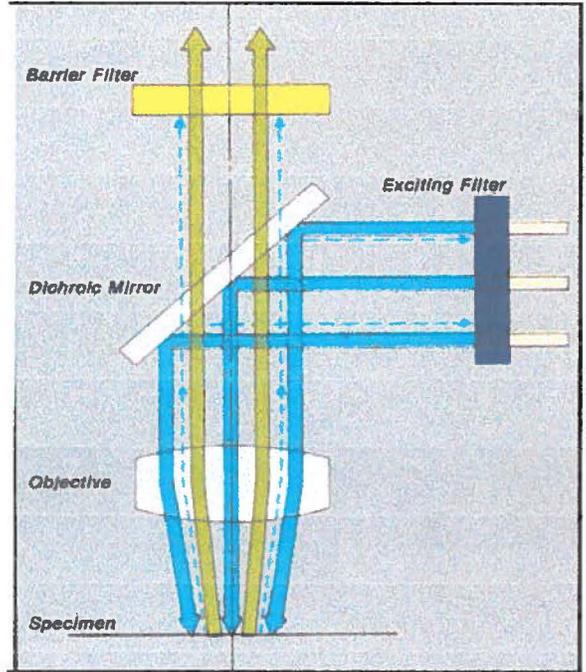


Figure 5 : a) Schéma représentant le microscope à épifluorescence
b) Schéma représentant la trajectoire des rayons lumineux
(source : Olympus,1982)

6. La corrélation

6.1 Industrie pharmaceutique

L'application de la méthode DEFT dans l'industrie pharmaceutique s'est effectuée dans un premier temps pour des fluides intraveineux. En 1983, le protocole mis au point par Pettipher *et al.* (1980) pour la filtration du lait a été appliqué par Denyer et Ward (1983) pour des fluides intraveineux. Un coefficient de corrélation moyen de $r^2 = 0,99$ a été obtenu entre la méthode DEFT et la méthode standard avec les organismes suivants: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Il a aussi été démontré que plus le volume de l'échantillon à filtrer est grand ou que le diamètre du filtre est diminué (moins grande surface à observer), plus la sensibilité de la méthode est augmentée. De ce fait, ils ont pu détecter aussi peu que 25 organismes par millilitre sur un filtre de 0,22 μm et 25 millimètres de diamètre en filtrant 500 mL de fluide intraveineux (Denyer et Ward, 1983).

Un protocole a été mis au point dans le but d'augmenter de 500 fois la sensibilité de la méthode DEFT. Pour augmenter cette sensibilité, une pré-incubation a été effectuée en variant les temps de 3 à 5 heures dans du bouillon de soja tryptique (TSB). Premièrement, l'échantillon a été filtré dans un entonnoir stérile. Le filtre a ensuite été recouvert de TSB et incubée à 37°C dans l'entonnoir. Suite à l'incubation, le TSB a été filtré et le traitement à l'acridine orange a été appliqué. Finalement, il y a eu lecture au microscope à épifluorescence. Ils ont noté que plus on augmentait le temps d'incubation, plus on augmentait la sensibilité de la méthode (Denyer et Lynn, 1987). Dans le même sens, Newby (1991) a appliqué la méthode mise au point par Rodrigues et Kroll en 1988 pour des échantillons d'aliments. Elle a consisté en l'incubation de la membrane sur une gélose sélective afin d'y laisser croître les microorganismes avant l'examen par la méthode DEFT. Cette méthode, nommée DEFT-MEM, a permis de détecter une concentration aussi petite que 10^3 organismes dans 500 mL. Newby (1991) a utilisé cette méthode afin d'analyser de l'eau purifiée d'où il a obtenu un coefficient de corrélation de $r^2 = 0,93$ entre la méthode DEFT-MEM et la méthode standard pour *Pseudomonas cepacia*. Quant à Esteban *et al.* (1992), ils ont obtenu un coefficient moyen de $r^2 = 0,99$

avec des fluides intraveineux. Connolly *et al.* (1993) ont obtenu un $r^2 = 0,94$ pour *Candida albicans*, $r^2 = 0,83$ pour *Pseudomonas aeruginosa* et $r^2 = 0,96$ pour *Staphylococcus aureus* dans des produits pharmaceutiques de différentes compositions: solide, crème, gel, émulsion et onguent. Cette nouvelle méthode, DEFT-MEM, a donné des résultats 0,5 à 1 log supérieurs à la méthode standard d'UFC. Ces résultats supérieurs sont sûrement dus au fait qu'avec DEFT il est possible de visualiser les bactéries vivantes mais non-cultivables.

6.2 Industrie alimentaire

Dans la majorité des cas, les corrélations de la méthode DEFT et de la méthode standard (UFC) ont démontré de très bons résultats. De plus, il a été affirmé que la différence entre la méthode standard et la méthode DEFT n'est pas significative (Pettipher *et al.* 1980) et que pour obtenir de bonnes corrélations entre la méthode standard et DEFT, il est nécessaire d'avoir une concentration bactérienne se situant entre $5,0 \times 10^3$ et $5,0 \times 10^8$ organismes sur le filtre (Pettipher *et al.*, 1980, 1981, 1982a; Montville, 1987; Holah *et al.*, 1988; Rodrigues et Kroll, 1988; Newby, 1991; Wirtanen *et al.*, 1995 et Vivengis *et al.*, 1996).

Pettipher *et al.* (1980), qui sont les premiers à avoir mis au point la méthode DEFT telle qu'elle est connue aujourd'hui, ont appliqué DEFT sur le lait de provenance diverses pour obtenir un coefficient de corrélation de $r^2 = 0,91$ entre la méthode DEFT et la méthode standard d'étalement sur géloses (UFC). Toujours selon Pettipher *et al.* (1983a) en collaboration avec 5 autres laboratoires, une très bonne corrélation a été obtenue entre la méthode standard UFC et DEFT. En effet, en dénombrant les bactéries du lait, ils ont obtenu un coefficient de corrélation plus grand que $r^2 = 0,90$ dans les 5 laboratoires. Par la suite, Abgrall et Bourgeois (1989) ont obtenu des coefficients de $r^2 = 0,88$ pour le jambon cru, de $r^2 = 0,84$ pour la chair de poisson cru et de $r^2 = 0,95$ pour la viande hachée. Quant à Vivengis *et al.* (1996), ils ont obtenu $r^2 = 0,87$ pour des légumes surgelés et $r^2 = 0,99$ pour *E. coli* et $r^2 = 0,80$ pour *S. aureus* dans des échantillons de viande hachée. Par contre, suite à des essais réalisés avec des lambeaux de carcasse de

poulet, ils ont obtenu $r^2 = 0,42$. Ces mauvais résultats s'expliquent par le fait qu'ils ont utilisé des filtres de $0,6 \mu\text{m}$ qui ont pu laisser passer les bactéries dans le filtrat.

APPROCHE
EXPÉRIMENTALE

1. Microorganismes

Les microorganismes utilisés, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, provenaient de cultures lyophilisées (Chrisope technologies, Lake Charles, Los Angeles).

2. Milieux de culture et tampons

Deux milieux de culture ont été utilisés, le bouillon tryptique de soja (TSB) (Difco, Detroit, Michigan) et la gélose tryptique de soja (TSA) (Difco), afin de faire croître les microorganismes précédemment cités. Le TSB était constitué de digestion pancréatique de caséine (17 g/L), de digestion papaïque de farine de soja (3 g/L), de dextrose (2,5 g/L), de chlorure de sodium (NaCl) (5 g/L) et de phosphate dipotassique (2,5 g/L). Le pH a été ajusté à $7,3 \pm 0,2$ à 25°C. Le TSA était constitué de digestion pancréatique de caséine (15 g/L), de digestion papaïque de farine de soja (5 g/L), de chlorure de sodium (NaCl) (5 g/L) et d'agar (15 g/l). Le pH de la gélose a été ajusté à $7,3 \pm 0,2$ à 25°C. Ces deux milieux, TSB et TSA, ont été stérilisés à l'autoclave (Castle, MDT Biologic Compagny, Rochester, New York) 15 min à 121°C.

Afin de déterminer la valeur D de l'isopropyl myristate (Pachem distribution, Ville St-Laurent, Montréal) un bouillon nutritif (BN) (Difco) supplémenté de Tween 80 1 % (Fisher, Whitby, Ontario) a été utilisé ainsi qu'un bouillon d'infusion de cœur de bœuf et cervelle de vache (BHI) (Difco) dans lequel nous avons ajouté du Triton X-100 0.1 % (BDH, Toronto, Ontario). Le BN était composé d'extrait de bœuf (3 g/L) et de peptone (5 g/L) et le pH a été ajusté à $6,8 \pm 0,2$ à 25°C. À cela, nous avons ajouté du Tween 80 1 % (v/v) que nous avons ensuite stérilisé à l'autoclave 15 min à 121°C. Quant au BHI, il était composé d'infusion de cervelle de vache (200 g/L), d'infusion de cœur de bœuf (250 g/L), de protéose peptone (10 g/L), de dextrose (2 g/L), de NaCl (5 g/L) et de phosphate dipotassique (2,5 g/L). Le pH a été ajusté à $7,4 \pm 0,2$ à 25°C et le tout a été supplémenté de Triton X-100 0,1% (v/v) (Robertson, 1974), pour ensuite être stérilisé à l'autoclave 15 min à 121°C.

Pour les différents rinçages, un tampon phosphate salin (PBS) (KH_2PO_4 0,125 mM, NaCl 8,5 mM à pH 7,2) a été filtré sur un filtre de polycarbonate 0,22 μm Isopore® de 47 mm de diamètre (Millipore, Bedford, Massachusetts) et stérilisé à l'autoclave 15 min à 121°C.

Pour la dissolution de la crème Topicort™, un tampon phosphate (KH_2PO_4 0,125 mM pH 7,2) + Tween 80 1 % (v/v) a été utilisé. Pour l'hydrolyse enzymatique de l'amidon, un tampon citrate de sodium 6 mM pH 6,0 a été utilisé.

Finalement, trois solutions ont été employées pour la méthode DEFT: (1) le Tween 80 1 % (v/v), (2) le tampon citrate de sodium 20 mM pH 3,0 et (3) le tampon citrate de sodium 7,1 mM pH 6,6. Toutes ces solutions ont été passées sur des filtres de polycarbonate de 0,22 μm Isopore® de 47 mm de diamètre (Millipore) pour enlever les particules susceptibles de gêner la lecture en microscopie épifluorescente. Ceux-ci ont été stérilisés à l'autoclave et conservés au réfrigérateur à 4°C – 8°C (Pettipher *et al.*, 1980).

3. Courbe standard

Comme une concentration précise de microorganismes était désirée, une courbe standard a été réalisée pour *Escherichia coli* ATCC 8739. À cet effet, une courbe standard de croissance pour *Escherichia coli* ATCC 8739 a été effectuée à une densité optique de 600 nm (UV/VIS Spectrophotomètre, Lambda 12, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut), afin de déterminer le nombre de cellules présentes à une densité optique donnée. À différents moments, un échantillon a été prélevé d'une culture pure, en incubation à 30 - 35°C dans du TSB, et la densité optique a été mesurée. Suite à la prise de la densité optique, un aliquot de 100 μL a été prélevé deux fois et a été étalé sur une gélose TSA pour ensuite être incubé 24 heures à 30 - 35°C. Suite à l'incubation, le dénombrement des colonies nous a permis de faire la courbe standard. Pour ce qui est de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 qui a été utilisé dans le calcul de la valeur D de l'IPM, des dilutions successives et des étalements sur géloses ont été effectués pour

connaître la concentration de cette culture. Les géloses ont été incubées 24 heures afin de laisser le temps aux microorganismes de croître sur les géloses TSA à 30 - 35°C. Suite au dénombrement, la culture de départ a été diluée selon la concentration désirée.

