

La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

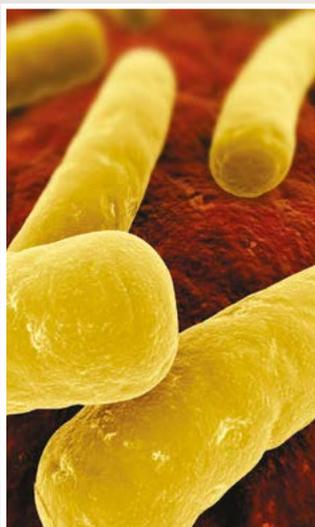
N° 48 | Janvier 2016
Trimestriel



Spécial
Microbiologie

**Rencontres A3P
de Microbiologie à
Tours, les 15 & 16 mars**

- **Les méthodes rapides en microbiologie, une opportunité pour tout un chacun au sein de l'entreprise.**
- **Libération des lots de produits injectables : une affaire d'état !**
- **Quel est l'impact des désinfectants sur les contrôles d'environnement ?**



Sommaire

N°48 // Janvier 2016

L'édito MICROBIOLOGIE, quand tu nous tiens	3
Ils ont participé à ce numéro 	4
Billet d'humeur Toujours plus !!.....	5
Stérédico S et T ... comme	7
Actualités G.I.C. A3P élastomères : Une aventure particulière !.....	9
Actualités Étude sur le programme d'incubation des milieux de culture	12
Actualités LES RENCONTRES A3P MICROBIOLOGIE	13
Maîtrise de la contamination Les méthodes rapides en microbiologie.....	15
Maîtrise de la contamination Libération des lots de produits injectables : une affaire d'état !.....	19
Cahier pratique Rationalisation des qualifications périodiques des autoclaves, des tunnels de dépyrogénéation et des laveuses de flacons pour les formes injectables	27
Maîtrise de la contamination La détection des mycoplasmes par qPCR.....	33
Maîtrise de la contamination Environmental Monitoring Program: Hot topics in Microbiology & Best Practices.....	37
Maîtrise de la contamination Quel est l'impact des désinfectants sur les contrôles d'environnement ?....	43
Maîtrise de la contamination Current U.S.P. Perspectives on Microbial Identification.....	47
Agenda A3P 	49

La Vague

Revue trimestrielle N° 48 - Janvier 2016

• Editeur
A3P Association
30, rue Pré Gaudry - 69007 Lyon
Tél. 04 37 28 30 40
E-mail : a3p@a3p.asso.fr
Prix de vente au numéro : 10€

• Directeur de la Publication :
Didier MEYER, Vice-Président A3P
E-mail : dgastonmeyer@gmail.com
• Rédactrice en Chef :
Monique DECRULLE
E-mail : m.decrulle@wanadoo.fr
• Comité scientifique :
G. ECOTIERE, F. MOREL, J. NAVELLOU,
E. PETAT
• Coordinateur :
Frédéric ESTASSY
E-mail : festassy@a3pservices.com
• Conception & graphisme
Sophie Torgue
E-mail : storgue@a3pservices.com

• Impression
2PRINT - 42000 Saint-Étienne

Dépôt légal à parution
N° d'ISSN : 1298-047
N° CPPAP : en cours

Tous droits réservés. Les articles publiés dans la revue n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs.



STERIS

Life Sciences

REMOVING TOUGH DISINFECTANT RESIDUE

An important aspect to any microbial control program is a strategy to address disinfectant and sporicidal residues. Since any disinfectant or sporicide will leave some residue, we recommend that every program include a rinsing or residue removal step.

STERIS typically recommends using water or isopropanol rinses on a routine basis to limit residue build-up. For facilities that do not routinely rinse or have tough residues, we recommend using a detergent. Our **ProKlenz® Booster and ProKlenz NpH** Sterile Detergents are ideal for this application because they can be easily brought into controlled environments and are formulated to remove challenging soils.

Our Technical Service group can help customize your contamination control program to take advantage of these excellent products.

Science & Solutions for Life



L'édito

Par *Éric PETAT*
Trésorier A3P Association

MICROBIOLOGIE

Quand tu nous tiens ...

L'année 2015 laissera pour A3P et tous ses adhérents le souvenir d'une année dynamique, dense, forte, riche en échanges. En un mot, une année A3P !!!
Avec tous les ingrédients du succès grâce à une philosophie maintenant bien établie, une recette éprouvée et des outils parfaitement adaptés.

Je souhaite en préambule rappeler que la recette du succès, tient à vous tous, adhérents de l'ensemble des délégations toujours plus nombreux, conseil d'administration efficace et dynamique, bureau A3P dévoué... et bien entendu à A3P Services, sous la houlette de Frédéric. Sans l'efficacité, la disponibilité, la dynamique et le sourire de chacune et chacun d'entre vous, notre Association ne serait pas ce qu'elle est ; alors MERCI à tous.

L'Association A3P a trouvé son rythme à Lyon au coeur d'une région clé pour l'industrie pharmaceutique et biotechnologique. Ce transfert a contribué également à notre développement avec la disponibilité de locaux polyvalents adaptés à notre organisation.

Tous les événements organisés en 2015 furent des succès avec une fin d'année réussie puisque le congrès de Biarritz a vu une affluence et un taux de satisfaction encore jamais atteints à ce jour (680 participants dont 101 exposants).

Le décalage au mois de novembre semble également avoir contribué à cette participation record.

Nous organiserons à nouveau l'événement à cette période, rendez-vous à Biarritz en novembre 2016 !

Au delà de cette satisfaction légitime et de ces remerciements mérités, nous devons rester lucides et mobilisés pour préparer une année 2016 à nouveau en croissance. Après la période des fêtes de fin d'année il conviendra que toutes et tous nous restions dans la même dynamique.

L'année 2016 sera Microbio ! : Rendez-vous autour des méthodes alternatives à Tours, journée Mycoplasmes et journée Endotoxines. Le premier sera organisé à Tours pour les 12^{ème} Rencontres de Microbiologie, les 15 et 16 mars prochains. Elles représentent un moment fort pour les microbiologistes de nos industries mais aussi pour tous ceux qui de près ou de loin sont concernés par des problématiques liées aux contaminations et à leur maîtrise.

La microbiologie n'est pas une science comme les autres, n'en déplaise aux chimistes ! Nous vivons avec les microorganismes, sources de vie et parfois de maladies, mais dans nos industries nous n'avons pas envie qu'ils vivent avec nous ! Les évolutions technologiques dans les domaines de la pharmacie et des biotechnologies (procédés aseptiques, produits biologiques etc ...) mais aussi les évolutions sociétales avec la "chasse aux conservateurs"... génèrent de nouvelles problématiques microbiologiques et de nouvelles exigences en matière de contrôles.

Les Rencontres de Microbiologie représentent un espace incomparable d'échanges de haut niveau entre tous les acteurs concernés par la maîtrise de la contamination. C'est pourquoi les thématiques de ces rencontres seront transversales. L'industrie cosmétique très impactée par le "sans conservateur" doit inventer de nouveaux concepts de production et de packaging avec des objectifs identiques à ceux de l'industrie du médicament. Il est donc logique que tous les acteurs puissent échanger leurs expériences à Tours sur ces sujets. Nos besoins analytiques en microbiologie ne cessent d'augmenter tant en nombre qu'en exigence de délais. Depuis plus de 20 ans le déploiement de méthodes alternatives aux méthodes "pastoriennes" est à l'ordre du jour. De nombreuses technologies sont apparues (certaines ont déjà disparu...) dans tous les domaines (mesure de contamination, essais de stérilité, contrôles d'environnement, identifications etc.), les Rencontres de mars à Tours représentent un espace privilégié d'échanges et de présentations sur ces nouvelles approches, ne les ratez pas !!!

Gageons qu'après cette période festive, ces rencontres seront un des succès de l'année 2016, qui s'annonce riche en événements pour A3P.

**Au nom du Bureau et du Conseil d'administration,
je vous remercie toutes et tous pour votre contribution au succès de notre Association et vous adresse
tous mes meilleurs voeux pour l'année 2016.**

Contributeurs

Ils ont participé à ce numéro

**Christophe Emonard**

Christophe.emonard@biomerieux.com

Rédacteur en chef Invité de ce numéro spécial Microbiologie.

La maîtrise de la contamination microbiologique a tenu, tient et tiendra une place prépondérante dans l'industrie Pharmaceutique. À l'heure actuelle, les contraintes de qualité, de productivité et réglementaires ont pour conséquences le développement de nouvelles solutions en microbiologie de plus en plus performantes répondant à ses exigences. Les techniques pasteurienues restent encore des méthodes de références mais de plus en plus de nouvelles techniques alternatives font leur apparition (spectrométrie de masse, technique rapides de détection...).

Ces techniques gagnent en temps et en simplicité.

Ce numéro spécial de la Vague axé sur la microbiologie permettra à ses lecteurs d'aborder différentes problématiques attenantes au monde de "l'extrêmement petit" qui suscitera toujours un intérêt "extrêmement grand" !

Pharmacien diplômé de la faculté de Pharmacie de Lyon.

DESS de Microbiologie à l'IPIL (Institut de Pharmacie Industrielle de Lyon).

Chef de produit industrie durant 13 ans dans une société de diagnostic et fonction d'expert auprès de l'AFNOR dans plusieurs commissions (bureau de normalisation et de validation des méthodes rapides), il occupe le poste de Regional Business Manager (RBM) depuis 7 ans chez **bioMérieux** pour la zone EMEA (Europe – Middle East – Africa).

**Olivier Chancel**

Olivier.chancel@Meriel.com

Rédacteur de "Libération des lots de produits injectables : une affaire d'état !"

Expert Assurance Stérilité de **Meriel**, entreprise du groupe Sanofi, il travaille depuis 15 ans avec plusieurs associations professionnelles et dans l'industrie pharmaceutique à différentes positions dont en recherche et développement, contrôle qualité, assurance de la qualité, production des formes sèches et injectables.

**Guy Roehrig**

guyr@lilly.com

Rédacteur de "Les méthodes rapides en microbiologie!"

Le remplacement des tests pyrogènes sur lapin par le test de recherche des endotoxines bactériennes au début des années 80 a été la première rencontre de Guy Roehrig avec les méthodes alternatives. Après avoir passé plus de 30 ans au sein du laboratoire de microbiologie de **Lilly** France dans le domaine des endotoxines bactériennes et des validations de méthodes, il met à profit ses acquis pour démystifier la microbiologie rapide et l'implémenter dans ce laboratoire.

**Laurent Leblanc**

laurent.leblanc@biomerieux.com

Rédacteur de "Quel est l'impact des désinfectants sur les contrôles d'environnement ?"

Fort d'une expérience de plus de 10 ans dans des sociétés de la biotechnologie et de la pharmacie, il a travaillé pour Sanofi Pasteur avant de rejoindre **bioMérieux** en 2008. Il dirige depuis 2012, le laboratoire de Recherche et Développement milieux de culture. À ce titre, il développe les nouvelles solutions dédiées aux industries pharmaceutiques et cosmétiques.

Aude Sanchez

SGS Life Science Services France

Christophe lochem

Rédacteurs de

"La détection des mycoplasmes par qPCR"

Depuis mars 2015, Aude a intégré SGS en qualité de Chef de Projet pour implémenter l'activité de détection des mycoplasmes sur le site **SGS** de Villeneuve-La-Garenne.

Depuis 25 ans, avec plusieurs fonctions opérationnelles au sein de l'Industrie

BioPharmaceutique, Christophe est aujourd'hui responsable du développement de l'activité de services Biosafety et BioAnalytique en Amérique du Nord chez **SGS Life Science Services**

**Benoit Ramond**

Benoit.Ramond@sanofi.com

Rédacteur de "Environmental Monitoring Program: Hot topics in Microbiology & Best Practices.!"

**Cyril Thouseau**

Cyril.Thouseau@sanofipasteur.com

Rédacteur de "G.I.C. A3P élastomères : Une aventure particulière !!!"

Vous aussi, vous souhaitez participer aux prochains numéros ? Faites-nous parvenir vos propositions d'articles qui seront étudiées par le comité de lecture pour approbation. => Coordonnées des contacts page 2

Billet d'Humeur

Par Jacques Navellou - Axys-Network

Toujours plus !!



Les nouvelles technologies de fabrication (au sens large) utilisées par l'industrie pharmaceutique du propre et du stérile ne cessent de progresser et elles sont utilisées de plus en plus largement dans nos usines de production.

A titre d'exemple, l'utilisation de la technologie isolateur, voire celle des RABS (Restricted Access Barrier System) a permis de fortement diminuer le risque de contamination et même de le supprimer dans certains cas.

Va-t-on pour autant pouvoir diminuer les coûts de validation d'un nouveau procédé ? On a pu voir dans certains cas qu'un procédé ancien type remplissage conventionnel en classe A dans B pouvait être accepté plus rapidement par des autorités de santé et dans le même temps ne pas accepter un procédé utilisant les nouvelles technologies bien que la simple observation du procédé faisait ressortir un risque de contamination presque nul.

Est ce que l'on a oublié dans nos usines que le bon sens est la qualité première d'un bon professionnel ? Qu'il vaut mieux un producteur connaissant les défauts de ses machines que la manipulation de Powerpoint ou Excel !!

On en revient encore une fois dans beaucoup de cas à l'utilisation du principe de précaution qui est encore fait avec peu de discernement.

Les coûts exponentiels de validation des procédés font que le prix des médicaments augmente toujours et que par conséquent on peut se poser la question suivante : pourra-t-on toujours fournir des produits dans certains pays car ils ne pourront plus les acheter à cause de leur prix ; cela devient alors un problème éthique pour notre industrie.

C'est à nous les acteurs industriels de l'industrie du propre et du stérile de pousser au retour du bon sens et du professionnalisme et de peut-être refuser tous ces "messieurs plus" bien connus dans la pub.

C'est cependant vrai que la "Qualité" n'a pas de prix, mais elle a un coût et ayons toujours à l'esprit cela pour en estimer les conséquences.

STERIDICO

Par Dominique Weill - Stérigène

S ... comme Silice ou acide Silicique



Chers amis lecteurs, la trêve estivale souvent propice aux maintenances nous a fait découvrir à l'intérieur des tubes ou... tuyaux (voyons plus tard) les résultats de phénomènes parfois insoupçonnés.

Si un inox vitrifié vous interpelle, voici quelques informations et expériences.

Quasiment toutes les analyses des eaux naturelles, profondes ou de surface révèlent la présence d'**acide silicique** (H_2SiO_4 issu de $SiO_2 + 2 H_2O$), le même que le stimulant naturel des os et quelques fonctions vitales. Les concentrations de cet acide faible varient de 1 à 100 ppm, donc bien soluble dans l'eau à l'inverse des matières en suspension insolubles telles que par exemple la **silice** (SiO_2).

Mais si les méthodes traditionnelles de coagulation et précipitation (silice colloïdale) permettent, après filtration, une réduction significative des floculats, il en est évidemment pas de même avec les substances dissoutes telles que l'acide silicique.

Sous forme de sels dans les eaux d'alimentation, il ne peut se vaporiser qu'à 27 bars mais sa solubilité croît proportionnellement à la température et devient totale combinée à un $pH \leq 8,3$ ce qui est le cas des eaux purifiées alimentant les générateurs de vapeur propre et les distillateurs d'eau.

Toutefois pour des pressions usuelles inférieures à 10 bars, nous n'en sommes pas quitte pour autant. Lors d'une détente, après la phase de surchauffe, l'expansion de la vapeur favorise, lors de condensation potentielle, selon la qualité des matériaux et la rugosité des surfaces, une forme de polymérisation. Ces dépôts de tartre silicique, sont précurseurs de gel colloïdal puis de silice. Très durs et difficiles, voire impossibles à éliminer pour des épaisseurs supérieures à 2 mm, la couche vitreuse souvent accrochée aux surfaces de métal, ne peut se dilater avec la même cinétique que l'acier. Les cracks ou fissures engendrées deviennent des "nids" collectant les impuretés diverses et des points de départ de corrosion surtout lorsque le métal refroidi se rétracte et "emprisonne" les éléments indésirables.

Lors d'investigations, il est recommandé d'engager un diagnostic dès que les échanges thermiques sont considérablement diminués et les rendements ralentis (réduction de la conductivité thermique des parois).

Pour éviter les dépôts de silice et la "vitrification", la concentration de l'acide silicique dans l'eau d'alimentation des générateurs de vapeur, inférieure à 0,02 ppm doit être monitorée tant en amont qu'en aval au niveau des condensats. En cas d'atteinte des seuils d'alerte, la déconcentration doit être accélérée avant les amorces d'attaques notamment aux rochages des soudures.

STERIDICO

Par Dominique Weill - Stérigène

T ... comme Tube ou Tuyau



Si bien sûr, il ne viendrait à personne une quelconque métonymie entre ces mots dans les expressions telles que "tube inox calorifugé" ou "tuyau d'arrosage domestique".

