

Suivi de la biocharge (Bioburden) des solutions stériles avant stérilisation en 2010



Sylvie
GUYOMARD

ACM Pharma / μ BioPharma

sylvie.guyomard@acmpharma.com

La stérilisation n'étant qu'une opération qui permet de réduire le nombre de microorganismes de 10^{-3} à 10^{-6} selon le procédé de stérilisation, la stérilité du produit fini dépend du nombre de microorganismes présents avant la stérilisation. De même, le taux d'endotoxines du produit fini dépend du nombre de microorganismes Gram négatif, présent avant la stérilisation.

L'objectif du contrôle de la biocharge avant stérilisation est de contrôler la contamination microbienne des produits avant stérilisation pour augmenter le niveau d'assurance de la stérilité (NAS/SAL) et si approprié pour contrôler le taux des endotoxines bactériennes. Les textes réglementaires dont l'annexe 1 des BPF européens demandent la connaissance de la biocharge avant stérilisation aussi bien pour la stérilisation terminale que pour la répartition aseptique, mais la méthodologie reste indéfinie. L'analyse de risque au niveau de la configuration du procédé de stérilisation et de la nature du produit permet de déterminer la localisation du prélèvement pour analyse, la quantité à prélever, le type d'analyse à réaliser et les limites en microorganismes à ne pas dépasser.

1 Différents textes réglementaires ou de recommandations vis à vis de la biocharge

La Pharmacopée Européenne (Ph Eur) dans le chapitre 5.1.1 : « Méthodes de préparation des produits stériles » donne les précautions à prendre pour limiter la charge microbienne avant la stérilisation : utilisation de composés présentant un niveau suffisamment faible de contamination microbienne, surveillance microbiologique et établissement de limites appropriées pour les composants comportant des risques de contamination en raison de leur origine, de leur nature ou de leur mode de préparation.

L'annexe 1 des BPF européennes demande **le contrôle de la biocharge avant stérilisation** et l'établissement de "limites de travail" immédiatement **avant la stérilisation**, basées sur l'efficacité de la méthode de stérilisation.

Il est clairement indiqué que la biocharge doit être réalisée sur chaque lot pour la répartition aseptique, à intervalle planifié et adapté pour la stérilisation terminale avec des paramètres sur-destructeurs (overkill stérilisation).

Pour la libération paramétrique, la biocharge est un paramètre important de la libération du lot et doit donc être réalisée sur chaque lot.

Selon le risque endotoxinique, il est préconisé de suivre le niveau des

endotoxines bactériennes dans la biocharge avant stérilisation.

On ne peut isoler la biocharge des différentes étapes du procédé de fabrication et l'annexe 1 recommande que toutes les solutions, en particulier les grands volumes pour injection, soient filtrées sur un filtre de rétention des microorganismes, si possible, situé immédiatement avant le remplissage.

La biocharge avant la filtration stérilisante étant connue comme un paramètre critique **le suivi de la biocharge avant filtration stérilisante sur chaque lot** de solution vrac **est déjà une pratique usuelle** en répartition aseptique. La biocharge avant stérilisation terminale est un paramètre peu critique surtout après une pré-filtration sur filtre de rétention des microorganismes et la détermination de l'intervalle de réalisation de la biocharge n'est pas actuellement une pratique courante en routine. La valeur usuelle de la limite d'action est de 100 UFC/ml sans réels fondements scientifiques ou réglementaires. Une limite d'alerte semble plus appropriée, fondée sur l'historique obtenu en développement ou sur les premiers lots et sur la durée maximale entre le remplissage et l'autoclavage (holding time).

La « Note for guidance on manufacture of the finished product CHMP/QWP/486/95 1996 » recommande la détermination de la biocharge avant filtration stérilisante sans information sur la fréquence du contrôle avec une limite d'action recommandée de 10 CFU/100 ml avant la filtration stérilisante, en précisant que si cette limite ne peut être atteinte un pré-filtre réducteur de la biocharge microbienne peut être ajouté après ou avant la cuve stérile. Par contre, il n'y a pas de normes conseillées pour une stérilisation terminale.