4. La méthode DEFT

L'unité de filtration consistait en un entonnoir à filtration stérile (Nalgene, Rochester, New York) dans lequel le filtre de polycarbonate noir (côté luisant vers le haut) de 47 mm de diamètre ayant une porosité de 0,45 µm Isopore® (Millipore) a été déposé. Il est important de noter que le diamètre réel de l'aire de filtration est diminuée à 20 mm due à l'entonnoir de filtration. La méthode utilisée a été celle proposée par Pettipher *et al.* (1980). Dans un premier temps, il y eu filtration de 5 mL de Tween 80 1% (v/v). Ensuite, il y a eu filtration de l'échantillon, puis de 5 mL de tampon citrate pH 3.0 20 mM et 5 mL de tampon citrate pH 6.6 7,1 mM. Un volume de 2 à 3 mL d'acridine orange (0.025% p/v) (AMD Manufacturing, Mississauga, Ontario) a été appliqué sur le filtre et incubé 1 à 2 minutes avant d'être filtré. Finalement, il y a eu filtration de 5 mL de Tween 80 1% (v/v) et de 1 mL d'alcool isopropylique 95% (v/v) (Fisher) afin de fixer les bactéries. Le filtre a ensuite été placé sur une lame de verre de 75 mm X 50 mm X 1 mm (Fisher) sur laquelle une goutte d'huile à immersion non fluorescente a été préalablement déposée (Type FF, Cargille, Fisher). Une autre goutte d'huile à immersion a été déposée sur le filtre et celui-ci a été recouvert d'une lamelle 45 mm X 50 mm (Fisher). La visualisation en microscopie épifluorescente a été effectuée à l'aide d'un microscope de type Axioskop (Zeiss, Don Mills, Ontario) possédant une lampe à vapeur de mercure HBO 50 W (OSRAM, Allemagne) et un objectif à immersion 1.30 de grossissement 100 X (Plan-Neofluar, Zeiss). Vingt champs ont été dénombrés aléatoirement et convertis en bactéries/mL selon la formule suivante (Shaw et Farr, 1989):

$$\frac{\text{Surface exposée du filtre (mm}^2\text{) X moyenne de bactéries / champs}}{\text{Surface visible par l'objectif (mm}^2\text{) / champs X volume d'échantillon (mL)}} = \text{bactéries/ mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Surface exposée du filtre} &= 1257 \text{ mm}^2 \text{ (surface réelle } 1735 \text{ mm}^2\text{)} \\ \text{Surface visible par l'objectif} &= 0,019 \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

5. Les sirops Novahistex™ et Novahistine™

5.1 La méthode standard

La méthode standard a consisté en la filtration de 10 mL de sirop dans un entonnoir à filtration stérile contenant un filtre en acétate de cellulose de 0,45 µm de 47 mm de diamètre. Par la suite, il y a eu trois lavages avec 100 mL de PBS. Dans le troisième lavage, l'équivalent de 10^2 UFC de la culture d'*E. coli* ont été ajoutées. Finalement, le filtre a été placé sur une gélose TSA et incubé à 30 - 35° C pendant 48 heures (United States Pharmacopoeia, 1995) avant l'énumération des colonies. Comme les sirops Novahistex™ et Novahistine™ narcotiques ne sont pas directement filtrables, ils ont été préalablement incubés à 40°C pendant 5 minutes pour faciliter la filtration.

5.2 Filtration des sirops pour la méthode DEFT

Le même protocole décrit en 5.1 s'est appliqué avec la méthode DEFT. Toutefois, il y a eu ajout de l'équivalent de 10^4 UFC de cellules d'*E. coli* provenant de la culture de départ. Finalement, la méthode DEFT telle que décrite à la section 4 a été appliquée.

5.3 Témoins

Afin de vérifier les paramètres, des témoins positifs et négatifs ont été effectués. Pour la méthode standard, l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* ont été ajoutées à du PBS et passées sur un filtre de 0,45 µm en acétate de cellulose. Par la suite, le filtre a été placé sur une gélose TSA et incubé à 30 - 35°C pendant 48 heures. La même quantité d'*E. coli* a directement été étalée sur une gélose TSA et incubée à 30 - 35°C pendant 48 heures.

Pour la méthode DEFT, l'équivalent de 10^4 UFC d'*E. coli* ont été ajoutées dans du PBS et passées sur un filtre de polycarbonate de 0,45µm Isopore® et la méthode DEFT a été appliquée (Section 4).

Afin de vérifier l'absence de contamination microbienne, il y a eu filtration de 100 mL de PBS suivi de 10 mL de sirop sur filtre de 0,45 µm en acétate de cellulose. Le filtre a ensuite été incubé sur une gélose TSA à 30 - 35°C pendant 48 heures. Les tampons servant à effectuer la méthode DEFT ont été filtrés sur un filtre de polycarbonate de 0,45 µm Isopore® afin de vérifier l'absence de microorganismes. La méthode DEFT telle que décrite à la section 4 a été appliquée.

6. La crème Topicort™

6.1 La méthode standard

La méthode standard a consisté en la dispersion de 1 g de crème dans un tampon phosphate 0,125 mM pH 7,2 + Tween 80 1% (v/v). Ensuite, deux échantillons de 2 mL ont été disposés dans des boîtes de Pétri vide (100 x 15 mm), puis l'équivalent de 10² UFC d'*E.coli* ont été ajoutées et 20 à 25 mL de TSA ont été coulés. Le tout a été incubé à 30 - 35°C pendant 48 heures (United States Pharmacopoeia, 1995) avant l'énumération des colonies.

6.2 Dispersion de la crème pour la méthode DEFT

Un gramme de crème Topicort™ a été mélangé manuellement pendant 2 à 3 min avec 25 mL de PBS + Tween 80 1% (v/v) et 25 mL d'IPM. L'équivalent de 10⁵ UFC d'*E. coli* ont été ajoutées. Lorsque la crème a été bien dispersée, l'homogénat a été centrifugé (Avanti 30, Beckman, Fullerton, Californie) à 12 000 g pendant 30 min à 40°C. Suite à la centrifugation, quatre échantillons de 100 µL de la phase organique (IPM) ont été prélevés pour être étalés sur des géloses TSA et incubés à 30 - 35°C pendant 48 heures afin de vérifier s'il y avait présence ou non de microorganismes dans cette phase. Ensuite, la phase organique a été aspirée et le culot bactérien a été dispersé dans la phase aqueuse résiduelle. La méthode DEFT (telle que décrite précédemment à la section 4) a été appliquée à cette suspension.

6.3 Témoins

Pour la méthode standard, l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* ont été ajoutées à du PBS et passées sur un filtre de 0,45 μm en acétate de cellulose. Par la suite, le filtre a été déposé sur une gélose TSA et incubé à 30 - 35°C pendant 48 heures. La même quantité d'*E. coli* a été directement étalée sur des géloses TSA et incubée à 30 - 35°C pendant 48 heures. Pour la méthode DEFT, l'équivalent de 10^5 UFC d'*E. coli* ont été ajoutées dans du PBS et passées sur un filtre de polycarbonate de 0,45 μm Isopore® auquel la méthode DEFT a été appliquée (Section 4).

Une gélose coulée de TSA sans échantillon a été incubée à 30 - 35°C pendant 48 heures afin de vérifier la stérilité de la gélose. Il y a aussi eu la filtration de 100 mL d'IPM et de 100 mL de PBS + Tween 80 1% (v/v) sur des filtres d'acétate de cellulose. Les filtres ont été déposés sur des géloses TSA et incubés à 30 - 35°C pendant 48 heures. Les tampons servant à effectuer la méthode DEFT ont été filtrés sur un filtre de polycarbonate de 0,45 μm Isopore® afin de vérifier l'absence de microorganismes. La méthode DEFT telle que décrite à la section 4 a été appliquée.

6.4 Préparation de l'isopropyl myristate (IPM)

Afin de diminuer sa toxicité, l'IPM a été purifié à l'aide de l'alumine basique. La méthode consistait en l'agitation de 50 g d'alumine basique (Brockman Activity 1, Fisher) en présence de 500 mL d'IPM pendant une heure. Le tout a été passé sur un filtre de 0,22 μm GS (Millipore) afin d'enlever les résidus d'alumine basique (Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974; Placencia *et al.*, 1982). Le pH a été déterminé en mélangeant 10 mL d'eau et 100 mL d'IPM pendant 60 min. Le tout a été centrifugé à 1 800 rpm pendant 20 min à température ambiante (Avanti 30, rotor F0865, Beckman). Finalement, l'IPM a été aspiré et le pH de l'eau a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (Accumet pH meter 15, Fisher). Le pH devait être plus élevé que 6,5 afin de pouvoir utiliser l'IPM à des fins de dispersion de la crème Topicort™ (Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974; Placencia *et al.*, 1982; Ringertz et Ringertz, 1982). La stérilisation de

l'IPM a été effectuée par filtration sur un filtre de 0,22 µm GS (Millipore) et recueilli dans une bouteille stérile (Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974).

6.5 Détermination de la valeur D de l'IPM

La valeur D, qui est le temps requis pour tuer 90 % des microorganismes en présence d'IPM, a été mesurée de la façon suivante (Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974; Placencia *et al.*, 1982; Ringertz et Ringertz, 1982). L'équivalent de 10² UFC de *Pseudomonas aeruginosa* ont été placées dans cinq erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL d'IPM et deux billes de verre de 6 mm. Il y a eu agitation à 250 cycles / min (HS 500, Janke & Kunkel, Ika-Werk). Au temps 0, 15, 30, 60 et 120 min le contenu de l'erlenmeyer a été filtré sur un filtre de 0,45 µm HA (Millipore) qui a préalablement été mouillé avec 5 mL de la solution de rinçage (BHI + Triton X-100 0.1% (v/v) ou BN + Tween 80 1% (v/v)). Le filtre a ensuite été rincé avec 200 mL d'une de ces deux solutions de rinçage, déposé sur TSA et incubé à 30 - 35°C pendant 7 jours. Des lectures ont été prises aux jours 1, 2 et 7. La moyenne obtenue pour les sept jours est exprimée au tableau 1.

Le calcul de la valeur D a été effectué de la façon suivante (Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974):

$$D = \frac{U}{\text{Log } a - \text{Log } b}$$

D = Temps requis pour tuer 90 % des microorganismes (min)

U = Temps (min) requis pour passer de a à b (a > b)

Log a = Log du nombre de colonies au temps a

Log b = Log du nombre de colonies au temps b

Tableau 1: Détermination de la Valeur D calculée entre les temps 15 et 60 min, 0 et 60 min et 0 et 120 min à l'aide du nombre de bactéries énumérées dans les deux milieux de culture utilisés.

Milieu de culture		
Temps (min)	BHI 0.5% + Triton X-100 0.1 % (nombre de bactéries énumérées)	BN + Tween 80 0.1% (nombre de bactéries énumérées)
0	177	182
15	105	152
30	122	122
45	79	130
60	53	72
120	6	7
Valeur D	(min)	(min)
15 – 60	100	139
0 – 60	115	149
0 – 120	82	85
Moyenne	99	124

7. Les capsules Altace™

Les capsules Altace™ sont composées à 99 % d'amidon pré-gélatinisé.

7.1 La méthode standard

Dix grammes d'amidon pré-gélatinisé ont été placés dans 90 mL de tampon phosphate (0,125 mM, pH 7.2). Deux échantillons de 1 mL ont été prélevés et placés dans des boîtes de Pétri et l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* y ont été ajoutées. Finalement, 20 à 25 mL de TSA ont été ajoutés et le tout a été incubé à 30 - 35°C pendant 48 heures avant l'énumération des colonies.

7.2 Dispersion pour la méthode DEFT

Le tampon d'entreposage des α -amylases (E.C. 3.2.1.1) et des amyloglucosidases (E.C. 3.2.1.3) était composé de sulfate d'ammonium 3.2M. Les suspensions enzymatiques ont été stérilisées par filtration à l'aide d'un STERICUP™ Express® (Millipore) muni d'un filtre de 0,22 μ m ayant une faible affinité pour les protéines. À cet effet, 800 μ L d' α -amylases (Boehringer) et 800 μ L d'amyloglucosidases (Boehringer) ont été placés dans 8 mL de tampon citrate 6 mM, pH 6,0 et le tout a été filtré.

La digestion enzymatique a été effectuée de la façon suivante. Un gramme d'amidon pré-gélatinisé a été mélangé avec 9 mL de tampon citrate 6 mM, pH 6,0. Ensuite, 1 mL de la suspension a été prélevé et ajouté dans 9 mL de tampon citrate 6 mM, pH 6,0 contenant 800 μ L d' α -amylases et 800 μ L d'amyloglucosidases préalablement stérilisés par filtration (selon la méthode décrite précédemment) et l'équivalent de 10^5 UFC d'*E. coli* ont été ajoutées. Le tout a été incubé pendant 15 minutes à 37°C. Suite à la digestion enzymatique, il y a eu pré-filtration sur un pré-filtre de fibre de verre A/D de 3,1 μ m nominal de 47 mm de diamètre (Gelman, Ville St-Laurent, Montréal). Ce pré-filtre a ensuite été placé sur une gélose TSA et incubé à 30 - 35°C pendant 48 heures. Le filtrat a été passé sur un filtre de polycarbonate 0,45 μ m Isopore® pour l'application de la méthode DEFT telle que décrite à la section 4.

