



**HAL**  
open science

**Nutrition parentérale et maîtrise du risque  
microbiologique : validation d'une méthode alternative  
pour l'essai de stérilité des mélanges nutritifs “ à la  
carte ”**

Élodie Quatremare

► **To cite this version:**

Élodie Quatremare. Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique : validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité des mélanges nutritifs “ à la carte ”. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01118532

**HAL Id: dumas-01118532**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01118532>**

Submitted on 19 Feb 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN

UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2014

N°

**MÉMOIRE du DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES (DES) de  
PHARMACIE Option PHARMACIE HOSPITALIÈRE – PRATIQUE et  
RECHERCHE**

*Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de*

**THÈSE pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Par Elodie Quatremare

Née le 02 mars 1986 à Rouen (76)

***Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique :  
validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité  
des mélanges nutritifs « à la carte »***

Président du jury : **Pr Rémi VARIN**, *Pharmacien, PU-PH*

Membres du jury : **Dr Christine CHEFSON-GIRAULT**, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

**Dr Aude COQUARD**, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

**Dr Lise GOURICHON**, *Pharmacien, Praticien Attaché*

**Pr Martine PESTEL-CARON**, *Pharmacien, PU-PH*

**Pr Jean-Louis PONS**, *Pharmacien, PU-PH*

UNIVERSITE DE ROUEN

UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2014

N°

**MÉMOIRE du DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES (DES) de  
PHARMACIE Option PHARMACIE HOSPITALIÈRE – PRATIQUE et  
RECHERCHE**

*Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de*

**THÈSE pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Par Elodie Quatremare

Née le 02 mars 1986 à Rouen (76)

***Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique :  
validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité  
des mélanges nutritifs « à la carte »***

Président du jury : **Pr Rémi VARIN**, *Pharmacien, PU-PH*

Membres du jury : **Dr Christine CHEFSON-GIRAULT**, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

**Dr Aude COQUARD**, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

**Dr Lise GOURICHON**, *Pharmacien, Praticien Attaché*

**Pr Martine PESTEL-CARON**, *Pharmacien, PU-PH*

**Pr Jean-Louis PONS**, *Pharmacien, PU-PH*



ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 – 2014  
U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET – C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUITRANCOURT - M.BENOZIO-  
J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -,  
DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER  
- J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R.  
LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P  
LEMOINE - M<sup>le</sup> MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F.  
MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS  
- H.PIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB -  
R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ -  
P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF**

I - MEDECINE

**PROFESSEURS**

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie Plastique
M. Bruno BACHY ( <i>Surnombre</i> )	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART ( <i>Surnombre</i> )	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD ( <i>Surnombre</i> )	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé

M. Jean - Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan <b>DARMONI</b> communication	HCN	Informatique Médicale/Techniques de
M. Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN (Surnombre)</b>	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Jean <b>DOUCET</b>	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
M. Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépatologie – Gastro - Entérologie
M. Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice <b>DUPARC</b> Traumatologique	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et
M. Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
M. Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
M. Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel <b>GODIN</b>	HB	Néphrologie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
M. Philippe <b>GRISE</b>	HCN	Urologie
M. Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
M. Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
M. Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc <b>KUHN</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
M. Eric <b>LEREBOURS</b>	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
M. Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
M. Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie Cardiaque
M. Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
M. Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	ORL
M. Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - obstétrique

M. Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
M. Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis <b>MICHOT</b>	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno <b>MIHOUT</b> ( <i>Surnombre</i> )	HCN	Neurologie
M. Jean-François <b>MUIR</b>	HB	Pneumologie
M. Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc <b>PERON</b>	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
M. François <b>PROUST</b>	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>Mise en dispo</i> )	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatologie – Gastro
Mme Céline <b>SAVOYE – COLLET</b>	HCN	Imagerie Médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
M. Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mme Florence <b>THIBAUT</b>	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
M. Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
M. Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. François <b>TRON</b> ( <i>Surnombre</i> )	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre <b>VERA</b>	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric <b>VERIN</b>	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
M. Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
------------------------------------	-----	---------------------------

M. Jeremy <b>BELLIEN</b>	HCN	Pharmacologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
M. Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
M. Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
M. Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
M. Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
M. Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie Cellulaire
M. Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Bactériologie
M. Jean-François <b>MENARD</b>	HCN	Biophysique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
M. Francis <b>ROUSSEL</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
M. Pierre Hugues <b>VIVIER</b>	HCN	Imagerie Médicale

#### **PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mme Dominique <b>LANIEZ</b>	UFR	Anglais
Mme Cristina <b>BADULESCU</b>	UFR	Communication

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

M. Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
M. Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
M. Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
M. Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
M. Jean Pierre <b>GOULLE</b>	Toxicologie
M. Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
M. Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX</b>	Physiologie
M. Paul <b>MULDER</b>	Sciences du médicament
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
M. Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
M. Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique <b>BOUCHER</b>	Pharmacologie
M. Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
M. Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
M. Jean <b>CHASTANG</b>	Biomathématiques
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
M. Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
M. Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
M. François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
M. Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
M. Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et Mathématiques

Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
M. Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
M. Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### **PROFESSEUR CONTRACTUEL**

Mme Elizabeth <b>DE PAOLIS</b>	Anglais
--------------------------------	---------

### **ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

M. Imane <b>EL MEOUCHE</b>	Bactériologie
Mme Juliette <b>GAUTIER</b>	Galénique
M. Romy <b>RAZAKANDRAINIBE</b>	Parasitologie

<b>III – MEDECINE GENERALE</b>
------------------------------------

**PROFESSEURS**

M. Jean-Loup <b>HERMIL</b>	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

**PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :**

M. Pierre <b>FAINSILBER</b>	UFR	Médecine générale
-----------------------------	-----	-------------------

M. Alain <b>MERCIER</b>	UFR	Médecine générale
-------------------------	-----	-------------------

M. Philippe <b>NGUYEN THANH</b>	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :**

M Emmanuel <b>LEFEBVRE</b>	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

Mme Elisabeth <b>MAUVIARD</b>	UFR	Médecine générale
-------------------------------	-----	-------------------

Mme Marie Thérèse <b>THUEUX</b>	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

Mme Yveline <b>SEVRIN-TARTARIN</b>	UFR	Médecine Générale
------------------------------------	-----	-------------------

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :** Mme Véronique DELAFONTAINE

**HCN - Hôpital Charles Nicolle**

**CB - Centre HENRI BECQUEREL**

**CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation**

**HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME**

**CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray**

<b>LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE</b>
---

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
M. Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
M Jean <b>CHASTANG</b>	Mathématiques
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation, Economie de la Santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
M. Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacodynamie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
M. Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
M. Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
M. Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
M. Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
M. Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil <b>ADRIOUCH</b>	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b>	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b>	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b>	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
M. Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b>	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b>	Biochimie (UMR 1079)

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Serguei <b>FETISSOV</b>	Physiologie (Groupe ADEN)
Mme Su <b>RUAN</b>	Génie Informatique

**L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leur auteurs.**

# Remerciements

**À Monsieur le Professeur Rémi Varin,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury,

Pour avoir coordonné mon internat de Pharmacie Hospitalière et m'avoir soutenu dans mon choix de faire de l'hygiène hospitalière,

Veillez trouver ici mon entière reconnaissance.

**À Monsieur le Professeur Jean-Louis Pons,**

Pour vous être rendu disponible afin de juger ce travail,

Veillez trouver ici mes vifs remerciements.

**À Madame le Professeur Martine Pestel-Caron,**

Pour votre disponibilité, vos conseils et pour m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire,

Pour votre soutien dans mon projet d'hygiène hospitalière,

Veillez trouver ici mon profond respect et ma reconnaissance.

**À Madame le Docteur Aude Coquard,**

Pour avoir accepté de prendre part au jury,

Pour m'avoir encadré durant tous ces stages et m'avoir fait découvrir et aimer l'univers de la production,

Veillez trouver ici mes profonds remerciements.

**À Madame le Docteur Michèle Nouvellon.**

Merci de m'avoir fait découvrir et aimer l'hygiène hospitalière, de m'avoir guidé tout au long de mon internat et de cette thèse.

Merci pour vos encouragements, votre soutien, votre gentillesse et votre confiance.

Merci également de m'avoir accueilli chaleureusement durant mon internat et de me permettre de rester au sein de votre équipe.

### **À Christine Chefson-Girault.**

Un grand merci pour ta gentillesse, ton soutien, les sorties resto, tes conseils, pour toute l'aide que tu as su m'apporter, pour ta disponibilité même quand tu n'avais pas le temps et, *last but not least*, pour avoir accepté de reprendre au pied levé la direction de ce travail. Merci également d'avoir testé et approuvé un nouveau somnifère pas trop cher et pour tes conseils d'hygiéniste voyageuse que je suivrais (peut être?) pour mon prochain voyage.

### **À Lise Gourichon.**

Merci pour ton savoir-faire et tes qualités d'épistolière dignes d'une critique littéraire. Tu suscites l'admiration pour tes connaissances bien supérieures au B.A.-BA dans des domaines aussi diversifiés que sont la qualité, les bonbons et les règles de ponctuations (même si elles ne font pas toujours consensus au sein du laboratoire). J'espère te recroiser bientôt en cowgirl!

### **À toute l'équipe du laboratoire d'hygiène du CHU de Rouen,**

Merci à Laure pour toute l'aide que tu m'as apporté et pour nos vendredi "pertinence"!

Merci à Antony, Christine, Edwige, Fabienne, Joëlle, Maud et Patricia pour tous les bons moments, vos conseils précieux et surtout votre bonne humeur à toute épreuve!

### **À mes collègues,**

Merci à toute l'équipe de la pharmacie et surtout de la pharmacotechnie pour l'aide qu'ils m'ont apportés dans la réalisation de ce travail.

Merci également à toute l'équipe de bactériologie pour l'accueil qu'ils m'ont réservé durant mon passage au laboratoire et qu'ils me réservent encore pour répondre à mes (nombreuses) questions ou lorsque je viens prendre (quelques!) places dans le BacT/Alert.

Pharmaciens, médecins, internes, préparateurs en pharmacie, techniciens et tout ceux que j'oublie... qui m'ont suivie, aidée et supportée tout au long de ces quatre années

### **À mes co-internes et amis,**

Connu tout au long de ma scolarité, que ce soit au collège, au lycée, à la fac ou pendant l'internat : Popo, Sandrine, Audrey, Elodie, Claire, Alice, Imane, Pauline, Les deux Marie, Judith, Evi, Lucie, Elise, Emma, Vero, et tout ceux que je n'ai pas la place de citer ici,

Merci pour votre présence, votre soutien, pour tous les bons moments passés et à venir!

### **À mon chef cuisinier préféré,**

Qui se reconnaitra,

Merci pour ton soutien et la patience dont tu as fait preuve tout au long de ce travail.

**À ma famille,**

Je vous dédie ce travail signe de mon affection.

À ma mère, qui m'a toujours écoutée, aidée, encouragée et soutenue durant ces (longues) années d'études

À Guillaume et Mathilde, pour leur présence et leur soutien sans faille,

À mon père.

# Table des matières

Remerciements .....	14
Index des tableaux .....	20
Index des figures.....	22
Liste des abréviations .....	23
Introduction .....	24
1 Nutrition parentérale : définition, indications et complications .....	25
1.1 Définition et objectifs .....	25
1.2 Indications à la nutrition parentérale .....	25
1.2.1 Prématurés et enfants.....	25
1.2.2 Adultes.....	26
1.3 Besoins nutritionnels et composants des solutions de nutrition parentérale .....	27
1.3.1 Energie.....	28
1.3.2 Glucides .....	29
1.3.3 Lipides .....	30
1.3.4 Protéines .....	31
1.3.5 Bilan hydro-électrolytique.....	33
1.3.6 Vitamines et oligo-éléments .....	34
1.4 Mélanges nutritifs .....	36
1.4.1 Mélanges nutritifs « standard » industriels.....	37
1.4.1.1 Mélanges binaires .....	37
1.4.1.2 Mélanges ternaires .....	38
1.4.2 Mélanges nutritifs « à la carte ».....	39
1.5 Complications.....	40
1.5.1 Complications mécaniques liées au cathéter .....	40
1.5.2 Complications métaboliques.....	42
1.5.2.1 Complications hépato-biliaires .....	42
1.5.2.2 Complications osseuses .....	42
1.5.2.3 Autres complications métaboliques.....	43
1.5.3 Complications infectieuses .....	44
2 Fabrication et contrôles microbiologiques des mélanges de nutrition parentérale.....	47
2.1 Réglementation.....	47
2.2 Modalités de préparation et risques de contamination microbiologique.....	47

2.2.1	Stérilisation terminale et filtration stérilisante.....	48
2.2.2	Remplissage aseptique.....	48
2.3	Locaux .....	49
2.3.1	Zone à atmosphère contrôlée.....	49
2.3.2	Préparation sous hotte à flux d'air laminaire .....	50
2.3.3	Préparation en isolateur .....	51
2.4	Personnel, entretien des locaux et contrôles environnementaux .....	52
2.4.1	Personnel, habillement et entretien.....	52
2.4.2	Contrôles environnementaux.....	53
2.5	Contrôles microbiologiques des mélanges de nutrition parentérale.....	55
2.5.1	Principe général .....	55
2.5.2	Mise en œuvre au CHU de Rouen.....	56
3	Tavaux personnels : validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité des mélanges de nutrition parentérale «à la carte» .....	60
3.1	Objectifs et principes .....	60
3.2	Matériel et méthode .....	61
3.2.1	Mélanges de nutrition parentérale analysés.....	61
3.2.2	Micro-organismes de référence .....	63
3.2.3	Méthodes d'analyse .....	64
3.2.3.1	Ensemencement des mélanges de nutrition parentérale .....	64
3.2.3.2	Analyse par la méthode de référence : filtration sur membrane (système Stéritest®).....	65
3.2.3.3	Analyse par ensemencement direct et détection automatisée de la croissance des micro-organismes (automate BacT/Alert®).....	66
3.2.4	Principes de validation selon la Pharmacopée européenne .....	67
3.2.4.1	Mise au point de la méthode alternative.....	68
3.2.4.2	Limite de détection .....	69
3.2.4.3	Exactitude .....	70
3.2.4.4	Fidélité.....	70
3.3	Résultats .....	71
3.3.1	Micro-organismes de référence .....	71
3.3.2	Mise au point de la méthode alternative.....	72
3.3.3	Limite de détection .....	75
3.3.4	Exactitude .....	78

3.3.5	Fidélité .....	79
4	Discussion.....	82
5	Conclusion et perspectives .....	86
	Bibliographie .....	88
	Annexes .....	95

## Index des tableaux

Tableau 1 : Dépense énergétique de base estimée en kcal/kg de poids corporel et par 24h en fonction de l'âge [8, 9] .....	28
Tableau 2 : Apports moyens recommandés en glucose [9, 14] .....	29
Tableau 3 : Acides aminés classés en fonction de leur caractère essentiel, semi-essentiel ou non essentiel pour l'organisme [20] .....	31
Tableau 4 : Besoins azotés quotidiens en fonction de l'âge (rapport azote/acides aminés : 1g d'azote pour 6,25 g d'acides aminés) [20] .....	32
Tableau 5 : Apports moyens recommandés en eau et en électrolytes en fonction de l'âge [9, 23, 24] .....	34
Tableau 6 : Composition de différentes formes injectables de vitamines [25-27] .....	35
Tableau 7 : Apports en vitamines et en oligo-éléments recommandés en fonction de l'âge [9, 24, 28] .....	36
Tableau 8 : Contamination particulaire maximale des différentes zones à atmosphère contrôlée [49] .....	49
Tableau 9 : Limites recommandées (valeurs moyennes) de contamination microbiologique pour la surveillance des zones à atmosphère contrôlée en activité [49] .....	50
Tableau 10 : Nombre minimal d'unités à analyser en fonction de la taille du lot .....	55
Tableau 11 : Quantité minimale de préparation à analyser pour chaque milieu .....	56
Tableau 12 : Composition des poches "hygiène" pédiatriques validées pour le contrôle de stérilité .....	57
Tableau 13 : Composition des poches "hygiène" adultes validées pour le contrôle de stérilité .....	57
Tableau 14 : Formulation des poches "hygiène" pédiatriques utilisées pour les tests de validation de la méthode alternative .....	62
Tableau 15 : Formulation des poches "hygiène" adultes utilisées pour les tests de validation de la méthode alternative .....	62
Tableau 16 : Dénombrement par étalement sur gélose au sang de 80 µl de suspension bactérienne de <i>Bacillus subtilis</i> en tryptone sel avant dilution en milieu BHI/glycérol .....	71
Tableau 17 : Dénombrement par étalement sur gélose au sang de 240 µl de suspension de <i>Bacillus subtilis</i> en milieu BHI/glycérol avant congélation .....	71

Tableau 18 : Dénombrement par étalement sur gélose au sang de 240 µl de suspension de <i>Bacillus subtilis</i> en milieu BHI/glycérol après 5 jours de congélation à -80°C .....	72
Tableau 19 : Résultats de l'essai de fertilité des milieux pour la méthode alternative .....	73
Tableau 20 : Résultats de l'essai de fertilité pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en flacon FA pour la méthode alternative .....	74
Tableau 21 : Test de faisabilité : recherche d'interférences induites par les solutés de nutrition parentérale.....	74
Tableau 22 : Test de faisabilité : recherche d'interférences entre les solutés de nutrition parentérale et la croissance de <i>Candida albicans</i> (inoculum d'environ 15 UFC/fiole).....	75
Tableau 23 : Détermination de la limite de détection de <i>Bacillus subtilis</i> par la méthode de référence (mélanges pédiatriques).....	76
Tableau 24 : Détermination de la limite de détection de <i>Bacillus subtilis</i> par la méthode alternative (mélange pédiatriques).....	76
Tableau 25 : Evaluation de la limite de détection de la méthode de référence de <i>Bacillus subtilis</i> pour les mélanges de nutrition parentérale adulte.....	77
Tableau 26 : Evaluation de l'exactitude de la méthode de référence pour <i>Bacillus subtilis</i> pour mélange de nutrition parentérale pédiatrique .....	78
Tableau 27 : Evaluation de l'exactitude de la méthode alternative pour <i>Bacillus subtilis</i> pour mélange de nutrition parentérale pédiatrique .....	78
Tableau 28 : Evaluation de l'exactitude de la méthode de référence pour <i>Bacillus subtilis</i> pour les mélange de nutrition parentérale adulte.....	79
Tableau 29 : Évaluation de la fidélité des méthodes de référence et alternative pour les six souches recommandées par la Pharmacopée (en mélange de nutrition parentérale pédiatrique).....	80

## Index des figures

Figure 1 : Poche de solution de nutrition parentérale ternaire tri-compartmentée .....	38
Figure 2 : Isolateur à parois rigides utilisé au CHU de Rouen .....	52
Figure 3: Biocollecteur utilisé pour les prélèvements microbiologiques d'air .....	54
Figure 4 : Gélose Count-Tact® .....	54
Figure 5 : Système de pompe péristaltique permettant le transfert en système clos de la solution à analyser et des différents milieux .....	58
Figure 6 : Canister de Stéritest® .....	59
Figure 7 : Site d'inoculation sur une poche de nutrition parentérale pédiatrique .....	64
Figure 8 : Aspect de canister de Stéritest® après incubation. ....	66
Figure 9 : Flacons d'hémoculture BacT/Alert®. ....	67

## Liste des abréviations

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

BPP : Bonnes Pratiques de préparation

BHI : Brain Heart Infusion

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

Cofrac : Comité Français d'Accréditation

CSP : Code de la Santé Publique

CVC : Cathéter Veineux Central

DEB : Dépense Énergétique de Base

HEPA : Haute Efficacité pour les Particules de l'Air

NE : Nutrition Entérale

NO : Nutrition Orale

NP : Nutrition Parentérale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

SA : Semaines d'Aménorrhée

TCL : Triglycéride à Chaine Longue

TCM : Triglycéride à Chaine Moyenne

TR : Thioglycolate Résazurine

TS : Trypticase Soja

UFC : Unité Formant Colonie

VVC : Voie Veineuse Centrale

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

# Introduction

La nutrition parentérale consiste à administrer des nutriments afin de couvrir les besoins de patients pour lesquels la nutrition orale ou entérale est insuffisante voire impossible.