En effet la définition apparaît évidente et claire : un **tube** est un conduit cylindrique rigide à section constante permettant l'écoulement de fluide etc., tandis qu'un **tuyau** peut être souple (ou rigide selon l'Académie Française 8^{ème} Ed) donc déformable, écrasable, pliable, clampable donc à diamètre variable.

Notons que de nombreuses définitions courant sur le net ajoutent de la confusion, définissant allègrement un tube comme un tuyau qui... et un tuyau comme un tube qui ... y compris chez les grands référents tels que Littré, Larousse ou Robert.

Alors que penser : exceptions, erreurs de sémantique ou lapsus lorsqu'on évoque le tube digestif et le tube de crème ou les tuyaux d'orgues. On intube pour le ramonage un tuyau de poêle rigide !!

Et mieux la tuyauterie s'entend comme l'ensemble des tubes d'un réseau de distribution et non comme une "tuberie".

Alors devons-nous nous résoudre à l'usage indifférencié, commode mais peu satisfaisant de ces termes ?

Au fait hors de nos frontières, outre Manche par exemple est-ce plus précis ? Eh bien la "romaine traversée" du chanel a renversé notre logique. En effet le tubing comme un ensemble de "tubes" représente des conduits flexibles (silicone etc.)

tandis que le piping ou assemblage de "pipes" correspond bien à nos tuyauteries et nos tubes.

Alors peut-on conclure : pas sûr mais le langage nous construit, perpétue notre culture et certains trouveront sûrement un intérêt à employer les mots justes à défaut d'être vrais.

Et puis voici un petit tuyau : il suffit de marcher dessus pour faire de l'eau plate.

Amis lecteurs, cette rubrique n'a d'autre ambition que de vous servir.

Si vous souhaitez réagir, enrichir, participer : contribuez au SteriDico

DoW.e.l.i pour STERIGENE
dominique.weill@sterigene.com

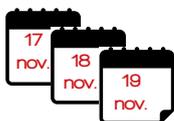
Actualités A3P

Merci à tous & RDV en 2016 !

congrès international



3 jours en 2015



694 participants



65 Congressistes

35% Expositors

14 conférences

12 ateliers

105 exposants

354 sociétés présentes

16 pays représentés



- "... Pour la deuxième année consécutive, nous avons été enchantés et ravis par les moyens qui ont été mis à notre disposition pour animer cet atelier, que ce soit au niveau de la taille de la salle que de l'équipement disponible. Notre auditoire, brillant et aux profils variés, nous a offert des moments de partage d'expérience des plus enrichissants." - Baxter

- "... des conférences de haut niveau et des ateliers enrichissants, de quoi faire le plein de motivation et d'enthousiasme pour la poursuite de nos projets et batailles afin de réussir nos tâches..." - A3P Algérie

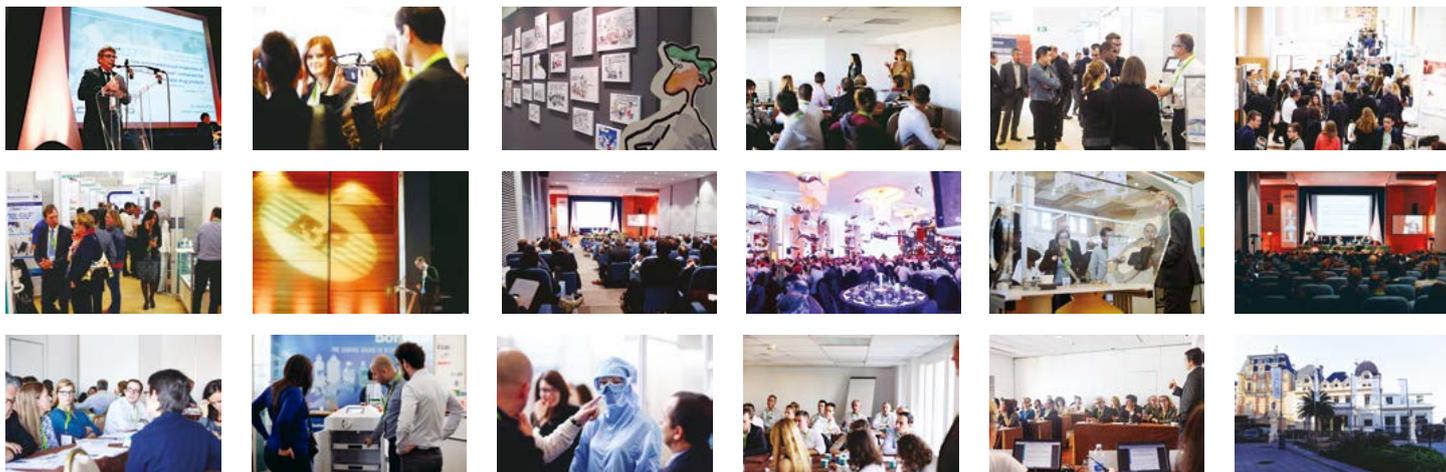
- "...Ces ateliers font la différence avec les autres séminaires équivalents et font la force de ce congrès A3P mais pas seulement." - Sanofi

- "... Un grand professionnalisme et un formidable sens de l'accueil... que dire d'autre!" - Lonza

- "...Un franc succès, certes par le nombre d'inscrits, mais surtout par la grande qualité des conférences et des ateliers, ainsi que de la soirée de gala. De nombreux contacts, idées, nouveautés et j'en passe...." - IMT

- "...N'ayant pas eu l'occasion de venir à Biarritz depuis 2012, j'ai été très heureux de pouvoir renouer des contacts avec des personnes que j'avais quelque peu perdues de vue...." - Lilly

- "...Merci pour cet A3P superbement organisé..." - Charles River



Tous les comptes-rendus sur www.a3p.org*

Actualités A3P

Par Cyril THOUSEAU - Sanofi - Cyril.Thouseau@sanofipasteur.com

G.I.C. A3P élastomères : Une aventure particulière !



Depuis 2012, un sous-groupe du Groupe d'Intérêt Commun (GIC) dédié aux particules s'est constitué sur les élastomères afin de permettre des échanges entre laboratoires pharmaceutiques et fournisseurs d'élastomères. L'objectif de ce groupe était de pouvoir partager les attentes des laboratoires et de leurs clients de sorte à faire émerger des axes de travail au sein des fabricants d'élastomères. Le groupe a pris conscience des travaux d'améliorations à mettre en place. La dynamique d'amélioration et de partage est toujours aussi active, comme en témoigne l'intérêt porté par les membres du GIC A3P et les nombreuses questions posées lors de notre dernière journée A3P Particules à Lyon (1^{er} juillet 2015). Le travail effectué depuis cette date étant conséquent, il est apparu opportun de vous présenter l'ensemble des réflexions menées dans notre GIC. J'en profite pour remercier tous ceux, hommes et femmes, qui ont rendu réalisable un travail de qualité.

1/ Une vision globale pour aboutir à un plan de réduction des risques

La réduction du risque particulière commence par une analyse fine des éléments nécessaires à la mise en place de cette réduction :



Fig A Les 4 éléments importants pour une approche de réduction des risques particulières dans les élastomères

2/ Les attentes des laboratoires pharmaceutiques

Pour les laboratoires pharmaceutiques et leurs clients (organismes, patients, etc.) et les autorités, la présence de particules est source de réclamations, de rappel de lots, de risques sur la santé. L'objectif de chacun est la réduction de ces risques voire même leur élimination. Pour ce faire il est nécessaire d'agir à la source et donc chez chaque fournisseur. Il faut aussi entendre que les laboratoires pharmaceutiques n'achètent pas uniquement un "simple bouchon" mais un objet en contact avec leurs produits pendant toute la durée de vie de ceux-ci. Cet objet est aussi livré dans des conditions à maîtriser.

Ainsi, l'objet de conditionnement à prendre en compte ne se réduit pas qu'au bouchon mais plutôt à son ensemble qu'il est préférable d'appeler système : bouchon + conditions de fabrication + transport + emballage.

C'est ce système que chacun des fournisseurs doit prendre en compte dans la réduction du risque particulière.

Une fois ce système pris en compte, reste à préconiser une cible donc une spécification. Notre groupe a essayé de proposer mais il est difficile de trouver un consensus. **Les enjeux sont nombreux et pour y arriver il faudra probablement beaucoup d'investissements financiers et humains.**

Notre groupe s'est attaché à définir une taille pour les particules visibles. Se basant sur les différentes expériences de chacun, des recommandations des pharmacopées ou normes ISO, nous avons admis que les particules visibles sont celles dont la taille est à minima de 50µm.

Puis nous avons essayé de proposer une spécification. Il ne nous a pas été possible de le faire dans le cadre du GIC A3P. En effet, en fonction des utilisations des clients (prêt à l'emploi, prêt à stériliser, lavé par le client), cela n'a pas été possible. Cependant, la nécessité de fixer un cap est important et si nous voulons pouvoir diminuer ce risque, il est nécessaire d'avoir l'ambition de nos attentes, les particules >100µm devraient donc être sur le long terme à bannir. L'objectif 0 particule > 100µm sur les élastomères prêt à l'emploi serait donc à viser. Pourquoi 100µm ? Il s'agit ici de rester dans les modes visibles et aussi de travailler sur la taille des particules la plus importante prenant part dans le calcul du Particle Count Index (PCI) utilisé par tous les fabricants d'élastomères ($PCI = 0,1 \times n (25-50\mu m) + 0,2 \times n (50-100\mu m) + 1 \times n (>100\mu m)$).

Un autre aspect de la maîtrise de la contamination particulaire est l'aspect interactions contenant-contenu.

Ces fermetures étant en contact avec les produits tout le long de leur vie, les formulations et leurs revêtements doivent permettre un minimum (voire pas) d'interactions. Le choix d'un élastomère devient alors ici très complexe. Le but recherché est de choisir une formulation d'élastomère en adéquation avec le produit, c'est-à-dire avec le minimum d'interaction pouvant créer des particules et donc un risque de toxicité avéré. Dans le cas où des particules seraient retrouvées, une évaluation toxicologique des composants de la particule devrait être effectuée.

Ainsi la connaissance pointue des produits ainsi que des formulations des élastomères deviendront probablement un des axes principaux de futures réflexions à développer (recherche d'extractibles par analyses physico-chimiques des formulations dans des conditions extrêmes puis comportement des produits vis-à-vis de ces extractibles). Cette approche pourrait permettre de prévoir et donc choisir la bonne formulation d'élastomère.

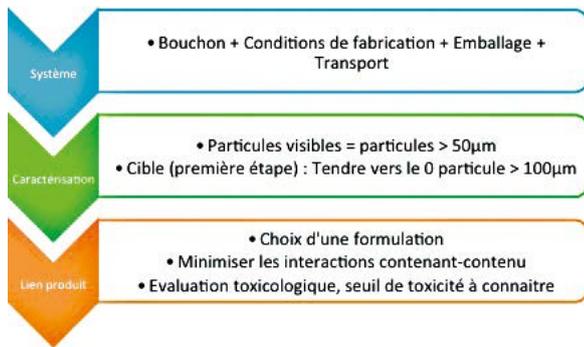


Fig B : Les principales attentes clients

3/ Description du procédé

Les étapes principales de fabrication des élastomères sont connues (mélange, moulage, ébarbage, lavage, revêtement, emballage). Cependant, chaque fabricant a son propre procédé et ses usines associées. Chaque fournisseur devra porter attention à ce que la description des procédés soit aussi fine que possible de sorte à identifier les zones à risque.

La description des procédés prendra principalement en compte :

- Les matières premières et leurs emballages
- Les conditions environnementales de chaque étape
- Les contenants et emballages intermédiaires de stockage

Les éléments de contact touchant les élastomères et/ou leurs états intermédiaires

- Les équipements de fabrication
- Les outils de prélèvement
- Les conditions d'habillages
- Les conditions de transport
- Les emballages finaux
- Etc.

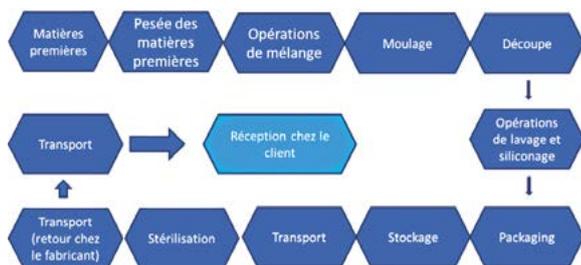


Fig C : Description du procédé de fabrication d'un élastomère prêt à l'emploi

4/ Un outil de gestion du risque commun : L'AMDEC

Très vite, il a été fondamental d'avoir une approche commune de sorte à ce que les fabricants d'élastomères puissent développer la même démarche. L'outil principal développé a été l'Analyse des Modes de Défaillances, de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC). 4 sessions ont permis de décrire de manière exhaustive le procédé de fabrication des élastomères et d'y associer cette démarche. Les fournisseurs ont donc un outil commun leur permettant d'établir une analyse de risque globale. L'ensemble des éléments est disponible et consultable sur le site de l'A3P (www.a3p.org).

Cette AMDEC doit impérativement vivre et ne pas rester figée à la seule situation initiale. C'est l'intérêt de cet outil qui permettra de montrer la diminution du risque particulaire lorsque les plans d'actions seront mis en place.

Grille de cotation

Cotation		Gravité
1	Par design, conception, ou durant l'exploitation, une particule ne peut pas être présente dans le procédé (robustesse)	
3	L'exploitation inappropriée de l'étape de procédé engendre une diminution de la robustesse (variation des conditions prévues, validées) et génère des particules quelqu'en soit le nombre et l'origine	
9	Si inconnu (absence de données) inhérent au procédé, il existe au moins un mode de défaillance qui permet la présence de particules dans le procédé quelqu'en soit le nombre et l'origine	
Cotation		Occurrence
1	Aucune défaillance sur les lots	
3	défaillance ponctuelle (1-10%)	
5	défaillance récurrente n'affectant pas systématiquement tous les lots (11-99%)	
9	au moins une défaillance a été enregistrée pendant la fabrication de chaque lot	
Cotation		DéTECTABILITÉ
1	Détection systématique immédiate du mode de défaillance	
3	Détection systématique différée du mode de défaillance	
5	Détection non systématique du mode de défaillance	
9	Aucune détection du mode de défaillance	

Cotation du Risque

G*O	DéTECTABILITÉ			
	1	3	5	9
1	1	3	5	9
3	3	9	15	27
5	5	15	25	45
9	9	27	45	81
15	15	45	75	135
27	27	81	135	243
45	45	135	225	405
81	81	243	405	729

Exemple d'AMDEC

Étape du Processus	Mode de Défaillance	Effets de la Défaillance pour les clients du processus	G	Causes de la défaillance	F	C Critères entourés lorsqu'on se cause ou amène la défaillance		I	Actions pour éliminer la Défaillance ou atténuer le Damp. sélection	T	P	O	P	D	P	
						O	I									
Definition du besoin client	ZSD - Absence de critère spécifique dans le choix de la formulation du produit et du mode de silicone / traitement de surface	Produit motté		Critères définis par le fabricant / Choix limité sur les particules générées client / Niveau de bruit	Unicité	1	1	1								
Spécification des MP & AC	Absence de spécification MP sur (niveau) contamination	Mauvais comportement du mélange final		Non identification du risque associé	Unicité	1	1	1								
Réception MP, ingrédients & AC	Contamination apportée par le MP	Poids MP apportée dans la formulation		Distance de séparation	Unicité	1	1	1								
	Non intégré dommage visible du packaging lors des MP	Contamination		Distance de séparation	Unicité	1	1	1								

L'AMDEC évolue



5/ Détection et caractérisation

Détection :

Les méthodes principales existantes de détection de particules sont les suivantes :

Méthode/référentiel	Principe	Application	Limite Principale
Pharmacopées – Particules visibles (Phe 2.9.20, U.S.P. <790>)	Evaluation visuelle avec fond noir/fond blanc	IPC ou Libératoire – Produits Injectables et Elastomères	Statistique
Pharmacopées – Particules non visibles (Phe 2.9.20, U.S.P. <788>)	Comptage particulaire (particules > 10µm et > 25µm)	IPC ou Libératoire – Produits Injectables	Statistique
ISO 8871-3	Comptage particulaire 3 classes de tailles de particules	IPC et Libératoires - Elastomères	Statistique – non réalisée sur le produit fini dans son emballage
Système de Vision à 100%	Détection de particules par Caméras	Elastomères	Détection de particules dont la taille est importante

La méthode utilisée par les fabricants d'élastomères correspond à celle décrite dans la norme ISO 8871-3. Les résultats sont ensuite intégrés dans le calcul du PCI (voir paragraphe précédent). Or en appliquant les spécifications des fabricants rapportées aux produits injectables, il serait possible de retrouver des quantités non négligeables dans ces produits. Ce n'est en réalité bien évidemment pas le cas.