7.3 Témoins

Pour la méthode standard, l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* ont été ajoutées dans du PBS et passées sur un filtre de $0,45\ \mu\text{m}$ en acétate de cellulose. Par la suite, le filtre a été déposé sur une gélose de TSA et incubé à $30 - 35^\circ\text{C}$ pendant 48 heures avant l'énumération des colonies. La même quantité d'*E. coli* a été étalée sur une gélose TSA et incubée à $30 - 35^\circ\text{C}$ pendant 48 heures. Pour la méthode DEFT, l'équivalent de 10^5 UFC de cellule d'*E. coli* ont été ajoutées dans du PBS et passées sur un filtre de polycarbonate de $0,45\ \mu\text{m}$ Isopore® auquel la méthode DEFT a été appliquée (Section 4). Un témoin a été effectué en utilisant l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* qui ont été mélangées à la suspension d'amidon. Après la digestion et la pré-filtration, le filtrat a été passé sur un filtre d'acétate de cellulose de $0,45\ \mu\text{m}$ qui a ensuite été déposé sur une gélose TSA et incubé à $30 - 35^\circ\text{C}$ pendant 48 heures avant l'énumération des colonies.

Une gélose de TSA sans échantillon a été incubée afin d'en vérifier la stérilité. Il y a aussi eu filtration de 100 mL de tampon citrate 6 mM pH 6,0 et de 100 mL de PBS sur filtre d'acétate de cellulose $0,45\ \mu\text{m}$. Les filtres ont été déposés sur des géloses TSA et incubés à $30 - 35^\circ\text{C}$ pendant 48 heures. Un pré-filtre de fibre de verre A/D, $3,1\ \mu\text{m}$ nominal stérile de 47 mm de diamètre (Gelman) a aussi été placé sur du TSA et dans un bouillon TSB pour ensuite être incubé à $30 - 35^\circ\text{C}$ pendant 48 heures afin de vérifier la stérilité des pré-filtres.

Les tampons servant à effectuer la méthode DEFT ont été passés sur un filtre de polycarbonate de $0,45\ \mu\text{m}$ Isopore® afin de vérifier l'absence de microorganismes et de cristaux. La méthode DEFT telle que décrite à la section 4 a été appliquée.

7.4 Détermination du pourcentage de digestion par les enzymes

Afin de déterminer le pourcentage de digestion de l'amidon par les enzymes, nous avons fait varier les temps d'incubation de 15 et 30 minutes et les températures de 37 et 45°C . Ces essais ont été effectués en utilisant 1 gramme d'amidon pré-gélatinisé placé dans 9 mL de tampon citrate 6 mM pH 6,0. Un mL de cette solution a été transféré dans

9 mL de tampon citrate 6 mM pH 6,0. À ce dernier, 800 μ L d' α -amylases et 800 μ L d'amyloglucosidases ont été ajoutés. Par la suite, les différents temps et températures ont été appliqués. Finalement, après la digestion enzymatique, le poids des filtres a été noté. Les résultats ont été comparés à un témoin où il n'y a pas eu de digestion enzymatique pour ainsi permettre de calculer le pourcentage de digestion des enzymes.

RÉSULTATS

1. Courbe standard

Une courbe standard de la culture d'*Escherichia coli* (Figure 6) a été réalisée afin de pouvoir définir la concentration cellulaire de la culture à une densité optique donnée. À cet effet, des densités optiques ont été prises à différents temps. De plus, des dilutions et des étalements sur des géloses TSA ont été réalisés. Une courbe de la densité optique à 600 nm en fonction de la concentration cellulaire a été effectuée et la régression linéaire a permis d'établir l'équation suivante: $y = 8 \times 10^8 x - 9 \times 10^7$ avec un $r^2 = 0,92$.

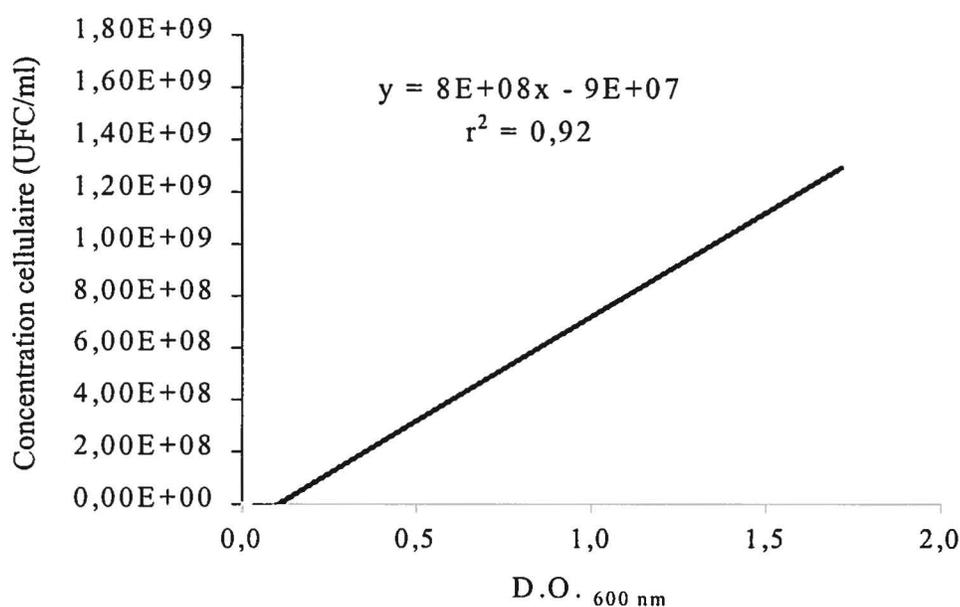


Figure 6: Régression linéaire de la courbe standard de la densité optique à 600 nm en fonction de la concentration cellulaire d'une culture pure d'*Escherichia coli*.

2. **Concordance entre la technique DEFT et la méthode standard par filtration**

Dans un premier temps, des corrélations ont été effectuées avec une solution de PBS afin de vérifier si la méthode standard par filtration et la méthode DEFT concordent bien. Les essais ont été réalisés à partir de cultures d'*E. coli* dont les D.O._{600 nm} variaient de 0,444 à 0,765 ce qui correspondait à des concentrations de $2,5 \times 10^8$ à $5,0 \times 10^8$ UFC/mL. La méthode DEFT a été appliquée à 100 mL de PBS contenant l'équivalent de 10^4 UFC provenant de dilutions de la culture initiale d'*E. coli* (concentration d'environ 10^8 UFC). En parallèle, la méthode standard a été effectuée par filtration et incubation sur une gélose TSA. À cet effet, 100 mL de PBS contenant l'équivalent de 10^1 et 10^2 UFC provenant de dilutions de la culture initiale d'*E. coli* ont été filtrés. Les comptes obtenus ont été ensuite normalisés selon la dilution appropriée pour déterminer la concentration initiale de la culture (tableau 2). Des concentrations bactériennes de $2,5 \times 10^8$ à $5,0 \times 10^8$ bactéries/mL par la méthode DEFT ont été obtenues et de $3,5 \times 10^8$ à $9,0 \times 10^8$ UFC/mL avec la méthode standard de filtration. D'après ces résultats, il est possible de conclure qu'il y a une très bonne corrélation entre la méthode standard et la méthode DEFT.

Tableau 2: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec du PBS

Essais	#1	#2	#3	#4	#5	#6
D.O. 600 nm	0,524	0,444	0,412	0,731	0,765	0,742
Concentration initiale (x10 ⁸ UFC/mL)	3,0	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0
Méthode DEFT à partir d'une dilution 10⁻⁴						
Compte*	15	8	7	12	13	11
	17	10	10	11	14	13
Compte normalisés (x10 ⁸ UFC/mL)	5,0	2,5	3,0	4,0	4,5	4,0
	5,5	3,5	3,5	3,5	4,5	4,5
Méthode standard à partir d'une dilution 10⁻⁶						
UFC	296	255	230	> 300	> 300	> 300
	274	247	> 300	> 300	> 300	> 300
Compte normalisés (x10 ⁸ UFC/mL)	3,0	2,5	2,5	> 3,0	> 3,0	> 3,0
	3,0	2,5	> 3,0	> 3,0	> 3,0	> 3,0
Méthode standard à partir d'une dilution 10⁻⁷						
UFC	33	40	33	93	61	55
	42	44	29	47	78	49
Compte normalisés (x10 ⁸ UFC/mL)	3,5	4,0	3,5	9,0	6,0	5,0
	4,0	4,5	3,0	4,5	7,5	5,0

* Nombre moyen de bactéries/champ

3. Les sirops Novahistex™ DM, Novahistine™ DH, Novahistex™ DH Novahistex™ C et Novahistex™ DH Expectorant

Comme les sirops sont sous forme liquide, il n'a pas été nécessaire de procéder à une dispersion. Lors des essais, les cultures initiales d'*E. coli* avaient une D.O._{600nm} variant de 0,282 à 0,469 (tableaux 3 et 4). Converties en UFC/mL selon l'équation de la régression linéaire de la culture d'*E. coli*, les concentrations obtenues variaient de $1,5 \times 10^8$ à $3,0 \times 10^8$ UFC/mL. Cinq essais ont été effectués pour le sirop Novahistex™ DM (tableau 3) ainsi que pour les sirops narcotiques Novahistine™ DH, Novahistex™ DH, Novahistex™ DH Exp. et Novahistex™ C (tableau 4). Il y a eu ajout de l'équivalent de 10^2 UFC lors de la filtration des sirops pour la méthode standard de filtration. Pour les cinq sirops, les comptes normalisés variaient de $1,5 \times 10^8$ à $3,5 \times 10^8$ UFC/mL. Lors de la filtration des sirops par la méthode DEFT, un préchauffage à 40°C a été nécessaire afin de faciliter la filtration. L'équivalent de 10^4 UFC, provenant de dilutions de la culture initiale d'*E. coli* ont été ajoutées aux sirops. Pour les cinq sirops, les comptes normalisés variaient de $1,5 \times 10^8$ à $5,0 \times 10^8$ bactéries/mL.

En ce qui concerne la méthode standard par filtration et la méthode DEFT, des témoins ont été effectués en remplaçant le sirop par du PBS. Ces témoins ont permis de déterminer s'il y avait toxicité des sirops envers les bactéries. Les comptes normalisés pour la méthode standard variaient de $1,5 \times 10^8$ à $3,5 \times 10^8$ UFC/mL alors qu'avec la méthode DEFT les comptes variaient de $1,5 \times 10^8$ à $4,0 \times 10^8$ bactéries/mL. À la lumière des résultats obtenus avec les sirops Novahistex™ DM, Novahistine™ DH, Novahistex™ DH Novahistex™ C et Novahistex™ DH Expectorant, nous pouvons conclure que la méthode DEFT est applicable pour les sirops relativement aux corrélations obtenues avec la méthode standard.

Tableau 3: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec le sirop Novahistex™ DM

Essais	#1	#2	#3	#4	#5
D.O. 600 nm	0,331	0,469	0,333	0,309	0,349
Concentration initiale (x10 ⁸ UFC/mL)	2,0	3,0	1,5	1,5	2,0
Méthode DEFT à partir de la dilution 10⁻⁴ dans le sirop					
Compte*	8	15	14	8	8
	11	11	14	11	11
Compte normalisé (x10 ⁸ bactéries/mL)	2,5	5,0	4,5	2,5	2,5
	3,5	3,5	4,5	3,5	3,5
Méthode DEFT à partir de la dilution 10⁻⁴ dans le PBS					
Compte*	8	11	12	-----	6
	5	13	10	-----	8
Compte normalisé (x10 ⁸ bactéries/mL)	2,5	3,5	4,0	-----	2,0
	1,5	4,0	3,5	-----	2,5
Méthode standard à partir de la dilution 10⁻⁶ dans le sirop					
UFC	250	297	265	250	175
	231	350	293	243	204
Compte normalisé (x10 ⁸ UFC/mL)	2,5	3,0	2,5	2,5	2,0
	2,5	3,5	3,0	2,5	2,0
Méthode standard à partir de la dilution 10⁻⁶ dans le PBS					
UFC	208	330	312	197	211
	199	313	278	238	150
Compte normalisé (x10 ⁸ UFC/mL)	2,0	3,5	3,0	2,0	2,0
	2,0	3,0	3,0	2,5	1,5

* Nombre moyen de bactéries/champ

Tableau 4: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec les sirops narcotiques Novahistex™ et Novahistine™