Dans de nombreuses situations, les besoins des patients peuvent être assurés par des poches de nutrition parentérale industrielles standardisées. Cependant, et c'est notamment le cas en pédiatrie, certaines situations imposent le recours à des poches prescrites et fabriquées "à la carte" c'est-à-dire selon une formule individualisée pouvant être réévaluée au jour le jour. Dans ce cas, la fabrication et la délivrance sont sous la responsabilité de la pharmacie à usage intérieure qui, lorsqu'elle dispose de moyens adaptés, peut assurer elle-même la fabrication ou choisir de sous-traiter à un industriel.

En raison de leur composition propice au développement de micro-organismes et de leur voie d'administration, les solutions de nutrition parentérale présentent un risque infectieux important pour le patient. Ce risque peut provenir de la voie d'abord permettant l'administration de la nutrition mais aussi, comme l'a montré l'actualité, de la solution de nutrition parentérale elle-même. Aussi, afin d'assurer au mieux la sécurité du malade, les conditions de fabrication doivent être maîtrisées et contrôlées régulièrement de même que la stérilité finale des solutions fabriquées. A l'heure actuelle, au CHU de Rouen, le contrôle de la stérilité finale des poches de nutrition parentérale est assuré par le laboratoire d'hygiène hospitalière selon la méthode de référence de la Pharmacopée européenne. Dans un objectif d'amélioration continue, le laboratoire souhaiterait recourir à une méthode alternative de contrôle aussi performante, plus rapide et moins onéreuse. Ce travail s'inscrit dans cette démarche en validant la possibilité du remplacement de la méthode de référence par cette méthode alternative.

Ainsi, après avoir décrit dans une première partie les indications, les besoins des patients et les risques de complications associés à cette thérapeutique, une deuxième partie présentera les conditions de préparation et les contrôles nécessaires à la stérilité finale du produit fabriqué.

Enfin, les étapes nécessaires à la validation de l'utilisation de la méthode alternative et les résultats obtenus seront détaillés dans une troisième partie.

# **1 Nutrition parentérale : définition, indications et complications**

## ***1.1 Définition et objectifs***

La nutrition parentérale (NP) est une technique de nutrition artificielle par voie intraveineuse dont l'objectif est de couvrir les besoins nutritionnels, quantitatifs et qualitatifs, chez des malades n'ayant plus la possibilité d'assurer la couverture de ces besoins par voie orale (NO) ou entérale (NE), par le biais d'une sonde naso-gastrique.

Elle a pour objectif de constituer un apport optimal d'énergie, de protéines et de micronutriments afin de prévenir l'apparition de complications liées à la malnutrition. Ainsi, elle permet, entre autres, de limiter la perte de poids, de prévenir le catabolisme protéique, d'éviter l'apparition ou l'aggravation de troubles métaboliques, de participer au bon fonctionnement du système immunitaire ou encore de réduire la mortalité. Chez l'enfant, la NP doit également apporter l'énergie et les nutriments indispensables à la croissance. Dans certaines situations, la NP peut même avoir pour objectif d'améliorer la qualité de vie des patients.

Cependant, cette technique n'utilise pas le tube digestif et est qualifiée de « non physiologique ». De ce fait, elle est à réserver aux situations pour lesquelles les voies orales ou entérales sont contre-indiquées ou insuffisantes pour couvrir les besoins du patient.

## ***1.2 Indications à la nutrition parentérale***

La NP concerne dans la plupart des cas des patients présentant une malabsorption sévère, un déficit des fonctions digestives ou nécessitant une mise au repos du tube digestif.

### ***1.2.1 Prématurés et enfants***

Plusieurs situations peuvent amener à la prescription de nutrition parentérale chez les enfants.

La première situation de prescription de NP chez l'enfant est la prématurité définie par l'OMS comme une naissance survenant entre la 20<sup>ème</sup> et la 37<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA). La grande fragilité de ces nouveau-nés est liée à l'immaturation de leur système respiratoire et cardio vasculaire. De plus, leur composition corporelle n'assurant des réserves énergétiques que pour quelques jours, une prise en charge nutritionnelle rapide après la naissance s'impose. La majorité des enfants nés après 34 SA sont capables de coordonner la succion, la déglutition et la respiration ce qui permet d'envisager une nutrition orale. Pour les enfants moins matures, une nutrition entérale peut être envisagée. L'immaturation du système digestif, immunitaire et circulatoire peut cependant provoquer une intolérance de la nutrition orale ou entérale voir même une entérocolite nécrosante (NEC), imposant une nutrition par voie parentérale parfois exclusive [1]. Dans ce cas, la NP a pour objectif d'assurer une croissance post-natale du prématuré équivalente à celle d'un fœtus du même âge gestationnel [2].

En dehors de la prématurité, les indications à la NP chez les nouveau-nés et les enfants sont similaires à celle rencontrées chez l'adulte et concernent principalement :

- les insuffisances intestinales congénitales ou inflammatoires, lorsque le maintien d'une autonomie nutritionnelle ou hydro-électrolytique est impossible du fait d'une absorption insuffisante et/ou d'une masse intestinale réduite (entéropathies, syndrome de grêle court, fistules entéro-cutanées, occlusions intestinales chroniques...)
- certaines situations chirurgicales, nécessitant la mise au repos temporaire du tube digestif (fistule cutanée, iléus post-opératoire)
- certaines situations d'hypercatabolisme (brûlés graves, oncologie)

La NP peut être, selon les indications, un complément à la voie entérale ou être exclusive afin de mettre au repos le tube digestif mais, dans tous les cas, elle doit fournir les nutriments nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme et à la croissance de l'enfant [3].

## 1.2.2 Adultes

Comme pour les enfants, la nutrition parentérale chez l'adulte est requise dès lors que la voie orale ou entérale est contre-indiquée, n'est pas tolérée ou qu'elle ne suffit plus à couvrir les besoins énergétiques et/ou hydro-électrolytiques des patients. Dans ce dernier cas, NP et NE sont alors complémentaires.

Les indications à la NP chez l'adulte sont similaires à celles chez l'enfant et concernent :

- les pathologies digestives variées telles qu'une insuffisance intestinale chronique sévère, une obstruction intestinale aiguë ou chronique ou encore des vomissements répétés ou incoercibles

- les situations d'hypercatabolisme résultant, par exemple, d'un traumatisme grave, d'un sepsis sévère ou de graves brûlures. Dans ces cas, il existe fréquemment une mauvaise tolérance de la nutrition entérale durant les 15 premiers jours chez ces patients. De plus, les patients ne sont pas toujours en mesure de recevoir une nutrition orale ou entérale. Il est donc recommandé de débiter la NP précocement, dès lors qu'il y a un risque de jeûne de plus de 7 jours. Elle doit être relayée le plus rapidement possible par une voie orale ou entérale et a pour but de limiter au maximum la durée et l'importance du catabolisme protéique, favorisant ainsi la cicatrisation [4].

- la dénutrition dans un contexte péri-opératoire afin de permettre, chez des patients dénutris, la réduction des complications post-opératoires et d'améliorer la cicatrisation et les fonctions immunitaires [5-7]

- la dénutrition chez la personne âgée après échec de l'alimentation orale enrichie et de la NE. Dans ce contexte, la NP est complémentaire d'une NO ou NE et reste temporaire[4].

- l'oncologie

### ***1.3 Besoins nutritionnels et composants des solutions de nutrition parentérale***

Lorsque l'indication à la NP est posée, il est nécessaire de définir les besoins du patient pour chaque constituant du mélange : besoins hydro-électrolytiques, énergétiques, proportion de glucides, protides et lipides, apports en vitamines et oligo-éléments, tout en respectant les apports maximum recommandés afin d'éviter la survenue d'effets indésirables.

### 1.3.1 Energie

Les besoins énergétiques varient de manière importante en fonction de nombreux paramètres et notamment selon l'âge, le sexe, l'état nutritionnel du patient, la pathologie sous-jacente et la vitesse de croissance chez les enfants.

Afin d'estimer les besoins caloriques des patients, des équations ont été développées. Elles permettent de déterminer la dépense énergétique de base (DEB) correspondant aux calories nécessaires au fonctionnement minimum de l'organisme au repos. Ces équations reposent principalement sur trois critères : la taille, la composition corporelle et l'âge. Aucune équation n'étant universelle, plusieurs modèles d'équation coexistent. Comme le montre le [Tableau 1](#), les besoins d'un enfant varient, en fonction de l'âge, entre 30 kcal/kg/j et 120 kcal/kg/j [8] et ceux d'un adulte oscillent entre 20 et 35 kcal/kg/j selon l'état nutritionnel et métabolique [9] en dépassant rarement 40 kcal/kg/j. A ces dépenses énergétiques de base viennent s'ajouter les besoins correspondant aux activités physiques quotidiennes ainsi que ceux induits par une éventuelle pathologie sous-jacente ou par un rattrapage pondéral. De plus, chez l'enfant, le calcul des besoins énergétiques doit inclure à la fois les fonctions métaboliques de base et la croissance. Il faut également tenir compte des faibles réserves énergétiques des enfants et des conséquences rapidement délétères notamment sur le plan neurologique de toute carence. Enfin, que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant, l'ajustement des apports énergétiques tient compte de la capacité d'absorption du tube digestif, en cas de nutrition orale ou entérale concomitante, et le réajustement est fait en comparant le gain pondéral obtenu et le gain attendu.

**Tableau 1 : Dépense énergétique de base estimée en kcal/kg de poids corporel et par 24h en fonction de l'âge [8, 9]**

	Prématuré	Nourrisson	Enfant	Adulte
DEB (kcal/kg/24h)	100-120	90-100	30-90	20-35

Au sein du mélange nutritif, l'apport énergétique est principalement réalisé par les glucides apportant 4 kcal/g et secondairement par les lipides fournissant 9 kcal/g. Les apports énergétiques amenés par les acides aminés ne sont habituellement pas considérés pour le calcul des apports énergétiques totaux. En effet, on estime que l'énergie qu'ils apportent est annulée par la dépense nécessaire à la synthèse protéique.

### 1.3.2 Glucides

Utilisable par l'ensemble du corps humain et seul substrat énergétique pour le cerveau, les hématies et les cellules tubulaires rénales, le glucose constitue la source principale de glucides et d'énergie dans les solutés de nutrition parentérale. Il doit ainsi représenter environ 70 % des apports énergétiques quotidiens soit 3 à 6 g/kg/j chez l'adulte et 10 à 18 g/kg/j chez les nourrissons et les enfants selon leur âge (cf. [Tableau 2](#)). Ces apports recommandés sont ajustés en fonction des apports glucidiques extérieurs (solutés de perfusion, apports oraux).

Différentes concentrations de solutions glucosées existent (2,5 %, 5 %, 10 %, 15 %, 30 %, 50 % etc.). Les plus concentrées en glucose sont hyperosmolaires et imposent une administration par voie veineuse centrale, une solution à 15% ayant par exemple une osmolarité d'environ 830 mOsm/l [10]. En comparaison, l'osmolarité physiologique du plasma est d'environ 290 mOsm/l et il est recommandé de ne pas perfuser par voie veineuse périphérique des solutions dont l'osmolarité dépasse 600 à 850 mOsm/l [11-13].

De plus, afin d'anticiper toute variation anormale de la glycémie, le débit de perfusion des solutions glucosées doit être maîtrisé. Une augmentation progressive du débit est recommandée, en début de perfusion, afin de limiter les risques d'hyperglycémie. En cours de perfusion, la vitesse de palier ne doit pas dépasser les capacités métaboliques de l'organisme soit 4 à 8 mg/kg/min chez le prématuré et 4 à 7 mg/kg/min chez l'adulte. L'arrêt de la perfusion doit également être progressif afin d'éviter toute hypoglycémie. Enfin, une surveillance régulière de la glycémie capillaire au cours de la perfusion permet de surveiller et d'anticiper toute variation anormale [9, 14].

**Tableau 2 : Apports moyens recommandés en glucose [9, 14]**

	Prématuré	Nourrisson	Enfant	Adulte
Glucose (g/kg/24h)	6-12	10-18	8-16	3-6

### 1.3.3 Lipides

Il est recommandé que l'apport énergétique quotidien se fasse à 30 % sous forme lipidique en respectant un apport maximal recommandé de 2 à 4 g/kg/j chez l'enfant et de 1 à 2 g/kg/j chez l'adulte limité à 1 g/kg/j en cas de NP au long cours [9, 15]. Les émulsions lipidiques intraveineuses (ELI) permettent d'éviter les complications liées à un apport glucidique exclusif telles que l'hyperglycémie et la stéatose hépatique. Elles apportent un grand nombre de calories sous un faible volume (9 kcal/g soit 1,8 kcal/ml). Par ailleurs, les émulsions lipidiques sont iso-osmotiques au plasma ce qui permet d'abaisser l'osmolarité des solutés de nutrition parentérale et, par conséquent, d'améliorer la tolérance des solutés par l'endothélium veineux.

Outre l'apport énergétique, ces émulsions préviennent les carences en acides gras essentiels non synthétisables par l'organisme, en apportant de l'acide linoléique (acide gras insaturé dit oméga 6) et de l'acide linoléique (acide gras insaturé dit oméga 3). Ces émulsions sont également enrichies en vitamines liposolubles.

Les ELI sont réalisées à base d'huiles végétales purifiées, émulsionnées en micelles et stabilisées par des phospholipides. Elles sont constituées, pour les plus anciennes, de triglycérides à chaînes longues (TCL) extraits d'huile de soja (Intralipides®). La deuxième génération d'ELI, représentée par le Médialipide®, est constituée pour moitié de TCL et de triglycérides à chaîne moyenne (TCM) issus d'huile de soja et d'huile de coco ou de palme. Le ClinOléic®, constitué d'un mélange d'huile de soja et d'huile d'olive appartient également à cette génération [16]. Ces émulsions contenant des TCM présenteraient l'intérêt d'être mieux oxydées donc moins stockées et mieux utilisées par l'organisme. Par ailleurs, les TCM ne seraient ni immunosuppresseurs ni impliqués dans les processus inflammatoires contrairement aux TCL [17]. Enfin, une 3<sup>ème</sup> génération d'ELI, représentée par le SMOFlipid®, a été commercialisée. Constituées d'un mélange d'huiles de soja, d'olive et riches en acides gras oméga 3 provenant d'huile de poisson [18], ces ELI permettraient notamment d'observer une moindre dégradation du bilan hépatique ce qui pourrait être intéressant lors de NP de longue durée [17, 19].

### 1.3.4 Protéines

L'ensemble des cellules de l'organisme est essentiellement constitué de protéines, elles-mêmes constituées de chaînes d'acides aminés. Parmi les 20 acides aminés existants, on distingue :

- 9 acides aminés dits essentiels car non synthétisables par l'organisme et devant donc être apportés par l'alimentation,
- 5 acides aminés semi-essentiels dont la synthèse ne couvre pas toujours les besoins de l'organisme
- 6 acides aminés dits non essentiels c'est-à-dire pouvant être synthétisés en quantité suffisante par l'organisme à partir d'autres acides aminés ou précurseurs ([Tableau 3](#)) [20].

**Tableau 3 : Acides aminés classés en fonction de leur caractère essentiel, semi-essentiel ou non essentiel pour l'organisme [20]**

Acides aminés essentiels	Acides aminés semi-essentiels	Acides aminés non essentiels
<b>Leucine</b>	Cystéine	Alanine
<b>Isoleucine</b>	Proline	Acide glutamique
<b>Valine</b>	Glycine	Acide aspartique
<b>Lysine</b>	Arginine	Asparagine
<b>Méthionine</b>	Tyrosine	Sérine
<b>Phénylalanine</b>		Glutamine
<b>Tryptophane</b>		
<b>Histidine</b>		
<b>Thréonine</b>		

Les besoins quotidiens sont en moyenne chez l'enfant de 240 à 640 mg d'azote/kg/j soit 1,5 à 4 g d'acides aminés/kg/j et de 160 à 320 mg d'azote/kg/j soit 1 à 2 g d'acides aminés/kg/j chez l'adulte (cf. [Tableau 4](#)).

Par ailleurs, les apports en azote sont à ajuster aux apports en énergie. Cette notion est exprimée par le rapport calorico-azoté qui représente le nombre de calories à apporter pour l'utilisation d'1 gramme d'azote par l'organisme. Il faudra ainsi à l'organisme d'un

enfant 200 à 250 kcal pour utiliser 1g d'azote contre 100 à 150 kcal/g d'azote pour l'organisme d'un adulte.

**Tableau 4 : Besoins azotés quotidiens en fonction de l'âge (rapport azote/acides aminés : 1g d'azote pour 6,25 g d'acides aminés) [20]**

	Prématuré	Nourrisson	Enfant	Adulte
<b>Rapport calorico-azoté (kcal/g d'azote)</b>	200 à 250			100 à 150
<b>Azote (mg/kg/24h)</b>	240 à 640	160 à 400	160 à 320	160 à 320
<b>Acides aminés (g/kg/24h)</b>	1,5 à 4	1 à 2,5	1 à 2	1 à 2

De nombreuses solutions commerciales existent (Primène®, Vintène®...). Elles apportent toutes les acides aminés essentiels mais diffèrent essentiellement sur 2 critères : leur concentration en azote, qui conditionne leur osmolarité et leur voie d'administration, et leur composition relative en acides aminés. En outre, une solution de dipeptide alanine-glutamine est commercialisée sous le nom de Dipeptiven® et sert à assurer les apports en glutamine. Le recours à cette solution peut s'avérer nécessaire notamment en situation de stress. En effet, la glutamine, acide aminé non essentiel, représente l'acide aminé libre le plus abondant dans l'organisme et est indispensable aux cellules à multiplication rapide comme les lymphocytes, les macrophages ou encore les entérocytes. Synthétisée par les muscles squelettiques, elle est libérée en grande quantité par ces mêmes tissus en situation de stress ou d'hypercatabolisme entraînant parfois des carences importantes chez certains patients de réanimation par exemple [21]. Ainsi, des études ont pu montrer qu'une supplémentation en glutamine à des doses de 0,3 à 0,5 g/kg/j est associée à une mortalité, un taux d'infections et à une durée de séjour en réanimation réduits [22], ces effets pouvant être expliqués, notamment, par l'amélioration de la fonction des cellules T, des neutrophiles et globalement des défenses immunitaires [21].

### 1.3.5 Bilan hydro-électrolytique

La proportion d'eau dans le corps humain varie de manière importante avec l'âge allant de 90 % du poids corporel chez un fœtus de 24 SA à 50 % du poids corporel chez un adulte. Dans un contexte de NP, les apports en eau et en électrolytes doivent compenser le mieux possible les pertes digestives, cutanées et urinaires ; les besoins varient de manière importante en fonction de l'âge, mais également de la pathologie. Ainsi, des facteurs tels qu'une fièvre, des vomissements, des diarrhées ou encore une restriction hydrique, pour détresse respiratoire par exemple, doivent être pris en compte dans l'estimation des besoins quotidiens. La surveillance de l'adéquation entre les besoins et les apports est réalisée grâce au poids corporel et au ionogramme sanguin.