Devant ce constat, nous souhaitons améliorer la méthode actuelle. Une réflexion est actuellement en cours au sein du groupe de travail. Les orientations prises sont les suivantes :

- **Prélèvement des bouchons dans les sachets identiques à celles utilisées pour leur conditionnement final**
- **Ratio nombre de bouchons/volumes de sachets proche de celui du conditionnement final**
- **Versement direct des bouchons dans un contenant utilisé pour l'analyse (simulation de transfert des bouchons sur les équipements des laboratoires pharmaceutiques)**
- **6 extractions maximales avec un ratio Particules Emises/ Particules Totales maxi de 10% (principe de la norme ISO16232-2)**

Les derniers essais ont montré des résultats encourageants avec des pistes d'améliorations identifiées par le groupe afin de garantir ce taux de 10% (représentant un taux de récupération de 90%). Les prochaines sessions de travail seront axées sur ces améliorations.

Caractérisation :

La caractérisation des particules est un des éléments importants pour les investigations nécessaires lors de l'apparition de particules. Ces caractérisations peuvent s'effectuer grâce à deux méthodes pouvant être complémentaires (une description détaillée de ces deux méthodes est consultable sur le site d'A3P).

Spectrophotométrie Infra-rouge, carte d'identité des particules principalement organiques ou des composés des élastomères (groupes chimiques).

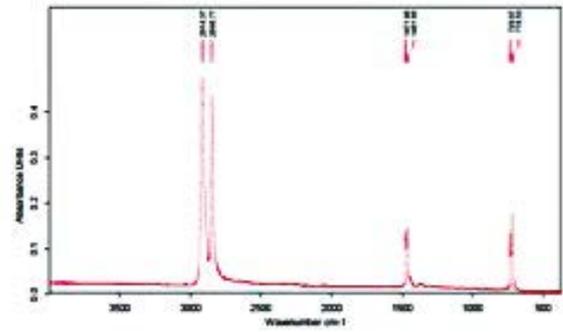


Fig D : Exemple de spectre infra-rouge

Microscopie à Balayage Electronique couplée à une sonde EDX, permettant une identification individuelle des éléments chimiques et une semi-quantification de chaque élément.

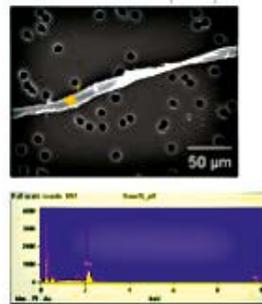


Fig E : Exemple de données générées par le MEB/EDX

Outre les identifications pouvant être réalisées lors de l'apparition des particules par chaque entité, ces méthodes pourront permettre :

- De constituer des défauts très détaillés afin d'avoir une cartographie des particules générées sur chaque étape des procédés des fabricants d'élastomères.
- D'améliorer la maîtrise de l'apparition de ces particules ou leur suppression
- D'échanger avec chaque client lors des investigations

6/ Conclusion

Le groupe de travail sur les élastomères a permis de partager les attentes des marchés actuels. Une démarche commune a été mise en place et partagée au sein du groupe. En fixant des cibles à atteindre, une méthode commune de gestion des risques, des méthodes de détection et de caractérisation communes, les fabricants d'élastomères peuvent développer des plans de réduction particuliers.

Références :

- ISO 8871-3 Éléments en élastomère pour administration parentérale et dispositifs à usage pharmaceutique -- Partie 3: Détermination des particules libérées
- ISO 16232-2 Véhicules routiers -- Propreté des composants des circuits de fluide -- Partie 2: Méthode d'extraction des contaminants par agitation
- Pharmacopée Européenne, version en vigueur
- 2.9.19 Particulate Contamination: Sub-visible Particles
- 2.9.20 Particulate Contamination : Visible particles
- ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINES
- EVALUATION AND RECOMMENDATION OF PHARMACOPOEIAL TEXTS FOR USE IN THE ICH REGIONS ON TEST FOR PARTICULATE CONTAMINATION: SUB-VISIBLE PARTICLES GENERAL CHAPTER Q4B ANNEX 3(R1)
- PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2)
- QUALITY RISK MANAGEMENT Q9
- Pharmacopée Américaine, version en vigueur
- <787> Subvisible Particulate Matter,
- <790> VISIBLE PARTICULATES IN INJECTIONS

Actualités A3P

Par Roland GUINET - RGmp Compliance

Étude sur le programme d'incubation des milieux de culture.

Les programmes d'incubation des contrôles relatifs à la qualité microbiologique des produits pharmaceutiques stériles tels que les contrôles de stérilité, la surveillance de l'environnement (EM) et les simulations de procédés aseptiques (APS) peuvent varier selon les recommandations et selon les fabricants alors que rien n'est actuellement indiqué dans l'Annexe 1⁽²⁾:

- les contrôles de stérilité réalisés selon la méthode harmonisée décrite au 2.6.1. de la Pharmacopée Européenne⁽¹⁴⁾ doivent être incubés à 20-25°C (Bouillon Trypticase Soja = BTS) et 30-35°C (thioglycolate),
- pour les simulations de procédés aseptiques le document du PIC/S⁽¹¹⁾ préconise d'incuber d'abord à 20-25°C puis à 30-35°C alors que d'autres textes FDA et PDA indiquent une seule température située entre 20 et 35°C^(3,13),
- pour les contrôles environnementaux les textes recommandent d'incuber le prélèvement à une seule température située entre 20 et 35°C⁽¹⁷⁾ ou aux 2 températures 20-25°C et/ou 30-35°C^(3,16,18) alors que seuls certains fabricants réalisent 2 prélèvements au même endroit dont l'un est incubé à 20-25°C et l'autre à 30-35°C⁽⁶⁾. Il paraît de plus en plus certain que l'incubation d'un

seul prélèvement à 2 températures différentes entraîne un choc thermique réduisant le taux de récupération^(10,15).

Deux études récentes réalisées par GSK (Ian Symonds et Mike Davies, en cours de publication) et par Novartis⁽⁴⁾ sur les températures d'incubation des contrôles environnementaux ainsi que la monographie PHSS 20⁽¹⁵⁾ et l'enquête A3P de 2012⁽⁶⁾ semblent indiquer que :

- les meilleurs résultats quantitatifs sont obtenus en utilisant 2 prélèvements dont l'un est incubé à 20-25°C et l'autre à 30-35°C.
- il n'y a pas de différence significative entre les milieux TSA et Sabouraud (SDA) pour la recherche des moisissures, même si SDA donne de meilleurs résultats.
- l'utilisation d'un seul prélèvement incubé successivement aux 2 températures 20-25°C puis 30-35°C ou l'inverse donne les moins bons résultats.
- bien que les souches de moisissures entretenues au laboratoire poussent à 30-35°C celles de l'environnement préfèrent 20-25°C.

Objectif

Le GIC A3P Annexe 1 souhaite formuler des recommandations pour les températures

d'incubation lors des recherches de contaminations microbiologiques dans ses propositions de modifications pour la révision de l'Annexe 1⁽⁹⁾ et ceci a été approuvé par une majorité des participants à la table ronde du dernier congrès international le 16 octobre 2014⁽⁷⁾. Afin d'appuyer ces recommandations sur des résultats expérimentaux, une étude multicentrique, soutenue par bioMérieux, a été proposée par A3P à la fois pour les températures d'incubation des contrôles environnementaux sur des milieux gélosés (étude EM) et pour les températures d'incubation des simulations de procédés aseptiques en milieu liquide (étude APS/MFT).

Cette étude a été réalisée sur 4 sites de fabrication de produits pharmaceutiques ou à usage pharmaceutique.

Elle a été réalisée au cours du premier semestre 2015 et l'analyse statistique des résultats devrait être finalisée début 2016.

Une première restitution est prévue lors des prochaines rencontres de Microbiologie à Tours, les 15 et 16 mars prochains et la publication du draft de la prochaine révision de l'Annexe 1 au cours du premier semestre 2016.

Bibliographie :

1. EMA and PIC/S, Concept paper on the revision of annex 1 of the guidelines on good manufacturing practice – manufacture of sterile medicinal products, February 2, 2015.
2. Eudralex Volume 4, EU GMP Annex 1. Manufacture of sterile medicinal products; Novembre 2008.
3. FDA, Guide on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice. Guidance for Industry, September 2004.
4. Gordon O., Berchtold M., Staerk A., Roesti D., Comparison of Different Incubation Conditions for Microbiological Environmental Monitoring, PDA J. Pharm. Sci. and Tech., 68, 394-406, 2014.
5. Guinet R., Interprétations de l'Annexe 1 des GMP Européennes : excès et insuffisances La Vague n°34, 25-28, juin 2012.

6. Guinet R., Les contrôles environnementaux suite aux rencontres de Microbiologie, La Vague n°35, 17-19, septembre 2012.
7. Guinet R., Résultats du vote sur les propositions du GIC A3P de modifications envisageables de l'Annexe 1, La Vague n°44, 7-8, janvier 2015.
8. Guinet R., Propositions du GIC A3P Annexe 1 pour la révision de l'Annexe 1, La Vague n°46, 33-35, juin 2015.
9. Guinet R., Propositions de modifications spécifiques de l'Annexe 1, La Vague n°47, 27-32, septembre 2015.
10. Horn J., Backes M., Schepp E.-C., P. Wenz P., Optimal Growth Conditions for Isolating Environmental Fungi from Air, 105th ASM meeting, Atlanta, June 5-9, 2005.
11. PIC/S, PI 007-05, Recommendation on the validation of aseptic processes,

July 2009.

12. PIC/S, PI 032-2, GMP Annex 1 revision 2008, Interpretation of most important changes, January 2010.
13. PDA TR22, Process simulations for aseptically filled products, 2011.
14. Pharmacopée Européenne, Stérilité 2.6.1.
15. PHSS, Bio-contamination, Technical Monograph 20, September 2014.
16. U.S.P. 34 chapter <1116>, Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments.
17. U.S.P. 35 chapter <1116>, Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments.
18. WHO, Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities, November 2012.

Actualités A3P

15 & 16 mars 2016 à Tours, rendez-vous aux 12^{ème} Rencontres A3P de Microbiologie



Organisé tous les deux ans, cet évènement professionnel et unique tire ses richesses et son succès des débats et confrontations d'idées sur les sujets d'actualité en Microbiologie. Animé par des experts qui souhaitent partager leurs connaissances, leurs expériences et leurs points de vue, c'est le rendez-vous incontournable des sociétés concernées par la contamination.

Durant 2 jours, le programme articulé autour des 3 activités : conférences, ateliers interactifs animés par nos partenaires et exposition, vous garantit des échanges scientifiques et techniques de qualité.



10 Conférences



"Sécurité microbiologique des produits cosmétiques : Actualités et enjeux"

Alain CROZIER - ITS JNJ

"Focus sur les méthodes de décontamination des matières premières"

Adrien AGOULON - AGROHALL

"Témoignage L'Oréal" : Validation et essais d'applicabilité de la méthode de détection par cytométrie en flux & démarche de "Change control"

Coralie AUSSUDRE - L'OREAL

"Contrôle de la biocharge : état des lieux , problèmes et solutions"

Véronique ESTEVE DAIX - SANOFI

"Tests de stérilité alternatif dans l'industrie pharmaceutique"

Lucile PLOURDE OWOBI - SANOFI PASTEUR & Thierry BONNEVAY - SANOFI PASTEUR

"Implantation et validation d'une méthode alternative rapide et polyvalente au laboratoire"

Philippe TAILLIEZ - ACM PHARMA

"Automatisation des contrôles environnementaux microbiologiques. Quelle(s) solution(s) ?"

Lucile PLOURDE OWOBI - SANOFI PASTEUR

"Stratégie de contrôles microbiologiques des procédés de thérapie cellulaire et génique"

Stéphanie BUCHER - CELL FOR CURE groupe LFB

"Identifications des micro-organismes"

Arnaud CARLOTTI - EUROFINS

"Contrôle de l'environnement - Présentation des résultats de l'étude sur la température d'incubation"

Roland GUINET - RGmp Compliance

Informations & inscription sur www.a3p.org

MicroBiologie

Les Ren@ntres

12 Thématiques d'Ateliers

Vous avez la possibilité d'assister à l'ensemble des ateliers interactifs de ces journées. Ces ateliers interactifs organisés par les Partenaires, sont l'occasion d'assister à des démonstrations, de s'informer sur les techniques existantes, les nouveautés en avant-première et de faire part de ses expériences et commentaires. Quatre sessions de 1 heure vous seront proposées afin de participer à tous les ateliers.



- # Environnement: la surveillance des paramètres physiques au laboratoire de contrôle.
- # Contrôles d'environnement : actualités et perspectives
- # Identification : quoi de neuf depuis l'avènement des technologies en identification ?



- # Technologie d'ATPmétrie amplifiée pour une détection microbienne en 24h et un test de stérilité en 4/7 jours : focus sur les produits complexes (non filtrables, opaques, huileux...)
- # Amélioration de votre monitoring environnemental avec l'approche d'identification polyphasique et le suivi de tendances



- # Low Endotoxin Recovery – Where does the industry stand?



- # Développement et validation d'un essai de stérilité rapide : Retour d'expérience de la société CONFARMA France, expert en contrôle qualité.
- # Echanges d'expériences sur la surveillance microbiologique des lignes de production aseptique en isolateur ou RABS. Nous partagerons les visions d'industriels pharmaceutiques.



- # Aucun micro-organisme ne vous échappera ! Présentation du nouveau système de contrôle microbien en temps réel destiné aux eaux pharmaceutiques.



- # L'offre Thermo Fisher Scientific renouvelée
- # Contrôle microbiologique de l'environnement en salle blanche ou isolateur... comment valider une nouvelle offre de milieux... et un nouvel applicateur de boîtes contacts innovant ?
- # Système d'identification MicroSEQ pour le contrôle environnemental

Sociétés exposantes



ACM PHARMA
ASSOCIATES OF CAPE COD
BACTUP
BECTON DICKINSON
BIOMERIEUX
BIOQUELL
CHARLES RIVER
CONFARMA

EUROFINS PHARMA QUALITY
CONTROL
GETINGE-LA-CALHENE
ICARE
LONZA
MERCK MILLIPORE
METIS BIOTECHNOLOGIES
METTLER TOLEDO

OXOID SAS
RAPIDMICRO BIOSYSTEM
SGS LIFE SCIENCE SERVICES
SKAN
STERIS
SYMBIOSE ENVIRONNEMENT
THERMO FISHER SCIENTIFIC
UPS CONSULTANT

Informations & inscription sur www.a3p.org

Les méthodes rapides en microbiologie.

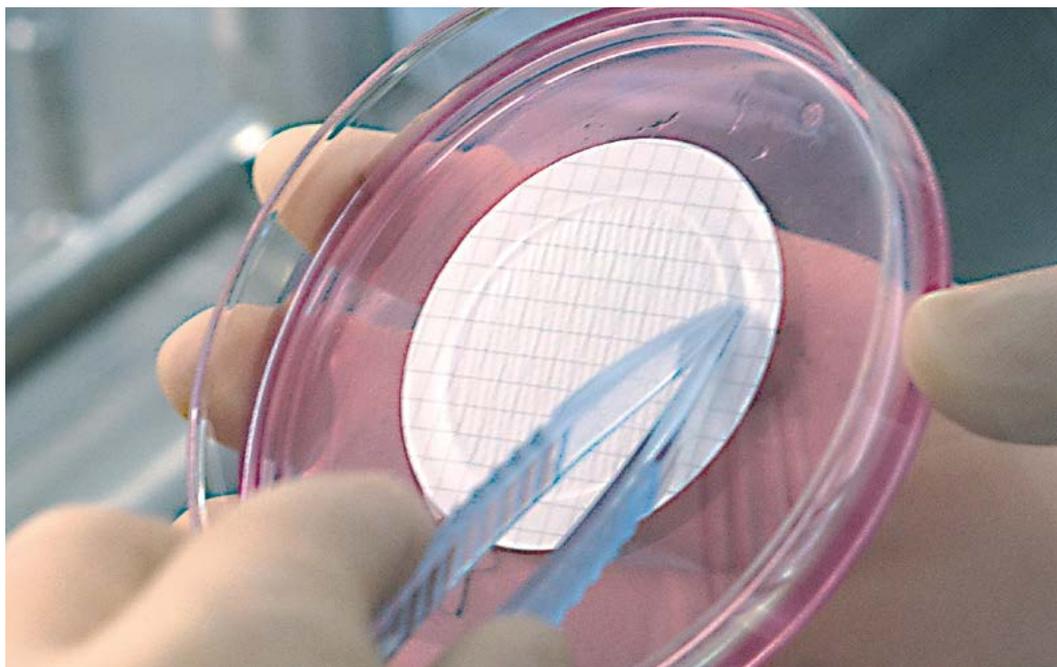
Une opportunité pour tout un chacun au sein de l'entreprise.