Essais		Novahistine™ DH	Novahistex™ DH Exp.	Novahistex™ C	Novahistex™ DH
D.O. 600 nm		0,300	0,323	0,282	0,299
Concentration initiale (x 10⁸ UFC/mL)		1,5	1,5	1,5	1,5
Méthode DEFT à partir de la dilution 10⁻⁴ dans le sirop					
Compte*	Moyenne¹	7,5	6,5	7,0	7,0
	Écart-type	1,1	1,3	1,8	2,5
Compte normalisé (x 10⁸ bactéries/mL)	Moyenne¹	2,5	1,6	2,5	2,0
	Écart-type	0,5	0,5	0,6	1,0
Méthode DEFT à partir de la dilution 10⁻⁴ dans le PBS					
Compte*	Moyenne¹	8,0	5,0	6,5	6,5
	Écart-type	1,6	1,4	1,3	0,5
Compte normalisé (x 10⁸ bactéries/mL)	Moyenne¹	2,5	2,0	2,0	2,0
	Écart-type	0,5	0,4	0,5	0,4
Méthode standard à partir de la dilution 10⁻⁶ dans le sirop					
Compte*	Moyenne¹	152	164	187	178
	Écart-type	11,5	35,0	3,0	6,0
Compte normalisé (x 10⁸ UFC/mL)	Moyenne¹	1,5	2,0	2,0	1,5
	Écart-type	0,1	0,3	0,03	0,1
Méthode standard à partir de la dilution 10⁻⁶ dans le PBS					
Compte*	Moyenne¹	149	172	182	177
	Écart-type	6,5	33,0	5,0	17,0
Compte normalisé (x 10⁸ UFC/mL)	Moyenne¹	1,5	1,5	2,0	2,0
	Écart-type	0,1	0,3	0,05	0,2

¹Moyenne de cinq essais pour Novahistine™ DH et quatre pour les autres

* Nombre moyen de bactéries/champ

4. La crème Topicort™

Le problème relié à la crème était son caractère hydrophobe (insoluble dans l'eau) d'où il fallait extraire les microorganismes. Lors des essais effectués, les cultures initiales d'*E. coli* avaient un D.O._{600 nm} variant de 0,257 à 0,851 ce qui correspondaient à des concentrations variant de $1,5 \times 10^8$ à $5,5 \times 10^8$ UFC/mL. Nous avons pu extraire avec succès la crème à l'aide d'un solvant hydrophobe et non toxique, l'isopropyl myristate (IPM), qui permettait la séparation des bactéries de la crème. Ainsi l'équivalent de 10^5 UFC d'*E. coli* ont été mélangées avec la crème Topicort™ et 25 mL de PBS. Après l'extraction à l'IPM (25 mL), les phases aqueuse et hydrophobe ont pu être séparées grâce à une centrifugation. La phase hydrophobe, qui s'est retrouvée à la surface, a été aspirée et le culot bactérien a pu être subséquentement dispersé dans la phase aqueuse pour ensuite être facilement filtré. Les comptes normalisés obtenus par la méthode DEFT variaient de $1,5 \times 10^8$ à $7,0 \times 10^8$ bactéries/mL.

La méthode standard consistait à mélanger 1 g de la crème Topicort™ avec 99 mL de tampon phosphate pH 7.2 + Tween 80 1 %. Deux millilitres de cette solution ont été mélangé à l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* et du TSA. Le tout a été coulé sur des boîtes de Pétri. Pour les cinq essais, les comptes normalisés variaient entre $1,0 \times 10^8$ à $7,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Nous avons vérifié l'absence de microorganismes dans la phase organique. En effet, après la centrifugation, 100 µL de la phase organique ont été étalés sur des géloses TSA en quadruplicata. Des comptes variant de 0 à 10 UFC ont été obtenus ce qui correspond à des comptes variant de 0 à 2 500 UFC ce qui, en soit, est négligeable par rapport au 10^5 UFC de bactéries de type *E. coli* ajoutées au départ. D'autres témoins ont également été effectués afin de vérifier les comptes bactériens. Ceux-ci ont été effectués de la même façon que la méthode standard, soit avec une filtration de PBS contenant l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* et 10^5 UFC pour la méthode DEFT. Des comptes normalisés de $1,5 \times 10^8$ à $4,5 \times 10^8$ UFC/mL ont été obtenus pour la méthode standard.

Pour la méthode DEFT, les comptes normalisés variaient de $1,5 \times 10^8$ à $6,0 \times 10^8$ bactéries/mL.

D'après les résultats obtenus avec la crème Topicort™, il est possible de conclure que la nouvelle méthode développée est applicable, car la récupération microbienne est excellente tout en minimisant le taux de mortalité à cause de la présence de l'IPM. De plus, les corrélations sont très bonnes relativement aux résultats obtenus avec la méthode standard et DEFT.

Tableau 5: Comparaison de la méthode DEFT avec la méthode standard avec la crème Topicort™

Essais	#1	#2	#3	#4	#5
D.O.-600 nm	0,851	0,352	0,310	0,252	0,282
Concentration initiale (UFC/mL)	5,5	2,0	2,0	1,5	1,5
Méthode DEFT à partir d'une dilution 10⁻³ dans la crème					
Compte*	220	73	63	84	45
	218	72	62	92	55
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	7,0	2,5	2,0	3,0	1,5
	7,0	2,5	2,0	3,0	2,0
Méthode DEFT à partir d'une dilution 10⁻³ dans le PBS					
Compte*	179	106	89	84	63
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	6,0	3,5	3,0	3,0	2,0
Phase organique (IPM) 100 µL					
	0	10	2	0	0
	0	6	3	5	2
	10	2	8	0	1
	0	8	0	2	0
Méthode standard à partir d'une dilutions 10⁻⁶ dans la crème					
UFC	533	170	203	180	108
	478	163	197	220	95
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	5,5	2,0	2,0	2,0	1,0
	5,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Méthode standard à partir d'une dilutions 10⁻⁶ dans le PBS					
UFC	455	150	169	161	125
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	4,5	1,5	2,0	3,0	1,5

*Nombre moyen de bactéries/champ

5. Les capsules Altace™

Pour les capsules Altace™, les essais n'ont pas été effectués sur la capsule entière, car celle-ci est de consistance gélatineuse ce qui crée un problème énorme au niveau de la filtration, la rendant même impossible. Donc, les essais n'ont été effectués que sur son contenu: l'amidon pré-gélatinisé et l'agent actif.

Les cultures initiales d'*E. coli* utilisées pour les essais liés à Altace™ avaient une D.O._{600nm} variant de 0,250 à 0,305 ce qui équivalait à des concentrations bactériennes variant de $1,5 \times 10^8$ à $2,0 \times 10^8$ UFC/mL (tableau 7). Le produit Altace™ est composé à 99% d'amidon, donc c'est un produit insoluble dans l'eau.

La méthode standard consistait à utiliser 10 g d'amidon dans 90 mL de tampon phosphate et 1 mL de cette suspension a été ajouté dans des Pétris stérile avec l'équivalent de 10^2 UFC d'*E.coli* et de la gélose TSA a été coulée sur ce mélange. Les comptes normalisés variaient de $1,5 \times 10^8$ à $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Dans le cas de la méthode DEFT, la filtration de la suspension d'amidon a provoqué le blocage du filtre. L'utilisation de pré-filtres de 3,0 à 20 μm n'a pas donné de meilleurs résultats. Ensuite, nous avons appliqué un traitement à l'aide d'enzymes (α -amylase et amyloglucosidase) suivi d'une pré-filtration sur un filtre de 3,1 μm avant l'étape finale de filtration sur filtre de polycarbonate de 0,45 μm . Nous avons varié le temps d'incubation et la température pour la digestion enzymatique. Nous nous sommes limités à des températures n'excédant pas 45°C pour ne pas endommager les microorganismes. De plus, le temps de digestion devait être limité afin de ne pas favoriser la croissance bactérienne. Le tableau 6 nous montre qu'une digestion enzymatique à 37°C pendant 15 min a permis de digérer 83% de l'amidon et que des temps plus long ou des températures plus élevées n'ont pas fait augmenter le pourcentage de digestion de l'amidon. Ainsi, suite à l'ajout de l'équivalent de 10^5 UFC d'*E. coli* à la suspension d'amidon suivi de la digestion enzymatique et de la pré-filtration, la méthode DEFT nous a donné des comptes normalisés variant de $1,5 \times 10^8$ à $3,5 \times 10^8$ bactéries/mL.

À chacun des essais, le pré-filtre a été déposé sur une gélose TSA afin de déterminer la présence de bactéries qui auraient été retenues par ce dernier. Dans tous les cas, la présence de bactéries a été détectée. À cause de la présence d'amidon résiduel sur le pré-filtre, la lecture du nombre de colonies a été impossible.

Un premier témoin à la méthode DEFT a été de filtrer l'équivalent de 10^2 UFC d'*E. coli* avec Altace™ (après digestion et pré-filtration) sur un filtre d'acétate de cellulose pour ensuite le déposer sur une gélose TSA. Les comptes normalisés obtenus variaient de $0,6 \times 10^8$ à $2,0 \times 10^8$ UFC/mL. Une croissance sur le pré-filtre a aussi été observée. Un second contrôle consistait à filtrer l'équivalent de 10^5 UFC d'*E. coli* avec seulement du PBS ayant subi le traitement enzymatique et la pré-filtration. L'énumération a été faite par la méthode DEFT. Les comptes normalisés variaient de $1,5 \times 10^8$ à $2,0 \times 10^8$ bactéries/mL.

Finalement, pour les deux méthodes, l'énumération bactérienne a été effectuée en utilisant seulement du PBS. Dans les deux cas, les comptes normalisés variaient de $1,0 \times 10^8$ à $2,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Tableau 6: Résultats démontrant le pourcentage d'amidon digéré par les enzymes par rapport à un contrôle sans enzymes.

		Poids (g)	% digéré
Contrôle négatif sans enzyme		0,285	0%
15 min	37° C	0,048	83%
	45° C	0,048	83%
30 min	37° C	0,051	82%
	45° C	0,049	82%

Tableau 7: Comparaison entre la méthode DEFT avec la méthode standard dans Altace™

Essais	#1	#2	#3
D.O. 600 nm	0,250	0,305	0,252
Concentration initiale (x10⁸ bactéries/mL)	1,5	1,5	1,0
Méthode DEFT à partir d'une dilution 10⁻³ avec le contenu de la capsule Altace™			
Pré-filtre A/D	+	+	+
Filtre de polycarbonate Compte*	116	40	49
Compte normalisés (x10⁸ bactéries/mL)	3,5	1,5	1,5
Méthode DEFT à partir d'une dilution 10⁻³ avec du PBS			
Filtre de polycarbonate Compte*	73	25	69
Compte normalisé (x10⁸ bactéries/mL)	2,5	1,0	2,0
Témoins à partir d'une dilution 10⁻⁶ avec le contenu de la capsule Altace™			
Pré-filtre A/D	+	+	+
Filtre d'acétate de cellulose UFC	55	190	90
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	0,6	2,0	1,0
Témoins à partir d'une dilution 10⁻⁶ avec du PBS			
Filtre d'acétate de cellulose UFC	177	153	188
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	2,0	1,5	2,0
Méthode standard à partir d'une dilution 10⁻⁶			
UFC	176	165	135
Compte normalisé (x10⁸ UFC/mL)	2,0	1,5	1,5

*Nombre moyen de bactéries/champ

DISCUSSION

1. Méthode DEFT

Les nouvelles méthodes de détection rapide de microorganismes dans des produits pharmaceutiques ont de l'avenir. En effet, ce que les industries pharmaceutiques veulent, c'est diminuer le plus possible les inventaires tout en éliminant les possibilités de rupture. En fait, elles cherchent à appliquer le principe du « Juste à Temps » qui signifie avoir les résultats d'analyses de demain aujourd'hui. C'est donc pour ces raisons que nous avons développé la méthode DEFT pour des produits pharmaceutiques de différentes compositions chez Hoechst Marion Roussel Canada.

Au départ, la méthode DEFT a été utilisée dans l'industrie alimentaire pour le lait (Anon., 1968; Pettipher *et al.*, 1980, 1983a, Pettipher et Rodrigues, 1981; Pettipher, 1983c; Rodrigues et Pettipher, 1984; Rodrigues et Kroll, 1985) et pour une multitude d'aliments (Pettipher et Rodrigues 1982a; Duffu et Sheridan, 1988; Holah *et al.*, 1988; Abgrall et Bourgeois, 1989; Jaeggi *et al.*, 1989; Pettipher *et al.*, 1989; Shaw et Farr, 1989; Liberski, 1990; Kroll, 1995b; Vivengis *et al.*, 1996; Sierra *et al.*, 1997). Par contre, cette méthode a été peu utilisée par l'industrie pharmaceutique. En réalité, elle n'y est utilisée que pour les fluides intraveineux et pour l'eau purifiée (Denyer et Ward, 1983; Denyer et Lynn, 1987; Shaw et Farr, 1989; Esteban *et al.* 1992). Cela explique donc la rareté de publications concernant la méthode DEFT dans l'industrie pharmaceutique. Ainsi, en ce qui concerne l'application de la méthode DEFT, nous nous sommes basés sur des publications dans le domaine alimentaire afin de réaliser l'extraction des microorganismes dans les produits à l'étude, c'est-à-dire les sirops Novahistex™ et Novahistine™, la crème Topicort™ et les capsules Altace™. Le principal objectif a été de trouver des conditions optimales afin de pouvoir appliquer la méthode DEFT à ces produits pharmaceutiques. À cet effet, nous avons à développer une méthode de détection rapide et d'énumération de microorganismes dans des produits pharmaceutiques à l'aide de la méthode DEFT. Nous devons aussi développer des méthodes physico-chimiques de séparation non destructives pour les microorganismes, trouver des moyens pour optimiser les étapes de filtration et, finalement, vérifier la

corrélation entre les méthodes conventionnelles et la méthode DEFT. Nos objectifs ont été atteints dans la majorité des cas pour les trois produits à l'étude.