Les besoins en sodium et le potassium sont liés au bilan hydrique. En effet, l'eau est répartie dans l'organisme en deux compartiments : le compartiment intracellulaire, où le potassium est l'électrolyte majoritaire, et le compartiment extracellulaire où le sodium prédomine. Un bon équilibre de ces ions est donc indispensable à un bon état d'hydratation, la surveillance des apports étant réalisée grâce au ionogramme sanguin.

Par ailleurs, le calcium et le phosphore sont également des éléments importants puisqu'ils participent au métabolisme osseux et sont indispensables à la croissance. Enfin, le magnésium, acteur de la contractilité musculaire et du maintien de la densité osseuse, agit également dans l'homéostasie du calcium.

Les apports recommandés en eau et en électrolytes, en fonction de l'âge, sont résumés dans le [Tableau 5](#) [9, 23, 24].

Les électrolytes sont donc indispensables mais, en pratique, certains peuvent avoir un effet déstabilisant sur la solution de NP. C'est le cas du bicarbonate qui, additionné à une solution contenant du calcium, aboutira à la formation d'un précipité. Les sels de phosphate et de calcium peuvent également, dans certaines conditions, être à l'origine d'un précipité. Enfin, le calcium a un rôle déstabilisant connu vis à vis des émulsions lipidiques. Toutes ces interactions sont donc à prendre en compte par le pharmacien lors de la validation de la formule prescrite.

**Tableau 5 : Apports moyens recommandés en eau et en électrolytes en fonction de l'âge [9, 23, 24]**

	Prématuré	Nourrisson	Enfant	Adulte <60ans	Adulte >60ans
<b>Eau (ml/kg/24h)</b>	140-180	140-160	60-120	35	30
<b>Sodium (mmol/kg/24h)</b>	3-5	2-3	1-3	1-1,5	
<b>Potassium (mmol/kg/24h)</b>	2-5	1-3	1-3	1-1,5	
<b>Calcium (mmol/kg/24h)</b>	1,3-3	0,8	0,2	0,1-0,15	
<b>Phosphate (mmol/kg/24h)</b>	1-2,3	0,5	0,2	0,3-0,5	
<b>Magnésium (mmol/kg/24h)</b>	0,2	0,2	0,1	0,1-0,2	

### 1.3.6 Vitamines et oligo-éléments

Les vitamines sont des substances organiques indispensables que l'homme ne synthétise pas ou, en quantité insuffisante, et qui doivent donc être apportées par l'alimentation. Treize vitamines sont identifiées et séparées en deux groupes principaux : les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C). On leur reconnaît deux grands types de fonctions : pseudo-hormonale (vitamine A et D dans la croissance et la différenciation cellulaire) et coenzyme ou cofacteur.

Les nourrissons, et tout particulièrement les prématurés, ont de faibles réserves corporelles en vitamines, en raison d'un transfert limité à travers le placenta. Essentielle à la croissance et au développement, une supplémentation de la NP en vitamines est donc indispensable dès le premier jour lorsque la NP est exclusive. Chez l'adulte, une supplémentation en vitamines est envisagée lorsque la NP est exclusive ou quand les apports par voie orale ou entérale sont insuffisants.

Ainsi, dans ces différentes situations, les préparations de NP doivent contenir l'ensemble des vitamines hydrosolubles et liposolubles à l'exception de la vitamine K afin de ne pas interférer avec un éventuel traitement antivitamine K. Des solutions prêtes à l'emploi sont disponibles sur le marché. On peut citer par exemple le Cernevit® qui contient l'ensemble des vitamines, ou d'autres solutions telle que Vitalipides® ou Hydrosol polyvitaminé® qui n'en contiennent qu'une partie. Par ailleurs, très peu de spécialités sont disponibles pour les prématurés et nourrissons.

Le [Tableau 6](#) présente les variations de composition de ces solutions.

**Tableau 6 : Composition de différentes formes injectables de vitamines [25-27]**

	<b>Cernevit®</b>	<b>Soluvit®</b>	<b>Hydrosol polyvitaminé®</b>
<b>Présentation</b>	flacon	flacon	Ampoule 2 ml
<b>Vitamines liposolubles (UI)</b>			
<b>A rétinol</b>	3500	-	5000
<b>D3 colécalciférol</b>	220	-	1000
<b>E alphatocophérol</b>	11,2	-	2
<b>Vitamines hydrosolubles (mg)</b>			
<b>B1 thiamine</b>	3,51	2,5	2,
<b>B2 riboflavine</b>	4,14	3,6	1,5
<b>B5 acide pantothénique</b>	17,25	15	4
<b>B6 pyridoxine</b>	4,53	4	2
<b>B12 cyanocobalamine</b>	0,006	0,005	-
<b>B3 ou PP nicotinamide</b>	46	40	10
<b>B8 ou H biotine</b>	0,069	0,06	-
<b>B9 acide folique</b>	0,414	0,4	-
<b>C acide ascorbique</b>	125	100	50

Douze oligo-éléments ou « éléments traces » sont considérés comme essentiels chez l'homme : le chrome, le cuivre, le fer, le fluor, l'iode, le manganèse, le molybdène, le sélénium, le zinc, le cobalt, le bore et le vanadium. Ces métaux ou métalloïdes représentent moins de 0,01 % du poids corporel et sont impliqués dans toutes les grandes fonctions de l'organisme : cofacteur d'enzymes antioxydantes, de cytochromes (transport d'O<sub>2</sub>), d'enzymes de la gluconéogénèse... Une supplémentation des solutions de NP par l'ensemble de ces éléments est nécessaire, surtout si la NP est prolongée. Ils sont administrés sous forme d'une ration quotidienne grâce à des solutions prêtes à l'emploi.

De manière générale, les besoins quotidiens en vitamines et oligo-éléments ne sont pas toujours précisément définis. Le [Tableau 7](#) ci-dessous présente les apports recommandés en fonction de l'âge.

**Tableau 7 : Apports en vitamines et en oligo-éléments recommandés en fonction de l'âge [9, 24, 28]**

	Nourrisson(/jour)	Enfant (/jour)	Adulte (/jour)
	<b>Oligo-éléments</b>		
<b>Zinc</b>	100 - 250 µg/kg	50 µg/kg	38 - 100 µmol
<b>Cuivre</b>	20 µg/kg	20 µg/kg	8 - 24 µmol
<b>Sélénium</b>	2 - 3 µg/kg	2 - 3 µg/kg	0,4 - 0,9 µmol
<b>Fer</b>	50 - 100 µg/kg	50 - 100 µg/kg	18 - 20 µmol
<b>Manganèse</b>	0,018 µmol/kg	0,018 µmol/kg	3 - 5 µmol
<b>Chrome</b>	0,2 µg/kg	0,2 µg/kg	0,2 - 0,3 µmol
<b>Molybdène</b>	1 µg/kg	0,25 µg/kg	0,2 - 0,26 µmol
<b>Iode</b>	1 µg	1 µg	0,01 - 1 µmol
<b>Fluor</b>	0,5 mg	0,5 mg	50 - 79 µmol
	<b>Vitamines</b>		
<b>Vitamine A</b>	150-300 µg/kg	150 µg	1000 µg
<b>Vitamine E</b>	2,8 - 3,5 mg/kg	7 mg	10 mg
<b>Vitamine K</b>	10 µg/kg	200 µg	150 µg
<b>Vitamine D</b>	0,8 µg/kg	10 µg	5 µg
<b>Vitamine B1 (thiamine)</b>	0,35 – 0,5 mg/kg	1,2 mg	3 - 3,5 mg
<b>Vitamine B2 (riboflavine)</b>	0,15 – 0,2 mg/kg	1,4 mg	3,6 - 4,9 mg
<b>Vitamine B6 (pyridoxine)</b>	0,15 – 0,2 mg/kg	1 mg	1 mg
<b>Niacine</b>	4 – 6,8 mg/kg	17 mg	40 - 46 mg
<b>Acide folique</b>	56 µg/kg	140 µg	400 µg
<b>Vitamine B12</b>	0,3	1 µg	5 – 6 µg
<b>Biotine</b>	5 – 8 µg/kg	20 µg	60 – 69 µg
<b>Vitamine C</b>	15 – 25 mg/kg	80 mg	100 – 125 mg

## 1.4 Mélanges nutritifs

Après avoir déterminé les besoins du patient, plusieurs possibilités s'offrent aux médecins pour l'administration d'une NP. Celle-ci peut se faire sous forme de flacons séparés apportant chacun un élément (glucides, lipides, protides). Cette technique n'est actuellement plus recommandée puisqu'elle nécessite un nombre important de lignes de perfusion et de manipulations augmentant ainsi le risque infectieux. Les éléments nutritifs de la NP peuvent également être conditionnés et administrés ensemble selon la technique du « tout en un ». Pour cela, deux grands types de mélanges existent : les mélanges industriels dits « standard » et les mélanges formulés « à la carte ».

### 1.4.1 Mélanges nutritifs « standard » industriels

L'apparition des mélanges nutritifs prêts à l'emploi a remplacé l'administration de NP en flacons séparés. Ces solutions prêtes à l'emploi ont notamment permis de réduire le risque infectieux et sont largement utilisées chez l'adulte. Cependant, la standardisation des compositions ne permet pas une adaptation précise aux besoins des patients. Ainsi, la variété des pathologies rencontrées chez les nouveau-nés et les enfants, ainsi que leur état de santé parfois instable, compliquent l'utilisation de ces poches prêtes à l'emploi. Chez l'adulte, une NP au long court nécessite une adaptation particulièrement précise aux besoins ce qui empêche, dans certains cas, l'utilisation de mélanges standard. Au final, la décision de recourir à des poches standard ou fabriquées selon une formule individuelle, dite « à la carte », revient à un clinicien expérimenté qui évalue les besoins du patient, la sécurité et le coût du traitement pour choisir la formule la mieux adaptée. La société américaine de nutrition entérale et parentérale recommande, en effet, que les deux types de formulation soient considérés en fonction des besoins des patients [29]. La société européenne de nutrition clinique et métabolisme préfère, quant à elle, l'utilisation de formules à la carte, surtout chez les nouveau-nés, mais indique que les poches standard peuvent également être utilisées. Dans ce cas, il convient de mettre en place un suivi approprié et de limiter l'utilisation de ces formules à 2 semaines [30]. Plusieurs types de mélanges sont disponibles sur le marché. On les distingue selon leur indication (pédiatrie, adulte), le type de mélange (binaire ou ternaire) et selon leur composition (apport énergétique, volume, teneur en électrolytes, osmolarité...).

#### 1.4.1.1 Mélanges binaires

Les formules binaires sont définies comme des mélanges constitués de glucide et protides et exempts de lipides. De rares cas contre-indiquent, en effet, la perfusion de lipides comme une hypertriglycéridémie  $> 6,5$  mmol/l, un ictère intense ou une hépatopathie grave. Dans tous les autres cas, un apport de lipides est recommandé au moins une fois par semaine, afin d'éviter toute carence en acides gras essentiels. Les mélanges binaires peuvent être complétés, si nécessaire, par une perfusion de lipides en « y » (aucun ajout dans la poche ne devant être effectué au risque de déstabiliser la solution). De même, pour des raisons de stabilité, ces mélanges ne contiennent pas toujours

d'oligo-éléments et jamais de vitamines. Ces composants sont alors à ajouter extemporanément. Enfin, toujours dans le but d'améliorer la stabilité et de simplifier les conditions de conservation, ces poches sont bi-compartimentées ce qui permet de séparer la solution de glucose et les solutions d'acides aminés et d'électrolytes.

Les annexes 1 et 2 présentent différents mélanges binaires standard disponibles sur le marché pour les indications pédiatriques et adultes. Si certaines spécialités ont obtenu l'AMM chez l'adulte et l'enfant de plus de 2 ans, leur composition n'est pas réellement adaptée aux besoins pédiatriques. Il est alors préférable, lors de NP à long terme, de recourir aux spécialités exclusivement pédiatriques.

#### 1.4.1.2 Mélanges ternaires

Les mélanges de NP ternaires sont constitués de glucides, protides et lipides. Ces formulations ont montré leur efficacité pour limiter les effets indésirables d'un apport calorique exclusivement glucidique et éviter les carences en acides gras essentiels. Ce type de mélange est nécessaire dès lors que la NP doit se prolonger.

Comme pour les mélanges binaires, ces solutions ne contiennent jamais de vitamines qui doivent être ajoutées extemporanément. Elles ne contiennent pas toujours non plus d'oligo-éléments. Toujours afin d'améliorer la conservation et comme le montre la [Figure 1](#), les poches sont tri-compartimentées pour séparer le glucose, les lipides et les acides aminés. Si le mélange contient des électrolytes, ceux-ci sont contenus dans la solution d'acides aminés. Le calcium, quant à lui, est ajouté à la solution de glucose. Enfin, il est possible d'administrer la poche avec ou sans lipides selon les besoins.



**Figure 1** : Poche de solution de nutrition parentérale ternaire tri-compartimentée

Les annexes 3 et 4 présentent différentes compositions disponibles sur le marché.

L'annexe 3 résume les différents mélanges ternaires adultes disponibles sur le marché. Si ceux-ci ont obtenu l'AMM pour une "nutrition parentérale chez l'adulte et l'enfant de plus de 2 ans quand la nutrition orale et entérale est impossible, insuffisante ou contre-indiquée", ces solutions n'ont pas une composition parfaitement adaptée à une population pédiatrique dans le cadre d'une NP à long terme.

De nombreuses spécialités sont donc à disposition des prescripteurs. Cependant, des études montrent que dans certains cas, ces mélanges ne permettent pas toujours de couvrir les besoins des patients [31, 32]. Ils sont alors remplacés par des poches dont la formulation est dite « à la carte ».

#### 1.4.2 Mélanges nutritifs « à la carte »

Déterminés par le prescripteur, les mélanges « à la carte » sont essentiellement indiqués chez l'enfant et chez l'adulte lorsque la NP est prolongée. L'enfant se distingue de l'adulte par des besoins nutritionnels très variables liés à sa croissance et par sa très grande vulnérabilité à la dénutrition, celle-ci pouvant compromettre sa croissance voire engager le pronostic vital. Chez certains enfants à besoins spécifiques, les poches de NP standard ne suffisent pas. Un nombre important d'ajouts et/ou de poches à utiliser, associé à l'impossibilité de couvrir complètement certains besoins, imposent souvent le recours à des mélanges dits "à la carte" [31, 32] ; ces mélanges nutritifs ayant une composition et une formulation déterminées par le prescripteur au plus proche des besoins du patient.

Chez l'adulte, dans le cadre d'une nutrition parentérale à long terme, les apports doivent être les plus proches possible des besoins, afin d'éviter toute carence ou surcharge délétères à long terme, ce qui rend parfois nécessaire le recours à une formulation la plus précise possible [9].

Ces mélanges nutritifs complexes peuvent être réalisés soit par la pharmacie à usage intérieur (PUI) de l'hôpital au sein de locaux adaptés, soit par un industriel spécialisé dans le cadre d'une sous-traitance sous la responsabilité de la PUI.

## 1.5 Complications

Quelque soit le type de mélange de NP, deux grandes voies d'administration sont possibles, la voie veineuse périphérique et la voie veineuse centrale. La voie veineuse périphérique est à réserver à des NP de courte durée et à des mélanges présentant une osmolarité < 850 mOsm/l [12]. La voie veineuse centrale peut être réalisée grâce à un cathéter veineux central (CVC) tunnelisé (veine subclavière ou jugulaire interne) ou à une chambre implantable. Cette voie d'abord est préférable lors de NP de longue durée ou lorsque l'osmolarité des solutions à perfuser est supérieure à 850 mOsm/l.

Compte-tenu de la voie d'administration et des spécificités des mélanges de NP particulièrement propices au développement bactérien, des complications peuvent survenir. Ainsi, trois grands types de complications, de gravité variable, peuvent être distingués à savoir les complications mécaniques liées au cathéter, les complications métaboliques liées au mélange nutritif en lui-même et les complications infectieuses associées à la fois au cathéter et au mélange administré.

### 1.5.1 Complications mécaniques liées au cathéter

Dès lors que la nutrition parentérale est prévue pour une durée supérieure à 6 jours, une voie veineuse centrale est à préférer [12]. Cette voie concerne donc la majorité des patients éligibles à une NP ; c'est pourquoi seules les complications la concernant seront décrites.

Les complications mécaniques liées au cathéter peuvent avoir plusieurs origines. Tout d'abord, elles peuvent survenir lors de la pose du cathéter. Ces situations représentent moins de 10% des complications mécaniques et correspondent à des plaies veineuses ou artérielles, des hémothorax, des pneumothorax voire à une mauvaise position finale du cathéter. Des complications plus rares, mais également graves, peuvent être observées telle qu'une perforation cardiaque, une embolie pulmonaire ou des lésions nerveuses. Enfin, dans environ 5 % des cas, un échec de pose peut être constaté, ce taux variant en fonction de l'expérience de l'opérateur ou des variations anatomiques propres au patient [33]. De nombreuses recommandations sur les conditions de pose existent afin de limiter ces complications. Ainsi, la réalisation d'un examen clinique pré-opératoire, le choix de la voie

d'accès ou encore la pose par un opérateur expérimenté dans des conditions d'asepsie chirurgicale permettent de réduire leur survenue [12, 34].

Après la pose et au cours de son utilisation, une migration de tout ou partie du cathéter ou encore une fuite du dispositif peuvent également être observées. Ces deux situations nécessitent alors un changement du matériel défectueux.

Dans de rares cas, une obstruction intra-cathéter peut survenir, notamment en raison du passage de solutés incompatibles avec le mélange nutritif ou encore d'apports électrolytiques inappropriés qui aboutissent à la formation de précipités. Ce type de complication peut être évité en dédiant le cathéter aux apports nutritifs et en vérifiant la compatibilité de tout autre soluté administré par cette voie veineuse. Un rinçage du cathéter par du sérum physiologique en fin de perfusion et un verrou du cathéter en pression positive permettraient également de limiter ces obstructions [12].

Enfin, les solutés de NP présentent une osmolarité élevée ce qui, combiné entre autres aux dommages infligés par le cathéter à la veine dans laquelle il est inséré, crée une inflammation pouvant conduire à une thrombose. Celle-ci peut aller d'une simple thrombose au point d'entrée veineux du cathéter à une thrombose extensive de la veine cave supérieure. Ces situations sont le plus souvent quasi asymptomatiques mais sont potentiellement graves et pouvant occasionner une perte de chance pour le patient du fait de la suppression de l'accès veineux. Ainsi, toute douleur, fièvre ou circulation veineuse collatérale doit faire suspecter une thrombose et doit être confirmée par doppler veineux ou phlébographie. Cette situation peut être essentiellement prévenue en limitant les dommages veineux lors de la pose du cathéter (guidage échographique, cathéter du calibre le plus petit possible, position adéquate du cathéter) [4]. Les recommandations actuelles préconisent un traitement préventif des thromboses uniquement pour les patients à haut risque ; ce traitement se basant sur l'administration sous-cutanée d'héparine de bas poids moléculaire [12].

Outre ces complications mécaniques, une intolérance aux mélanges nutritifs peut être observée.

## 1.5.2 Complications métaboliques

Les complications métaboliques sont directement liées à une composition inappropriée ou à une administration inadaptée de la NP et peuvent concerner les fonctions hépato-biliaires, le métabolisme osseux ou glucidique.

### 1.5.2.1 Complications hépato-biliaires

Les complications hépato-biliaires sont les complications métaboliques à long terme les plus fréquentes et peuvent se manifester sous différents aspects : élévation des enzymes hépatiques, stéatose, cholestase, lithiase biliaire, fibrose ou une cirrhose.