Par Guy ROEHRIG - Lilly

guyr@lilly.com

Jusqu'à tout récemment la question que nous nous posions était de savoir quelles informations nous serions prêts à sacrifier pour arriver plus vite à des résultats. Toutes les méthodes disponibles sur le marché étaient certes rapides, mais aussi destructives. Nous étions en mesure de détecter relativement vite la présence de micro-organismes, mais nous ne pouvions plus les identifier.

Ce qui peut être gênant lors de la détermination de la charge microbienne d'un produit, ou encore lors de l'utilisation de ces techniques pour un test de stérilité. À moins de dédoubler les tests, au grand dam des financiers, (un premier test pour le comptage rapide et le second pour l'identification dans l'éventualité d'une contamination), ces méthodes ne présentaient pas beaucoup d'intérêt. Sans parler de la fiabilité entre les deux répliquâts ! Si l'on ajoute à cela les niveaux très bas de contamination auxquels nous sommes sensés nous situer, les statistiques ne nous seraient pas favorables et les résultats de deux tests menés conjointement seraient sûrement différents.



Que veut dire "rapide" dans ce contexte ? Une réponse quasi-instantanée comme pour la technique d'identification MALDI-TOF exposée ci-dessous ne prête pas à discussion. Mais qu'en est-il des méthodes de dénombrement non destructives, qui pour la plupart, comportent une phase de croissance des microorganismes. Sommes-nous prêts à attendre, certes moitié moins de temps, mais tout de même plusieurs jours, avant d'éteindre notre soif scientifique ? Nous souhaiterions pourtant laisser de moins en moins de place à la subjectivité liée à cette science, que ce soit lors des comptages, de l'aspect des colonies, de l'interprétation des colorations de Gram ou des virages d'indicateurs colorés. Cet article ne se veut ni limitatif, ni exhaustif, son seul but est de partager une longue expérience dans le domaine de la microbiologie qu'elle soit traditionnelle ou rapide.

Le point de vue réglementaire

Les industriels sont encore très prudents quant à l'usage de méthodes rapides, ils ne se sentent que peu encouragés par les pharmacopées qui insistent pourtant sur leur utilisation, mais en des termes encore timides, proposant l'introduction de ces nouvelles technologies lors "d'intervention corrective proactive" ou en vue de "l'amélioration significative de la qualité des contrôles". Certaines d'entre elles proposent même un guide pour nous aider à choisir une méthode alternative en complément ou en remplacement d'approches conventionnelles.

Un enthousiasme partagé ne pourrait qu'être profitable au développement de ces méthodes rapides. La comparaison avec les techniques traditionnelles que nous maîtrisons reste la règle, même si nous reconnaissons tous des performances supérieures aux nouvelles technologies. **Que ce soit pour la détermination de présence ou d'absence de microorganismes ou pour leur dénombrement, les critères de vérification, incontournables et indispensables à raison, s'alignent sur ceux de nos collègues chimistes (exactitude, fidélité, spécificité, limite de détection et/ou de quantification, robustesse, linéarité et intervalle de mesure).** Ce qui représente, pour certains de nos confrères biologistes, plus ou moins réfractaires au changement dans ce domaine, un défi apparemment insurmontable, mais qui l'est parfaitement, si l'on pense aux bénéfices tant d'un point de vue qualitatif et quantitatif, que nous apporte le confort de disposer d'une méthode rapide validée en bonne et due forme, répondant, de surcroît, pleinement aux exigences réglementaires très précises mentionnées dans les pharmacopées. (Pharmacopée Européenne : 5.6.1 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique. – U.S.P. <1223> Validation of alternative microbiological methods.) Nous pouvons de surcroît compter sur la compétence, l'implication, l'aide et le soutien total des fabricants d'équipements de microbiologie rapide dont la proactivité nous a conduits à la situation actuelle, à savoir : disposer de résultats microbiologiques plus rapidement et de façon plus fiable que par le passé.



- Système automatisé rapide et facile à former.
- Utilisation des pompes à air pour minimiser l'investissement.
- Adapter pour une utilisation avec les seringues.

Pour ces méthodes, les entreprises commercialisant des équipements pour la microbiologie rapide préfèrent rester proches des pharmacopées

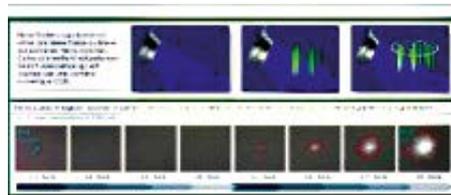
Les techniques

1. Les méthodes de dénombrement

En ce qui concerne les méthodes qualitatives de présence/absence de microorganismes, la difficulté d'établir une relation précise, pour un faible nombre de microorganismes, entre des unités relatives de lumière et le nombre de microorganismes présents en font de parfaits candidats aux validations de méthodes alternatives.

Pour les méthodes de dénombrement quantitatif, les entreprises mettant sur le

marché des équipements de microbiologie rapide préfèrent rester proches des pharmacopées pour éviter de voir leurs méthodes classées comme méthodes alternatives. De ce fait, ces méthodes dites rapides sont de plus en plus basées sur la détection, par des artefacts physiques et optiques, de micro colonies visibles grâce à la technologie bien avant que notre œil soit capable de les détecter. Dans ce dernier cas, une validation plus traditionnelle, dont nous maîtrisons tous parfaitement le principe et qui facilite le changement, s'applique. Dans le domaine du dénombrement, la référence reste -à tort probablement et l'avenir nous le dira- la méthode classique du comptage des colonies sur une gélose, à l'œil humain. Si on la compare à l'œil humain, les méthodes rapides permettent de réduire de moitié le temps de détection des microorganismes.



Le système détecte et compte les colonies en moitié moins de temps que la culture par méthode traditionnelle.

L'utilisation de milieux de culture traditionnels (U.S.P./PE/JP), l'absence d'ajout de réactifs et le dénombrement effectif en CFU (colonies formant unité) font de ces équipements des compteurs de colonies automatisables ou automatisés.

L'automatisation de cette technologie a permis à une entreprise spécialisée en microbiologie rapide de mettre récemment sur le marché un équipement basé sur ce principe. Il permet de réaliser à la fois des tests de dénombrement de microorganismes (ou test bioburden pour le contrôle de l'eau ou des solutions pharmaceutiques avant filtration stérilisante) à l'aide de milieux adaptés (TSA, R2A, SDA etc.), de contrôle de l'environnement de production (TSA avec lécithine te tween etc.) et des tests de stérilité qui pourraient intéresser bien des unités de production parentérale soumises à ces contrôles réglementaires.



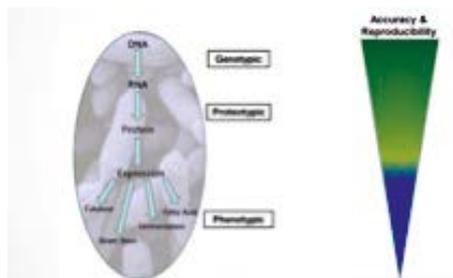
La méthode de dénombrement (bioburden) utilise des tailles de membrane de filtration et des types de milieux préconisés dans les pharmacopées.

Ces méthodes représentent une avancée certaine, tant du point de vue de la qualité, de la réduction des coûts de stockage que des délais de mise sur le marché. Elle permet également le contrôle de produits pharmaceutiques à courte durée de vie pour lesquels un contrôle de stérilité d'une durée minimale de 14 jours n'était pas envisageable.

2. Les méthodes d'identification

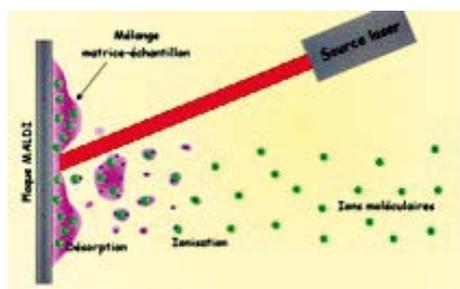
Dans ce domaine également, outre les méthodes phénotypiques, le choix reste relativement limité. La méthode de référence (bien que discutable et discutée) reste le séquençage de l'ADN ("Gold standard"). Cette technique est réputée être la plus fiable, la plus précise et la plus reproductible, mais reste indéniablement la plus onéreuse. Sa mise en œuvre nécessite non seulement des analystes expérimentés, mais également des spécialistes en classification phylogénétique pour les organismes présentant un résultat brut non reportable, ce qui dans nos industries ne représente pas moins de 20% des cas lors de la surveillance des environnements de production. On rajoutera à cela les coûts importants de matériels, de réactifs et de main d'œuvre. Si dans bien des cas, l'identification au genre et à l'espèce nous permet de mener des investigations approfondies lors d'incidents de production, elle se résume souvent en des recommandations de nettoyage approfondi des zones dans lesquelles ces microorganismes ont été retrouvés. Ce dernier point, petit luxe que l'on peut s'offrir en période de vaches grasses, est rapidement remis en question dans le contexte actuel. Sorti de cette petite note d'humour, il est certainement très important, pour des environnements de production, a fortiori parentérale, de bien connaître la flore présente au genre et à l'espèce afin de pouvoir l'éradiquer ou tout au moins la maîtriser. Des techniques rapides, nous permettent d'obtenir ces résultats tout en faisant de substantielles économies par rapport à la méthode de référence, sans avoir à sacrifier d'importantes informations pour cette application.

La mise en place de ces méthodes d'identification est déjà bien avancée car il y a peu de brides réglementaires en la matière, en tout cas pas de contraintes complémentaires par rapport aux méthodes phénotypiques que nous utilisons jusqu'ici. La méthode protéotypique MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) est l'une de ces méthodes qui permet l'obtention d'identifications de haute qualité à moindre coût.



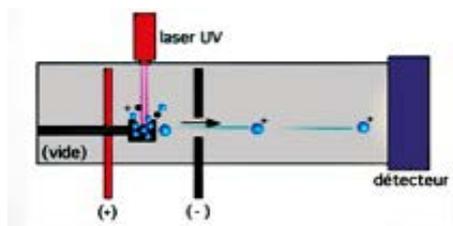
Les méthodes d'identification et leur lien avec leur précision et leur reproductibilité

Elle fait appel à la spectrophotométrie de masse. Extrêmement simple à mettre en œuvre, celle-ci ne demandera que quelques minutes à un opérateur formé et quelques euros au laboratoire, pour obtenir un spectre de protéines qui sera comparé à une base de données validée.



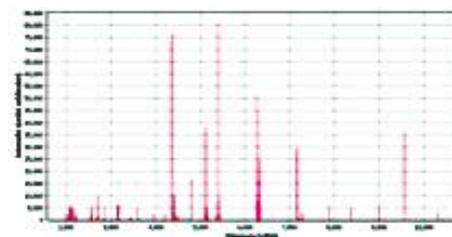
L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet).

Une fraction de colonie à identifier est placée sur une plaque puis mélangée au réactif (matrice). Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions peuvent être chargés positivement ou négativement selon leur nature. Les protéines et peptides ont des groupements accepteurs de protons et sont ionisés positivement. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. **La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite.**



Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui

traite les données et restitue les résultats sous forme de spectre. Les données enregistrées sont calculées afin de transposer les résultats dans un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule.



L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal et l'axe des abscisses indique la taille de la molécule en Daltons.

L'équipement intègre les différents pics enregistrés et recherche l'identification du germe correspondant dans la base de données de référence des microorganismes.

C'est au niveau de cette base de données qu'il est important de se positionner. Quel que soit le fabricant du spectrophotomètre de masse (ils sont 2 à se partager le marché), il conviendra de bien choisir cette base de référence de microorganismes (3 industriels majeurs les commercialisent). Certaines de ces bases commercialisées sont orientées vers le "clinique" et sont essentiellement sollicitées par les laboratoires hospitaliers et d'analyses biologiques pour identifier les microorganismes responsables de pathologies humaines. D'autres bases à dominante "industrie" permettront aux unités de productions pharmaceutiques et autres de suivre de façon précise l'évolution de leur flore dans les environnements de production. On portera également attention à la taille de la base de microorganismes de référence. On comprendra aisément que plus une bibliothèque de référence comportera de microorganismes, plus les chances d'identifier un microorganisme inconnu sera grande. Quelle que soit la technique utilisée -phénotypique, génotypique ou protéotypique- l'évolution des microorganismes et de leur classification étant permanente, il faudra régulièrement mettre à jour sa bibliothèque de référence (1x par an au vu de l'évolution actuelle de cette science), ce qui entraîne bien sûr sa revalidation. Pour effectuer ce travail fastidieux, un des grands laboratoires spécialisé dans cette technique et disposant de la plus grande base de référence dans le domaine de l'industrie propose une comparaison des spectres obtenus, non pas à une base de données interne à votre

laboratoire, mais à ses propres bases de données, régulièrement mises à jour et validées, de façon à vous dispenser de ce travail fastidieux.

Mais quel que soit votre choix de matériel et de fournisseur, cette méthode rapide vous permettra d'identifier les microorganismes non pas en 2 jours, ni même en 1 jour comme pour la méthode génotypique de référence, mais en quelques minutes, vous permettant ainsi d'améliorer votre réactivité face à une tendance ou une investigation portant sur des microorganismes.

Spécies	Score	Probabilité
Staphylococcus aureus	1.000	100%
Staphylococcus epidermidis	0.999	99.9%
Staphylococcus saprophyticus	0.998	99.8%
Staphylococcus sciuri	0.997	99.7%
Staphylococcus carnosus	0.996	99.6%
Staphylococcus epidermidis	0.995	99.5%
Staphylococcus epidermidis	0.994	99.4%
Staphylococcus epidermidis	0.993	99.3%
Staphylococcus epidermidis	0.992	99.2%
Staphylococcus epidermidis	0.991	99.1%
Staphylococcus epidermidis	0.990	99.0%

Exemple de résultat obtenu lors d'identification par spectrophotométrie de masse MALDI-TOF

3. Le test de recherche des endotoxines bactériennes

Parce qu'il existe depuis plusieurs années une variante rapide de cet essai (résultat en 15 min.) qui permet de gagner du temps par rapport à la méthode traditionnelle (résultat en 1h au mieux), et qui de surcroît ne détecte pas de microorganismes, mais leurs résidus au moment de leur lyse (endotoxines bactériennes), le test LAL est souvent oublié quand on mentionne les méthodes rapides. Une fois le point de la viabilité des limules écarté (*), la problématique de ce test reste la même que pour les méthodes proprement microbiologiques. Premièrement, sommes-nous prêts à utiliser une méthode alternative (facteur recombinant C) avec sa multitude de critères à valider (voir§2.) ou préférons-nous suivre une approche plus conservatrice et nous limiter à la vérification de la méthode pharmacopée LAL (méthode et variantes du Lysat d'Amebocytes de Limules)? Deuxièmement, souhaitons-nous mettre en place une méthode automatisée ou automatisable ? Ce qu'il faut savoir, c'est qu'il existe à l'heure actuelle un système de cartouches pré-calibrées, faisant appel à des gammes archivées, ne nécessitant pas de réaliser de

gamme d'étalonnage et pouvant fournir un résultat en moins de 15 minutes.

Cette avancée peut servir les laboratoires ne réalisant que peu de tests. Pour les plus gros "consommateurs", la question de l'automatisation de la méthode pharmacopée ou de la méthode alternative devra être évaluée au cas par cas, sachant que la seule méthode automatisée commercialisée ("clés en main") actuellement est susceptible d'entraîner une réduction des frais de main d'œuvre plus ou moins équivalente à l'augmentation des frais de consommables. Et c'est ce constat qui nous mènera au point suivant.

La mutation d'une profession

Si les méthodes rapides comme les techniques d'identification sont une manne pour les financiers, elles n'en restent pas moins source d'appréhension.

Appréhension, pour les investisseurs, qui n'ont à ce jour que peu de recul, leur utilisation étant encore limitée.

Appréhension, pour les décideurs, qui seront les boucs émissaires au moindre petit défaut

de jeunesse de ces techniques et les victimes de leur ouverture d'esprit concernant les technologies de l'avenir.

Appréhension, pour les analystes surtout, qui se voient déchargés de plus de la moitié de leur temps de travail, quelle que soit la méthode évoquée.

Ces méthodes sont destinées à "dégager du temps qu'ils pourront passer à des activités plus gratifiantes" aux dires de leurs promoteurs. Et s'il est vrai que ces méthodes, pour la plupart automatisables, prennent en charge les tâches routinières et parfois bien ingrates, il suffira d'un rapide exercice de remue-méninges pour en dégager les opportunités bien réelles qu'elles offrent aux techniciens de laboratoire.

Pour combler nos attentes les équipements devront être utilisés par des techniciens ayant une parfaite connaissance de leur fonctionnement et de leurs possibilités. Ces équipements ramèneront à coup sûr, leur lot de nouveaux petits problèmes à résoudre. L'évolution du métier se fera vers ces postes qui demandent bien plus de prises de décision que d'exécution. Les plus créatifs

d'entre nous utiliseront leurs connaissances pour appliquer d'autres méthodes existantes au labo à ces nouveaux équipements (comptages, tests AET, tests de fertilité etc.).