Cette méthode de dénombrement de microorganismes en microscopie épifluorescente est rapide et simple. En effet, le temps de préparation de l'échantillon ainsi que la lecture ne requièrent que 30 minutes. De plus, avec cette méthode, il est possible de distinguer les cocci des bâtonnets ainsi que les levures et les moisissures, ce qui facilite la lecture lorsqu'on est à la recherche de bactéries Gram -, par exemple. Par contre, lorsque l'opérateur doit faire la différence entre des Streptocoques et des Microcoques, il est difficile d'appliquer la méthode DEFT afin de les distinguer parce que leur morphologie est identique.

La fatigue des yeux de l'opérateur est un facteur important à considérer dans l'application de la méthode DEFT, car la variation d'interprétations qu'il peut y avoir entre les différents opérateurs influence les résultats. En effet, la présence de débris ou de cristaux de fluorochrome sur les filtres peut occasionner une mauvaise interprétation de la part des opérateurs (Pettipher 1982a; Pettipher 1983c; Rodrigues et Kroll, 1990). De ce fait, l'opérateur doit avoir préalablement eu une formation rigoureuse concernant l'observation et l'énumération des microorganismes en microscopie épifluorescente.

Les filtres ont aussi leur importance au niveau de la lecture en microscopie épifluorescente, car ils se doivent d'être le plus opaques possible afin de diminuer les problèmes d'auto-fluorescence. En ce qui nous concerne, nous avons favorisé les filtres Isopore (Millipore) de polycarbonate noirs de 0,45 μm . Ils ont été préférés aux autres (MSI, Poretics et Nucléopore), car ils ont donné le meilleur temps de filtration ainsi que la meilleure opacité en microscopie épifluorescente. Il est aussi important de tenir compte du temps de filtration parce qu'avec une filtration rapide, il y a moins de chances que les pores du filtre soient colmatés par les débris et que les microorganismes aient le temps de se multiplier. Le temps de filtration est aussi avantageux par une basse viscosité de l'échantillon. Dans notre cas, nous avons des échantillons de viscosité moyenne en ce qui concerne les sirops. Cependant, pour les produits solides (Altace™ et Topicort™)

nous avons dû développer des méthodes d'extraction afin de pouvoir appliquer la méthode DEFT. L'opacité est aussi un facteur déterminant dans l'application de cette méthode car plus elle est élevée, plus il est facile de discerner les microorganismes des débris en microscopie épifluorescente étant donné qu'il y a moins de phénomènes d'auto-fluorescence.

2. Application de la méthode DEFT

2.1 Les solutions aqueuses

Les résultats obtenus dans le PBS démontrent très bien que la corrélation entre la méthode standard et DEFT est excellente et qu'elle est applicable immédiatement sans problèmes dans l'industrie pour des solutions aqueuses simples. Des études effectuées par Bowden (1977) et Newby (1991) avec de l'eau, ont révélé un coefficient de corrélation environnant $r^2 = 0,94$ en comparant la méthode standard de filtration de l'eau sur un filtre d'acétate de cellulose avec la méthode DEFT. Ceci vient donc appuyer les résultats que nous avons obtenus. De fait, la méthode DEFT est utilisée occasionnellement chez Hoechst Marion Roussel Canada afin de vérifier l'absence de microorganismes dans le système d'eau lorsqu'il y a interruption ou lorsque des travaux sont effectués au système d'eau purifiée. Ces analyses permettent de remettre la production en marche immédiatement parce qu'il est possible de détecter sans délai la présence de microorganismes dans le système d'eau purifiée.

2.2 Les sirops Novahistex™ et Novahistine™

De façon générale, l'utilisation de la méthode DEFT pour les sirops a été appliquée au sirop Novahistex™ DM. Il n'y a pas eu de problème de filtration et aucun pré-traitement n'a été nécessaire. En fait, la filtration s'est effectuée directement sur un filtre de polycarbonate en utilisant 10 mL de ce sirop et la méthode DEFT a été appliquée. Quant aux sirops Novahistex™ et Novahistine™ narcotiques, le problème se situait au niveau de leur viscosité parce qu'ils sont composés d'une grande quantité de

glycérine. Celui-ci a été résolu par un simple préchauffage à 40°C pendant 5 min. Par la suite, il y a eu filtration sur un filtre de polycarbonate de 0,45 µm et application de la méthode DEFT. De bonnes corrélations ont été obtenues entre la méthode standard et la méthode DEFT. Au niveau de la documentation que nous avons pu trouver sur le sujet, la méthode DEFT a été appliquée à l'eau et à des fluides intraveineux (Bowden, 1977; Denyer et Ward, 1983; Denyer et Lynn, 1987; Newby, 1991; Esteban *et al.* 1992) où de bonnes corrélations ont été obtenues. Toutefois, nous n'avons relevé aucun rapport ou article concernant l'application de la méthode DEFT à des sirops. Le préchauffage sur les sirops a été inspiré par la pratique utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour les composantes comme la glycérine, les parabènes, la paraffine, etc. (USP, 1995). Ces résultats signifient donc que la méthode DEFT est applicable immédiatement aux sirops et à d'autres composantes liquides. La limitation de cette méthode se situe au niveau de sa capacité de détection, car des concentrations microbiennes inférieures à 10³ organismes/mL sont difficiles à détecter avec la méthode DEFT. L'organisme qui régit les normes de l'industrie pharmaceutique, le USP, stipule qu'il doit y avoir moins de 10 organismes/mL de sirop, ceci rend donc l'implantation de cette nouvelle méthode de détection rapide un peu difficile. Toutefois, tout ce qui a préalablement été appliqué aux sirops peut l'être pour une tout autre méthode de détection rapide semi-automatisée et automatisée dont il sera discuté ultérieurement. Un aspect important à considérer au niveau de l'implantation d'une nouvelle méthode sera sa validation avec des microorganismes connus et elle devra être acceptée par le United States Pharmacopoeia afin de pouvoir l'utiliser en industrie pharmaceutique.

2.3 La crème Topicort™

Nous avons mis au point une nouvelle méthode d'extraction microbiologique afin d'extraire les microorganismes de la matière hydrophobe pour l'application de la méthode DEFT. Cette nouvelle méthode est basée sur des méthodes existantes utilisant l'IPM dans lequel est placé l'échantillon qui est ensuite filtré sur un filtre d'acétate de cellulose puis incubé sur un milieu nutritif. Depuis longtemps, l'IPM a été utilisé afin d'effectuer des dispersions d'onguent à base de gelée de pétrole ou de crème (Bowman,

1969; Tsuji *et al.*, 1970; Tsuji et Robertson, 1970; Allwood et Hambleton, 1972; Bowman *et al.*, 1972; Diding *et al.*, 1973; Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974; Hart et Ratansi, 1975; Placencia *et al.*, 1982; Ringertz et Ringertz, 1982; Brown *et al.*, 1986; USP, 1995). Une des premières équipes à utiliser cette méthode a été Sokolski et Chidester (1964) pour des tests de stérilité. Ils ont utilisé l'IPM chaud pour disperser des échantillons d'onguents afin d'extraire les microorganismes de la matière. Avec cette méthode, les microorganismes sont concentrés sur une membrane et les agents antimicrobiens, ainsi que la gelée de pétrole, sont éliminés par le simple rinçage du filtre. De meilleurs résultats ont été enregistrés comparativement à la méthode standard. Ce n'est pas le cas lorsqu'on utilise les géloses coulées ou l'étalement, car les agents de conservation et les agents actifs sont toujours présents (Tsuji *et al.*, 1970; Brown *et al.*, 1986). C'est sur cette méthode d'extraction des microorganismes que nous nous sommes basés afin d'effectuer les essais avec de la crème Topicort™. En effet, nous avons utilisé l'IPM chaud tel qu'utilisé par Sokolski et Chidester (1964) auquel nous avons ajouté du PBS pour disperser la crème. L'élimination de l'IPM s'est faite par centrifugation suivie de l'aspiration de la phase organique avant l'étape de filtration de la phase aqueuse. L'élimination de l'IPM était nécessaire, car la viscosité de ce solvant organique aurait diminué l'efficacité de la filtration en bloquant les pores du filtre. De très bonnes corrélations ont été obtenues entre la méthode standard et la méthode DEFT. De plus, le nombre de microorganismes retrouvés dans la phase organique était négligeable comparé à ce qui avait été ajouté au départ. Par conséquent, nous pouvons conclure que cette méthode d'extraction microbiologique est applicable à tous les produits pharmaceutiques sous forme de crème ou d'onguent.

Étant donné le pouvoir bactéricide de l'IPM, il a été suggéré de n'effectuer qu'un seul échantillon à la fois pour ainsi diminuer le temps de contact avec l'IPM qui peut occasionner de la mortalité. L'effet bactéricide de l'IPM peut être mesuré à l'aide de la valeur D qui est le temps requis pour tuer 90% des microorganismes. Celle-ci doit être supérieure 60 minutes afin d'éviter un haut taux de mortalité des microorganismes (Sokolski et Chidester, 1964; Robertson, 1974). Comme organisme cible pour déterminer la valeur D, *Pseudomonas aeruginosa* a été utilisé, car il a été démontré que

cet organisme est plus sensible qu'*Escherichia coli* à l'IPM (Tsuji *et al.*, 1970; Hart et Ratansi, 1975). Afin de diminuer la toxicité de ce solvant organique, nous avons passé l'IPM sur une colonne d'alumine basique (Tsuji et Robertson, 1973) qui consiste en l'agitation directe de l'IPM et de l'alumine basique dans un erlenmeyer suivie d'une filtration sur un filtre de 0,22 μm pour éliminer les résidus d'alumine basique (Placencia *et al.*, 1982).

Cependant, comme l'IPM n'est pas un composé organique stérile, il a donc été nécessaire de le stériliser avant son utilisation afin de s'assurer de ne pas contaminer l'échantillon. De ce fait, Tsuji *et al.* (1970) ont démontré que l'IPM stérilisé par filtration est moins toxique que celui stérilisé à l'autoclave. Le pH de l'IPM étant lui aussi un facteur critique. Il peut être facilement mesuré avec de l'eau qui a été agitée avec de l'IPM pendant un temps précis (Tsuji et Robertson, 1973; Robertson, 1974; Placencia *et al.*, 1982; Ringertz et Ringertz, 1982). En résumé, l'extraction à l'aide de l'IPM peut être utilisée pour des crèmes et des onguents ce qui rend l'application de la méthode DEFT tout à fait possible dans l'industrie pharmaceutique. Par contre, le problème qui s'était posé avec les sirops se répète parce que la limite de détection de cette méthode est de 10^3 alors que la quantité limite prescrite est de moins de 100 organismes/g de crème ou d'onguent (les spécifications USP peuvent varier d'un produit à un autre). De ce fait, l'implantation de cette nouvelle méthode de détection rapide est un peu difficile. Une solution serait d'utiliser plus de crème en appliquant la même méthode de dispersion. Par contre, tous les traitements d'extractions appliqués aux crèmes ou aux onguents peuvent l'être pour une tout autre méthode de détection rapide semi-automatisées et automatisées dont il sera discuté ultérieurement.

2.4 La capsule Altace™

Dans un premier temps, il est important de préciser que les essais n'ont pas été effectués sur la capsule entière, car celle-ci est en gélatine ce qui a créé un problème énorme au niveau de la filtration, la rendant presque impossible. Premièrement, il nous a été possible de dissoudre la capsule dans un bain-marie. Par contre, lors de la filtration, il

Il y a eu formation d'un gros dépôt sur le filtre obstruant ainsi les pores. Donc, les essais n'ont été orientés que sur le contenu de la capsule (l'amidon pré-gélatinisé ainsi que l'agent actif).