Chez l'adulte comme chez l'enfant, ces complications sont fréquentes lors de nutrition parentérale à long terme et touchent de 20 à 75 % des patients selon les études [35, 36]. Ces anomalies peuvent apparaître en quelques semaines à quelques mois et chez l'enfant, des taux de mortalité de 38 à 51 % ont pu être décrits [33, 37]. L'origine des complications hépato-biliaires semblent multifactorielles, les facteurs étiologiques propres à la NP restent difficiles à définir. Ces complications peuvent être liées à la pathologie sous-jacente, comme à un excès de glucose dans le cas d'une stéatose ou encore à un excès de lipides qui peut entraîner une cholestase. Il a en effet été démontré qu'un apport supérieur à 1 g/kg/j est associé à un risque significativement accru de cholestase intra-hépatique chronique et de fibrose extensive pouvant conduire rapidement à la cirrhose (2 à 3 ans). Chez l'enfant, ces complications apparaissent associées à une naissance prématurée, un petit poids de naissance, un sepsis ou de multiples interventions chirurgicales gastro-intestinales.

L'utilisation d'ELI à base d'huile de poisson, dans le cas de pathologie hépatique associée à la nutrition parentérale, a montré un rôle préventif et curatif chez l'enfant. L'effet anti-inflammatoire des acides gras oméga 3 pourrait être en partie responsable de cet effet protecteur [37].

### 1.5.2.2 Complications osseuses

Ces effets indésirables sont le plus souvent décrits chez l'adulte. Ils se manifestent par une déminéralisation osseuse pouvant faciliter la survenue d'une ostéoporose et

entraînant des douleurs, une fragilisation du squelette et, exceptionnellement, des fractures. Le diagnostic se fait par ostéodensitométrie. Ces complications sont d'origine multifactorielle mais, parmi les facteurs étiologiques, on peut citer des apports inadéquats de phosphore, de calcium, d'acides aminés ou de vitamine D. Le rôle toxique de l'aluminium est également évoqué [4].

### 1.5.2.3 Autres complications métaboliques

D'autres complications, à plus ou moins long terme, peuvent également apparaître. L'hyperglycémie est ainsi un des effets secondaires les plus fréquents. Elle peut être observée chez 50% des patients lorsque le débit de perfusion en glucose est trop rapide et est favorisée par le fait que toute agression provoque une diminution de la tolérance de l'organisme au glucose. Les conséquences de ce type de complications varient en fonction de l'intensité et de la durée de l'hyperglycémie allant de la polyurie osmotique au coma hyperosmolaire. De plus, l'hyperglycémie répétée diminue les défenses immunitaires favorisant ainsi les infections. Plusieurs mesures permettent de prévenir ce trouble métabolique comme la limitation du débit maximal en glucose à 4 mg/kg/min chez l'adulte, l'augmentation progressive du débit en début de perfusion, la surveillance glycémique capillaire rapprochée, et la mise en place d'une insulinothérapie adaptée (maintien de la glycémie < 110 mg/dl dans la mesure du possible) [3, 4, 33, 38].

A l'inverse, une modification, voire un arrêt brutal de la perfusion, peut conduire à une hypoglycémie qui, par ses possibles conséquences cérébrales, représente un des effets indésirables à court terme les plus graves. À nouveau, une maîtrise du débit de perfusion en glucose, une surveillance glycémique et une insulinothérapie adaptée permettent d'éviter ce type d'effet secondaire [4].

À court terme, un apport excessif en lipides peut conduire à une hypertriglycéridémie parfois associée à une hypercholestérolémie aux conséquences délétères à long terme.

De plus, l'intolérance aux lipides est également une complication rare mais grave de la NP. Souvent liée à un débit de perfusion trop élevé (> 150-200 mg/kg/h), elle se manifeste par une accumulation de triglycérides et de phospholipides à l'origine d'un syndrome

d'activation macrophagique. Principalement décrit chez l'enfant, ce syndrome peut parfois engager le pronostic vital en l'absence de traitement [38].

Concernant les apports azotés, aucune toxicité à court terme ne semble exister. En revanche, un excès d'acides aminés est susceptible d'entraîner une hyperammoniémie chez l'insuffisant hépatique. Dans cette situation, un contrôle régulier de l'ammoniémie permet de prévenir ce type d'effet indésirable.

Enfin, chez certains patients dénutris chroniques, l'administration d'une NP inadaptée à haut niveau calorico-azoté peut provoquer un syndrome de renutrition associant hypophosphorémie, hypokaliémie, hypomagnésémie et pouvant conduire à des complications cardiaques, respiratoires et hématologiques. La prévention de ce syndrome passe par une augmentation très progressive des apports énergétiques sur 7 à 10 jours avec une supplémentation adaptée en phosphore, potassium et magnésium (surveillance par la réalisation de ionogrammes sanguins) [4].

Outre les complications mécaniques liées au cathéter et celles liées à la composition du mélange perfusé, les complications infectieuses sont le risque majeur de la NP.

### 1.5.3 Complications infectieuses

Avec 0,38 à 4,58 infections pour 1000 journées cathéter selon les séries [39, 40], les complications infectieuses représentent la première complication liée à la nutrition parentérale à domicile. Elles sont dues, dans deux tiers des cas, à des cocci gram positif dont environ 10 % de *Staphylococcus aureus*, à des gram négatif dans environ un quart des infections, les levures représentant moins de 10% des cas. Plusieurs facteurs de risque comme le diamètre du cathéter, l'exclusivité de la NP ou encore l'existence d'une pathologie sous-jacente chez le patient semblent être associés à la survenue de ces infections [39].

Ces infections liées à la voie veineuse centrale (VVC) comprennent, d'une part, les infections locales représentées par l'infection du site de sortie d'un CVC ou du trajet sous-cutané d'un cathéter tunnelisé et, d'autre part, les infections systémiques. Ces dernières sont recherchées sur signes cliniques par la réalisation d'hémocultures prélevées simultanément

en périphérie et sur la voie veineuse centrale. Sans retrait de cathéter, une infection systémique est définie par la mise en évidence du même germe sur les deux types d'hémocultures sans autre point d'appel infectieux. Un différentiel de temps de croissance bactérienne supérieur à 2h entre les hémocultures centrales et périphériques est actuellement considéré comme le critère diagnostique de référence [12, 41].

On distingue 3 mécanismes de contamination de la VVC : extraluminale, intraluminale ou hématogène.

La contamination extraluminale de la VVC est responsable d'infections survenant dans les premiers jours suivant la pose. Elle correspond principalement à une contamination du cathéter par la flore cutanée qui colonise puis contamine la paroi externe du cathéter. Ceci se manifeste par une infection du tunnel du cathéter (tunnelite) ou de la loge de pose de la chambre implantable [4].

Cause la plus fréquente d'infection de VVC à distance de la pose, la contamination intraluminale est secondaire à la manipulation de la ligne de perfusion ou, exceptionnellement, à la contamination des solutés de NP. Elle correspond à la colonisation des parois internes du cathéter par la flore cutanée du patient ou des soignants [4].

Enfin, phénomène beaucoup plus rare, la contamination hématogène correspond à une contamination de la portion intravasculaire du cathéter. Elle survient lors de la décharge d'un foyer septique à distance.

La prévention de ce type de complications passe par le respect de recommandations concernant la pose, l'utilisation et l'entretien de la VVC. Ainsi, il est recommandé de poser dans des conditions d'asepsie chirurgicale un cathéter à simple lumière. Les soins doivent ensuite être réalisés par un personnel formé, en respectant une hygiène des mains stricte et en utilisant un antiseptique alcoolique pour réaliser l'antisepsie cutanée. Les lignes nutritives doivent être changées toutes les 96 h, sauf si la perfusion contient des lipides. Dans ce cas, le changement immédiat des lignes est recommandé. Enfin, les connecteurs doivent être manipulés avec des compresses imprégnées d'un antiseptique alcoolique [12, 42, 43].

En revanche, si en dépit de ces précautions une infection de la VVC est avérée, il faut envisager le retrait du CVC. C'est le cas lors d'une infection du trajet sous-cutané du cathéter avec issue de pus à l'orifice externe, d'un choc septique, d'une thrombophlébite,

d'une endocardite ou encore d'une ostéomyélite. Le germe responsable de l'infection est également déterminant dans la conduite à tenir. Ainsi, les infections fongiques, à bacille gram négatif et à *Staphylococcus aureus* constituent des indications à l'ablation du CVC.

En dehors de ces situations, un traitement conservateur peut permettre le maintien de la VVC. Il associe un verrou antibiotique à une antibiothérapie systémique pour une durée de 2 semaines. La technique du verrou consiste à injecter dans le CVC infecté un volume d'antibiotique égal à celui du volume mort du CVC. La solution est alors laissée en place pour une durée variable et sera ré-aspirée avant toute nouvelle utilisation du cathéter [12, 44, 45]. Chez certains patients, les infections de la VVC peuvent être récurrentes. Dans ce cas, l'utilisation en fin de perfusion d'un verrou à base de taurolidine, substance antiseptique sans propriétés antibactériennes, semble montrer son efficacité dans la prévention secondaire d'infection de CVC [46].

Les complications sont donc nombreuses et le pharmacien a un rôle particulièrement important à jouer dans leur prévention. Il doit non seulement s'assurer de la bonne qualité des matières premières utilisées pour la fabrication des mélanges nutritifs mais aussi vérifier que chaque nutriment est prescrit en quantité adaptée à chaque patient. Il est également responsable de la mise en place d'un système qualité de fabrication et de contrôle permettant la réalisation de mélanges stériles, apyrogènes et dépourvus de particules. Enfin, il doit s'assurer de la bonne conservation des solutions à perfuser. Pour cela, la maîtrise et le contrôle du processus de fabrication et des conditions de stockage s'avèrent indispensables.

## **2 Fabrication et contrôles microbiologiques des mélanges de nutrition parentérale**

### ***2.1 Réglementation***

Le décret du 26 décembre 2000 [47] relatif aux PUI précise que les pharmacies à usage intérieur doivent disposer de locaux, de moyens en personnel, de moyens en équipements et d'un système d'information leur permettant d'assurer l'ensemble de leurs missions et notamment la réalisation des préparations magistrales à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques.

Les mélanges de NP « à la carte » sont fabriqués individuellement pour chaque patient et correspondent à la définition des préparations magistrales. Le décret impose donc aux PUI la préparation des mélanges de NP conformément aux bonnes pratiques de préparation, tel que le définit l'article L. 5121-5 du code de la santé publique [48].

Par conséquent, toute PUI se doit de disposer de locaux et équipements adaptés ainsi que de personnel formé à la préparation de NP « à la carte » ou de mettre en place un accord de sous-traitance afin de se procurer ces solutions de NP.

### ***2.2 Modalités de préparation et risques de contamination microbiologique***

Les modalités de fabrication d'une préparation stérile et les possibilités techniques pour assurer la stérilisation terminale du produit vont permettre de définir les conditions environnementales de cette fabrication. Deux cas de figure se présentent : soit le produit peut être stérilisé par la chaleur humide ou par filtration stérilisante, soit il ne supporte pas ces procédés et, dans ce cas, toutes les étapes de fabrication et de conditionnement doivent être particulièrement maîtrisées afin de limiter au maximum les risques de contamination de la préparation.

### 2.2.1 Stérilisation terminale et filtration stérilisante

Lorsque les caractéristiques, notamment physico-chimiques, de la préparation le permettent, la stérilisation terminale du produit par la chaleur humide est à préférer. Cette technique se base sur la destruction des micro-organismes par la vapeur d'eau saturée sous pression à 134°C. La stérilité du produit n'est pas à démontrer si la préparation est présentée dans un conditionnement garantissant sa stérilité terminale et si les paramètres de chaque cycle (pression et température en fonction du temps) sont enregistrés et validés [49].

Pour certains principes actifs thermosensibles ne tolérant pas une stérilisation par la chaleur humide, une filtration stérilisante peut être envisagée. Si la préparation le permet, la solution doit alors être filtrée au plus près du point de remplissage du contenant sur un filtre stérile de diamètre nominal inférieur ou égal à 0,22 µm. Celui-ci est défini par la Food and Drug administration (FDA) comme un filtre capable de produire un effluent stérile à partir d'une suspension de *Brevundimonas diminuta* à une concentration de 10<sup>7</sup> germes par cm<sup>2</sup> de surface filtrante. Cette technique n'est donc efficace que dans la mesure où la charge bactérienne avant filtration est maîtrisée. De plus, l'intégrité du filtre doit être, dans la mesure du possible, vérifiée après filtration [49].

### 2.2.2 Remplissage aseptique

Dans le cas des préparations pour lesquelles les deux techniques décrites ci-dessus sont impossibles à mettre en œuvre, le recours à la préparation aseptique s'impose. L'objectif est alors de maintenir la stérilité d'un produit fabriqué à partir de matériel et de matières premières stériles. Pour cela, la préparation doit se faire préférentiellement en système clos, c'est-à-dire selon un procédé de répartition des matières premières stériles, utilisant exclusivement du matériel stérile et permettant leur transfert vers leur contenant final sans contact avec l'environnement [49].

Les solutés de NP sont constitués d'éléments thermosensibles tels que les vitamines et ne peuvent donc pas subir de stérilisation terminale à la chaleur humide. De plus, la présence d'émulsion lipidique dans les mélanges ternaires empêche toute filtration

stérilisante. Le remplissage aseptique est donc la seule possibilité disponible permettant d'assurer l'asepsie des solutés de nutrition parentérale. Ainsi, compte-tenu de l'impossibilité de stériliser le produit fini et de la composition des solutions de NP propice au développement des micro-organismes, les conditions de préparation doivent permettre de limiter au maximum la contamination. La fabrication en zone à atmosphère contrôlée est donc indispensable.

## 2.3 Locaux

### 2.3.1 Zone à atmosphère contrôlée

Une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) est définie comme une zone pour laquelle un système de filtration et de contrôle du débit d'air permettent une maîtrise de la contamination particulaire et microbiologique. Les particules inertes pouvant être un support aérien de germes, la limitation de la contamination particulaire contribue à réduire la contamination bactérienne et fongique. Ces particules ont plusieurs origines possibles telles que l'activité humaine, la ventilation ou encore les équipements présents dans la zone. En pratique, quatre niveaux de ZAC, correspondant à des systèmes de traitement d'air de plus en plus évolués, sont définis. La qualité de l'air est évaluée en activité, c'est-à-dire en présence humaine, ou au repos en dehors de toute activité humaine. Cette évaluation se fait par la mesure du nombre de particules (comptages particulaires) et la numération des germes et des champignons présents par m<sup>3</sup> d'air (prélèvements d'air). Les BPP définissent le nombre maximal de particules et de microorganismes autorisés en fonction de la classe de ZAC requise (cf. [Tableau 8](#) et [Tableau 9](#)).

**Tableau 8 : Contamination particulaire maximale des différentes zones à atmosphère contrôlée [49]**

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particules par m <sup>3</sup> de taille égale ou supérieur à			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	Non défini	Non défini

**Tableau 9 : Limites recommandées (valeurs moyennes) de contamination microbiologique pour la surveillance des zones à atmosphère contrôlée en activité [49]**

Classe	Echantillon d'air (UFC/m <sup>3</sup> )	Boîtes de Pétri (diamètre 90mm) (UFC/ 4 heures)	Géloses count-tact® (diamètre 55mm) (UFC/ plaque)	Empreintes de gants (5 doigts) (UFC/ gant)
<b>A</b>	<1	<1	<1	<1
<b>B</b>	10	5	5	5
<b>C</b>	100	50	25	-
<b>D</b>	200	100	50	-

Une ZAC peut se présenter sous différentes formes comme une hotte à flux laminaire, un isolateur, une salle à flux d'air laminaire ou encore une salle blanche mais dans tous les cas, elle est en surpression par rapport à son environnement afin de limiter l'entrée de particules extérieures et d'évacuer les particules présentes dans le périmètre.

L'environnement des ZAC est également maîtrisé et correspond le plus souvent à une ZAC de classe moins élevée. On y accède par un système de sas dont les portes ne peuvent pas s'ouvrir en même temps, le tout correspondant à une cascade de pressions. Le circuit matériel/matières premières diffère de celui du personnel et, toujours dans le but de limiter la contamination particulaire, le décartonnage des matières premières se fait en dehors des ZAC.

Le choix de la ZAC est conditionné par le niveau de risque de la préparation à réaliser. Les solutés de NP étant des produits non stérilisables et dont la formulation est particulièrement favorable au développement des micro-organismes, ils sont à fort risque de contamination microbiologique. De ce fait, leur préparation doit se faire dans une ZAC de classe A. En pratique, leur fabrication est le plus souvent réalisée sous hotte à flux d'air laminaire ou en isolateur.

### 2.3.2 Préparation sous hotte à flux d'air laminaire

Ce type d'équipement correspond à une ZAC de classe A (comme défini au paragraphe 2.3.1) car il dispose notamment d'un filtre à haute efficacité pour les particules de l'air (HEPA) qui permet d'obtenir une qualité d'air optimale. Afin de protéger au mieux la zone de préparation, les hottes à flux d'air laminaire sont placées dans des locaux qui

sont eux-mêmes en classe B ou C selon le procédé de préparation choisi (répartition en système clos ou ouvert). Si la préparation est réalisée en système clos tel que défini en 2.2.2 alors l'environnement de la hotte peut être de classe C. En revanche, dès qu'une des étapes de préparation n'est pas réalisée en système clos, la préparation aseptique est dite en système ouvert. L'environnement de la hotte doit alors être de classe B.

### 2.3.3 Préparation en isolateur

L'isolateur est un équipement clos qui propose un environnement de classe A. Tout comme une hotte à flux d'air laminaire, un isolateur doit être placé dans une salle dont la qualité de l'air est maîtrisée. Quelque soit le mode de préparation choisi, la zone environnant l'isolateur doit être au minimum de classe D [49].

Les isolateurs sont constitués de parois souples ou rigides qui matérialisent une barrière physique étanche entre la préparation et le manipulateur ou l'environnement. L'isolateur est équipé d'un système de ventilation autonome, pourvu en amont et en aval de filtres HEPA ce qui permet de placer l'isolateur en surpression par rapport à l'environnement, évitant ainsi l'entrée de toute contamination en cas de rupture d'étanchéité.

Les opérations de transfert vers l'intérieur et vers l'extérieur de l'isolateur sont les principales sources potentielles de contamination microbiologique de l'enceinte. L'ensemble du matériel entrant dans l'isolateur est donc obligatoirement soumis à un cycle de stérilisation, par l'intermédiaire de sas de stérilisation ou dans l'enceinte même lorsque l'isolateur est ouvert. Cette stérilisation chimique doit être validée et peut être obtenue par un gaz stérilisant tel que l'acide peracétique ou le peroxyde d'hydrogène. La sortie du matériel, quant à elle, se fait par un système de sas dynamique ventilé en cascade de pressions positives évitant ainsi une rétro-contamination aérienne de l'isolateur, et les déchets sont évacués par des poubelles étanches stériles.

C'est ce type d'équipement qui a été choisi par l'unité de pharmacotechnie de la pharmacie à usage intérieur du CHU de Rouen, les isolateurs servant à la fabrication des poches de nutrition parentérale adultes et pédiatriques étant deux isolateurs à parois rigides (Figure 2).



**Figure 2** : Isolateur à parois rigides utilisé au CHU de Rouen

## *2.4 Personnel, entretien des locaux et contrôles environnementaux*

Si des mesures telles que la filtration de l'air ou le maintien d'un gradient de pression permettent de limiter la contamination des ZAC, la formation du personnel et l'entretien des locaux s'avèrent également indispensables.