Et c'est libérés des suspicions d'erreurs de dilutions ou de contaminations par l'analyste, toujours faciles mais encore trop souvent mises en avant, libérés de la frustration de ne pouvoir suivre jusqu'au bout les investigations résultant de leurs travaux par manque de temps, qu'ils pourront se projeter dans l'avenir. Plus de problème d'intégrité de données brutes non plus. Cette adaptation nécessitera la participation de tous les acteurs (RH, encadrement, techniciens ...) afin de surmonter cette peur de l'innovation et d'acquiescer l'ouverture d'esprit nécessaire pour affronter le monde professionnel de demain.

()Atlantic States Marine Fisheries Commission Stock Assessments. http://www.asmfmc.org/uploads/file//52a88db82013HSC_StockAssessmentUpdate.pdf*

South Carolina Department of Natural Resources, Marine Resources Research Institute.

www.dnr.sc.gov/marine/mrri/SEAMAP/seamap.html

REMEMBER IN THE OLD DAYS WHEN THE
ENDOSAFE®-PTS™ HAD BUTTONS?



INTRODUCING THE ENDOSAFE® NEXGEN-PTS™

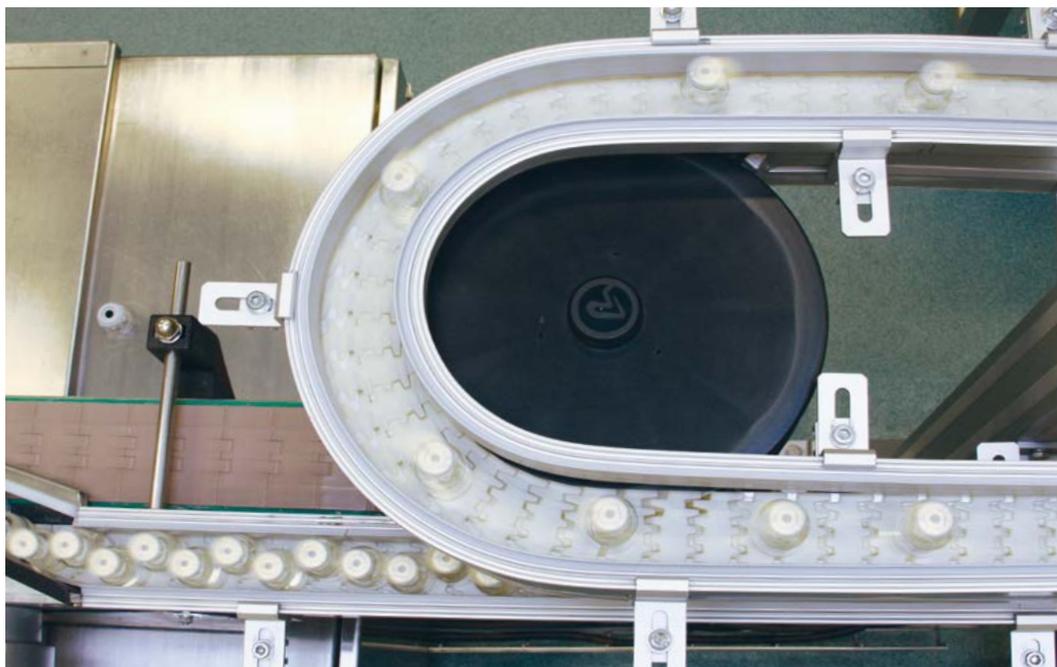
Color touch screen. Wi-Fi. Barcode scanning. Password protection. Enhanced reporting.
The features you want, in a tool you need.

Discover the next generation of endotoxin testing at www.criver.com/nexgen-pts.

Libération des lots de produits injectables : une affaire d'état !

Par Olivier CHANCEL - Merial
Olivier.chancel@Merial.com

Depuis quelques années certains mots résonnent régulièrement dans nos oreilles dont "LEAN", amélioration continue, innovation... Ce n'est pas toujours sans crainte qu'ils sont prononcés tant le "faire comme avant" est souvent plus "rassurant". Il est certes plus "confortable" de ne pas trop "changer", de prôner un certain "conservatisme"... Pour des raisons souvent économiques, l'industrie pharmaceutique fait pourtant de gros efforts pour être dans une vraie mouvance de progrès, pour faire "aussi bien voire mieux



en faisant moins ou différemment". Ainsi quelques paradigmes ont pu être brisés. Tous ? Non, car quelques irréductibles tabous résistent encore et toujours, pas tant au progrès mais à une crainte de bouleverser le système. Rien que d'évoquer ces tabous fait trembler les murs. C'est d'ailleurs avec crainte de froisser que cet article a été écrit. Ce n'est évidemment pas son objet... après tout, ce n'est qu'un simple article sans volonté d'imposer à quiconque la moindre consigne. Mais force est de constater que la libération des lots de produits injectables est chose sérieuse et ne peut être traitée sans déférence ni précaution. Cet article aurait été écrit ne serait-ce que dix ans auparavant, qu'il aurait certainement été voué au bucher sans aucune forme de procès... si ce n'est, à la rigueur, un procès en sorcellerie !?

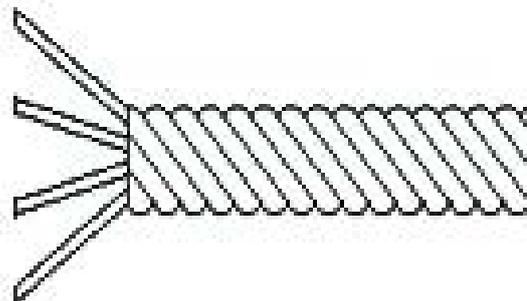
La responsabilité pharmaceutique de libérer un lot ou pas est indéniablement l'une des plus grandes qui soit. Elle est bien souvent difficile. Les produits issus de procédés aseptiques ne font pas exception. Cette libération pose évidemment moins de difficultés lorsque cent pour cent des voyants sont au vert, que tous les contrôles sur le produit fini, dont le test de stérilité, sont conformes, idem pour les contrôles en cours, idem pour les qualifications, les validations... La non libération d'un lot lorsque le test de stérilité est non conforme n'est pas plus difficile. Mais que dire alors d'un lot pour lequel tous les voyants seraient au vert à l'exception d'un "tout petit" contrôle

d'environnement en classe A ? La facilité serait de rebuter à grande échelle en se disant "Tuez-les tous, Dieu reconnaîtra les siens". La difficulté est de se demander ce que nous apportent les contrôles microbiologiques et ceux des particules non viables en cours de production.

Le risque déontologique serait de traiter ce sujet en liant libération des lots et économie de l'entreprise. Ce ne sera pas le cas, la ligne rouge ne sera pas franchie ! Mais au bout du compte une personne honnête, qualifiée et expérimentée devra prendre une décision en son âme et conscience à partir de "faits" mais également "d'éléments parfois moins tangibles". L'intention de cet article est

....→

- Conception des Z.A.C.,
- Qualification des autoclaves,
 - Formation,
- Habilitation du personnel,
 - Classification des Z.A.C.,
- Supervision du personnel,
 - Qualification des flux,
- Validation de la filtration,
 - Media Fill Tests,



finalement de partager quelques réflexions sur le thème du contrôle d'environnement positif. Il ne donnera pas les clés de la libération " facile" mais souhaite offrir à celui qui a la responsabilité de libérer ou pas, de prendre un peu de temps avec lui-même autour d'un sujet si difficile... mais qui ne fait absolument jamais l'objet d'aucune publication ni communication. Rappelons-nous que c'est un sujet tabou !! Tout en respectant les responsabilités de chacun... mieux vaut donc en parler !



Éléments mis en œuvre en termes d'assurance de stérilité

Dessin 1 :

En mai 2012 a eu lieu, n'ayons pas peur de le dire, un véritable évènement. La très sérieuse Pharmacopée U.S. (U.S.P.) proposait dans sa trente-cinquième édition une mise à jour à ce point " audacieuse", "innovante", "inattendue", "différente", du chapitre <1116>⁽¹⁾ que si l'un de nous n'avait ne serait-ce qu'évoqué le centième, il se serait fait rapidement guillotiné ! Mais alors qui sont ces "fous furieux" qui ont travaillé pendant pas moins de sept ans sur la mise à jour de ce chapitre pour le moins avant-gardiste sur le suivi environnemental des salles propres et pourquoi ?

Ces experts du Comité Microbiologie et Assurance de la Stérilité de l'U.S.P. ont établi cette nouvelle monographie <1116> tout simplement en s'appuyant sur un constat scientifique. A partir de là, ils ne sont peut-être pas si fous que ça mais tout simplement des scientifiques s'appuyant sur des faits ? En premier lieu, ils s'étonnent de constater que les milieux gélosés recommandés pour les contrôles d'environnement sont finalement présentés comme des instruments de mesure mais à cela près qu'ils ne sont pas calibrés. Pour rappel et à titre d'exemple, la monographie <1227>⁽²⁾ établit que la plupart des bactéries sont quantifiables à partir de 25 U.F.C. (Unités Formant Colonies). Que dire alors de limites recommandées à 1 ou 5 ou même à 10 U.F.C. ? Doit-on s'enorgueillir d'un prélèvement avec 4 colonies pour une limite recommandée à 5 ou trembler pour

un prélèvement avec 6 colonies pour une limite toujours à 5 ? 0 colonie en classe A est-il meilleur que 2 ? Que dire également d'une limite d'alerte à 4 U.F.C. pour une limite B.P.F. (Bonnes Pratiques de Fabrication) recommandée à 5 ? La recevabilité B.P.F. d'un test n'est donc pas une fin en soi ! Certains diront qu'il s'agit bien de limites recommandées et non de spécifications imposées mais il est probable que des limites internes supérieures à celles recommandées par les B.P.F. seraient bien difficiles à défendre quand bien même elles seraient techniquement et scientifiquement plus justes.

Etant donné la capabilité des méthodes microbiologiques pasteuriennes actuelles, leur imprécision, nous ne devons pas attendre d'elles ce qu'elles ne peuvent pas offrir. Ainsi, nos experts de l'U.S.P. considèrent le suivi environnemental des microorganismes selon une approche semi-quantitative et c'est là que se trouve toute l'originalité de la monographie <1116>. Avec courage, ils ont décidé d'aller jusqu'au bout de cette logique scientifique et de retirer tout simplement les limites telles que nous les connaissions jusqu'en 2012 pour les germes vivants. Oui, notre fameux comité d'experts de l'U.S.P. a retiré de la monographie <1116> les limites recommandées en U.F.C. pour préférer des prises de décisions sur la base d'informations semi-quantitatives, sur la base de taux de contamination. Dit autrement, ils proposent une lecture environnementale des Z.A.C. (Zones d'Atmosphère Contrôlée) selon leurs tendances et non plus selon une

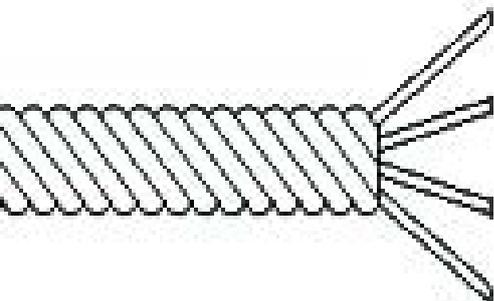
interprétation littérale d'un résultat ponctuel: une révolte ? Non, une révolution !

Attention, notre comité d'experts n'a pas perdu la tête. Il savait de toute façon qu'aucun programme environnemental ne peut prouver la stérilité de nos produits et rappelle finalement que le suivi environnemental participe indirectement à la libération d'un lot, que c'est un faisceau d'informations parmi d'autres. Il n'est pas sans ignorer que le programme environnemental n'est d'une part pas complètement fidèle, qu'il ne se suffit pas en lui-même et qu'au-delà du suivi, viennent s'accumuler un grand nombre de précautions en termes de conception et de qualification des Z.A.C. ainsi que de suivi des procédés aseptiques (simulations, filtration, encadrement). Il n'ignore pas non plus que le seul fait de prélever est en lui-même générateur de contaminations et de faux positifs.

Les amateurs de la monographie <1116>, et certainement de risques, apprécieront l'absence d'investigation jusqu'à 14 colonies: sensations fortes assurées... Il n'est pas sûr que les industriels comprennent, pas plus que les autorités européennes, ni même les américaines⁽³⁾ : "En l'absence de mauvaise tendance, un seul résultat au-dessus de la limite d'action doit déclencher une évaluation et doit permettre de déterminer si des actions correctrices/préventives sont adaptées ..."

Malgré l'évolution indéniable apportée par cette monographie, en toute chose il faut savoir raison garder.





- Suivi microbiologique environnemental,
- Suivi particulaire,
- Test de stérilité,
- Dossier de lot,
- ...

Amarre de bateau

Signaux reçus par le responsable pharmaceutique relatifs à la possible contamination

La littérature sur le sujet est tout de même relativement riche avec notamment le Technical Report (T.R.) numéro 13 de la Parenteral Drug Association⁽⁴⁾, les I.S.O. 14698⁽⁵⁾ sur la maîtrise de la bio contamination, la directive F.D.A. relative à la fabrication aseptique⁽³⁾ et bien sûr son équivalent B.P.F. européen avec la ligne directrice numéro 1⁽⁶⁾. A quelques rares exceptions, dont la monographie <1116> et un peu le TR13 dans leurs dernières moutures, la très grande majorité est relativement conservatrice et recommande à ce jour des limites inférieures à la limite de quantification pour les classes A et B. Quelques éléments plus progressistes seront livrés ultérieurement.

Toujours est-il qu'au-delà de l'interprétation arithmétique des résultats environnementaux et de la pertinence des tests de stérilité, la décision du responsable pharmaceutique, en termes de contamination, sera toujours plus simple à prendre si le système qualité entourant la production aseptique est solide et pour cause ! En fait, la décision se prend-elle réellement sur la base des résultats qu'il reçoit ? Ou bien les résultats qu'il reçoit ne sont qu'une information lui permettant d'apprécier si la production a eu lieu dans le périmètre connu voire "validé" (bien malin celui qui sait valider un procédé aseptique...) d'assurance de la stérilité ? Même dans un système robuste, les signaux qu'il reçoit sont relativement pauvres comparés à tous les éléments mis en œuvre en termes d'assurance de la stérilité et l'image d'une amarre de bateau est souvent assez parlante (Cf. dessin 1).

Si l'amarre est bien solide, quelques cordelettes, petites ou grosses, peuvent céder, le commandant est serein et le bateau ne quittera pas le quai. Une autre image serait celle du pilote commandant un avion de ligne : un instrument peut lui indiquer une légère dérive de sa trajectoire par rapport à son plan de vol. Il peut consulter d'autres instruments, questionner des radars militaires, des radars civils, interroger d'autres avions, consulter son G.P.S. et bien entendu comparer ce qu'il voit par la vitre à ce qu'il lit sur sa carte. Si toutes les informations qu'il reçoit lui indiquent que la position de l'avion est manifestement sur la route théorique, il ignorera l'information initiale, privilégiera toutes les autres informations concordantes et gardera en tête la bonne conception de son avion, la redondance de ses systèmes de navigation... Finalement, nous n'inventons rien car les anciens avaient l'habitude de dire que les contrôles d'environnement participaient indirectement à la libération des lots, qu'ils n'étaient que le reflet de pratiques, de locaux et de compétences.

Soyons honnêtes avec nous même, personne n'est à l'aise lorsqu'une seule petite colonie est retrouvée sur les gants d'un opérateur. Patrie de Descartes oblige, nous serions tentés de prendre une décision d'ordre mathématique alors que c'est bien logiquement une décision microbiologique qui s'impose.