La capsule Altace™ étant principalement composée d'amidon (insoluble dans l'eau), un traitement enzymatique a été appliqué. Nous avons utilisé des α -amylases de pancréas porcin, de *Bacillus amyloliquefaciens* et d'autres enzymes provenant d'espèces *Bacillus*. Des β -amylases provenant de patates douces, des pullulanases de *Klebsiella pneumoniae* et des amyloglucosidases d'*Aspergillus niger* ont aussi été mises à l'essai dans différents tampons: phosphate pH 7,0, citrate pH 4,8 – 5,0 et acétate 5,0. Lors de ces essais, nous avons fait varier les températures de 25 à 45°C, les temps d'incubation 5 min à 3 heures et les quantités d'enzymes de quelques microlitres à 2000 μ L. Malgré tous ces traitements, nous n'avons jamais pu dépasser 83 % de digestion de l'amidon. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une partie de l'amidon, l'amylopectine, est très ramifiée et que les sites d'attaque des enzymes sont difficiles à atteindre en raison du repliement de la molécule. Voyant que pas plus de 83 % de digestion enzymatique n'a été obtenue avec 800 μ l d' α -amylases et d'amyloglucosidases dans un tampon citrate 6 mM pH 6,0 pendant 15 min à 45°C, nous avons essayé la fixation au paraformaldéhyde 3 % pour ensuite appliquer une hydrolyse acide de l'amidon. La fixation au paraformaldéhyde 3 % a bien fonctionné en microscopie épifluorescente (sans produit). Nous pouvions bien dénombrer les bactéries qui avaient préalablement été colorées à l'acridine orange avant d'être fixées au paraformaldéhyde 3 %. Les résultats corrélaient bien avec un témoin qui n'avait pas subi de fixation. Par contre, suite à l'hydrolyse acide de l'amidon avec de l'acide chlorhydrique à des concentrations variant de 0,5 à 1,5 % (Betancur et Chel, 1997), le filtre de polycarbonate était complètement orangé ce qui empêchait toute lecture en microscopie épifluorescente. Nous croyons que ce résidu orange laissé sur le filtre correspond à la partie d'amidon restante qui a absorbé l'acridine empêchant ainsi une lecture adéquate au microscope. Même si la digestion enzymatique n'a pas été efficace à 100 %, nous avons obtenu une très bonne corrélation entre la méthode standard et la nouvelle méthode que nous avons développée pour l'application de la méthode DEFT. Par contre, certaines bactéries sont restées attachées aux pré-filtres

de 3,1 μm ce qui nous laisse croire que la récupération pourrait être meilleure. Pour essayer de récupérer 100 % des microorganismes, nous avons utilisé des pré-filtres de différentes porosités et de compositions diverses. À cet effet, différents types de pré-filtres de 3,1 à 20 μm ont été utilisés: ceux de fibre de verre, de nylon, de copolymère d'acrylique, de chlorure de polyvinyle (PVC) ou de polyéthersulfone.

La présence de bactéries sur le pré-filtre a mis en doute la stérilité du matériel et des manipulations effectuées. Dans un premier temps, nous avons utilisés le VITEK, un appareil automatisé, afin d'effectuer l'identification de bactéries et de levures. Ainsi, nous avons identifié les bactéries se retrouvant sur les pré-filtres et nous y avons détecté la présence de cellules *E. coli* (bactérie de référence ajoutée au départ), de cellules de *Bacillus cereus* et de cellules de *Bacillus licheniformis*. Suite à ces identifications, nous avons à trouver la source de cette contamination. Nous avons donc effectué des témoins négatifs sur les pré-filtres, sur les tampons, sur les enzymes et sur les pinces utilisées lors de la manipulation des filtres. Pour la verrerie, elle était immédiatement placée sous un hotte à flux laminaire lorsque le cycle de stérilisation a été terminé. Suite à ces investigations, des contaminants ont été retrouvés dans les suspensions d'enzymes. À partir de ce moment, les enzymes ont été filtrées à l'aide d'un STERICUP™ Express© (Millipore) muni d'un filtre de 0,22 μm ayant une faible affinité pour les protéines.

Suite aux résultats obtenus, nous pouvons constater que les essais réalisés avec des témoins révèlent de très bons taux de corrélation. Ceux obtenus avec la méthode DEFT et avec les essais effectués dans le PBS corréleront très bien avec ceux de la concentration initiale, et ce, malgré la croissance observée sur les pré-filtres pour la méthode DEFT. Il nous a été impossible de dénombrer son importance car la croissance sur le filtre était diffuse. (Comme la limite de détection est de 1 000 organismes/g, la méthode DEFT développée pour le contenu de la capsule Altace™ pourrait être appliquée avec une certaine réserve). D'autres investigations s'avèrent nécessaires afin de voir si les mauvais résultats obtenus pour la méthode témoin vont se répéter. Somme toute, il reste à améliorer certains points critiques comme la digestion enzymatique qui pourrait être augmentée par d'autres enzymes que les α -amylases, les amyloglucosidases ou les

pullulanases. De plus, pour que l'application de la méthode DEFT en industrie soit possible, il reste encore des études à effectuer car, jusqu'à présent, toutes les analyses ont été conduites sur le contenu de la capsule seulement et non sur la capsule entière qui constitue le produit fini. Par exemple, des gélatinases, pourraient être utilisées afin de voir s'il y aurait ou non digestion de la capsule de gélatine.

3. Méthodes semi et automatisées

3.1 Optomax System III

Afin de diminuer les risques d'erreurs liées à la fatigue des yeux des opérateurs lors de la lecture en microscopie épifluorescente, Pettipher et Rodrigues (1982b) ont appliqué une méthode semi-automatisée pour dénombrer les bactéries du lait en utilisant un microscope à épifluorescence. Les images du microscope ont été captées par une caméra (Chalnicon) reliant ce dernier à l'analyseur d'images Optomax System III (Micro-Measurements Ltd. Shirehill Industrial Estate, Saffron Walden, Essex). Les cellules ont été détectées par l'analyseur d'images selon leur degré de contraste. Finalement, le système a été contrôlé par un ordinateur PET 2001 (Commodore, London) qui a enregistré les données. Malgré le fait que cette méthode semi-automatisée ait éliminé les longues heures d'observations effectuées par l'opérateur, elle a nécessité beaucoup de manipulations manuelles, car comme la méthode est semi-automatisée, le déplacement de la platine et la mise au foyer doivent être ajustés par l'opérateur.

3.2 AMS 40-10 Image Analyzer

L'AMS 40-10 Image Analyser (Analytical Measuring Systems Ltd.) est un système semi-automatique comprenant une caméra, une unité centrale de calcul et un moteur vidéo. Le tout couplé à un microscope à épifluorescence. Le niveau de détection a été fixé de manière à dénombrer uniquement les cellules rouge-oranges. Cette énumération s'est effectuée en contraste avec le fond clair. Donc, la qualité de la préparation devait être un élément bien maîtrisé afin d'avoir des comptes exacts et les

filtres devaient être exempts de micro-particules (Pettipher *et al.*, 1989). En comparant le comptage visuel au comptage automatique, Jaeggi *et al.* (1989) ont obtenu des coefficients de corrélation de $r^2 = 0.97$ pour le lait cru, de $r^2 = 0.98$ pour la viande hachée et de $r^2 = 0.94$ pour le beurre. Quant à Abgrall et Bourgeois (1989), ils ont obtenu un coefficient de corrélation de $r^2 = 0,95$ dans des échantillons de viande hachée. Finalement, pour leur part, Vivengis *et al.* (1996) ont obtenu un coefficient de corrélation de $r^2 = 0.98$ dans plusieurs échantillons de légumes surgelés avec cette même méthode.

3.3 Bactoscan 8000

Au cours des années 1980, une autre méthode complètement automatisée et améliorée a vu le jour: le Bactoscan 8000 (Metrofoss KS, Hillerd, Denmark). Cette méthode consiste en l'injection d'un échantillon de lait dans l'appareil où il y a séparation des particules indésirables (cellules somatiques, la caséine, les globules de gras et de la matière organique) du lait par centrifugation en gradients. Cette centrifugation sépare les bactéries des particules indésirables. Le lait provenant du gradient contenant les bactéries a ensuite subi une coloration à l'acridine orange. Finalement, le lait est séché en un mince film sur un disque rotatif. Les microorganismes sont détectés du au fluorochrome par un système de microscopie épifluorescente intégré. Le principe de cette méthode repose sur un photo-détecteur qui capte la fluorescence émise par le fluorochrome. Cette fluorescence est par la suite convertie en une impulsion électrique enregistrée par un ordinateur. Les résultats ont été disponibles en 7 minutes et la capacité de cet instrument est de 70 échantillons par heure. Enfin, la corrélation entre la méthode standard et la lecture avec le Bactoscan 8000 donne un coefficient de corrélation de $r^2 = 0.88$ dans des échantillons de lait (Montville, 1987; Suhren et Reichmuth, 1997).

3.4 ChemScan

La méthode automatisée la plus récente pour la lecture des filtres est le ChemScan (Chemunex, France). Son principe de base repose sur un laser qui effectue une lecture du filtre de polycarbonate en entier. Il est si sensible qu'il est capable de détecter la présence d'un seul organisme sur le filtre. Afin que le système puisse dénombrer les

microorganismes, il est nécessaire d'appliquer le ChemChrome, un agent non fluorescent dérivé de la fluorescéine, essentiel à la détection par le laser. Le ChemChrome est absorbé seulement par la cellule vivante et clivé par des estérases pour donner de la fluorescéine et être détecté par le laser (Guyomard, 1997; Wallner, 1997). Le laser peut effectuer la lecture d'un filtre de 25 µm en trois minutes. De plus, le système est apte à faire la différence entre les particules fluorescentes et les microorganismes marqués (Wallner *et al.*, 1997). L'analyse totale d'un échantillon avec cet appareil ne requiert qu'une à deux heures si on la compare aux méthodes standard où les délais peuvent s'étendre de deux à cinq jours. En général, de meilleurs résultats sont obtenus avec le ChemScan. C'est un appareil précis, spécifique et reproductible (Guyomard, 1997; Wallner *et al.* 1997).

3.5 Méthode Ab-DEFT

Comme autre méthode de détection rapide à l'aide de la méthode DEFT, il est possible d'utiliser des anticorps spécifiques à chacun des microorganismes recherchés. L'identification de microorganismes en industrie pharmaceutique est importante, car la présence de certains pathogènes pourrait considérablement détériorer la santé d'un patient. Les spécifications d'un produit exigent une concentration limite d'organismes totaux à respecter par millilitre ou par gramme tout dépendant de la nature du produit. De plus, certains de ces produits doivent être exempts de *Salmonelles*, d'*Escherichia coli* et d'autres de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que de *Candida albicans* pour être conformes.

Il est aussi possible d'identifier des microorganismes à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux couplés avec un fluorochrome comme: la rhodamine, le Texas Red ou la fluorescéine diacétate (FITC) (Kroll, 1995a). En fait, ces composés fluorescents (fluorochrome) sont conjugués à l'anticorps. Lorsque l'anticorps a reconnu les déterminants antigéniques de la cellule cible et que les fluorochromes sont excités par une source lumineuse, il y a émission d'énergie sous forme de fluorescence. Cette technique a été nommée Ab-DEFT (Antibody-Direct Epifluorescent Filter Technique).

Cette méthode d'identification directe a été utilisée afin de détecter plusieurs microorganismes dans l'eau, dans des aliments et dans des échantillons fécaux. Citons comme exemples: *Salmonella* (Georgala et Boothroyd, 1964; Thomasson, 1981; Rodrigues et Kroll, 1990), *Listeria monocytogenes* (McLauchlin et Pini, 1989; Torterello *et al.*, 1997), *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Serratia marcescens* (Phillips et Martin, 1984), *Escherichia coli* O157:H7 (Torterello et Gendel, 1993; Torterello et Stewart, 1994; Torterello, 1996; Torterello *et al.*, 1998), *Legionelle pneumophila* (Vesey *et al.*, 1990), *Vibrio cholerae* (Xu *et al.*, 1984), *Cryptosporidium oocysts* et *Giardia cysts* (Vesey *et al.*, 1993) et toutes les espèces de *Campylobacter* (Hodge *et al.*, 1986).

Cette méthode est très rapide pour l'identification, car en moins d'une heure les résultats peuvent être disponibles. Par contre, les anticorps marqués d'un fluorochrome ne sont pas toujours disponibles pour un microorganisme en particulier. De plus, ils ne font pas la différence entre les cellules vivantes et les cellules mortes (Rosak et Colwell, 1987; Vesey *et al.*, 1990).