### *2.4.1 Personnel, habillage et entretien*

La contamination particulière d'une pièce augmente considérablement en présence humaine. De ce fait, l'accès aux ZAC doit être réglementé et limité aux seules personnes autorisées. Les déplacements dans ces zones sont également maîtrisés.

Le personnel effectuant des opérations liées à la nutrition parentérale doit recevoir une formation initiale et continue adaptée à son travail et devant être régulièrement évaluée et validée. Toutes les personnes amenées à entrer dans la ZAC doivent être formées à l'hygiène des mains et revêtir une tenue professionnelle spécifique limitant la formation de

particules. Ainsi, pour une zone de classe D, les agents sont équipés de charlotte, surblouse, surchaussures et cache-barbe si nécessaire. Si la zone est de classe B, chaque opérateur doit revêtir un vêtement protecteur propre et stérile ne libérant pas de fibres ou de particules et retenant les particules émises par l'opérateur. Il doit également porter un masque évitant l'émission de gouttelettes, des gants stériles, une cagoule enfermant totalement les cheveux et des bottes stériles enserrant le bas du pantalon. Enfin, quelque soit la classe de la ZAC, maquillage, bijoux et montres-bracelets sont à exclure.

L'entretien des ZAC est essentiel au maintien d'une contamination particulaire et microbiologique conforme aux valeurs requises. Les zones doivent être nettoyées de manière approfondie conformément à une procédure validée. Cet entretien régulier comportera un bionettoyage voire, quand cela est applicable, une stérilisation (cas des isolateurs).

#### 2.4.2 Contrôles environnementaux

L'ensemble des mesures de limitation de la contamination particulaire et microbiologique doit être validé par des contrôles de la qualité de l'air, comprenant la réalisation de comptages particuliers et de prélèvements d'air et de surface au niveau de la zone de préparation et de son environnement immédiat.

Les comptages particuliers sont réalisés grâce à un compteur optique de particules capable de déterminer, en temps réel, le nombre de particules par taille dans 1 m<sup>3</sup> d'air. Il est ainsi possible de s'assurer immédiatement de la conformité des valeurs mesurées avec les valeurs recommandées en fonction de la classe de la zone prélevée.

Les prélèvements d'air sont effectués grâce à un biocollecteur qui aspire un volume d'air connu (1 m<sup>3</sup>) à travers un crible (Figure 3). L'air chargé en particules est impacté sur une gélose de 90 mm de diamètre incubée à 30°C durant 5 jours. Cette analyse détermine, selon le type de gélose utilisé, le nombre total de germes (gélose tout germe type trypticase soja) et/ou le nombre de champignons (gélose Sabouraud) par m<sup>3</sup> d'air.



**Figure 3 :** Biocollecteur utilisé pour les prélèvements microbiologiques d'air

Enfin, les prélèvements de surface sont réalisés par mise en contact d'une gélose spécifique (gélose type Count Tact® non sélective : [Figure 4](#)) offrant une surface de contact de 25 cm<sup>2</sup> avec le support ou par essuyage de la surface à l'aide d'un écouvillon humide. Géloses et écouvillons sont ensuite mis à incuber à 30°C durant 5 jours. Les écouvillons présentent l'avantage de pouvoir prélever des surfaces non planes telles que des gants ou les replis des hémi-scaphandres. En revanche, ils donnent plutôt, selon la technique utilisée, un résultat qualitatif contrairement aux géloses qui fournissent un résultat quantitatif.



**Figure 4 :** Gélose Count-Tact®

L'ensemble de ces prélèvements peut être effectué à différents moments (à distance ou non du bionettoyage, en repos ou en activité) en fonction des objectifs requis mais leur périodicité doit être définie. Des contrôles supplémentaires doivent également être mis en œuvre si besoin (en cas de travaux par exemple).

## 2.5 Contrôles microbiologiques des mélanges de nutrition parentérale

### 2.5.1 Principe général

L'essai de stérilité appliqué à la préparation terminée est considéré comme la dernière étape d'une série de contrôles permettant de garantir la stérilité. En effet, quelque soit la taille du lot, la garantie de la stérilité est assurée en amont par le respect d'un ensemble de conditions et de paramètres couvrant en particulier la qualification des installations et des équipements, la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, la validation et la maîtrise des procédés de préparation et de stérilisation, les contrôles microbiologiques et particuliers de l'environnement ainsi que la formation initiale et continue du personnel.

La 8<sup>ème</sup> édition de la Pharmacopée européenne précise les conditions d'application et de réalisation de l'essai de stérilité [50].

Ainsi, le nombre d'unités à analyser est fonction de la taille du lot de production (Tableau 10). Pour les préparations parentérales, si le lot est inférieur à 100 unités, 10 % des récipients doivent être analysés avec un minimum de quatre.

**Tableau 10 : Nombre minimal d'unités à analyser en fonction de la taille du lot**

Nombre d'unité par lot	Nombre minimal d'unités à analyser par milieu
≤ 100	10 % des récipients avec un minimum de 4
100 < nombre de récipients ≤ 500	10 récipients
> 500	2 % des récipients avec un maximum de 20 (10 dans le cas de préparations parentérales de grand volume)

Dans le cas de la NP « à la carte », il n'existe pas réellement de lot de fabrication puisque chaque poche à une formulation différente des autres. De ce fait, un lot est défini comme l'ensemble des préparations d'une journée, et les échantillons prélevés pour l'essai de stérilité doivent être représentatifs du lot.

Le volume à analyser pour le contrôle est lui aussi défini par la Pharmacopée en fonction de la taille des récipients (Tableau 11) [50]. Ainsi, pour tout récipient de volume

supérieur ou égal à 100 ml, le volume à analyser doit correspondre à 10 % du contenu du récipient sans toutefois être inférieur à 20 ml.

**Tableau 11 : Quantité minimale de préparation à analyser pour chaque milieu**

Quantité par récipient à analyser	Quantité minimale de préparation à analyser pour chaque milieu
< 1 ml	Contenu total de chaque récipient
1-40 ml	La moitié du contenu de chaque récipient mais pas moins de 1 ml
> 40 ml mais ≤ 100 ml	20 ml
> 100 ml	10 % du contenu du récipient mais pas moins de 20 ml

### 2.5.2 Mise en œuvre au CHU de Rouen

Au CHU, le contrôle de stérilité est délégué au laboratoire d'hygiène et repose sur l'analyse d'une poche pédiatrique et d'une poche adulte par jour de production soit cinq poches pédiatriques et 4 poches adultes par semaine. Ces poches sont réalisées en fin de production pour être représentative d'une éventuelle contamination du lot survenue au cours de la fabrication. Elles sont réalisées selon des formules standards définies afin d'être proches des mélanges destinées aux patients et validées comme n'ayant pas de propriétés antimicrobiennes pouvant être à l'origine de faux négatifs (Tableau 12 et Tableau 13).

**Tableau 12 : Composition des poches "hygiène" pédiatriques validées pour le contrôle de stérilité**

Elément	Quantité (en ml)
Glucose	80
Primène	100
Médialipide	34
Chlorure de sodium	2
Chlorure de potassium	4
Gluconate de calcium	6
Chlorure de magnésium	4
Phocytan	6
Cernévit	2
Oligo éléments prématurés	2
Héparine	2
Eau	8
Volume total	250

**Tableau 13 : Composition des poches "hygiène" adultes validées pour le contrôle de stérilité**

Elément	Quantité (en ml)
Glucose	300
Vintène	300
Clinoléic	250
Chlorure de sodium	10
Chlorure de potassium	10
Gluconate de calcium	10
Chlorure de magnésium	10
Phocytan	10
Cernévit	5
Eau	1095
Volume total	2000

L'essai de stérilité mis en œuvre au laboratoire repose sur le principe de filtration sur membrane et est une des techniques recommandées par la Pharmacopée [50]. Cette méthode consiste à transférer et à filtrer la solution de NP à analyser sur des membranes stériles capable de retenir les micro-organismes potentiellement présents. Ces membranes doivent avoir une porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm.

Après filtration, les membranes sont incubées pendant 14 jours en présence de milieu permettant la détection de germes aérobies (trypticase soja, TS) et anaérobies (thioglycolate résazurine, TR), à respectivement 20-25°C et 30-35°C. Les milieux sont examinés quotidiennement afin de détecter des signes macroscopiques de prolifération de micro-organismes (trouble du milieu de culture).

En pratique, au laboratoire, l'intégralité du contenu des poches pédiatriques (soit 250 ml) ou 500 ml des poches adultes est filtré grâce au système Stéritec®. Ce dispositif permet une filtration en système clos sur une membrane. Il est constitué d'une pompe péristaltique (Figure 5) qui transfère le produit à analyser dans des chambres de filtration appelées canister dont les parois sont constituées de styrène acrylonitrile et qui contiennent chacune, à leur base, une membrane de filtration de 0,45 µm en ester de cellulose (Figure 6).



**Figure 5** : Système de pompe péristaltique permettant le transfert en système clos de la solution à analyser et des différents milieux



**Figure 6 : Canister de Steritest®**

Constitué d'une membrane de filtration de porosité égale à  $0,45 \mu\text{m}$  en ester de cellulose et de parois en styrène acrylonitrile

Les membranes sont humidifiées avec du peptone sel avant filtration du liquide de NP puis, après rinçage et introduction des milieux aérobies et anaérobies, les membranes sont incubées durant 14 jours.

En pratique, cette technique s'avère coûteuse, longue et complexe à mettre en œuvre. Le laboratoire a donc souhaité développer une technique alternative de contrôle de stérilité simplifiée, moins coûteuse et surtout plus rapide notamment en terme de délai de rendu de résultats.

### **3 Tavaux personnels : validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité des mélanges de nutrition parentérale « à la carte »**

#### **3.1 Objectifs et principes**

Le laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Rouen a souhaité mettre en place une méthode alternative à la filtration sur membrane pour le contrôle de stérilité des mélanges de nutrition parentérale « à la carte » produits par l'unité de pharmacotechnie. Les recommandations de la Pharmacopée offrent, en effet, la possibilité, sous certaines conditions, d'utiliser une méthode alternative à la méthode de référence pour l'essai de stérilité [51]. Cette dernière se révèle lente, les résultats définitifs n'étant obtenus qu'après 14 jours d'incubation, et complexe à mettre en œuvre puisque 3h30 sont nécessaires à l'analyse de la production hebdomadaire de poches dédiées à l'essai. Une méthode alternative par ensemencement direct permettrait de s'affranchir de ces inconvénients en raccourcissant le délai d'incubation et de réponse ainsi qu'en simplifiant les conditions de réalisation de l'essai. Enfin, l'utilisation d'une technique alternative par ensemencement direct permettrait de réduire le budget annuel dédié aux contrôles de stérilité des poches de NP de 13 500 € par an à environ 5 600 €. La validation de l'utilisation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité reposant sur l'ensemencement direct et la détection automatisée de croissance des germes est donc l'objectif de ce travail.

Préalablement à la validation proprement dite, les conditions de mise en œuvre de la méthode alternative doivent être déterminées comme le volume à analyser ou encore la compatibilité des milieux avec les germes de référence.

Les différents paramètres de la méthode de référence et de la méthode alternative sont ensuite évalués (limite de détection, exactitude, fidélité, spécificité). Pour pouvoir être utilisée en remplacement de la méthode de référence, la méthode alternative doit être au moins équivalente en termes de limite de détection, spécificité, fidélité et exactitude.

## 3.2 *Matériel et méthode*

Toutes les expériences ont été réalisées sous hotte à flux laminaire dans des conditions d'asepsie stricte avec du matériel stérile ou préalablement désinfecté à l'alcool et manipulé avec des gants stériles.

### 3.2.1 Mélanges de nutrition parentérale analysés

En routine, une poche par type et par jour de production est fabriquée en fin de lot par la pharmacotechnie. Ce sont ces poches de composition fixe, validée et proche de celle administrée aux patients [52], qui sont considérées comme représentatives d'une éventuelle contamination du lot de fabrication et analysées par le laboratoire. Cependant, pour diverses raisons, les compositions de ces poches types ont dû être adaptées pour réaliser cette validation. Ainsi, une rupture d'approvisionnement en Phocytan® et Ionitan® a nécessité une modification des formules pédiatriques et adultes, les stocks disponibles étant réservés aux patients (Tableau 14 et Tableau 15). Dans nos conditions de test, les micro-organismes n'étaient présents que transitoirement dans la solution de nutrition parentérale. Par conséquent, aucune croissance des micro-organismes dans ce milieu n'était attendue. Nous avons donc considéré que l'absence de phosphore et de sodium induite par la rupture en Phocytan® ne devait pas modifier les résultats. De plus, les bactéries environnementales susceptibles de contaminer les mélanges de NP étant généralement peu exigeantes, l'absence de phosphore ou de sodium dans la formulation ne devrait donc pas modifier leur survie dans le mélange.

**Tableau 14 : Formulation des poches "hygiène" pédiatriques utilisées pour les tests de validation de la méthode alternative**

Elément	Quantité (en ml)
Glucose	80
Primène	100
Médialipide	34
Chlorure de sodium	2
Chlorure de potassium	4
Gluconate de calcium	6
Chlorure de magnésium	4
Cernévit	2
Oligo éléments prématurés	2
Héparine	2
Eau	14
Volume total	250

**Tableau 15 : Formulation des poches "hygiène" adultes utilisées pour les tests de validation de la méthode alternative**

Eléments	Quantité (en ml)
Glucose	100
Vintène	100
Médialipides	100
Chlorure de sodium	5
Chlorure de potassium	5
Gluconate de calcium	5
Chlorure de magnésium	5
Cernévit	5
Eau	600
Volume total	925

Par ailleurs, la composition des poches adultes a été revue et améliorée pour tenir compte des contraintes de fabrication (volumes minimums, ajustements de volumes possibles ou non).

En effet, lors de la fabrication, les volumes de certains composants des poches adultes sont mesurés visuellement grâce aux graduations présentes sur les flacons. Cette méthode impose donc des contraintes dans la formulation puisque les volumes demandés doivent

correspondre aux graduations. Ainsi, glucose et Vintène® ne peuvent être ajoutés que par 100 ml, le Médialipide® par 50 ml et le Cernévit® par flacon soit 5 ml ce qui a limité les possibilités de modifications de la formule.

### 3.2.2 Micro-organismes de référence

Afin de pouvoir réaliser les différents tests requis pour la validation, les solutés de nutrition parentérale étaient contaminés artificiellement par des concentrations variables de micro-organismes. Conformément à la Pharmacopée européenne [50, 51], les souches de référence utilisées étaient les suivantes :

- Pour les bactéries aérobies :
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
  - *Bacillus subtilis* ATCC 6633
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
  
- Pour les bactéries anaérobies :
  - *Clostridium sporogenes* ATCC 19404
  
- Pour les moisissures et levures :
  - *Candida albicans* ATCC 10231
  - *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Ces souches se présentaient sous forme de pastilles calibrées, lyophilisées et congelées à -20°C (laboratoire Bioréférence® Eurofins). Un certificat d'analyse indiquant le nombre moyen d'unités formant colonies (UFC) par pastille a été fourni pour chaque souche et chaque lot par le fabricant. Ces pastilles étaient reconstituées dans un volume précis de solution de tryptone sel stérile ce qui permettait d'obtenir une suspension calibrée de concentration connue.

Afin de limiter la consommation de pastilles de *B. subtilis*, la suspension de reconstitution en solution de tryptone sel était congelée à -80°C en bouillon BHI/glycérol

(13 % de glycérol). Sa conservation était vérifiée par étalement et dénombrement sur gélose au sang des suspensions suivantes :

- suspension en solution de tryptone sel après reconstitution de la pastille lyophilisée congelée,
- suspension en bouillon BHI/glycérol prête à congeler,
- suspension en bouillon BHI/glycérol après 5 jours de congélation à -80°C.

Afin de faciliter les expériences ultérieures, les suspensions congelées ont été calibrées à 1 UFC/10 µl. L'annexe 5 décrit les modalités de préparation des suspensions de micro-organismes.

### 3.2.3 Méthodes d'analyse

#### 3.2.3.1 Ensemencement des mélanges de nutrition parentérale

Après préparation d'inoculum calibrés, les mélanges de nutrition parentérale étaient ensemencés. Le volume à prélever pour chaque inoculum était déterminé au préalable en fonction du nombre d'UFC attendu par poche. Ce volume était prélevé à l'aide d'une pipette de précision puis ajouté dans la poche par la tubulure (Figure 7). Celle-ci était ensuite rincée trois fois avec la solution de NP contenue dans la poche puis le cône de pipette ayant servi à l'ensemencement était lui-même rincé trois fois dans la solution de nutrition. Les poches étaient ensuite homogénéisées par agitation douce durant 30 secondes puis prélevées pour analyse. En parallèle et en fin de manipulation, la calibration et la pureté de l'inoculum étaient vérifiées par ensemencement sur trois géloses au sang.

Après ensemencement, les contenus des poches étaient analysés immédiatement, soit par la méthode de référence recommandée par la Pharmacopée, soit par la méthode alternative.



Figure 7 : Site d'inoculation sur une poche de nutrition parentérale pédiatrique

### 3.2.3.2 Analyse par la méthode de référence : filtration sur membrane (système Stéritest®)

Pour la méthode de référence, le protocole utilisé au laboratoire, décrit en paragraphe 2.5.2, a été adapté pour la réalisation des tests, afin d'analyser des volumes identiques par les deux techniques, tout en se conformant aux exigences de la Pharmacopée européenne.

Ainsi, les membranes stériles contenues dans les canisters étaient humidifiées par un faible volume de solution tampon d'eau peptonée. Pour cela, environ 10 ml de solution tampon étaient aspirés puis filtrés sur chaque membrane. Quatre-vingt-dix ml de chaque poche préalablement contaminée étaient ensuite filtrés sur la membrane. L'ensemble du système était alors rincé avec environ 90 ml de solution tampon. Enfin, 100 ml de milieu TS (milieu de croissance pour germes aérobies) ou thioglycolate résazurine (milieu de croissance pour germes anaérobies), en fonction du germe introduit dans la poche, étaient aspirés dans chaque canister. Ceux-ci étaient alors fermés hermétiquement, identifiés puis mis à incuber en condition statique à 22 ou 30 °C selon le germe recherché.

Un test, c'est-à-dire l'analyse d'une poche par un canister, était considéré comme positif dès lors qu'il présentait un trouble du milieu de culture (Figure 8). Lorsqu'un canister était positif, quelques gouttes du milieu de culture étaient prélevées après agitation et ensemencées sur gélose au sang puis incubées 2 à 5 jours à 22 ou 30°C, selon le canister d'origine, afin de s'assurer de la pureté de la souche.



**Figure 8 : Aspect de canister de Stéritest® après incubation.**

À gauche, aspect d'un test positif (trouble du milieu de culture) et à droite, aspect d'un test considéré comme négatif (bouillon limpide)

### 3.2.3.3 Analyse par ensemencement direct et détection automatisée de la croissance des micro-organismes (automate BacT/Alert®)

Pour la méthode alternative, afin d'analyser le même volume qu'avec la méthode de référence, trois fois 30 ml de soluté par poche ensemencée étaient prélevés à l'aide d'une seringue stérile puis répartis dans 3 flacons d'hémoculture Biomérieux®.

Ces flacons contenaient du charbon activé et un milieu de culture, le tout placé en atmosphère aérobie ou anaérobie selon le type de germe recherché. On distinguait ainsi les flacons FA, qui contenaient 30 ml de milieu en atmosphère aérobie (bouillon aux peptones, trypticase soja supplémenté avec un milieu Brain Heart Infusion (BHI) et du charbon activé), et les flacons FN qui contenaient 40 ml de milieu en atmosphère anaérobie (même bouillon que pour les flacons FA mais atmosphère azotée). Le charbon activé était présent dans les flacons pour inactiver un éventuel antibiotique lors de prélèvements sanguins et n'était ni utile ni gênant pour nos essais.