Les B.P.F. nous cantonnent involontairement

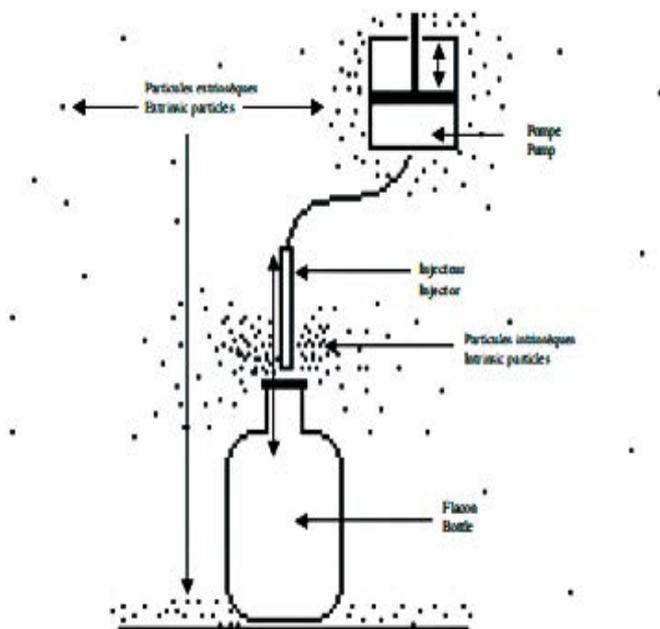
à ce paradigme, mais cela reste un non-sens frustrant. Zéro ou une colonie, c'est pareil ! Il y a tant de raisons qu'un microorganisme ne pousse pas (Viable But Not Culturable, température, microorganisme moribond). La microbiologie n'est peut-être pas une science exacte mais c'est certainement une science quantique. A moins que tous nos produits fassent l'objet d'une stérilisation terminale ou équivalent ou d'un contrôle à cent pour cent, nos lots seront à la fois stériles et non stériles tant que nous n'apporterons pas la preuve qu'ils sont contaminés. Nos programmes environnementaux actuels, quels qu'ils soient, n'apporteront pas cette preuve. En revanche, indirectement, de manière semi-quantitative, au travers des analyses des tendances, et faute de mieux, nous indiquerons si nous sommes toujours dans notre périmètre de maîtrise ou si nous l'avons quitté.

En introduction de cette communication, il est écrit que la décision libératoire, suite à la détection d'un contrôle d'environnement est difficile mais que c'est avant tout un vrai tabou. Nos confrères nord-américains connaissent bien évidemment les mêmes difficultés mais sont "un peu" moins dans le tabou, osent "un peu" la discussion, le débat d'idées. Les communications sont rares mais infiniment plus fréquentes qu'en Europe. Ainsi, pouvons-nous lire dans la Directive Aseptique U.S.⁽³⁾ : "Les niveaux d'alerte et d'action doivent être utilisés pour surveiller, maîtriser un procédé aseptique et ne doivent pas être traités comme des spécifications".

De même, l'Aseptic Processing Working Group du très sérieux P.Q.R.I.⁽⁷⁾ nous indique "qu'il est bien compris que les méthodes d'échantillonnage et d'incubation utilisées pour la surveillance des surfaces sont des opérations essentiellement manuelles, et du fait des interventions humaines, il peut y avoir un petit nombre de faux positifs. Pour cette raison, la détection de microorganismes sur un point critique ne doit pas nécessairement se traduire par le rejet du lot mais doit être investigué ».

Ce même Working Group du P.Q.R.I. continue en écrivant⁽⁷⁾ "Si l'investigation ne permet

→



Dessin 2 : Particules extrinsèques versus intrinsèques

pas d'expliquer un résultat positif ET qu'il n'y a pas de mauvaise tendance pour la surface critique incriminée ou avoisinante, il s'agit d'une situation clairement favorable au non rejet du lot pour cause d'un résultat positif".

Pour être honnête, il est nécessaire de préciser que cette proximité d'idées entre les communications du P.Q.R.I. et la monographie <1116> s'explique en partie par le fait que les auteurs ou les membres étaient bien souvent les mêmes. Il est d'ailleurs probable que les travaux du P.Q.R.I. ont en fait alimenté la révolution de la monographie <1116>.

Robert Friedman de la F.D.A. en va également de son couplet⁽⁶⁾ : " La libération des lots doit considérer 2 éléments : un seul résultat au-dessus du niveau d'action mais clairement atypique et les tendances". Mais il tempère en rajoutant logiquement que "l'entreprise sera challengée si elle libère un lot avec un résultat O.O.S. (Out Of Specification) sur une surface et sur un opérateur, surtout s'il s'agit du même germe".

Si nous doutons de la pertinence de nos contrôles d'environnement alors généralisons l'usage des isolateurs pourrait-on croire !

Pour peu qu'il soit convenablement conçu et exploité, un isolateur permet des activités aseptiques offrant un niveau très élevé d'assurance de la stérilité. A ce point que certaines agences évoquent ou proposent de réduire la fréquence et/ou la taille des simulations aseptiques voire d'envisager une libération paramétrique. Mais voilà, il arrive quand même que des contrôles microbiologiques d'environnement traduisent la présence d'un germe. Ce dernier est très probablement apporté lors du prélèvement lui-même ou lors des transferts ou de l'incubation. Le taux relatif de faux positifs dans les isolateurs est de fait élevé. Finalement, isolateur ou pas, investigation ou pas, les difficultés d'interprétation des résultats et de prise de décision de libération restent entières.

Si le suivi environnemental microbiologique ne tient pas toutes ses promesses, est-ce que le suivi des particules non viables peut aider dans la prise de décision que ce soit en nombre de particules ou en taille ?

Rarement oui, souvent non... mais créera certainement beaucoup de confusion !

Extrêmement rares sont les fois où contrôles des particules viables et non viables sont simultanément non conformes. Ces deux types de suivis environnementaux pèchent par des limites à la fois opposées et complémentaires : contrairement aux cultures de bactéries, de levures ou moisissures sur des milieux de cultures gélosés, les compteurs de particules sont des instruments calibrés, très sensibles mais non spécifiques.

En revanche, le suivi environnemental particulaire a un point fort de taille qui le distingue des méthodes microbiologiques pasteuriennes : son résultat est quasi instantané.

A côté de ça, le monitoring particulaire non viable présente donc l'immense défaut de ne pas être spécifique. Les intentions de ce type de suivi sont très louables sur le principe. En revanche, dans la pratique chaque démarrage de lot revient à perpétuellement ouvrir la boîte de Pandore et, absence de spécificité et grande sensibilité obligent, à libérer des signaux difficilement interprétables : particules intrinsèques, pics électriques... Suite à un dépassement de limite et une faute d'investigation toujours conclusive, il est tentant de pallier cette absence de spécificité en appelant au principe de précaution et en rebutant les flacons douteux avec comme résultat : "plus je rebute et plus ce qui reste est bon"... quand on en est là...

D'une manière générale, la Ligne Directrice 1⁽⁶⁾ est très bien informée et compréhensive: "It is accepted that it may not always be possible to demonstrate low levels of $\geq 5.0 \mu\text{m}$ particles at the point of fill when filling is in progress, due to the generation of particles or droplets from the product itself" et de rajouter "The occasional indication of $\geq 5.0 \mu\text{m}$ particle counts may be false counts due to electronic noise, stray light, coincidence, etc."

Le produit fabriqué/réparti est effectivement lui-même générateur d'un nuage de particules intrinsèques presque toujours invisibles qui par nature n'ont pas d'impact sur sa qualité (Cf. dessin 2).

Les particules extrinsèques sont quant à elles celles de l'environnement du produit. Les particules extrinsèques sont donc les seuls contaminants potentiels du produit, ce qui n'est naturellement pas le cas des particules intrinsèques. Autrement, nous serions amenés à considérer que le produit se contamine lui-même... Au-delà de cette évidence, la difficulté consiste à faire la part des choses entre les particules intrinsèques et extrinsèques lors du suivi particulaire.

En attendant des compteurs spécifiques, comment ne pas être aveuglé par les signaux "faux positifs" et faire la part des choses entre le bon grain et l'ivraie ? La Ligne Directrice 1⁽⁶⁾ indique "Appropriate alert and action limits should be set for the results of particulate and microbiological monitoring". Ne s'agit-il pas là d'une invitation à l'analyse de tendance ? De plus, cette même Ligne Directrice numéro 1⁽⁶⁾ indique également " ... consecutive or regular counting of low levels is an indicator of a possible contamination event and should be investigated". Cette attente est certainement d'une grande portée :

- La réalité est qu'un pic isolé, même massif (surtout massif !), est pour beaucoup de Responsables Pharmaceutiques moins inquiétant qu'une succession de plus petits pics.
- La contamination particulaire a sans doute plus de sens en termes de fréquence que de taille de pic.
- La présence de pics, grands ou pas, signifie "investigation" !
- Là où l'actuelle monographie <1116> ⁽¹⁾ est très innovante

→

en termes de fréquence de contamination microbiologique, les autorités européennes ne le sont pas moins en termes de fréquence de contamination particulaire avec la Ligne Directrice 1⁽⁶⁾ mais... dès 2009!

A toutes fins utiles, il est probablement nécessaire de rappeler que non la Ligne Directrice 1⁽⁶⁾ n'impose pas strictement un suivi particulaire en nombre de particules. L'étude de la fréquence des pics est de fait appropriée et surtout plus pertinente en termes d'analyse d'impact et de prise de décision libératoire⁽⁹⁾. La toute nouvelle ISO 14644-2 va d'ailleurs en ce sens avec ses approches dites alternatives. Il existe effectivement une assimilation "malheureuse" entre classification des Z.A.C. et suivi particulaire mais la Ligne Directrice 1⁽⁶⁾ dissipe rapidement toute confusion : "Classification should be clearly differentiated from operational process environmental monitoring". De plus, les limites présentées au chapitre 4 sont exclusivement limitées à la classification des Z.A.C. et en aucun cas au suivi particulaire en activité. Pour s'en convaincre⁽⁶⁾ : "Appropriate alert and action limits should be set for the results of particulate and microbiological monitoring".

Jusqu'à-là, l'article fait la part belle au suivi des particules dans leur composante quantitative. Bien que non spécifique, ce suivi présente tout de même une toute petite partie qualitative.

Même si la littérature n'a pas cru bon à ce jour de documenter de relation entre taille et origine des particules, il est régulièrement entendu que celles de "grosses tailles", supérieures à 5 µm, seraient d'origine intrinsèque, là où les particules de "petites tailles" seraient davantage d'origines extrinsèques.

En revanche, la littérature rappelle depuis très longtemps le lien étroit qui unit le nombre et la taille des particules non-viables avec le risque de contamination microbiologique.

Pour ce qui est du nombre, de multiples études scientifiques ont rapporté une corrélation en classe A entre le nombre de particules non viables et viables^(10, 11, 12, 13, 14) et le risque associé de contamination des produits^(15, 16).

Pour ce qui est de la taille, Noble, Lidwell et Kingston⁽¹⁷⁾ indiquaient déjà que plus grande est la particule, plus grande est la probabilité que cette dernière porte une bactérie. Ils considèrent que les bactéries sont le plus souvent portées par des particules dont le diamètre équivalent est généralement compris entre 4 et 20 µm. Greene, Vesley, Bond et Michaelsen⁽¹⁸⁾ ont spécifiquement étudié cette corrélation entre taille des particules et contamination microbienne dans les blocs opératoires. Ils ont constaté que 75,6% des contaminants microbiens sont associés avec des particules de dimensions supérieures à 5 µm.

De là à penser qu'il est possible de tolérer, sans s'interroger, des particules de 0,5 µm est bien regrettable : une augmentation de fréquence de pics, qu'il s'agisse de particules de 0,5 ou 5 µm ou autres, traduit a priori une dégradation de l'environnement, tout du moins une évolution du système de production. Au final, la taille des particules a finalement plus d'intérêt pour le producteur puisqu'elle oriente l'investigation et très peu pour le libérateur.

→

Associates of Cape Cod, Int'l.

Le chef de file dans la détection des endotoxines et du glucane.



Nous sommes la première entreprise autorisée par la FDA à fabriquer du lysat d'amœbocytes de limule (LAL) devant servir à un test de contrôle qualité des endotoxines. Nos réactifs et nos instruments sont utilisés dans les industries pharmaceutiques, des dispositifs médicaux et de biotechnologie pour le contrôle qualité et la mise sur le marché des produits. Dans plus de 80 pays, nous offrons à nos clients des instruments pour tester les endotoxines selon des méthodes conformes au test des endotoxines bactériennes (BET) de l'USP.



Associates of Cape Cod, International

Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Royaume-Uni
(44) 151.547.7444 • INFO@ACCIUK.CO.UK • WWW.ACIIUK.CO.UK



L'intérêt du monitoring particulière n'est certainement pas d'évaluer la génération de particules intrinsèques, de pics électriques, de coïncidences quels que soient les tailles des particules ou des pics. En revanche, il est bien de constater précocement une contamination extrinsèque à proximité des points les plus critiques, d'alermer le producteur sur une situation inhabituelle, de l'amener à s'interroger afin de détecter une éventuelle dégradation du système.

L'idée n'est évidemment pas de remettre en cause l'intérêt de ces contrôles en cours mais, faute de mieux, d'en rappeler quelques limites techniques, pour mieux les exploiter et au final prendre une décision de raison plus que de précaution. En attendant les progrès technologiques, l'étude des taux de contamination des particules viables et non viables en lieu et place des traditionnelles limites est une première réponse. Les progrès de la microbiologie rapide sont indéniables avec un vrai gain en sensibilité mais ce n'est pas pour autant que les compteurs de particules avec distinction des "viables et des non viables" deviendront plus spécifiques dans le proche futur. De plus, la forte proportion de faux positifs est difficile à gérer : des fibres fluorescentes par exemple peuvent être considérées comme des bactéries.

Le principe de précaution est rassurant et certainement tentant mais ce dernier n'est-il pas en fait une non décision ?

Sans cause identifiée et sur la seule base des limites B.P.F. microbiologiques ou particulières, ce n'est pas en isolant des fractions lors de la production aseptique ou en rebutant un lot entier que les fractions restantes seront meilleures ou que les lots précédents ou suivants ne seront pas contaminés.

Les progrès des méthodes de microbiologie rapide spécifiques ET plus sensibles, et par définition plus rapides sont prometteurs. Les informations qu'elles offriront seront précieuses pour maîtriser davantage la contamination en cours de fabrication et pour accompagner la prise de décision libératoire. En attendant, seule la qualité du système fait la différence et les taux de contaminations en sont le reflet.

Acronymes	
B.P.F.	<i>Bonne Pratiques de Fabrication</i>
F.D.A.	<i>Food and Drug Administration</i>
I.S.O.	<i>International Standard Organization</i>
O.O.S.	<i>Out Of Specification</i>
P.Q.R.I	<i>Product Quality Research Institute</i>
T.R.	<i>Technical Report</i>
U.F.C.	<i>Unité Formant Colonie</i>
U.S.	<i>United States</i>
U.S.P.	<i>United States Pharmacopeia</i>
Z.A.C.	<i>Zone d'Atmosphère Contrôlée</i>

Bibliographie :

- 1 U.S.P. <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments.
- 2 U.S.P. <1227> Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles.
- 3 Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice Food and Drug Administration September 2004.
- 4 Technical Report No. 13 (Revised) Fundamentals of an Environmental Monitoring Program, P.D.A., 2014.
- 5 ISO 14698 Salles propres et environnements maîtrisés apparentés 2003
- 6 Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1, Manufacture of Sterile Medicinal Products, Mars 2009.
- 7 Product Quality Research Institute, Aseptic Processing Working Group, Final report, 2003.
- 8 R. Friedman. Presentation on Sterility. Assurance Issues, P.D.A. Spring Conference, March 2002, Orlando, FL, U.S.A.
- 9 STP PHARMA PRATIQUES, VOLUME 18 N°6 (NOVEMBRE-DÉCEMBRE 2008) - Classification et monitoring particulière des ZAC : interprétation de la nouvelle annexe 1 des BPF européennes, L. Bolechala, O. Chancel, J.-M. Pedebidou, L. Pisarik.
- 10 De Abreu, C., Pinto, T. and Oliveira, D. 'Environmental Monitoring: A Correlation Study between Viable and Nonviable Particles in Cleanrooms', Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Vol. 58, No.1, January-February 2004, pp: 45-53.
- 11 PDA Special Scientific Forum on Environmental Monitoring and Aseptic Processing, August 21, 2000, PDA Letter, p.1, November 2000.
- 12 B. Reinmüller, "Dispersion and Risk Assessment of Airborne Contaminants in Pharmaceutical Clean Rooms," Ph.D. thesis, Bulletin No 56, Building Services Engineering, KTH, Stockholm, 2001.
- 13 B. Reinmüller, "Microbiological Risk Assessment of Airborne Contaminants in Clean Zones", Bulletin No. 52, Building Services Engineering, KTH, Stockholm, 2001.
- 14 B. Ljungqvist and B. Reinmüller, "Hazard Analysis of Airborne Contamination in Clean Rooms—Application of a Method for Limitation of Risks," PDA J. Pharm Sci. Technol., 49, p. 239, 1995.
- 15 Ljungqvist, B., and Reinmüller, B., Clean Room Design: Minimizing Contamination Through Proper Design; Interpharm Press, 1997.
- 16 Sinclair, C.S.. 1995. Performance of Bow/Fill/Seal Equip Under Controlled Airborne Microbial Challenges. PDA J Pharm Sci Tech. 49:294-299.
- 17 Noble, W. C., Lidwell, O. M., Kingston, D. 1963: The size distribution of airborne particles carrying microorganisms. J. Hyg., Camb. 61:385-391.
- 18 Greene, V.W., Vesley, D., Bond, R.G., Michaelsen, G.S. 1962: Microbiological contamination of hospital air. I. Quantitative studies

Installations de procédé multilots : pour un rendement & une rentabilité élevés.