CONCLUSION

Le but de ce travail consistait à développer des méthodes de dispersion et d'extraction de produits pharmaceutiques non destructives pour les microorganismes afin d'être en mesure d'appliquer la méthode DEFT en industrie, sous certaine réserve et conditions, car pour qu'une nouvelle méthode soit utilisée pour des analyses de routine elle doit d'abord être validée et acceptée par les dirigeants et les gouvernements. Suite aux études que nous avons réalisées, nous sommes en mesure de proposer l'application de la méthode DEFT en industrie pharmaceutique pour les sirops et les crèmes. Ceci à l'égard des corrélations obtenues entre la méthode standard et DEFT pour chacun des produits. Pour les crèmes, les résultats concordent bien mais la nouvelle méthode de dispersion développée pour l'application de la méthode DEFT nécessite plus de manipulations, ce qui pourrait générer de la contamination. En contre partie, les résultats avec la méthode DEFT sont disponibles immédiatement alors qu'avec la méthode conventionnelle les résultats ne sont disponibles que 48 heures plus tard. Une amélioration consisterait en la diminution du nombre de manipulations diminuant ainsi le risque de contamination et la méthode pourrait être proposée pour son application en industrie. En ce qui concerne Altace™, avec lequel nous n'avons obtenu que 83 % de digestion enzymatique du contenu de la capsule, il y a eu blocage des filtres de polycarbonate de 0,45 µm. Pour ce produit, il reste donc encore des études à effectuer afin d'en arriver à 100 % de digestion enzymatique et pouvoir appliquer la méthode DEFT sans trop de dommages aux microorganismes. Par contre, la méthode DEFT est quand même applicable, au contenu de la capsule, étant donné les corrélations obtenues entre la méthode standard et la méthode DEFT. Donc, pour l'application de la méthode DEFT à une capsule comme Altace™ il reste encore des études à faire afin de pouvoir appliquer cette méthode à la capsule entière.

La méthode DEFT présente une contrainte majeure, car elle ne détecte pas des concentrations inférieures à 10^3 organismes / mL ou / g. Elle est donc difficilement applicable directement en industrie pharmaceutique où les limites de détection se situent en deçà de celle de la méthode DEFT. Même si cette méthode est difficilement applicable en industrie pharmaceutique, il n'en reste pas moins que les nouvelles méthodes de dispersion et d'extraction que nous avons développées sont applicables à des

méthodes plus sensible de détection rapide de microorganismes. Certains de ces appareils semi-automatisés et automatisés seront en mesure de détecter un seul microorganisme dans un échantillon.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur pour son soutien tout au long de ces deux dernières années.

Je voudrais aussi remercier les gens de chez Hoechst Marion Roussel qui m'ont fourni tout le support nécessaire à la réalisation de mon projet. En particulier Robert Forand, Kristof Biniiecki, Lynda Létourneau ainsi que tous les autres associés d'HMRC qui ont contribué de près ou de loin à ma réussite.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdullah, M., Catley, B.J., Lee, E.Y.C., Robyt, J., Wallenfels, K. et Whelan, W.J. 1966. Pullulanase an enzyme specific for the hydrolysis of alpha-1→6-bonds in amylaceous oligo and polysaccharides. The mechanism of carbohydrase action II. **43**:111-118.
- Abgrall, B. et Bourgeois, C.M. 1989. Dénombrement de la flore totale de produits alimentaires par la technique DEFT. *Science des Aliments*. **9**(4): 713-724.
- Allen, W.G. et Spradlin, J.E. 1974. Amylases and their properties. *Brewers digest*. pp.48-65.
- Anon. 1968. Methods of microbiological examination for dairy purposes. British Standard 4285. British Standards Institution, London.
- Allwood, M.C. et Hambleton, R. 1972. The recovery of bacteria from white soft paraffin. *J. Pharmacy & Pharmacology*. **25**(7): 559-562.
- Betancur, A.D. et Chel, G.L. 1997. Acid hydrolysis and characterization of *Canavalia ensiformis* starch. *J. Agric. Food Chem.* **45**:4237-4241.
- Biliaderis, C.G., Grant, D.R. et Vose, J.R. 1981. Structural characterization of legume starches. II-Studies on acid-treated starches. *Cereal Chem.* **58**(6):502-507.
- Bodnar, D.A., Hinman, C.W. et Nelson, W.J. 1972. Highly fermentable starch conversion syrups. U.S. patent 3644126.
- Bowman, F.W. 1969, Microbial contamination of antibiotic ophthalmic ointments. *J. Pharm. Sciences*. **58**(2): 277-278.
- Bowman, F.W., Knoll, E.W., White, M. et Mislivec, P. 1972. Survey of microbial contamination of ophthalmic ointments. *J. Pharm. Sciences*. **61**(4): 532-535.
- Bowden, W.B. 1977. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **33**: 1229.
- Boyer, P.D., Lardy, H. et Myrback, K. 1960. The enzymes. Second edition Academic Press, New York and London. pp.:315-343.
- Brown, M.W., Evans, C., Ford, J.L. et Pilling, M. 1986. A note on the recovery of microorganisms from an oil-in-water cream. *J. Clin. Hospital Pharmacy*. **11**: 117-123.

- Bruno, J.G., Sinock, S.A. et Stopa, P.J. 1996. Highly selective acridine et ethidium staining of bacterial DNA and RNA. *Biotechnic & Histochemistry*. Editeurs, Williams & Wilkins.
- Buhlman, X., Gray, M., Gubler, H.U., Hess, H., Kabay, A., Knussel, F., Sackman, W., Schiller, I. et Urban, S. 1972. Microbiological quality of pharmaceutical preparation. Guideline and methods *American Journal of Pharmacy & the Sciences Supporting Public Health*. **144**(6): 165-186.
- Buch, J.H. 1953. New bacteriological technique for testing water and sewage. *Water and sewage works*. **100**:151.
- Carter, J. 1996. Evaluation of recovery filters for use in bacterial retention testing of sterilizing-grade filters. *PDA J. Pharm. Sciences & Technologies*. **50** (3): 147-153.
- Clark, H.F. et Kabler, P.W. 1952. The membrane filter in water quality tests. *Am. J. Pub. Health*. **42**: 385.
- Connoly, P., Bloomfield, S.F. et Denyer, S.P. 1993. A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics. *J. Appl. Bacteriol.* **75**(5): 456-462.
- Denyer, S.P. et Ward, K.H. 1983. A rapid method for the detection of bacterial contaminants in intravenous fluids using membrane filtration and epifluorescence microscopy. *J. Parental Science & Technology*. **37**(5): 156-158.
- Denyer, S.P. et Lynn, R.A. 1987. A sensitive method for the rapid detection of bacterial contaminants in intravenous fluids. *J. Parental Science & Technology*. **41**(2): 60-66.
- Desseaux, V., Seigner, C., Pierron, Y., Grisoni, M.L. et Marchis-Mouren, G. 1988. Porcine pancreatic α -amylase: a model for structure-function studies of homodepolymerases. *Biochimie*. **70**: 1163-1170.
- Diding, N.A., Johansson, S. et Wallenborg, C. 1973. Isopropyl myristate as solvent in sterility testing of petrolatum-based ointments. *Svensk Farm. Tidskr.* **77**: 616-621.
- Duffu, G. et Sheridan, J.J. 1988. Viability staining in direct count rapid method for the determination of total viable counts on processed meat. *J. Microbiol. Methods*. **31**: 167-174.
- Englyst, H.N. et Cummings, J.H. 1988. Vitamins and other nutrients. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**(4): 808-814.

- Entis, P., Brodsky, M.H. et Sharpe, A.N. 1982. Effect of Pre-Filtration and Enzyme Treatment on Membrane Filtration of Foods. *J. Food Protection*. **45**(1): 8-11.
- Esteban, J.M., Diaz, M.L., Soriano, F. et Marin, E. 1992. Improved direct epifluorescence filter technique for rapid bioburden control in intravenous solutions. *J. Parental Science & Technology*. **46**(5): 146-149.
- Favero, M.S. et Drake, C.H. 1964. The use of staphylococci as indicators of swimming pollution by the use of the membrane filter technique. *Pub. Health Reports*. **79**: 61.
- Fernandez-Astorga, A., Hijarrubia, M.J., Lazaro, Barcina, I. 1996. Effect of the pre-treatments for milk sample filtration on direct viable cell counts. *J. Appl. Bacteriol.* **80**(5): 511-516.
- Fiedurek, J. 1991. Glucose oxidase synthesis by *Aspergillus niger* GIV-10 on starch. *Acta Microbiologica Polonica*. **40**:197-203.
- Fleischer, R.L., Price, P.B. et Symes, E.M. 1964. Novel filter for biological materials. *Science* **143**: 249-250.
- Fogarty, W.M. et Kelly, C.T. 1979. Starch-degrading enzymes of microbial origin. *Progr. Ind. Microbiol.* **15**:87-150.
- Francisco, D.E., Mah, R.A. et Rabin, A.C. 1973. Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Transaction of the American Microscopical Society*. **92**(3): 416-421.
- Georgala, D.L. et Boothroyd, M. 1964. A rapid immunofluorescence technique for detecting *Salmonellae* in raw meat. *J. Hygiene*. **62**:319-327.
- Goetz, A., Gilman, R.H. et Rawn, A.M. 1952. Application of molecular filter membranes to specific problems in water analysis. *J.A.W.W.A.* **44**:4741.
- Graves, D.C. et Schipper, T.A. 1966. Membrane filtration technique for isolation organisms from raw milk of normal udders. *Appl. Microbiol.* **14**: 535.
- Guyomard, S. 1997. Validation of a scanning laser system for microbiological quality control (QC) analysis. *Pharm. Tech. Europe*. Reprint Publication Number 0225.
- Hart, A. et Ratansi, M.B. 1975. The isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from oily cream. *J. Pharmacy & Pharmacology*. **27**(2): 142-144.

- Hart, H. 1987. Introduction à la chimie organique. Interéditions, Paris.
- Haugland, R.P. 1996. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Printed in the United States of America. 6th edition.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. et Jasper, S. 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Env. Microbiol.* **33**(5): 1225-1228.
- Hodge, D.S., Prescott, J.F. et Shewen, P.E. 1986. Direct immunofluorescence microscopy for rapid screening of *Campylobacter enteritis*. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 863-865.
- Holah, J.T., Betts, R.P. et Thorpe, R.H. 1988. The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescence technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* **65**(3): 215-221.
- Hollo, J. et Hoschke, A. 1993. Bioconversion of starch. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2/43**(1): 5-37.
- Holz, H.M. 1985. Worthwhile facts about fluorescence microscopy. 3rd edition. Carl Zeiss, D-7082 Oberkochen, West Germany.
- Holm, J., Bjorck, I. et Eliansson, A.C. 1988. Relationship between degree of gelatinisation, digestion rate in vitro and metabolic responses in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **47**:1010-1016.
- Hyun, H.H. et Zeikus, J.G. 1985. General Biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfurium*. *Appl. Env. Microbiol.* **49**:1168-1173.
- Jaeggi, N.E., Simes, V. et Huges, D. 1989. Evaluation of a television image analyser as an aid to estimation of microbial numbers in food using the direct epifluorescent technique. *Food Microbiol.* **6**: 85-91.
- Jones, J.G et Simon, B.M. 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bacteriol.* **39**(3): 317-329.
- Kapuscinski, J. 1990. Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *J. Histochem. Cytochem.* **38**: 1323-1329.

- Kepner, R.L. Jr. et Pratt, J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.* **58**(4): 603-615.
- Korgaonkar, K.S. et Ranade, S.S. 1965. Evaluation of acridine orange fluorescence test in viability studies on *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **12**:185-190.
- Krishnakumari, S. et Thayumanavan, B. 1995. Content of starch and sugars and in-vitro digestion of starch by α -amylases in five minor millets. *Plant Foods Human Nutri.* **48**:327-333.
- Kroll, R. 1995a. The direct immunofluorescent filter technique (DIFT). *Methods Mol. Biol.* **46**: 107-112.
- Kroll, R. 1995. The direct epifluorescence filter technique (DEFT). *Methods Mol. Biol.* **46**: 113-121.
- Liberski, D.J. 1990. Bacteriological examinations of chilled, cured canned pork hams and shoulders using a conventional microbiological technique and the DEFT method. *International J. Food Microbiol.* **10**(1): 19-22.
- Lillie, R.D. 1977. *H. J. Conn's Biological Stains* 9th ed. Williams and Wilkins, Co., Baltimore. pp.355-357.
- Manjunath, P., Shenoy, C. et Raghavendra Rao, M.R. 1983. Fungal glucoamylases. *J. Appl. Biochem.* **5**:235-260.
- McLauchlin, J. et Pini, P.N. 1989. The rapid demonstration and presumptive identification of *Listeria monocytogenes* in food using monoclonal antibodies in a direct immunofluorescence test (DIFT). *Lett. Appl. Microbiol.* **8**: 25-28.
- McFeters, G.A., Singh, A., Byun, S., Callis, P.R. et Williams, S. 1991. Acridine orange staining reaction as an index of physiology activity in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods.* **13**: 87-97.
- McFeters, G.A., Feipeng, P.Yu., Barry, H.P. et Stewart, P.S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J. Microbiol. Methods* **21**:1-13.
- Merck index. 1989. *An encyclopaedia of chemicals, drugs and biologicals.* 11th ed. Merck & Co., Inc.