Le guide de la FDA pour l'industrie de 2004 « Sterile drug product produced by aseptic processing » indique que les procédés de fabrication doivent permettre d'avoir une biocharge faible dans le produit non filtré et recommande de fixer une limite à la biocharge avant filtration. Comme dans l'annexe 1 des BPF, la réalisation de 2 filtrations est envisagée.

Tous ces textes, concernant directement ou indirectement le suivi de la biocharge, ont pour but d'obtenir et de maintenir un niveau faible en microorganismes avant la stérilisation afin d'augmenter le niveau d'assurance de la stérilité (NAS) particulièrement important pour les produits fabriqués par procédé aseptique.

Le niveau de biocharge avant stérilisation dépend de la configuration du système de stérilisation

2 Méthode

- Pour le dénombrement des microorganismes, la méthode utilisable peut être la méthode de la Ph Eur chap. 2.6.12 par filtration sur membrane (milieu de culture aux peptones de caséine et soja, incubation 30-35°C, 5 jours).

Les méthodes alternatives microbiologiques quantitatives plus rapides peuvent être utilisées, mais les méthodes actuelles ne permettent pas une réponse avant la répartition du produit.

Il ne paraît pas nécessaire de faire une recherche spécifique des levures et moisissures du fait que le dénombrement des microorganismes totaux permet la détection de la grande majorité des microorganismes aérobies. Si un problème particulier, avec certaines moisissures (ne poussant pas à 30°C par exemple), est connu, la méthode de la Ph Eur peut être légèrement modifiée avec incubation pendant 3 jours à 20-25°C suivie de 3 jours à 30-35°C. L'identification des microorganismes peut être réalisée sur les 1^{ers} lots fabriqués pour une bonne connaissance microbiologique du produit. Par contre pour les stérilisations non sur- destructives (non overkilled), l'identification de tous les microorganismes isolés est requise.

Pour les produits stérilisés par filtration stérilisante et avant la filtration

revendiquée stérilisante, le prélèvement doit être d'au moins 100 ml. Il peut être difficile de filtrer de tels volumes soit du fait de leur toxicité, soit pour les lots de faibles volumes (lots de développement, produits biotech). Dans ce cas, une quantité minimale de 30 ml peut être envisagée.

Pour la stérilisation terminale, un volume correspondant à celui de l'essai de stérilité (soit 40 contenants au maximum) est prélevé sur les flacons remplis juste avant l'autoclavage et l'analyse de 10 ml du pool est réalisée.

- Pour la détermination des endotoxines bactériennes, une méthode quantitative est préférée à la méthode par gélification, et une méthode quantitative rapide pouvant être effectuée sur le lieu de fabrication, telle que le PTS (Endosafe) peut donner une réponse avant le début de répartition.

3 Exemples sur les solutions injectables

Les exemples suivants, illustrés par des schémas de configuration de procédés en accord avec l'annexe 1 des BPF, proposent la localisation des prélèvements et des analyses à réaliser ainsi que les limites associées.

Exemple 1 : Stérilisation terminale

Échantillon 1 :

- Le filtre A n'est pas revendiqué comme stérilisant. Il est placé ici comme filtre de rétention microbienne pour diminuer la biocharge avant la stérilisation terminale. En particulier, le challenge avec *B. diminuta* n'est pas requis, la stérilité du filtre non plus, la répartition peut être faite en classe C.

- La biocharge de l'échantillon 1 apporte la connaissance de la

Le partenaire
spécialisé en microbiologie
traditionnelle et alternative

Etablissement Pharmaceutique
Fabrilab
Déclaration AFSSAAPS
N° M07/186

www.acmpha.com



ACM Pharma est aujourd'hui le partenaire privilégié des industriels de la pharmacie, de la cosmétique et du dispositif médical.