Après ensemencement par le soluté de NP, les flacons étaient mis à incubés dans l'automate pour hémoculture BacT/Alert® à 37°C durant 5 jours au maximum, ces conditions de mise en œuvre étant déterminées par l'utilisation de l'appareil pour l'analyse des hémocultures humaines. La lecture des flacons était effectuée toutes les 10 min par l'automate. Le système se basait sur la détection de CO<sub>2</sub> qui se forme lorsque les micro-

organismes se multiplient et métabolisent les substrats présents dans le milieu. Dans ce cas, la diffusion du gaz faisait virer la couleur de la pastille située dans le fond des flacons du gris à l'orange (Figure 9) et l'automate signalait une fiole positive. Celle-ci était alors retirée de l'automate et le délai de positivité relevé.

Un test, c'est-à-dire 90 ml d'une poche analysés par trois flacons d'hémoculture, était considéré comme positif dès lors qu'une fiole sur les trois était détectée positive par l'automate et que la couleur de la pastille avait bien viré du gris-vert à l'orange. Quelques gouttes d'une des fioles positives étaient alors ensemencées sur gélose au sang et incubées 2 à 5 jours à 37°C afin de vérifier la pureté de la souche.



**Figure 9 : Flacons d'hémoculture BacT/Alert®.**

À gauche, aspect d'une pastille de détection de CO<sub>2</sub> d'un flacon négatif, à droite, aspect orangé de la pastille de détection de CO<sub>2</sub> d'un flacon détecté positif par l'automate

### 3.2.4 Principes de validation selon la Pharmacopée européenne

Avant de pouvoir utiliser une méthode alternative en remplacement de la méthode de référence, la Pharmacopée européenne, dans la monographie 5.1.6 [51], décrit plusieurs paramètres à déterminer afin de valider ses performances.

Par ailleurs, elle précise que lorsque l'emploi d'un équipement est crucial pour l'application d'une méthode alternative, celui-ci doit faire l'objet d'une qualification complète, à savoir une qualification de conception et d'installation ainsi qu'une qualification opérationnelle et de performance. Dans notre cas, ces aspects sont convenablement couverts par la démarche d'accréditation du pôle de biologie par le Comité français d'accréditation (Cofrac) et notamment par le dossier de validation de l'utilisation

de l'automate BacT/Alert® pour la détection automatisée de germes réalisé par le laboratoire de microbiologie. C'est pourquoi ils ne seront pas développés ici.

#### 3.2.4.1 Mise au point de la méthode alternative

La Pharmacopée européenne n'imposait pas les tests décrits ici mais ils se sont avérés nécessaires à la réalisation des essais ultérieurs.

Ainsi, il a fallu s'assurer, dans un premier temps, de la stérilité des milieux utilisés à partir de certificats émanant du fabricant. De plus, l'aspect des milieux était vérifié avant chaque utilisation afin de s'assurer de l'absence de trouble, généralement synonyme de contamination.

De plus, des tests de fertilité sur les flacons d'hémoculture FA et FN étaient également à réaliser. Pour cela, un faible inoculum compris entre 10 et 100 UFC de chacune des six souches de références était introduit dans une fiole d'hémoculture correspondant aux conditions métaboliques requises par le germe. Les six flacons ainsi obtenus étaient alors mis à incuber dans l'automate à 37°C durant 5 jours au maximum. L'inoculum était vérifié en parallèle, par dénombrement sur gélose au sang. Les milieux convenaient si une croissance était détectée par l'automate. Cet essai permettait également de vérifier le critère de spécificité de la méthode à savoir sa capacité à détecter la gamme voulue de micro-organismes potentiellement présents dans les échantillons examinés.

Enfin, un test de faisabilité servant à déterminer le volume optimal de solution de NP à introduire dans chaque fiole était à réaliser. Dans un premier temps, 30 ml de soluté de NP pédiatrique, adulte ou de tryptone sel étaient introduits dans des flacons FA et FN afin de s'assurer de l'absence de faux positifs. Ces mêmes solutés étaient analysés, en parallèle, par la méthode Stérite® afin de s'assurer de leur stérilité. Puis, 15 ou 30 ml de solution de NP pédiatrique ou adulte étaient injectés dans des flacons FA en présence d'un inoculum de *Candida albicans*. L'objectif était alors de déterminer si le volume de soluté de NP influait sur la croissance de ce germe. *C. albicans* a été choisi en raison des difficultés de croissance qu'il présentait dans les conditions d'incubation imposées. L'ensemble de ces fioles était ensuite incubé durant 5 jours à 37°C.

### 3.2.4.2 Limite de détection

La limite de détection d'une méthode qualitative alternative est définie, par la Pharmacopée européenne, comme le plus petit nombre de micro-organismes pouvant être détecté dans un échantillon dans les conditions de l'essai. En microbiologie, un essai limite sert à déterminer la présence ou l'absence de micro-organismes et la limite de détection se réfère au nombre de micro-organismes présents dans l'échantillon initial avant toute dilution ou incubation, et non au nombre de micro-organismes présents au moment de l'essai.

En pratique, elle peut être déterminée par le plus petit inoculum d'un micro-organisme pouvant être détecté par la méthode alternative, sans faux négatifs.

Pour cela, il faudrait réaliser plusieurs inoculums de chacun des six micro-organismes de référence voisins de 5 UFC/inoculum et réaliser ensuite pour chacun d'entre-eux au moins cinq réplicats ; ceci pour chaque méthode dans le cadre de cette étude. Ce test n'a donc pas pu être réalisé dans son intégralité pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, à raison d'une poche par réplicat, de cinq réplicats pour chaque inoculum testé et de six souches à tester, il aurait fallu, en se limitant à trois tailles d'inoculum, 90 poches pédiatriques et 90 poches adultes ; ces chiffres pouvant encore augmenter si les inoculums testés n'approchaient pas suffisamment la limite de détection et que les essais étaient à réitérer. Ces quantités représentant une à deux semaines complètes de travail pour la pharmacotechnie ; il semblait difficile d'ajouter cette charge supplémentaire de travail à l'unité.

De plus, en comptant trois flacons par essai, 540 flacons BacT/Alert® auraient été nécessaires pour déterminer la limite de détection de la méthode alternative pour les poches de NP adultes et pédiatriques. À l'heure où nous réalisions nos tests, les flacons BacT/Alert® étaient en rupture fabricant au niveau mondial et il n'existait pas d'alternative utilisable dans l'automate. Il était donc impossible d'obtenir 540 fioles quand celles-ci manquaient pour la réalisation d'hémocultures chez les patients.

Enfin, le nombre de places disponibles dans l'automate était limité, en raison de l'occupation prioritaire de l'appareil par les hémocultures patients.

Un compromis a donc été fait. En pratique, pour chaque méthode, la limite de détection était déterminée en réalisant six séries indépendantes de pochesensemencées par

trois concentrations différentes de *B. subtilis*. Pour chaque méthode, la limite de détection correspondait au plus petit inoculum pour lequel un résultat positif était obtenu dans les 6 séries. La méthode alternative devait présenter une limite de détection égale ou inférieure à celle de la méthode de référence pour pouvoir être validée.

#### 3.2.4.3 Exactitude

L'exactitude de la méthode alternative est exprimée en termes de proportions relatives de faux négatifs obtenus avec cette nouvelle méthode, par rapport à la méthode de référence, lorsqu'un inoculum normalisé de faible concentration est utilisé.

En pratique, il était possible de se baser sur les essais réalisés pour établir la limite de détection; celle-ci correspondant par définition à 0 % de faux négatifs. Le pourcentage de faux négatifs était ensuite calculé pour chaque méthode sur les deux concentrations immédiatement inférieures à la limite de détection. La méthode alternative devait présenter un pourcentage de faux négatifs, pour chacune de ces concentrations, inférieur ou égal à celui obtenu avec la méthode de référence.

Les essais pour la détermination de la limite de détection des méthodes n'étant réalisés que sur *B. subtilis*, seuls les résultats obtenus pour ce germe étaient utilisés pour déterminer l'exactitude des 2 méthodes.

#### 3.2.4.4 Fidélité

La fidélité d'une méthode alternative est exprimée en termes de proportions relatives de résultats positifs obtenus avec cette méthode, par rapport à la méthode de référence, lorsqu'un inoculum normalisé de faible concentration est utilisé. Dans notre cas, il était à nouveau possible de se baser sur la limite de détection établie précédemment.

Les deux méthodes étaient considérées comme équivalentes si, pour chaque micro-organisme, et pour un inoculum considéré comme voisin de la limite de détection, le pourcentage de résultats positifs obtenu pour la méthode alternative était de 100 % et supérieur ou égal à celui obtenu avec la méthode de référence.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Micro-organismes de référence

L'utilisation de pastilles lyophilisées congelées de souches autres que *B. subtilis* étant limitée, il ne s'est pas avéré nécessaire de conserver les suspensions réalisées pour les autres micro-organismes de référence.

Pour *B. subtilis*, après reconstitution dans une solution de tryptone sel, la suspension bactérienne obtenue a été congelée en bouillon BHI/glycérol. Afin de s'assurer de la bonne conservation de la suspension congelée dans ce milieu, un étalement puis un dénombrement sur gélose au sang des différentes suspensions ont été réalisés. Les tableaux 16, 17 et 18 résument les résultats obtenus. Les dénombrements sur géloses permettaient, en fonction du volume étalé par gélose, de calculer une concentration moyenne observée pour chaque suspension testée, celle-ci étant ensuite comparée à la concentration théorique connue de la suspension.

**Tableau 16** : Dénombrement par étalement sur gélose au sang de 80 µl de suspension bactérienne de *Bacillus subtilis* en tryptone sel avant dilution en milieu BHI/glycérol

	Nombre d'UFC/80 µl
Gélose n°1 (nombre d'UFC)	348
Gélose n°2 (nombre d'UFC)	356
Gélose n°3 (nombre d'UFC)	284
Nombre moyen d'UFC/gélose	329,3
Concentration moyenne observée (UFC/µl)	4,1
Concentration attendue (UFC/µl)	4

**Tableau 17** : Dénombrement par étalement sur gélose au sang de 240 µl de suspension de *Bacillus subtilis* en milieu BHI/glycérol avant congélation

	Nombre d'UFC
Gélose n°1 (nombre d'UFC/240 µl)	36
Gélose n°2 (nombre d'UFC/240 µl)	19
Gélose n°3 (nombre d'UFC/240 µl)	10
Nombre moyen d'UFC/gélose	21,7
Concentration moyenne observée (UFC/µl)	0,09
Concentration attendue (UFC/µl)	0,1

**Tableau 18** : Dénombrement par étalement sur gélose au sang de 240 µl de suspension de *Bacillus subtilis* en milieu BHI/glycérol après 5 jours de congélation à -80°C

	Nombre d'UFC
Gélose n°1 (nombre d'UFC/240 µl)	19
Gélose n°2 (nombre d'UFC/240 µl)	28
Gélose n°3 (nombre d'UFC/240 µl)	19
Nombre moyen d'UFC/gélose	22
Concentration moyenne observée (UFC/µl)	0,09
Concentration attendue (UFC/µl)	0,1

Les concentrations calculées après dénombrement, avant et après congélation, correspondaient aux concentrations théoriques attendues. Les suspensions bactériennes congelées de *B. subtilis* à -80°C, réalisées à partir de pastilles calibrées, pouvaient donc être utilisées pour la suite de nos essais.

### 3.3.2 Mise au point de la méthode alternative

Des tests préliminaires ont été menés afin de définir les conditions de réalisation de la méthode alternative.

Tout d'abord, les certificats garantissant la stérilité des milieux ont été obtenus et la limpidité de ces derniers était vérifiée avant chaque essai.

Ensuite, un essai de fertilité des milieux a été réalisé. Les résultats obtenus sont résumés dans le [Tableau 19](#).

**Tableau 19 : Résultats de l'essai de fertilité des milieux pour la méthode alternative**

Milieu utilisé (selon les recommandations de la Pharmacopée)	Germe	Nombre d'UFC/gélose (200 µl/gélose)	Nombre moyen d'UFC/gélose	Volume ensemencé par fiole (en µl)	Nombre d'UFC/fiole	Délai de positivité (en heure)
FA	<i>B. subtilis</i>	14 15 18	16	400	31	11,4
FA	<i>A. brasiliensis</i>	13 13 13	13	1000	65	44,1
FA	<i>C. albicans</i>	99 70 96	88	200	88	40,9
FN	<i>S. aureus</i>	69 74 86	76	200	76	16,6
FN	<i>C. sporogenes</i>	28 33 Non dénombrable	31	300	46	17,7
FN	<i>P. aeruginosa</i>	3 3 4	3	4000	67	Négatif

Pour tous les germes, l'inoculum était bien compris entre 10 et 100 UFC par fiole. De plus, pour *B. subtilis*, *A. brasiliensis*, *C. albicans*, *S. aureus* et *C. sporogenes*, une croissance a été détectée par l'automate dans les délais validés par le fabricant. En revanche, aucune croissance n'a été observée en 5 jours pour *P. aeruginosa*. La Pharmacopée recommandait d'utiliser un milieu anaérobie pour sa détection par la méthode de référence. Ceci n'a pas semblé pas s'appliquer pour la méthode BacT/Alert®. Le test a été réitéré avec un milieu aérobie (fiole FA). Une croissance a alors été détectée par l'automate dans les délais attendus (cf. [Tableau 20](#)). Les témoins négatifs réalisés en parallèle étaient toujours négatifs après le délai de 5 jours d'incubation.

**Tableau 20** : Résultats de l'essai de fertilité pour *Pseudomonas aeruginosa* en flacon FA pour la méthode alternative

Milieu utilisé	Germe	Nombre d'UFC/gélose (200 µl/gélose)	Nombre moyen d'UFC/gélose	Volumeensemencé par fiole (en µl)	Nombre d'UFC/fiole	Délai de positivité (en heure)
FA	<i>P. aeruginosa</i>	9 7 10	9	2000	88	17,1

Il a donc été nécessaire, pour la réalisation des essais, d'utiliser des flacons FA contenant un milieu de croissance pour germes aérobies pour *B. subtilis*, *A. brasiliensis*, *C. albicans* et *P. aeruginosa* contrairement à *C. sporogenes* et *S. aureus* pour lesquels des flacons FN contenant un milieu favorable à la croissance de germes anaérobies étaient requis.

De plus, l'automate a été en mesure de détecter l'ensemble des micro-organismes de références présents en faible inoculum ce qui a permis de s'assurer de la spécificité de la méthode.

Enfin, l'essai de fertilité était complété par le test de faisabilité. Les résultats des analyses effectuées pour s'assurer de l'absence d'interférences liées à la composition et au volume d'échantillon analysés sont présentés dans les [tableaux 21](#) et [22](#).

**Tableau 21** : Test de faisabilité : recherche d'interférences induites par les solutés de nutrition parentérale

Milieu	Soluté de NP pédiatrique (30 ml par milieu)	Soluté de NP adulte (30 ml par milieu)
FA	Négatif à 5 jours	Négatif à 5 jours
FN	Négatif à 5 jours	Négatif à 5 jours

Le [Tableau 21](#) met en évidence l'absence de faux positifs susceptibles d'être induits par la complexité des mélanges et ceci pour les 2 types de composition (adulte et pédiatrique) soumis à l'essai.

Le [Tableau 22](#) quant à lui, indique des délais de réponses positive compatibles avec les conditions de mise en œuvre de la méthode (5 jours, 37°C) pour chaque type de composition et quelque soit le volume introduit dans les fioles (15 ou 30 ml).

**Tableau 22 : Test de faisabilité : recherche d'interférences entre les solutés de nutrition parentérale et la croissance de *Candida albicans* (inoculum d'environ 15 UFC/fiole)**

Volume de soluté ajouté par fiole (en ml)	Délai de positivité avec du soluté de NP pédiatrique (en heures)	Délai de positivité avec du soluté de NP adulte (en heures)
15	37,6	46,1
30	39,3	43,2

Compte-tenu des résultats obtenus lors de ces essais préliminaires, il était possible d'envisager la réalisation du contrôle de stérilité des poches de NP par la méthode alternative en analysant 30 ml par flacon et trois flacons par type de milieu (FA ou FN) et par poche.

Il convenait alors de s'assurer que la méthode alternative était au moins équivalente à la méthode de référence en terme de limite de détection, exactitude et fidélité.

### 3.3.3 Limite de détection

Dans un premier temps, la limite de détection a été déterminée pour la méthode de référence sur les poches de NP pédiatriques. Trois concentrations de *B. subtilis* ont été testées jusqu'à constater l'absence de faux négatifs ([Tableau 23](#)). Les inoculums étaient vérifiés en parallèle par étalement et dénombrement du nombre d'UFC sur trois géloses au sang.

**Tableau 23 : Détermination de la limite de détection de *Bacillus subtilis* par la méthode de référence (mélanges pédiatriques)**

Inoculum théorique (en UFC/ poche de 250 ml)	Dénombrement sur gélose au sang (nombre moyen d'UFC/inoculum)	Nombre de tests positifs	Nombre de tests négatifs
10 UFC/poche	10	4	2
20 UFC/poche	21	5	1
30 UFC/poche	26	6	0

La limite de détection correspondait à la concentration minimale nécessaire pour ne pas observer de faux négatifs. Des faux négatifs étaient observés pour des concentrations de 10 et 20 UFC/poche de 250 ml. En revanche, tous les tests étaient positifs à partir de 30 UFC/poche de 250 ml. La limite de détection de la méthode de référence pour *B. subtilis* en poche pédiatrique se situait donc à environ 30 UFC/poche de 250 ml.

Des poches pédiatriques ont ensuite étéensemencées avec un inoculum calibré à 30 UFC environ puis analysées par la méthode alternative. Il a été fait de même avec des inoculums à 10 et 20 UFC/poche. Les résultats sont présentés en [Tableau 24](#).

**Tableau 24 : Détermination de la limite de détection de *Bacillus subtilis* par la méthode alternative (mélange pédiatriques)**

Inoculum théorique (en UFC/ poche de 250 ml)	Dénombrement sur gélose au sang (nombre moyen d'UFC/inoculum)	Nombre de tests positifs	Nombre de tests négatifs
10 UFC/poche	8	5	1
20 UFC/poche	20	6	0
30 UFC/poche	26	6	0

Aucun faux négatif n'était observé pour un inoculum d'environ 20 UFC/poche de 250 ml. La limite de détection de *B. subtilis* pour la méthode alternative se situait donc à environ 20 UFC/poche de 250 ml.

La limite de détection de la méthode de référence étant d'environ 30 UFC/poche de 250 ml pour les poches de NP pédiatrique, la limite de détection de la méthode alternative était donc au moins équivalente à la limite de détection de la méthode de référence.

Ces tests ont également été réalisés pour les poches adultes. La détermination des inoculums à tester s’est basée sur les résultats obtenus pour les poches pédiatriques. Ainsi 10 UFC/poche de 250 ml devenait 37 UFC/poche de 925 ml, 20 UFC/poche de 250 ml devenait 74 UFC/poche de 925 ml et 30 UFC/poche de 250 ml devenait 111 UFC/poche de 925 ml. Afin de s’approcher au plus près de la limite de détection, il a été choisi de tester également un inoculum de 56 UFC/poche de 925 ml. Les résultats obtenus sont résumés dans le [Tableau 25](#).