- Molecular Probes Europe BV. 1998. LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit product information sheet. Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands.
- Montville, T.J. 1987. New and emerging technologies. Food microbiology volume II. Édition CRC press, Boca Raton, Fla. pp41-60.
- Nakamura, N., Watanabe, K. et Horikoshi, K. 1975. Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain Bacillus no. 201-1 on alkalophilic microorganism. Biochim. Biophys. Acta. **397**:188-193.
- Neidle, S., Pearl, L.H., Herzyk, P. et Berman, H.M. 1988. A molecular model for proflavine DNA intercalation. Nucleic Acids Res. **16**: 8999-9016.
- Newby, P.J. 1991. Analysis of high-quality pharmaceutical grade water by direct epifluorescent filter technique microcolony method. Letters Appl. Microbiol. **13**: 291-293.
- Nobile, J. 1967. Use of membrane filter technique in microbiological control for the brewing industry. Appl. Microbiol. **15**: 736.
- Olympus Optical CO. 1982. The use of the Olympus fluorescence microscope. Olympus Optical CO., Ltd. Japon.
- Pazur, J.H. et Ando, T. 1959. The action of amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides. J. Biol. Chem. **234**(8); 1966-1970.
- Peppler, H.J. et Reed, G. 1987. Enzymes in food and feed processing. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. **7**:547-603.
- Pettipher, G.L., Mansell, R., McKinnon, C.H. et Cousins, C.M. 1980. Rapid Membrane Filtration-Epifluorescent Microscopy Technique for Direct Enumeration of Bacteria in Raw Milk. Appl. Env. Microbiol. **39**(2): 423-429.
- Pettipher, G.L. et Rodrigues, U.M. 1981. Rapid enumeration of bacteria in heat-treated milk and milk products using a membrane filtration-epifluorescent microscopy technique. J. Appl. Bacteriol. **50**: 157-166.
- Pettipher, G.L. et Rodrigues, U.M. 1982a. Rapid enumeration of microorganisms in foods by direct epifluorescent filter technique. Appl. Env. Microbiol. **44**(4): 809-813.
- Pettipher, G.L. et Rodrigues, U.M. 1982b. Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis. J. Appl. Bacteriol. **53**(3):323-329.

- Pettipher, G.L. et Rodrigues, U.M. 1982c. A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 259-265.
- Pettipher, G.L., Fulford, R.J. et Mabbitt, L.A. 1983a. Collaborative trial of the direct epifluorescence filter technique (DEFT), a rapid method for counting bacteria in milk. *J. Appl. Bacteriol.* **54**(2): 177-182.
- Pettipher, G.L. 1983b. The direct epifluorescent filter technique for the rapid enumeration of microorganism. Research studies Press Ltd., Letcworth, Hertfordshire, John Wiley & Sons editors.
- Pettipher, G.L. 1983c. La microscopie par épifluorescence. *La Technique Laitière.* **974**:37-43.
- Pettipher, G.L., Kroll, R.G., Farr, L.J. et Betts, R.P. 1989. DEFT: recent developments for foods and beverages. In *Rapid Microbiological Methods for foods, Beverages and Pharmaceuticals.* Edition Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Phillips, A.P. et Martin, K.S. 1984. The effect of the environment on the immunofluorescence staining bacteria. *J. Immunol. Methods.* **69**: 85-93.
- Placencia, A.M., Oxborrow, G.S. et Danielson, J.W. 1982. Batch-swirl method for detoxification of isopropyl myristate used for sterility testing of oils and ointments: membrane selection. *J. Pharm. Sciences.* **71**(6): 714-715.
- Pomeranz, Y. 1991. Functional properties of food components. Second edition. Academic Press, San Diego, California.
- Ringertz, S. et Ringertz, O. 1982. Antimicrobial effect of IPM when used as a solvent in sterility testing. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* **57**(7): 193-195.
- Robertson, J.H. 1974. Sterility testing of ophthalmic ointments using isopropyl myristate. *Bulletin of the Parenteral Drug Association.* **28**(6): 288-94.
- Rodrigues, U.M. et Pettipher, G.L. 1984. Use of the direct epifluorescent filter technique for predicting the keeping quality of pasteurized milk within 24 hours. *J. Appl. Bacteriol.* **57**(1): 125-130.
- Rodrigues, U.M. et Kroll, R.G. 1985. The direct epifluorescence filter technique DEFT: increased selectivity, sensitivity and rapidity. *J. Appl. Bacteriol.* **59**(6): 493-499.

- Rodrigues, U.M. et Kroll, R.G. 1988. Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. *J. Appl. Bacteriol.* **64**(1): 65-78.
- Rodrigues, U.M. et Kroll, R.G. 1990. Rapid detection of salmonellas in raw meats using a fluorescent antibody-microcolony technique. *J. Appl. Bacteriol.* **68**(3): 213-223.
- Rogalski, J., Dawidowicz, A.L. et Jamroz, J. 1996. Application of starch hydrolyzate to the production of glucose oxydase by *Aspergillus niger* G-IV-10. *Starch.* **48**(10): 369-375.
- Rosak, D.B. et Colwell, R.R. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Env. Microbiol.* **53**: 2889-2983.
- Sabbour, M.M. et El-Zanfaly, H.T. 1987. Status of membrane-filter procedure in the examination of water and milk for *Staphylococcus aureus*. *Zentralblatt fur Mikrobiologie.* **142**(5): 379-386.
- Shaw, B.G. et Farr, L.J. 1989. The rapid estimation of bacterial counts on meat and poultry by the direct epifluorescent filter technique. In *Rapid Microbiological Methods For foods, Bervages and Pharmaceuticals*. Edition Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Sierra, M.-L., Sheridan, J.J. et McGuire, L. 1997. Microbial quality of lamb carcasses during processing and the acridine orange direct count technique (a modified DEFT) for rapid enumeration of total viable counts. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 61-67.
- Sjöberg, A.-M., Manninen, M., Härmälä, P. et Pinnioja, S. 1990. Methods for detection of irradiation of spices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **190**: 99-103.
- Sokolski, W.T. et Chidester, C.G. 1964. Improved viable counting method for petrolatum based ointments. *J. Pharmaceutical Sciences.* **53**(1): 222-225.
- Solomon, B. 1978. Starch hydrolysis by immobilized enzymes. Industrial application. Dans: *Advances in biochemical Engineering*. Édition Ghose, T.K., Fietcher, A. et Blakebrough, N. New York. pp. 131-177.
- Suhren, G. et Reichmuth, J. 1997. Determination of the bacteriological quality of raw milk by automatic fluorescent microscopic counting of single bacteria (Bactoscan 8000) -a review-. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* **49**(3): 163-186.

- Svensson, B., Perderson, T.G., Svebdsen, I.B., Sakai, T. et Ottesen, M. 1982. Characterization of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Calsberg Res. Commun.* **47**: 55-69.
- Takasaki, Y. 1976. Production and utilization of β -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoïdes*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1515-1522.
- Takeda, Y., Hizukuri, S., Ozono, Y. et Suetake, M. 1983. Actions of porcine pancreatic and *Bacillus subtilis* α -amylase and *Aspergillus niger* glucoamylase on phosphorylated (1 \rightarrow 4)- α -D-glucan. *Biochim. Biophys. Acta.* **749**:302-311.
- Thomasson, B.M. 1981. Current status of immunofluorescent methodology for *Salmonallae*. *J. Food Protec.* **44**:381-384.
- Tortorello, M.L. et Gendel, S.M. 1993. Fluorescent antibodies applied to direct epifluorescent filter technique for microscopic enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and juice. *J. Food Protect.* **56**: 672-677.
- Tortorello, M.L. et Stewart, D.S. 1994. Antibody-direct epifluorescent filter technique for rapid, direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 3553-3559.
- Tortorello, M.L., Stewart, D.S. et Cray, W.C. Jr. 1996. Rapid identification of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces using the antibody-direct epifluorescence filter technique (Ab-DEFT). *Vet. Microbiol.* **51**(3-4): 343-349.
- Tortorello, M.L., Reineke, K.F. et Stewart, D.S. 1997. Comparison of antibody-direct epifluorescent filter technique with the most probable number procedure for rapid enumeration of *Listeria* in fresh vegetables. *J. AOAC. International.* **80**(6): 1208-1214.
- Tortorello, M.L., Stewart, D.S. et Raybourne, R.B. 1998. Quantitative analysis and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in a food matrix using flow cytometry and cell sorting. *FEMS Immunol. Medical. Microbiol.* **19**:267-274.
- Tsuji, K. et Robertson, J.H. 1970. Microcount method for petrolatum-based topical ointments containing waxes. *Appl. Microbiol.* **20**(5): 802-804.
- Tsuji, K., Stapert, E.M., Robertson, J.H. and Waiyaki, P.M. 1970. Sterility test method for petrolatum-based opthalmic ointments. *Appl. Microbiol.* **20**(5): 798-801.

- Tsuji, K. et Robertson, J.H. 1973. Microbial toxicity of isopropyl myristate used for sterility testing of petrolatum-based ophthalmic ointments. *Appl. Microbiol.* **25**(1): 139-145.
- United State Pharmacopoeia. 1995. Twenty-third revision incorporating National Formulary, 18th ed. Rockville, Maryland, USA: United States Pharmacoeial Convention, INC.
- Vesey, G., Nightingala, A., James, D., Hawthorne, D.L. et Colbourne, J.S. 1990. Rapid enumeration of viable *Legionelle pneumonphila* serogroup 1. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**:113-116.
- Vesey, G., Slade, J.S., Byrne, M., Sheperd, K. et Fricker, C.R. 1993. New techniques for the detection of protozoan parasites in water, in *New Techniques in Food and Bervage Microbiology*. Blackwell, Oxford, Uk. Pp. 101-114.
- Vihinen, M. et Mäntsälä, P. 1989. Microbial amylolytic enzymes. *Critic. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**(4): 329-418.
- Vivengis, J., Chiang, C., Lambert, B. et Decallonne, J. 1996. Applicabilité de la méthode DEFT pour le dénombrement bactérien dans les aliments. *Science des Aliments.* **16**(5): 475-490.
- Voet, D. et Voet, J.G. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. New York.
- Vollhardt, C. et Shore, N.E. 1995. *Traité de chimie organique*. 2^{ième} édition. De Boeck-Wesmael, S.A., Bruxelles. p. 970-973.
- Wallner, G., Tillmann, D., Haberer, K., Cornet, P. et Drocourt, J.-L. 1997. The ChemScan system: a new method for rapid microbiological testing of water. *European J. Parenteral Sci.* **2**(4): 123-126.
- Wallner, G. 1997. Evaluation of the ChemScan system. Status Report. HMR-Global Quality Operations Microbiology. Doc. No.: H-CMNX-010/01-WA.
- Walsh, C. et Allwood, M.C. 1973. The isolation of micro-organisms from creams and ointments by membrane filtration. *Laboratory Practice.* **22**(7): 522-524.
- White, M., Bowman, F.W. et Kirshbaum, A. 1968. Bacterial contamination in some non sterile antibiotic drugs. *J. Pharm. Sciences.* **57**(6): 1061-3.

- Winter, F.H., York, G.K. et El-Hakhal, H. 1971. Quick counting method for estimating the number of viable microbes in food and food processing equipment. *Appl. Microbiol.* **22**: 89.
- Wirtanen, G., Salo, S., Karwoski, M. et Sjobeg, A.M. 1995. A microbial screening method for the indication of irradiation of frozen poultry meat. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung.* **200**(3): 194-197.
- Würsh, P. et Koellreutter, B. 1992. Susceptibility of resistant starch to α -amylase. *European J. Clin. Nutri.* **46**(Suppl. 2); S113-115.
- Xu, H.S., Roberts, N.C., Adams, L.B., West, P.A., Spielbeling, R.J., Huq, A. *et al.* 1984. An indirect fluorescent antibody staining procedure for detection of *Vibrio cholerae* serovar 01 cells in aquatic environmental samples. *J. Microbiol. Methods* **2**: 221-231.
- Yamashita, M., Matsumoto, D. et Murouka, Y. 1997. Amino acid residues specific for the catalytic action towards α -1-6-glucosidic linkages in *Klebsiella pullulanase*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**(4): 283-290.