Laboratoire indépendant à taille humaine, ACM Pharma, expert en microbiologie traditionnelle et alternative, met à votre service une équipe de pharmaciens, scientifiques et techniciens spécialisés.

Professionalisme, proximité, disponibilité et réactivité sont les ingrédients de notre réussite, rejoignez-nous dès aujourd'hui !

Pour vos besoins en formation : le partenariat ACM Pharma et UPS Consultants vous garantit la mise en œuvre de formations adaptées à vos attentes (programmes disponibles sur www.acmpharma.com).



ACM Pharma SAS
34-36, av. du 21 Août 1944
45270 Bellegarde

Tél. : (+33) 02 38 90 41 01
Fax : (+33) 02 38 90 41 10

info@acmpharma.com

www.acmpharma.com



qualité microbiologique du produit (Gram - → endotoxines) et peut servir aussi à déterminer les holdings time maximum du produit dans la cuve de fabrication.

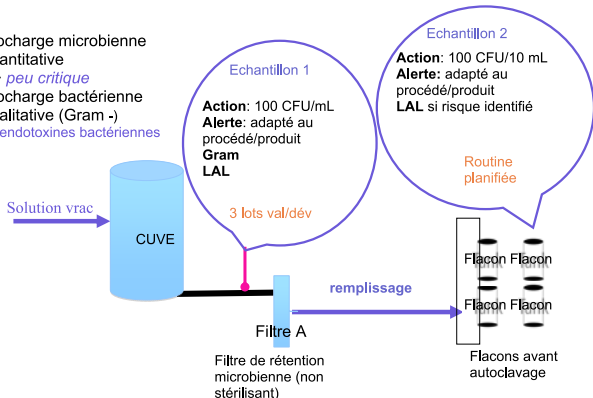
- Le prélèvement le plus critique est donc en fin de filtration. Un volume de 10 ml est suffisant.

Échantillon 2 :

La stérilisation est une stérilisation terminale. Le prélèvement le plus critique est juste avant l'autoclavage des flacons.

Exemple 1: BIOCHARGE en stérilisation terminale (chaleur humide)

- Biocharge microbienne quantitative → peu critique
- Biocharge bactérienne qualitative (Gram -) → endotoxines bactériennes

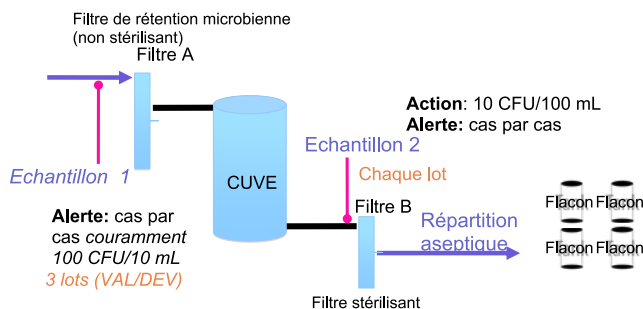


Exemple 2 : répartition aseptique

Procédé avec un « holding time » long avant la filtration stérilisante. Dans ce cas, le filtre A est là pour réduire la biocharge dans la cuve avant la filtration stérilisante par le filtre B. L'échantillon 1 donne la biocharge avant toute filtration dont le but est la connaissance de la qualité microbiologique du produit (quantitative et qualitative) Le contrôle de la biocharge en endotoxine n'est pas utile.

Exemple 2 : BIOCHARGE en répartition aseptique

- Procédé avec un holding time long avant la filtration stérilisante



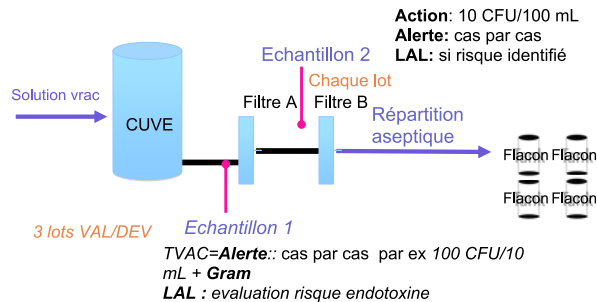
Exemple 3 : répartition aseptique

Procédé pour Biocharge élevée (>10 CFU/100 ml) et « holding time » court.