Par Jürg HURNI - JAG Jakob AG

Le traitement simultané de plusieurs lots de production sur une seule ligne (mode multilots) permet d'exploiter au mieux les installations et de maximaliser leur rendement et rentabilité. Quels sont les facteurs de succès d'un point de vue automation ?



Exemple multilots : cinq lots de production basés sur trois différentes recettes sont simultanément en cours dans la même installation de procédé

L'illustration ci-dessus montre une représentation schématique de la production simultanée de 5 lots sur la même installation de procédé. La commande à base de recettes demande des interactions de l'opérateur (cases bleues) et informe ce dernier en cas d'avertissements et alarmes (cases jaunes et rouges). Les facteurs de succès dans la réalisation de ce type de solution sont :

Réduction des temps d'arrêt pour assurer un taux d'utilisation maximal.

La solution d'automation doit éliminer le plus possible les arrêts liés au processus et aux opérations de nettoyage (CIP, SIP). Seul un degré d'automation élevé permet la commande et la surveillance simultanées de plusieurs lots sur une même installation. La minimalisation des interventions opérateur est donc essentielle.

Gestion de l'intégralité du processus.

Pour assurer le déroulement optimal du processus principal il faut gérer ou dialoguer avec les autres

processus (qui ont lieu en amont, en parallèle ou en aval). Par exemple, concernant la préparation de solutions auxiliaires et produits de nettoyage, l'approvisionnement en air comprimé, vapeur, eau glacée ou tout autre fluide nécessaire à la production.

De même il faut s'occuper des matières premières pulvérulentes, des emballages et autres auxiliaires. C'est le seul moyen d'assurer que tous les fluides et matériaux soient à disposition au bon moment, dans la bonne quantité et au bon endroit. Il faut gérer ou dialoguer avec l'intégralité des processus pour assurer une exploitation optimale des installations.

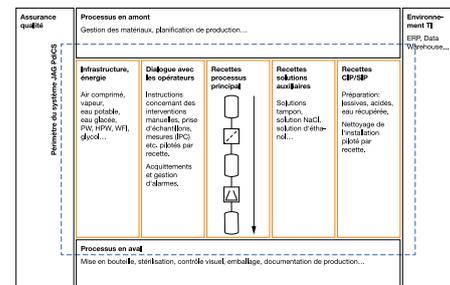
Production sans papier, enregistrement et gestion efficace des données de production.

La génération de dossiers de lot entièrement électroniques (100% EBR) et des mesures et analyses réalisées directement dans l'installation (in-process control) représentent un potentiel d'optimisation significatif.

Par exemple, une analyse d'échantillons dans l'installation évite les retards créés par une analyse au laboratoire, et permet le stockage de toutes les données de production de façon centralisée. Ceci est idéal pour des analyses telles que l'évaluation d'indicateurs de performances clés et des tendances, et permet en même temps

des libérations de lot effectuées sans papier (validations électroniques).

Le respect de ces facteurs de succès contribue non seulement au rendement et à la rentabilité des installations, il en résultent d'autres effets positifs. La surveillance continue, la commande des procédés entièrement automatique et le guidage des opérateurs par la commande éliminent presque entièrement les erreurs de l'opérateur. Il en résultent des produits de qualité constante et une sécurité maximale des processus.



Il faut gérer ou dialoguer avec l'intégralité des processus pour assurer une exploitation optimale des installations.

JAG Jakob AG Prozesstechnik



JAG PdICS CONTROLS MULTI-BATCH PROCESSES FULLY AUTOMATED



Efficient

Maximum plant utilization thanks to fully automated multi-batch operation

Safe

Simultaneous control of consecutive batches in one process cell through a high degree of automation

JAG PdICS – Automation Solution for the Process Industry

Recipe based process control, Systematic operator guidance, Recipe controlled cleaning and auxiliary processes

Bringing serenity to Environmental Monitoring



- Now with extended shelf-life
- Designed with improved moisture control
- Reduced dehydration effects during routine use



<http://www.biomerieux-industry.com/em>



PIONEERING DIAGNOSTICS

THERA



Cahier
Pratique

Rationalisation des qualifications périodiques des autoclaves, des tunnels de dépyrogénéation et des laveuses de flacons pour les formes injectables

Par Vanessa NARBONNE & Jean-Marie GARCIA - Merial

Cet article est un résumé de l'atelier proposé lors du Congrès A3P à Biarritz en 2014.

Attente réglementaire, les équipements des formes injectables de type autoclave, laveuse de flacons et tunnel de dépyrogénéation font l'objet de qualifications périodiques. A travers ce cahier pratique, nous vous apportons le contexte réglementaire lié à ces activités ainsi que les attentes en termes de qualification pour ces trois types d'équipements.

Dans un souci d'économie de nos ressources matérielles, humaines et énergétiques, nous avons mis en place sur le site de Merial Toulouse une démarche de rationalisation des qualifications périodiques.

Nous présentons ainsi l'approche méthodologique, mise en œuvre sur ce site qui s'est inscrite dans une rationalisation de nos pratiques de qualification. Cette démarche nous a également apporté une meilleure connaissance de nos équipements.

Après avoir présenté le contexte réglementaire de la qualification, nous détaillerons pour chaque type d'équipement (autoclaves, tunnels de dépyrogénéation et laveuses) les attendus en termes de qualification et l'approche de rationalisation.

Enfin, nous terminerons avec un bilan des gains réalisés.

1. Contexte réglementaire et guides de l'industrie pharmaceutique

Dans tous les référentiels, la qualification des équipements utilisés par la production dans l'industrie pharmaceutique est une exigence réglementaire. Dans ce cadre, il est recommandé de réaliser une requalification à intervalle déterminé (appelée qualification périodique) et/ou après chaque modification apportée sur l'équipement pouvant avoir un impact sur son fonctionnement.

Les référentiels classiques généralement opposables sont :

- ✗ Bonnes Pratiques de Fabrication n°2014/1 bis,
- ✗ Annexe 15 des BPF "Qualification and Validation" Octobre 2015,
- ✗ Annexe 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products", Annex 1, European Union,
- ✗ 21 CFR part 11 section C Bâtiments et installations ; section D Equipements,
- ✗ Norme ISO 17665-1 : Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide.

Par ailleurs, les Directives canadiennes détaillent les activités de qualification :

- ✗ Directive sur la validation des formes posologiques pharmaceutiques (GUI-0029 décembre 2009),
- ✗ Directive sur Validation de procédés : Stérilisation par la chaleur humide des produits pharmaceutiques de 2002.

Nous disposons également de guidelines définissant la qualification:

- ✗ Guideline OMS 2006,
- ✗ PIC/S (2001): Validation Master Plan Installation and Operational Qualification non-sterile process validation cleaning validation,
- ✗ International Society of Pharmaceutical Engineering (ISPE) guide, volume 5 : Commissioning and Qualification, mars 2001,
- ✗ American Society for Testing and Materials (ASTM): Standard Guide for Specification, Design and Verification of Pharmaceutical and Biopharmaceutical Manufacturing Systems and Equipment, 2007.

Enfin, les guides suivants de la PDA et les comptes rendus de commissions SFSTP présentent des recommandations pour la réalisation des qualifications sur les équipements tels que les autoclaves ou les tunnels de dépyrogénéation :

- ✗ Technical Report (PDA) n°1 v2 Revised 2007 : validation of moist Heat Sterilisation Processes : cycle Design, Development, Qualification and ongoing control,
- ✗ Commission SFSTP : Qualification des fours et tunnels de stérilisation et de dépyrogénéation (juillet août 2008),
- ✗ Commission SFSTP : Stérilisation à la chaleur humide : Guide de Qualification d'un équipement (avril 2005).

2. Attentes en termes de qualifications initiales et périodiques pour les tunnels

2.1 Attentes en termes de qualification initiale pour les tunnels de dépyrogénéation

Les attendus pour les qualifications des tunnels sont les suivants :

Pour la Qualification d'Installation (QI) :

- ✗ Vérification des parties de l'équipement, raccordement, documentation, aspect sécurité, ...
- ✗ Vérification de la métrologie des chaînes de mesures (température, pression, vitesse tapis, vitesse d'air).

Pour la Qualification Opérationnelle (QO) :

- ✗ Test d'intégrité des filtres,
- ✗ Relevé des cascades de pression,
- ✗ Schéma aéraulique du tunnel,
- ✗ Vérification de la vitesse du tapis du tunnel (étalonnage),
- ✗ Comptage particulaire (au repos et à froid),
- ✗ Cartographie des températures (pour la zone de chauffe du tunnel)
- ✗ En fin de QO, formation du personnel et présence des modes opératoires d'utilisation du tunnel.

Pour la Qualification de Performance (QP), les étapes mises en œuvre sont classiquement les suivantes :

- ✗ Définition de la charge à dépyrogéner : l'approche "worst case" est acceptable (les critères pouvant être pris en compte sont : le type de verre, sa coloration, sa masse, les tailles de lots peuvent également être considérées, etc.)
Pour rappel, les contenants testés (avec sondes et/ou endotoxines) doivent être identiques au contenant de la charge
- ✗ Vérification des paramètres physiques : calcul de la valeur stérilisatrice (FT) par la mise en place de thermocouples (1 thermocouple par flacon d'endotoxines)
- ✗ Vérification des paramètres biologiques : utilisation d'endotoxines avec réduction d'au moins 3 log de la quantité des endotoxines

Il est nécessaire de prendre quelques précautions pour l'utilisation des endotoxines :

- ✗ La charge minimale doit être d'au moins 1000 UI par pièce (valeur théorique demandée par l'U.S.P. Dans la pratique, il est d'usage d'avoir une valeur comprise entre 5000 UI et 10000 UI par flacon),
- ✗ Il est nécessaire d'indiquer précisément, dans le protocole, où sont déposées les endotoxines,
- ✗ Réalisation de l'inoculation des pièces,
- ✗ Nécessité d'avoir, au moins, un témoin pour intégrer les impacts environnementaux (transport par exemple),
- ✗ Avant utilisation, protection des flacons avec aluminium et conservation au froid ainsi qu'identification,
- ✗ Après chaque cycle, les pièces doivent être récupérées avec précaution de manière à ne pas induire de contamination. Une réconciliation des flacons est alors recommandée.

2.2 Attentes en termes de qualification périodique pour les tunnels de dépyrogénéation

En qualification périodique des tunnels de dépyrogénéation, les tests suivants sont conduits :

- ✗ Test d'intégrité des filtres,
- ✗ Vérification métrologique des chaînes de mesure,
- ✗ Relevé des cascades de pression du tunnel,
- ✗ Schéma aéraulique du tunnel,
- ✗ Mesure des vitesses d'air,
- ✗ Comptage particulaire en activité,
- ✗ Cartographie de la zone de chauffe (à faire si intervention sur ventilateur),
- ✗ Test de dépyrogénéation avec vérification de la réduction d'endotoxines,
- ✗ Calcul de la valeur stérilisatrice.

3. Attentes en termes de qualification pour les autoclaves

3.1 Attentes en termes de qualification initiale pour les autoclaves

Pour les qualifications des autoclaves, les attendus en termes de qualifications sont les suivants :

Pour la Qualification d'Installation (QI) :

- ✗ Vérification de la documentation,
- ✗ Vérification de l'identification et de l'installation,
- ✗ Vérification des matériaux de la chambre,
- ✗ Vérification des raccordements aux fluides,
- ✗ Vérification des systèmes électriques et automatismes,
- ✗ Dossier de soudure et tuyauteries.

Pour la Qualification Opérationnelle (QO) :

- ✗ Contrôle métrologique des chaînes de mesure,
- ✗ Homogénéité de la distribution des températures pour les cycles ayant un pré-vide,
- ✗ Fonctionnement normal (test d'étanchéité, stérilisation et intégrité des filtres),
- ✗ Alarmes et sécurités,
- ✗ Paramètres programmables, impression et sécurité des données,
- ✗ En fin de QO, formation du personnel et présence des modes opératoires d'utilisation de l'autoclave.

Enfin, en **Qualification de Performance (QP)**, la vérification de la pénétration de la chaleur avec mise en œuvre d'indicateur biologique et vérification des critères physiques pour les charges maximales et minimales est réalisée. De ce fait, les charges intermédiaires sont qualifiées. A l'issue de la qualification, le plan de chargement est alors figé conformément à ce qui a été mis en œuvre au cours des essais de qualification.

3.2 Attentes en termes de qualification périodique pour les autoclaves

En qualification périodique des autoclaves, les BPF recommandent une revalidation des charges à intervalle déterminé, au moins annuellement et à chaque modification avec un impact sur l'équipement.

Les tests à réaliser sont les suivants :

- ✗ Test de tenue au vide,
- ✗ Vérification de la stérilisation du filtre (à réaliser avant et après chaque changement de filtre ainsi qu'à chaque intervention de la maintenance sur l'autoclave),
- ✗ Test de pénétrabilité de la vapeur (Bowie-Dick, facultatif pour les autoclaves dédiés à la stérilisation terminale ou traitement thermique non stérilisant),
- ✗ Validation périodique des charges par challenge microbiologique.

4. Attentes en termes de qualification pour les laveuses de flacons

4.1 Attentes en termes de qualification initiale pour les laveuses de flacons

Les attendus pour les qualifications des laveuses de flacons sont les suivants :

Pour la Qualification d'Installation (QI) :

- ✗ Vérification de la documentation,
- ✗ Vérification de l'identification et de l'installation,
- ✗ Vérification des matériaux de la chambre,
- ✗ Vérification des raccordements aux fluides,
- ✗ Vérification des systèmes électriques et automatismes,
- ✗ Dossier de soudure et tuyauteries.

Pour la Qualification Opérationnelle (QO) :

- ✗ Contrôle métrologique des chaînes de mesure,
- ✗ Vérification du bon déroulement des recettes de lavage des flacons,
- ✗ Vérification des alarmes et stress test (arrêt d'urgence, perte d'électricité, perte utilités, perte de communication automate, etc.),
- ✗ Vérification de l'aspersion des flacons (test à la riboflavine),
- ✗ Vérification des débits d'eau,
- ✗ En fin de QO, formation du personnel et présence modes opératoires d'utilisation de la laveuse.

Enfin, en **Qualification de Performance (QP)**, le contrôle du lavage des flacons pour chaque charge, chaque type de format flacons est mis en œuvre. Des conditions "worst case" en termes de durée d'injection, pression des fluides sont appliquées. Les paramètres de routine sont alors établis à +20% des valeurs des paramètres appliqués lors de la qualification.

4.2 Attentes en termes de qualification périodique pour les laveuses de flacons

En qualification périodique, chaque type de format de flacon doit faire l'objet d'un contrôle de lavage. Les conditions "worst case" pour les paramètres de lavage sont alors appliquées.

5. Méthodologie de rationalisation pour les tunnels

Le pré-requis à prendre en compte pour la rationalisation des qualifications des tunnels est une seule température de stérilisation pour tous les formats.

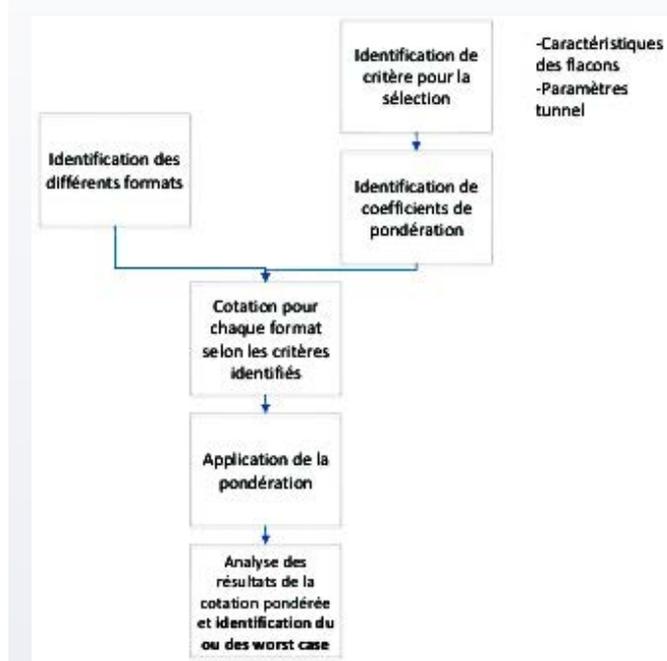
Dans notre cas, les flacons sont présentés avec une dimension d'ouverture du col identique pour tous.