**Tableau 25** : Evaluation de la limite de détection de la méthode de référence de *Bacillus subtilis* pour les mélanges de nutrition parentérale adulte

Inoculum théorique (en UFC/ poche de 925 ml)	Dénombrement sur gélose au sang (nombre moyen d’UFC/inoculum)	Nombre de canisters positifs	Nombre de canisters négatifs
37	30	5	1
56	45	5	1
74	72	6	0
111	116	6	0

Des faux négatifs étaient constatés jusqu’à 56 UFC/ poche de 925 ml. A partir de 74 UFC/ poche de 925 ml, l’ensemble des tests se révélait positif. La limite de détection de *B. subtilis*, pour la méthode de référence, se situait donc à environ 74 UFC/poche de 925 ml. En raison de difficultés d’approvisionnement en flacons BacT/Alert®, seul cet inoculum a été testé pour la méthode alternative. Six séries de poches indépendantes ont ainsi été analysées et tous les tests se sont avérés positifs (cf. annexe 8). La limite de détection de la méthode alternative était donc au moins équivalente à celle de la méthode de référence. De plus, elle était proche de la limite de détection observée pour les poches pédiatriques.

### 3.3.4 Exactitude

L'exactitude d'une méthode était évaluée par le pourcentage de faux négatifs observé pour les 2 à 3 concentrations immédiatement inférieures à la limite de détection. Les expériences réalisées pour la détermination de la limite de détection de *B. subtilis* permettaient d'évaluer l'exactitude de la méthode de référence pour ce même germe.

Pour les poches pédiatriques, le [Tableau 26](#) indique le pourcentage de faux négatifs calculés pour la méthode de référence.

**Tableau 26 : Evaluation de l'exactitude de la méthode de référence pour *Bacillus subtilis* pour mélange de nutrition parentérale pédiatrique**

Inoculum théorique (en UFC/ poche de 250 ml)	Dénombrement sur gélose au sang (nombre moyen d'UFC/inoculum)	Nombre de tests positifs	Nombre de tests négatifs	Pourcentage de faux négatifs
5	5	3	3	50
10	10	4	2	33,3
20	21	5	1	16,7

Les mêmes inoculum ont été testés par la méthode alternative. Les résultats détaillés sont donnés en annexes 6, 7 et 8. Le [Tableau 27](#) résume les résultats obtenus.

**Tableau 27 : Evaluation de l'exactitude de la méthode alternative pour *Bacillus subtilis* pour mélange de nutrition parentérale pédiatrique**

Inoculum théorique (en UFC/ poche de 250 ml)	Dénombrement sur gélose au sang (nombre moyen d'UFC/inoculum)	Nombre de tests positifs	Nombre de tests négatifs	Pourcentage de faux négatifs
5	4	5	1	16,7
10	8	5	1	16,7
20	20	6	0	0

Ainsi, dans le cas de la composition de nutrition parentérale pédiatrique, pour les deux concentrations immédiatement inférieures à la limite de détection, les pourcentages de faux négatifs obtenus pour la méthode alternative étaient inférieurs à ceux obtenus avec la méthode de référence. Les deux méthodes étaient donc au moins équivalentes en matière d'exactitude sur ce type de formulation.

Pour les poches de nutrition parentérale adulte, le [Tableau 28](#) indique les résultats obtenus pour la méthode de référence.

**Tableau 28** : Evaluation de l'exactitude de la méthode de référence pour *Bacillus subtilis* pour les mélange de nutrition parentérale adulte

Inoculum théorique (en UFC/poche de 925 ml)	Dénombrement sur gélose au sang (nombre moyen d'UFC/l)	Nombre de tests positifs	Nombre de tests négatifs	Pourcentage de faux négatifs
19	15	5	1	16,7
37	30	5	1	16,7
56	45	5	1	16,7
74	72	6	0	0

En raison de difficultés d'approvisionnement en fioles BacT/Alert®, ces mêmes concentrations en *B. subtilis* pour les mélanges adultes n'ont pas pu être testées au cours de notre étude. Ces tests seraient donc à réaliser ultérieurement pour compléter l'étude comparative entre les 2 méthodes dans le cas des compositions adultes.

### 3.3.5 Fidélité

La fidélité évalue la capacité d'une méthode à détecter différents micro-organismes présents à des concentrations proches de la limite de détection.

Pour les poches pédiatriques, les six souches de la Pharmacopée européenne ont été testées. Pour chaque souche et chaque méthode, trois poches ont été analysées. Les résultats obtenus sont résumés dans le [Tableau 29](#).

Inoculum théorique	Méthode	<i>B. subtilis</i>		<i>A. brasiliensis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. sporogenes</i>	
		Dénombrement de l'inoculum (UFC/250 ml)	Résultats	Dénombrement de l'inoculum (UFC/250ml)	Résultats								
30 UFC/ poche de 250 ml	Stéritest®	26	6 tests+ 0 test -	26	3 tests + 0 test -	17	3 tests + 0 test -	18	3 tests + 0 test -	21	3 tests + 0 test -	38	3 tests + 0 test -
	BacT/Alert®	26	6 tests + 0 test -	26	3 tests + 0 test -	12	3 tests + 0 test -	15	3 tests + 0 test -	38	3 tests + 0 test -	35	3 tests + 0 test -

**Tableau 29** : Évaluation de la fidélité des méthodes de référence et alternative pour les six souches recommandées par la Pharmacopée (en mélange de nutrition parentérale pédiatrique)

En se plaçant, pour les poches pédiatriques, à 30 UFC/poche de 250 ml (inoculum proche de la limite de détection), le pourcentage de résultats positifs obtenu pour la méthode alternative, pour chaque souche testée, était de 100% et égal à celui obtenu pour la méthode de référence.

Les 2 méthodes étaient donc équivalentes en termes de fidélité pour la composition pédiatrique.

Les différentes souches n'ont pas pu être testées pour les poches de NP adulte en raison de difficultés à obtenir des flacons BacT/Alert®. Ces expériences seraient donc également à réaliser lorsque les flacons BacT/Alert® seront à nouveau disponibles afin de valider cette étude comparative pour la composition adulte.

## 4 Discussion

La nutrition parentérale est une technique de soins qui a prouvé son utilité et son efficacité tout au long des années. Cependant, comme tout traitement, elle présente des risques de complications notamment infectieuses. La maîtrise de ces risques passe, entre autres, par l'application de recommandations spécifiques à la NP émises par différentes sociétés savantes ou agences nationales, de la fabrication à la perfusion au patient. Les bonnes pratiques de préparation imposent ainsi un contrôle de stérilité des solutés de nutrition parentérale ; celui-ci pouvant être réalisé par différentes techniques.

Une des méthodes de référence selon la Pharmacopée repose sur la filtration des solutés de nutrition parentérale sur membrane. Cette technique s'avère fiable mais impose un délai de réponse de 14 jours. De plus, elle se révèle longue et complexe à réaliser et présente un coût non négligeable de l'ordre de 30 euros par analyse. D'autres méthodes également admises par la Pharmacopée existent, comme, par exemple, l'ensemencement direct des solutés de nutrition parentérale en milieu de culture. Dans ces conditions, il semble envisageable de recourir à des techniques automatisées de détection de croissance de micro-organismes type BacT/Alert® (laboratoire Biomérieux®). Cette technique semble plus rapide, plus simple et moins coûteuse. Cependant, peu de littérature confirme l'utilisation de ce type d'automate pour la réalisation de tests de stérilité sur des solutés de NP ; les articles disponibles décrivant plus généralement le contrôle des produits de biothérapie. Or, les volumes analysés et la présence d'émulsions lipidiques dans les mélanges de nutrition parentérale sont autant de différences avec les produits de biothérapies susceptibles de rendre impossible l'utilisation de l'automate pour cette analyse. Deux travaux de thèse [53, 54] ont proposé une validation de ce type de méthode alternative mais pour des poches adultes et sans se conformer totalement aux conditions requises par la Pharmacopée européenne pour la validation. Le travail présenté ici s'inscrit donc dans cette démarche en proposant la validation, selon les critères de la Pharmacopée européenne 8<sup>ème</sup> édition, de méthode alternative pour le contrôle de stérilité des solutés de nutrition parentérale produits par l'unité de pharmacotechnie du CHU de Rouen.

Au cours de ce travail de validation il a fallu, dans un premier temps, caractériser la méthode de référence selon un certain nombre de critères définis par la Pharmacopée (limite de détection, exactitude, fidélité), puis faire de même pour la méthode alternative utilisant l'automate BacT/Alert® afin de comparer les performances des deux techniques et de valider, le cas échéant, l'utilisation en routine de la méthode alternative au sein du laboratoire.

Ainsi, pour les compositions pédiatriques, la limite de détection observée pour *B. subtilis* se situait à environ 30 UFC/ poche de 250 ml soit environ 0,12 UFC/ml pour la méthode de référence et à 20 UFC/ poche de 250 ml soit 0,08 UFC/ ml de soluté pour la méthode alternative. Les limites de détection de *B. subtilis* des 2 méthodes étaient donc similaires.

En pratique, peu de cas d'infections de patients dues à un soluté de NP contaminé ont été décrits. La dernière contamination décrite en France s'est déroulée à l'hôpital de Chambéry en décembre 2013. Dans le cadre des investigations menées par l'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM) , les analyses de poches du même lot de fabrication qui ont été réalisées ont retrouvé des contaminations de l'ordre de  $10^6$  bacilles gram négatif/ml de soluté [55]. Au regard de ces chiffres, les limites de détection des méthodes étudiées dans ce travail s'avèrent donc suffisantes pour détecter une contamination de cet ordre.

En revanche, les contrôles de stérilité réalisés en routine par le fabricant sur les poches produites n'avaient rien révélés. Ceci soulève notamment le problème de l'exactitude des méthodes. On peut alors se demander si les pourcentages de faux négatifs observés dans cette étude pourraient avoir des conséquences cliniques. Nous avons montré que la méthode alternative présentait des pourcentages de faux négatifs inférieurs à ceux obtenus pour la méthode de référence et ce pour des concentrations en *B. subtilis* inférieures à la limite de détection. Ces résultats valident partiellement l'utilisation de la méthode alternative à la place de la méthode de référence mais impliquent de ne pas pouvoir détecter de très faibles contaminations des mélanges et ceci quelque soit le type de méthode utilisée. Or, en cas de défaillance des mesures de prévention lors de la fabrication, il est tout à fait possible d'envisager une contamination environnementale, de l'ordre de 1 à 30 UFC par poche, qui ne serait pas forcément retrouvée lors de l'essai de stérilité. La dose infectante par voie intraveineuse pour les germes étudiés n'est pas connue mais elle est sans

doute très faible, ce qui laisse présager de possibles conséquences cliniques. De plus, même si les poches fabriquées sont stockées au réfrigérateur après leur production, ce qui permet de ralentir la prolifération de certains micro-organismes, elles sont remises à température ambiante avant perfusion. Ces conditions de conservation pourraient donc permettre à un germe capable de résister au froid et présent initialement en très petite quantité, donc non détecté par les contrôles, de se multiplier durant la perfusion et être responsable de bactériémie voir de choc septique chez le patient.

Par ailleurs, l'analyse des poches possiblement contaminées dans l'affaire de l'hôpital de Chambéry a montré la présence d'un bacille gram négatif non identifié jusqu'alors et proche de deux entérobactéries environnementales – *Ewingella americana* et *Rahnella aquatilis* – toutes deux susceptibles de se multiplier à + 4°C puis de provoquer une infection chez l'homme [56-58]. Les poches de NP adulte produites au CHU étant conservées à +4°C chez les patients, jusqu'à 14 jours après leur fabrication, une contamination de ces poches par ce type de germe pourrait s'avérer dangereuse pour les patients. Lors de nos essais de spécificité, les six souches recommandées par la Pharmacopée européenne ont bien été détectées par les deux méthodes à des concentrations proches de leur limite de détection, seulement aucune d'entre-elles n'est psychrotrophe. Ainsi, bien que ces germes soient représentatifs des contaminations environnementales habituelles, il pourrait être pertinent de vérifier l'aptitude de ces techniques à détecter des micro-organismes, d'origine environnementale, capables de se multiplier lors du stockage des poches de nutrition parentérale au réfrigérateur.

A l'inverse, certains germes peuvent ne pas survivre à un passage prolongé au froid or, à l'heure actuelle, les poches de NP réalisées pour les essais de stérilité sont conservées entre un et dix jours au réfrigérateur avant analyse. Les deux méthodes de contrôle de stérilité reposant toutes les deux sur la détection d'une croissance d'un micro-organisme, des résultats faussement négatifs sont possibles, même si cela semble peu probable compte-tenu de résultats obtenus lors de précédents travaux [52]. Cependant, le risque pour le patient n'est pas nul. En effet, outre le risque infectieux, une contamination par un germe à gram négatif peut s'accompagner de la production d'endotoxines susceptibles d'entraîner un choc septique chez le patient en cas de contamination massive. Ce mécanisme ne nécessite pas que les bactéries contaminantes soient viables et peut ainsi ne pas être détecté lors des contrôles de stérilité. Il serait nécessaire, pour cela, de réaliser une recherche

d'endotoxines sur les poches, ce test n'étant pas réalisé à l'heure actuelle, du fait du caractère stérile et apyrogène des matières premières utilisées.

Au final, il apparaît que les deux méthodes caractérisées au cours de cette étude présentent des limites équivalentes relativement aux critères étudiés. En revanche, la méthode alternative s'avère plus rapide à mettre en œuvre. Il faut ainsi environ 1h30 pour analyser 9 poches par cette méthode contre 3h30 par la méthode de référence. La méthode alternative présente également l'avantage de ramener le délai de rendu de résultats à 5 jours au lieu de 14 avec une simplicité de mise en œuvre permettant d'envisager une analyse quotidienne des poches fabriquées et ainsi une plus grande réactivité en cas de contamination. Enfin, la méthode alternative représente une économie importante par rapport à la méthode de référence, le budget annuel des analyses passant de 13 500 euros à l'heure actuelle à 5 600 euros si l'ensemble des poches est analysé par la méthode alternative.

Tous ces avantages plaident en faveur du remplacement de la méthode de référence par la méthode alternative. Cependant, la validation de la méthode alternative pour les poches de nutrition parentérale adulte reste à compléter.

## 5 Conclusion et perspectives

Alimenter un malade par voie parentérale est une technique à risque et les complications, qu'elles soient d'ordre mécanique, métabolique ou septique, sont nombreuses.

Le pharmacien hospitalier est responsable de la délivrance des mélanges nutritifs et peut, dans certains cas particuliers, être amené à fabriquer les mélanges sous forme de préparations magistrales au sein de l'unité de pharmacotechnie dont il est responsable. Il doit alors garantir que les mélanges produits répondent aux critères des médicaments stériles injectables et pour cela mettre en place un ensemble de mesures préventives ; l'ensemble du processus de fabrication étant validé par, entre autres, un essai de stérilité réalisé sur un échantillon du lot de fabrication.

Au laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Rouen, l'essai de stérilité mis en œuvre est réalisé par la méthode de référence selon la Pharmacopée européenne. Cette technique se révèle coûteuse et longue, en termes de réalisation et de rendu de résultats, ce qui permet rarement la mise en œuvre d'une action corrective rapide.

Notre étude comparative a permis de montrer que les méthodes recourant au système Stéritest® d'une part, et à l'automate BacT/Alert® d'autre part, sont deux techniques de contrôle microbiologique aux performances équivalentes pour les poches pédiatriques. La réalisation de l'essai de stérilité par la méthode alternative (BacT/Alert®) apparaît donc envisageable pour le contrôle des poches de nutrition parentérale pédiatrique ; cette méthode présentant l'avantage d'être simple et rapide à mettre en œuvre puisque reposant sur une technique d'ensemencement direct. De plus, en ramenant le délai de rendu de résultat à cinq jours au lieu de 14 jours, elle ouvre la possibilité d'une action corrective plus précoce en cas d'anomalie.

Pour finaliser ce projet, il apparaît nécessaire de poursuivre la validation de la méthode alternative (BacT/Alert®) pour les poches adultes afin, de pouvoir analyser à

terme toutes les poches produites selon les mêmes modalités. De plus et afin d'augmenter la représentativité des résultats obtenus, il peut être intéressant de compléter les tests déjà réalisés pour les formulations adulte et pédiatrique afin de pouvoir réaliser une exploitation statistique approfondie des résultats.

Néanmoins, comme nous l'a montré la rupture en milieux de cultures BacT/Alert® tout au long de cette étude, il semble prudent de conserver la possibilité d'effectuer les contrôles par la méthode de référence.

Enfin, même si la Pharmacopée ne l'impose pas, l'actualité pourrait inciter à effectuer des tests complémentaires afin de vérifier la capacité des deux méthodes à détecter des germes environnementaux susceptibles de se multiplier à + 4°C et de provoquer une infection chez l'homme.

## **Bibliographie**

1. McGuire W., Henderson G., and Fowle P.W. (2004) Feeding the preterm infant. Vol. 329.
2. William W.H. (2008) Strategies for Feeding the Preterm Infant. *Neonatology*, Vol. 94.
3. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
4. Dall'Osto H., Simard M., Delmont N., Mann G., Hermitte M., Cabrit R., *et al* (2005) Nutrition parentérale : indications, modalités et complications. *EMC - Hépto-Gastroenterologie*, Vol. 2.
5. Correia M.I., Caiaffa W.T., Da Silva A.L., and Waitzberg D.L. (2001) Risk factors for malnutrition in patients undergoing gastroenterological and hernia surgery: an analysis of 374 patients. *Nutr Hosp*, Vol. 16.
6. Evans D.C., Martindale R.G., Kiraly L.N., and Jones C.M. (2014) Nutrition optimization prior to surgery. *Nutr Clin Pract*, Vol. 29.
7. Sandstrom R., Drott C., Hyltander A., Arfvidsson B., Schersten T., Wickstrom I., *et al* (1993) The effect of postoperative intravenous feeding (TPN) on outcome following major surgery evaluated in a randomized study. *Ann Surg*, Vol. 217.
8. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): energy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
9. Staun M., Pironi L., Bozzetti F., Baxter J., Forbes A., Joly F., *et al* (2009) ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: home parenteral nutrition (HPN) in adult patients. *Clin Nutr*, Vol. 28.
10. Résumé des caractéristiques de produit : Glucose 15% injectable
11. Cies J.J. and Moore W.S. (2014) Neonatal and pediatric peripheral parenteral nutrition: what is a safe osmolarity? *Nutr Clin Pract*, Vol. 29.

12. Pittiruti M., Hamilton H., Biffi R., MacFie J., and Pertkiewicz M. (2009) ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: central venous catheters (access, care, diagnosis and therapy of complications). *Clin Nutr*, Vol. 28.
13. Isaacs J.W., Millikan W.J., Stackhouse J., Hersh T., and Rudman D. (1977) Parenteral nutrition of adults with a 900 milliosmolar solution via peripheral veins. *Am J Clin Nutr*, Vol. 30.
14. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): carbohydrates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
15. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): lipids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
16. Résumé des caractéristiques de produit : Clinoléic®.
17. Chambrier C., Laverjat M., and Boulétreau P. (2006) Émulsions lipidiques : indication des différentes émulsions lipidiques. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, Vol. 20.
18. Résumé des caractéristiques de produit : SMOFlipid®
19. Klek S., Chambrier C., Singer P., Rubin M., Bowling T., Staun M., *et al* (2013) Four-week parenteral nutrition using a third generation lipid emulsion (SMOFlipid)-a double-blind, randomised, multicentre study in adults. *Clin Nutr*, Vol. 32.
20. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): amino acids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.