Le but de la 1^{ère} filtration est de réduire le niveau de biocontamination avant la filtration stérilisante et donc d'accroître le SAL. La durée maximale dans la cuve (holding time) doit être courte et qualifiée pour éviter le développement microbien avant la filtration stérilisante. Il peut être intéressant d'avoir un échantillon avant la 1^{ère} filtration pour connaître le niveau de biocontamination de la solution initiale et le type de microorganismes qui peut se développer dans le produit. Le but de l'échantillon 2 est de suivre le niveau de contamination avant la stérilisation.

Exemple 3: BIOCHARGE en répartition aseptique

- Procédé pour Biocharge élevée (>10 CFU/100 mL) et holding time court



Exemple 4 : Répartition aseptique :

Procédé pour des produits couteux à faible biocharge (<10 UFC/100ml) et "holding time court".

Dans cet exemple les 2 filtres sont en série. Il est admissible qu'un des 2 filtres ne passe pas le test d'intégrité en fin de remplissage sans que l'assurance de stérilité soit compromise. Dans ce cas on doit avoir une combinaison d'une biocharge basse, d'un "holding time" court et d'un produit coûteux.

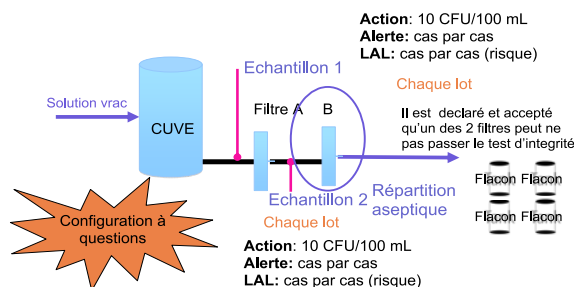
Cette situation peut entraîner un certain nombre de question lors des inspections PIC'S car le PIC'S dans le guide pour la validation aseptique (2007) recommande que l'intégrité de chaque filtre doit être réalisé en production de routine avant et après utilisation. De plus, si un des tests d'intégrité est non conforme, il n'y plus qu'une seule filtration. Le suivi de la biocharge de chaque lot et une limite d'action basse sont importants dans cette configuration.

- Le but de l'échantillon 1 est de prouver que chaque lot a une biocharge avant filtration inférieure à 10 UFC/100 ml puisqu' il peut n'y avoir qu'un seul filtre considéré comme stérilisant.

- Le but de l'échantillon 2 est de qualifier l'installation avec les 2 filtres et le résultat doit être en accord avec le guide de l'EMEA, soit inférieure à 10 UFC/100 ml.

Exemple 4: BIOCHARGE en répartition aseptique

- Procédé pour des produits couteux à faible biocharge (<10UFC/100mL) et holding time court



Conclusion

Le suivi de la biocharge est une pratique commune dans l'industrie pharmaceutique.

Le suivi de la biocharge pour les stérilisations terminales sur- destructrices n'est pas aussi répandu. Un contrôle aléatoire étant permis, cette pratique devrait s'installer.

L'utilisation d'un pré-filtre de rétention bactérienne recommandée par l'annexe 1, l'EMEA, la FDA, avant la stérilisation (filtration stérilisante ou terminale) permet d'avoir la biocharge avant stérilisation sous contrôle dans la majorité des cas.

La détermination de la biocharge avant le pré-filtre de rétention microbienne est intéressant au moins sur les 3 premiers lots représentatifs fabriqués et pendant le développement, pour une meilleure connaissance de la qualité de base microbiologique du produit.

Une équipe composée de fabricants et de microbiologistes détermine la localisation des prélèvements pour le suivi de la biocharge, les limites et la démarche en cas de dépassement de ces limites, en fonction du procédé et du produit.