21. Griffiths R.D., Allen K.D., Andrews F.J., and Jones C. (2002) Infection, multiple organ failure, and survival in the intensive care unit: influence of glutamine-supplemented parenteral nutrition on acquired infection. *Nutrition*, Vol. 18.
22. Wischmeyer P.E., Dhaliwal R., McCall M., Ziegler T.R., and Heyland D.K. (2014) Parenteral glutamine supplementation in critical illness: a systematic review. *Crit Care*, Vol. 18.
23. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): fluids and electrolytes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
24. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): iron minerals and trace elements. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
25. Résumé des caractéristiques de produit : Cernevit®.
26. Résumé des caractéristiques de produit : Soluvit®.
27. Résumé des caractéristiques de produit : Hydrosol polyvitaminé®.
28. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): vitamins. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
29. Boullata J.I., Gilbert K., Sacks G., Labossiere R.J., Crill C., Goday P., *et al* (2014) A.S.P.E.N. clinical guidelines: parenteral nutrition ordering, order review, compounding, labeling, and dispensing. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, Vol. 38.
30. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the

- European Society of Paediatric Research (ESPR): organisational aspects of hospital PN. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
31. Osman N., Perrinet M., Marinier E., Brion F., and Storme T. (2011) La nutrition parentérale « à la carte » en pédiatrie : une vraie nécessité. *Nutrition clinique et métabolisme*, Vol. 25.
  32. Quessada T., Loras-Duclaux I., Rose A., Klotz M.C., Vételé F., Januel F., *et al* (2013) Mélanges industriels de nutrition parentérale en pédiatrie : faisabilité en nutrition parentérale à domicile. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, Vol. 27.
  33. Anonyme (2001) Alimentation entérale et parentérale (2) : Alimentation parentérale. *Cahier de nutrition et diététique*, Vol. 36.
  34. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): venous access. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
  35. Kelly D.A. (1998) Liver complications of pediatric parenteral nutrition-epidemiology. *Nutrition*, Vol. 14.
  36. Guglielmi F.W., Boggio-Bertinet D., Federico A., Forte G.B., Guglielmi A., Loguercio C., *et al* (2006) Total parenteral nutrition-related gastroenterological complications. *Dig Liver Dis*, Vol. 38.
  37. Premkumar M.H., Carter B.A., Hawthorne K.M., King K., and Abrams S.A. (2013) High rates of resolution of cholestasis in parenteral nutrition-associated liver disease with fish oil-based lipid emulsion monotherapy. *J Pediatr*, Vol. 162.
  38. Layec S., Stefanescu C., Corcos O., Amiot A., Pingetot I., Messing B., *et al* (2011) Les vraies indications de la nutrition parentérale. *Post'U*.
  39. Dreesen M., Foulon V., Spriet I., Goossens G.A., Hiele M., De Pourcq L., *et al* (2013) Epidemiology of catheter-related infections in adult patients receiving home parenteral nutrition: a systematic review. *Clin Nutr*, Vol. 32.
  40. Madeo M. and Lowry L. (2011) Infection rates associated with total parenteral nutrition. *J Hosp Infect*, Vol. 79.
  41. Mermel L.A., Allon M., Bouza E., Craven D.E., Flynn P., O'Grady N.P., *et al* (2009) Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of

- intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, Vol. 49.
42. SF2H (2012) Prévention des infections associées aux chambres à cathéter implantable pour accès veineux. *Hygiènes*, Vol. 20.
  43. Koletzko B., Goulet O., Hunt J., Krohn K., and Shamir R. (2005) Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR): complications of parenteral nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 41.
  44. Lerebours E., Stetiou M., and Armengol-Debeir L. (2013) Infection liée à la voie veineuse centrale : Prévention et traitement. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, Vol. 27.
  45. Mermel L.A., Farr B.M., Sherertz R.J., Raad I.I., O'Grady N., Harris J.S., *et al* (2001) Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-Related Infections. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 32.
  46. Toure A., Lauverjat M., Peraldi C., Boncompain-Gerard M., Gelas P., Barnoud D., *et al* (2012) Taurolidine lock solution in the secondary prevention of central venous catheter-associated bloodstream infection in home parenteral nutrition patients. *Clin Nutr*, Vol. 31.
  47. Décret n°2000-1316 du 26 décembre 2000 relatif aux PUI. *Journal officiel de la république française*.
  48. Article L5121-5. *Code de la santé publique*.
  49. Afssaps (2007) Bonnes pratiques de préparation.
  50. *Pharmacopée européenne, 8ème édition, 2ème version, 2.6.1. Stérilité*. 2014.
  51. *Pharmacopée européenne 8ème édition, 2ème version, 5.1.6. Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique* 2014.
  52. Gourichon L., Assurance qualité et nutrition parentérale : contribution d'un service d'hygiène hospitalière. *Th. D. Pharm.*, UFR de Médecine et de Pharmacie, 2006.
  53. Frossard A., Validation de l'automate BacT/Alert pour le contrôle microbiologique de poches de nutrition parentérale. *Th. D. Pharm.*, Université Paris 5 Descartes, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, 2006.

54. Normand S., Assurance de la qualité en nutrition parentérale : applications aux contrôles microbiologiques. *Th. D. Pharm*, Université Paris 5 Descartes, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, 2000.
55. A.N.S.M. (2014) Note de synthèse relative aux contrôles microbiologiques sur les poches Murette.
56. Hassan S., Amer S., Mittal C., and Sharma R. (2012) *Ewingella americana*: an emerging true pathogen. *Case Rep Infect Dis*.
57. Li L., Shen J., Tao J., and Xue Z. (2014) Peritonitis caused by *Ewingella americana* in a patient with peritoneal dialysis: a case report. *J Med Case Rep*, Vol. 8.
58. Gaitan J.I. and Bronze M.S. (2010) Infection caused by *Rahnella aquatilis*. *Am J Med Sci*, Vol. 339.

## **Annexes**

## Annexe 1

### Mélanges binaires industriels de nutrition parentérale adulte disponibles sur le marché et leur caractéristiques

Laboratoire	Spécialités	Volume (l)	Calories glucidiques (kcal/l)	Rapport calorico-azoté (kcal/g d'azote)	Oligo-éléments	Recommandations d'âge	Electrolytes
<b>Baxter</b> ®	Clinimix ® N9G15E	1 et 1,5	300	72	Non	Adulte	oui
	Clinimix ® N12G20E	1; 1,5 et 2	400	75	Non	Adulte	oui
	Clinimix ® N12G20	2	400	75	Non	Adulte	non
	Clinimix ® N14G30	1; 1,5 et 2	600	93	Non	Adulte	Non
<b>Fresenius Kabi</b> ®	Aminomix ® 500E	1 et 1,5	480	63	Non	Adulte, enfant>2ans	Oui
	Aminomix ® 500	1 et 1,5	480	63	Non	Adulte, enfant>2ans	Non
	Aminomix ® 800E	1; 1,5 et 2	800	100	Non	Adulte, enfant>2ans	oui

## Annexe 2

### Mélanges binaires industriels de nutrition parentérale pédiatrique disponibles sur le marché et leur caractéristiques

Laboratoire	Spécialité	Volume (ml)	Calories glucidiques (kcal/poche)	Rapport calorico-azoté (kcal/g d'azote)	Oligo éléments	Recommandations d'âge	Electrolytes
AP HP	NP 100®	500	300	195	non	Prématuré, nouveau-né	Oui
	NP 2®	500	400	267	non	Enfant	oui
	Pediaven NN1®	250	100	185	oui	Nouveau-né durant les premières 48h	oui
	Pédiaven NN2®	250	100	164	oui	Nouveau-né du 2 <sup>ème</sup> jour de vie à 1 mois	oui
	Pédiaven® G15	1000	600	286	oui	Du nourrisson de plus de 1 mois à l'enfant de 18 ans	oui
	Pédiaven® G20	1000	800	276	Oui	Du nourrisson de plus de 1 mois à l'enfant de 18 ans	oui
	Pédiaven® G25	1000	1000	278	oui	Du nourrisson de plus de 1 mois à l'enfant de 18 ans	oui

## Annexe 3

### Mélanges ternaires industriels de nutrition parentérale adulte disponibles sur le marché et leur caractéristiques

Laboratoire	Spécialité	Volume (l)	Calories glucido-lipidiques (kcal/l)	Rapport calorico-azoté (kcal/g d'azote)	Electrolytes
<b>Baxter</b> ®	Oliclinomel ® N4-550E	1 ; 1,5 ; 2 et 2,5	520	144	Oui
	Oliclinomel ® N5-800E	1 ; 1,5 ; 2 et 2,5	800	174	Oui
	Oliclinomel ® N7-1000E	1 ; 1,5 ; 2 et 2,5	1040	158	Oui
	Oliclinomel ® N7-1000	1 ; 1,5 ; 2 et 2,5	1040	158	Non
	Oliclinomel ® N8-800	2	800	100	Non
	Olimel ® N7E	1 ; 1,5 et 2	960	137	Oui
	Olimel ® N7	1 ; 1,5 et 2	960	137	Non
	Olimel ® N9E	1 ; 1,5 et 2	840	93	Oui
	Olimel ® N9	1 ; 1,5 et 2	840	93	Non
	PeriOlimel ® N4E	1 ; 1,5 ; 2 et 2,5	600	150	Oui
<b>B Braun</b> ®	Mednutriflex ® lipide G120/N4,5/E	1,25 ; 1,875 et 2,5	860	158	Oui
	Mednutriflex ® lipide G120/N5,4	1,25 ; 1,875 et 2,5	860	158	Non
	Mednutriflex ® omega G120/N5,4/E	1 ; 1,25 ; 1,875 et 2,5	860	159	Oui
	Réanutriflex ® lipide G144/N8/E	0,625 ; 1,25 ; 1,875 et 2,5	956	120	Oui
	Réanutriflex ® lipide G144/N8	1,25 ; 1,875 et 2,5	956	120	Non
	Reanutriflex ® omega G144/N8/E	0,625 ; 1 ; 1,25 ; 1,875 et 2,5	955	119	Oui
	Périnutriflex ® G64/N4,6/E	1,25 ; 1,875 et 2,5	636	140	Oui
<b>Fresenius Kabi</b> ®	Kabiven ®	1,026 ; 1,54 ; 2,053 et 2,566	780	148	Oui
	Perikabiven ®	1,44 ; 1,92 et 2,4	625	167	Oui

## Annexe 4

### Mélanges ternaires industriels de nutrition parentérale pédiatrique disponibles sur le marché et leur caractéristiques

Laboratoire	Spécialité	Volume (ml)	Calories glucido-lipidiques (kcal)	Rapport calorico-azoté (kcal/g d'azote)	Electrolytes	Classe d'âge
<b>Baxter</b> ®	Numetah ® G16%	500	465	238	oui	Nouveau-né à terme et enfant de moins de 2ans
	Numetah ® G19%	1000	1045	302	oui	Enfant de plus de 2 ans et adolescent de 16 à 18 ans

## Annexe 5

### **Modalités de reconstitution des pastilles lyophilisées congelées (Bio référence®, Eurofins®)**

- Définir le nombre d'UFC/ml voulu dans la solution finale
- Définir le volume requis de solution de tryptone sel en fonction du nombre moyen d'UFC/ml contenu dans la pastille à reconstituer. Le calcul est le suivant :  
$$\text{Volume de solution de tryptone sel à utiliser (en ml)} = (\text{nombre moyen d'UFC/pastille}) / (\text{nombre d'UFC/ml attendu})$$
- Préparer sous hotte à flux laminaire le volume de solution de tryptone sel dans un récipient stérile
- Sortir la pastille à reconstituer du congélateur et la placer rapidement dans la solution de tryptone sel
- Attendre 5 min que la pastille se dissolve sans agiter
- Vortexer la suspension pendant environ 10 secondes
- Utiliser la souche dans les 15 min après reconstitution

## Annexe 6

### Détermination de l'exactitude de la méthode alternative (BacT/Alert®) : *Bacillus subtilis* 5 UFC/poche pédiatrique de 250 ml

Poche analysée	Flacon n°1 (délai de positivité en jour)	Flacon n°2 (délai de positivité en jour)	Flacon n°3 (délai de positivité en jour)	Bilan test
<b>Poche n°1</b>	0,63	0,63	Négatif à 5 j	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			
<b>Poche n°2</b>	Négatif à 5 j	Négatif à 5 j	0,62	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°3</b>	Négatif à 5 j	0,63	0,62	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°4</b>	Négatif à 5 j	Négatif en 5 j	Négatif en 5 j	<b>Négatif</b>
<b>Poche n°5</b>	Négatif à 5 j	0,65	0,63	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		
<b>Poche n°6</b>	Négatif à 5 j	0,64	Négatif à 5 j	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		

## Annexe 7

### Détermination de l'exactitude de la méthode alternative (BacT/Alert®) : *Bacillus subtilis* 10 UFC/poche pédiatrique de 250 ml

Poche analysée	Flacon n°1 (délai de positivité en jour)	Flacon n°2 (délai de positivité en jour)	Flacon n°3 (délai de positivité en jour)	Bilan test
<b>Poche n°1</b>	0,64	Négatif à 5 j	Négatif à 5 j	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			
<b>Poche n°2</b>	0,64	0,71	0,66	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°3</b>	Négatif à 5 j	0,65	0,66	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°4</b>	0,68	Négatif en 5 j	Négatif en 5 j	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			
<b>Poche n°5</b>	Négatif à 5 j	0,64	0,65	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		
<b>Poche n°6</b>	Négatif à 5 j	Négatif à 5 j	Négatif à 5 j	<b>Négatif</b>

## Annexe 8

### Détermination de l'exactitude de la méthode alternative (BacT/Alert®) : *Bacillus subtilis* 20 UFC/poche pédiatrique de 250 ml

Poche analysée	Flacon n°1 (délai de positivité en jour)	Flacon n°2 (délai de positivité en jour)	Flacon n°3 (délai de positivité en jour)	Bilan test
<b>Poche n°1</b>	0,67	0,69	0,67	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			
<b>Poche n°2</b>	Négatif à 5 j	0,69	0,66	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		
<b>Poche n°3</b>	Négatif à 5 j	0,66	0,71	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°4</b>	0,67	0,72	0,65	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			
<b>Poche n°5</b>	Négatif à 5 j	0,65	0,68	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		
<b>Poche n°6</b>	0,67	0,70	0,67	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			

## Annexe 9

### Détermination de la limite de détection de *Bacillus subtilis* pour la méthode alternative (BacT/Alert®) pour les poches de composition adulte

Inoculum à 74 UFC/ poche de nutrition parentérale adulte de 925 ml

Poche analysée	Flacon n°1 (délai de positivité en jour)	Flacon n°2 (délai de positivité en jour)	Flacon n°3 (délai de positivité en jour)	Bilan test
<b>Poche n°1</b>	0,58	0,60	0,61	<b>Positif</b>
	Pureté de la souche vérifiée par repiquage			
<b>Poche n°2</b>	0,62	0,61	0,59	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°3</b>	0,62	0,63	0,62	<b>Positif</b>
			Pureté de la souche vérifiée par repiquage	
<b>Poche n°4</b>	0,65	0,62	0,63	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		
<b>Poche n°5</b>	0,63	0,60	0,65	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		
<b>Poche n°6</b>	0,63	0,60	0,61	<b>Positif</b>
		Pureté de la souche vérifiée par repiquage		

## **ELODIE QUATREMARE**

### **Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique : validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité des mélanges nutritifs « à la carte »**

Th. D. Pharm., Rouen, 2014, 105 p.

---

#### **RÉSUMÉ**

La nutrition parentérale est une technique de nutrition artificielle qui vise à prévenir ou corriger la dénutrition de malades incapables de satisfaire leurs besoins énergétiques. Coûteuse et non dénuée de risques, elle doit être conduite de façon rigoureuse de manière à réduire les complications et à obtenir le meilleur bénéfice pour le patient.

En l'absence de spécialités pharmaceutiques adaptées, le pharmacien hospitalier peut être amené à faire réaliser, sous sa responsabilité, des mélanges nutritifs adaptés sous forme de préparations magistrales. Dans ce cas, des mesures doivent être mises en place afin de garantir la stérilité finale des préparations. Ainsi, la maîtrise de l'environnement dans lequel sont réalisées les préparations est indispensable et le contrôle de stérilité d'un échantillon de mélanges, représentatif du lot de production, contribue à la validation du processus de fabrication.

À l'heure actuelle, au laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Rouen, cet essai de stérilité est réalisé selon la méthode de référence d'après la 8ème édition de la Pharmacopée européenne. Le travail présenté ici a permis de définir les performances de cette technique pour les mélanges pédiatriques de nutrition parentérale et de les comparer à celles d'une méthode alternative utilisant l'automate BacT/Alert® de détection automatisée de germes. Cette méthode s'avérant aussi performante que la méthode de référence, il semble possible de l'utiliser pour l'essai de stérilité des mélanges pédiatriques de nutrition parentérale.

---

#### **MOTS-CLÉS**

Nutrition parentérale, essai de stérilité, validation de méthode, filtration sur membrane, automate BacT/Alert®

---

#### **MEMBRES DU JURY :**

Président du jury : Pr Rémi VARIN, *Pharmacien, PU-PH*

Membres du jury : Dr Christine CHEFSON-GIRAULT, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

Dr Aude COQUARD, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

Dr Lise GOURICHON, *Pharmacien, Praticien Attaché*

Pr Martine PESTEL-CARON, *Pharmacien, PU-PH*

Pr Jean-Louis PONS, *Pharmacien, PU-PH*

---

**DATE DE SOUTENANCE :** 30 septembre 2014

## **ELODIE QUATREMARE**

### **Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique : validation d'une méthode alternative pour l'essai de stérilité des mélanges nutritifs « à la carte »**

Th. D. Pharm., Rouen, 2014, 105 p.

---

#### **RÉSUMÉ**

La nutrition parentérale est une technique de nutrition artificielle qui vise à prévenir ou corriger la dénutrition de malades incapables de satisfaire leurs besoins énergétiques. Coûteuse et non dénuée de risques, elle doit être conduite de façon rigoureuse de manière à réduire les complications et à obtenir le meilleur bénéfice pour le patient.

En l'absence de spécialités pharmaceutiques adaptées, le pharmacien hospitalier peut être amené à faire réaliser, sous sa responsabilité, des mélanges nutritifs adaptés sous forme de préparations magistrales. Dans ce cas, des mesures doivent être mises en place afin de garantir la stérilité finale des préparations. Ainsi, la maîtrise de l'environnement dans lequel sont réalisées les préparations est indispensable et le contrôle de stérilité d'un échantillon de mélanges, représentatif du lot de production, contribue à la validation du processus de fabrication.

À l'heure actuelle, au laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Rouen, cet essai de stérilité est réalisé selon la méthode de référence d'après la 8ème édition de la Pharmacopée européenne. Le travail présenté ici a permis de définir les performances de cette technique pour les mélanges pédiatriques de nutrition parentérale et de les comparer à celles d'une méthode alternative utilisant l'automate BacT/Alert® de détection automatisée de germes. Cette méthode s'avérant aussi performante que la méthode de référence, il semble possible de l'utiliser pour l'essai de stérilité des mélanges pédiatriques de nutrition parentérale.

---

#### **MOTS-CLÉS**

Nutrition parentérale, essai de stérilité, validation de méthode, filtration sur membrane, automate BacT/Alert®

---

#### **MEMBRES DU JURY :**

Président du jury : Pr Rémi VARIN, *Pharmacien, PU-PH*

Membres du jury : Dr Christine CHEFSON-GIRAULT, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

Dr Aude COQUARD, *Pharmacien, Praticien Hospitalier*

Dr Lise GOURICHON, *Pharmacien, Praticien Attaché*

Pr Martine PESTEL-CARON, *Pharmacien, PU-PH*

Pr Jean-Louis PONS, *Pharmacien, PU-PH*

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 30 septembre 2014