L'approche "worst case" pour la qualification périodique des tunnels peut prendre en compte les critères de sélection suivants :

- ✗ Résultat de la qualification initiale,
- ✗ Masse, type (type I ou II) et couleur de verre (blanc ou brun),
- ✗ Valeur stérilisatrice théorique : $FH = \sum_i \cdot 10(T_i - Tréf)/Z \cdot \Delta t_i$ (avec dans notre cas utilisation des données suivantes : $Tréf = 170^\circ C$, $Z = 54^\circ C$, $T_i =$ Température Instantanée, $\Delta t_i =$ Intervalle de Temps),
- ✗ Les paramètres machines de fonctionnement utilisés : vitesse tapis, température de stérilisation, etc.
- ✗ Résistance au flux : la résistance au flux représente la capacité de la zone de chauffe d'un tunnel à conserver ses calories pour un profil de col de flacon donné, plus la surface entre le volet d'entrée du tunnel, l'épaule et le col du contenant est réduite, plus la résistance au flux fait obstacle à la fuite de calories, le format présentant la résistance au flux la plus faible est considéré comme le cas le plus défavorable.

L'analyse permet alors d'obtenir un (ou plusieurs) "worst case" devant faire l'objet d'une requalification périodique. Un nouveau format entraîne une nouvelle cotation.

Cette méthodologie est formalisée dans le logigramme suivant :



A titre d'exemple, les critères de choix ainsi que les pondérations mises en œuvre sur notre site sont les suivantes (chaque critère est pondéré par un coefficient permettant de tenir compte de l'importance que nous donnons à celui-ci) :

Critères	Coefficients de pondération
Masse de verre	2
Couleur du verre	1
Valeur stérilisatrice théorique	4
Résistance au flux	3

6. Méthodologie de rationalisation pour les autoclaves (flacons vides et flacons pleins)

L'approche de rationalisation mise en œuvre pour les autoclaves concerne les charges de flacons pleins (appelée charge liquide) et de flacons vides. Cette approche est différente en fonction du type de charge et s'applique pour des charges différentes mais ayant un cycle identique (température, durée, etc.).

L'approche de rationalisation de la qualification périodique des autoclaves peut prendre en compte les paramètres suivants :
Démonstration de l'équivalence des cycles dans le cadre de cycle utilisant les mêmes paramètres de cycles (prévu par le Technical Report n°1 V2 de la PDA (TR1 V2)) :

1. Equivalence entre les charges maximales et minimales
2. Equivalence entre les formats
3. Equivalence entre les autoclaves (non mis en place et non présentés ci-dessous)

Rappel :

Charge : Charge dont le nombre et la nature des items sont modulables en fonction d'un besoin défini et validé. Une charge mini et une charge maxi sont ainsi spécifiées.

Format : Type de conditionnement primaire du produit. Dans notre cas, les formats sont les quantités admissibles dans les flacons pouvant varier de 5 à 500 ml.

Le TR1 V2 de la PDA propose les principes d'équivalence suivants :

L'équivalence entre deux charges de tailles différentes pour le même format peut être établie par comparaison des valeurs stérilisatrices accumulées par les sondes de pénétration sur les charges minimales et maximales, et en utilisant les mêmes paramètres de cycle d'autoclavage.

Si les données démontrent l'équivalence, un total de 4 cycles (3 charges maximales et 1 minimale) peut être utilisé pour valider le procédé de stérilisation.

Ainsi, si les charges minimales, et maximales sont considérées équivalentes, alors toutes les charges de tailles intermédiaires sont également supposées équivalentes.

L'équivalence entre deux formats de tailles différentes peut être établie par comparaison des valeurs stérilisatrices accumulées par les sondes de pénétration sur le format le plus grand, et le plus petit, en utilisant les mêmes paramètres de cycle d'autoclavage, et le même plan de chargement.

Si les données démontrent l'équivalence, un total de 4 cycles (3 charges du format le plus grand, et une charge du format le plus petit) peut être utilisé pour valider le procédé de stérilisation.

Si le plus grand, et le plus petit format sont considérés équivalents, alors tous les formats de tailles intermédiaires sont également supposés équivalents.

Selon le TR1 V2 de la PDA, l'équivalence est reconnue si et seulement si :

- ✗ Les températures de consigne des paliers de stérilisation du cycle de référence et du cycle de comparaison ne diffèrent pas de plus de 0,5°C ;
- ✗ Les valeurs stérilisatrices du cycle de référence et du cycle de comparaison pour le point accumulant la valeur stérilisatrice la plus faible ne diffèrent pas de plus de 20% (valeur stérilisatrice au cœur de la charge) ;
- ✗ Les valeurs stérilisatrices du cycle de référence et du cycle de comparaison pour le point accumulant la valeur stérilisatrice la plus élevée ne diffèrent pas de plus de 20% (valeur stérilisatrice au cœur de la charge) ;
- ✗ Les températures enregistrées à proximité du drain lors des paliers de stérilisation du cycle de référence et du cycle de comparaison ne diffèrent pas de plus de 1,0°C.

Dans notre cas, après application des principes d'équivalence tels que définis par le TR1 V2 de la PDA, toutes les charges sont équivalentes et un format représentatif est choisi arbitrairement pour les qualifications périodiques.

Cette application du principe d'équivalence est formalisée dans le logigramme suivant :

7. Méthodologie de rationalisation pour les laveuses de flacons

L'approche de rationalisation de la qualification périodique des laveuses peut prendre en compte les paramètres suivants :

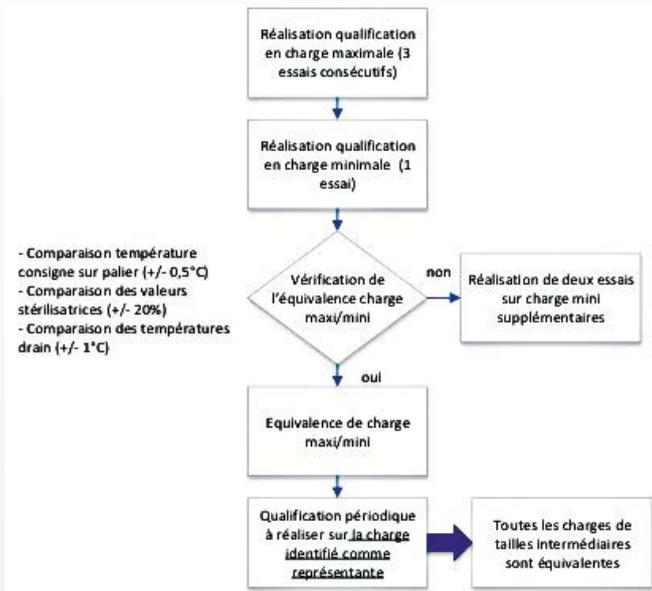
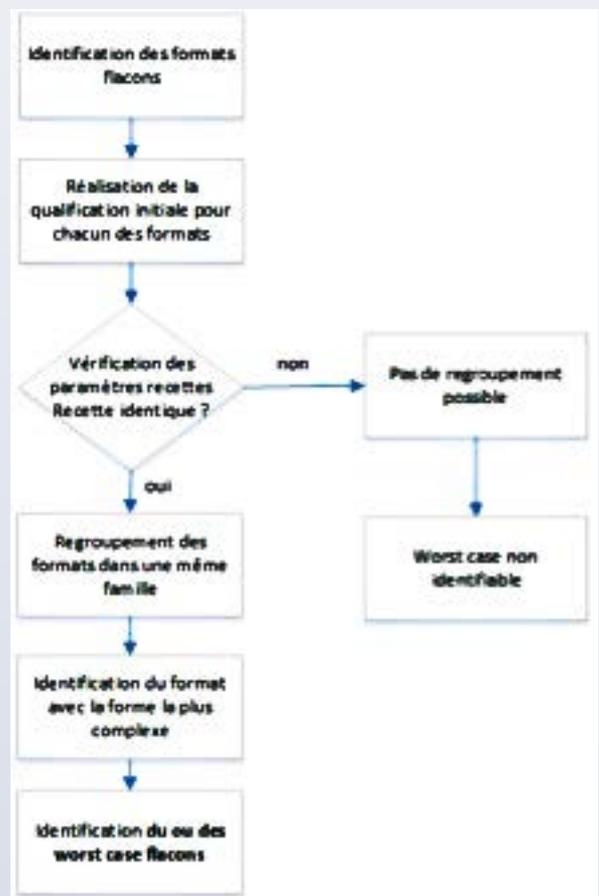
- ✗ Regroupement par famille de flacons pour les charges utilisant les mêmes paramètres de cycle
- ✗ Identification de la forme de flacons la plus complexe (un flacon est considéré comme complexe lorsque l'on peut avoir une difficulté d'accès pour le lavage)



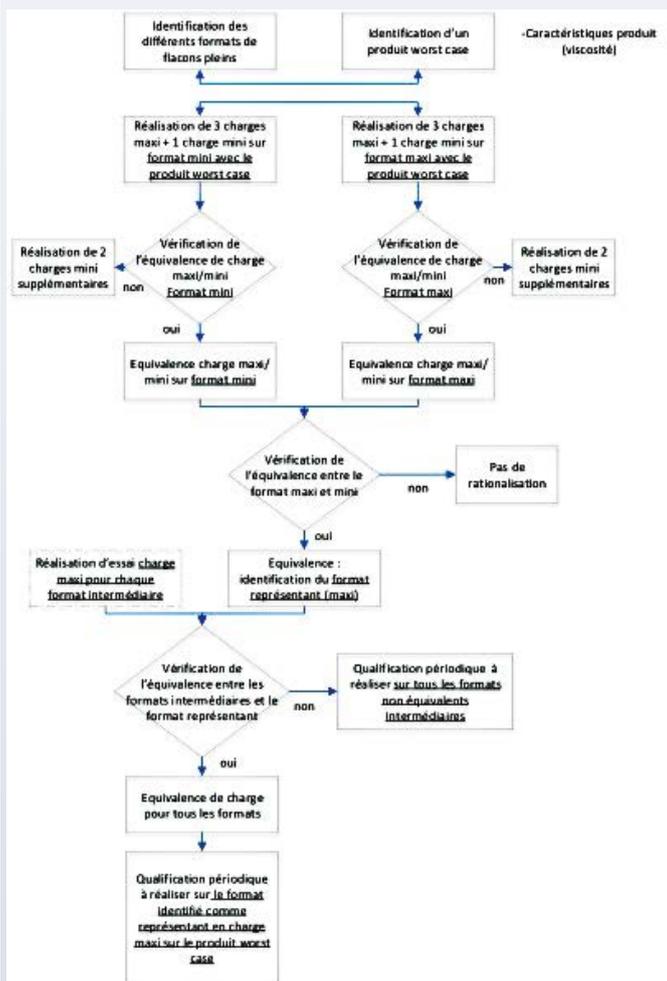
La méthodologie appliquée consiste à regrouper les formats de flacons pour lesquels les paramètres suivants sont identiques :

- ✗ Durée injection d'eau pour préparations injectables,
- ✗ Pression injection d'eau pour préparations injectables,
- ✗ Durée injection eau recyclée,
- ✗ Pression injection eau recyclée,
- ✗ Durée injection air comprimé.

Le logigramme suivant présente la méthodologie proposée pour le regroupement :



Pour les charges de type liquide, le logigramme de rationalisation est le suivant :



Notons que dans le cas des charges liquides, la sensibilité du produit à la température est un paramètre à prendre en compte. Par ailleurs, pour les regroupements des charges liquides, la sonde pilote doit être placée dans le même flacon déterminé lors de la qualification initiale quelque que soit la charge.

8. Bilan global de la rationalisation

La rationalisation des différents appareils en appliquant la méthodologie telle que précédemment proposée, nous a permis de faire différents types de bénéfices :

- ✗ Gain financier en limitant le nombre de tests de qualification et le fonctionnement des équipements,
- ✗ Gain en termes de ressources en production et en qualification,
- ✗ Limitation des immobilisations des appareils pour cause de qualification,
- ✗ Gain énergétique (fluides, électricité).

Cet exercice a également contribué à une meilleure connaissance de nos procédés (et de leurs limites) et de nos équipements.

Une économie proche de 80% (en comptabilisant les gains liés à la perte de production lors des essais de qualification, à la main d'œuvre utilisée, aux économies de fluides et électricité et économie sur le matériel utilisé pour les tests) a été réalisée.

Le tableau ci-dessous indique en nombre de tests de qualifications, les gains réalisés pour notre site sur une année :

Type d'équipement	TYPE DE CHARGE	Nombre de tests de qualification de performance avant rationalisation (en nombre de formats)	Nombre de tests de qualification de performance après rationalisation (en nombre de formats)
TUNNEL	Dépyrogénéation de 5 formats et 2 couleurs	10	1
AUTOCLAVE	Stérilisation flacons vides	42	1
	Stérilisation flacons Pleins	48	1
LAVEUSE DE FLACONS	Lavage de 7 formats	7	3
Total AVANT rationalisation (en nombre de tests de qualification)			107
Total APRES rationalisation (en nombre de tests de qualification)			6

Glossaire des Acronymes

PDA	Parenteral and Drug association
QI	Qualification d'installation
QO	Qualification opérationnelle
QP	Qualification de performance
TR	Technical Report
UI	Unité internationale

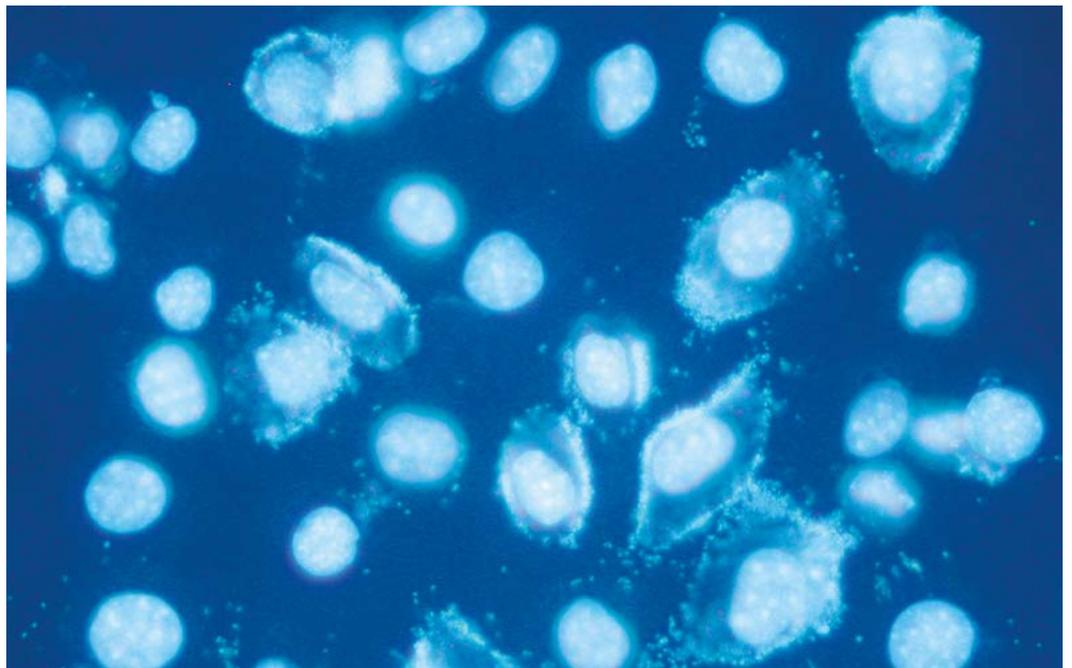
**Cahier
Pratique**

La détection des mycoplasmes par qPCR :

les challenges de la mise en place de ce test en remplacement de la méthode réglementaire par culture décrite dans différentes pharmacopées (USP, EP, JP...)

Par A. SANCHEZ et C. IOCHEM - SGS Life Science Services France
Aude.sanchez@sgs.com - Christophe.iochem@sgs.com

La contamination des cultures de cellules par des mycoplasmes représente un risque majeur pour l'industrie biopharmaceutique. De part leur diversité, leur petite taille et l'absence de paroi bactérienne, ces microorganismes ne sont pas détectables par microscopie, sont très difficiles à éliminer et peuvent compromettre la qualité des médicaments. La détection d'une contamination mycoplasmaïque est par conséquent critique dans les différentes étapes de production des produits biotechnologiques.



Récemment, l'utilisation de différentes techniques d'amplification des acides nucléiques et en particulier de la PCR quantitative en temps réel pour détecter des mycoplasmes a été décrite dans différents rapports des Pharmacopées Européenne, Américaine et Japonaise. Ces rapports ont confirmé l'utilisation de ces méthodes comme alternatives aux méthodes conventionnelles à la condition d'être convenablement validées.

La qPCR est une méthode directe sensible et rapide permettant d'obtenir un résultat dans la journée. En comparaison, la méthode standard réglementaire (méthode directe par culture sur milieu broth et agar dans différentes conditions) nécessite un délai de 28 jours. Pour utiliser cette technique très rapide en routine, la Pharmacopée Européenne

(Ph. Eur. 2.6.7) impose la réalisation d'une étude de validation détaillée pour démontrer l'équivalence avec la méthode réglementaire. Le design de cette qualification s'articule autour de trois critères : la limite de détection (LOD: 10 CFU/ml), la spécificité ainsi que la robustesse.

→

La méthode indirecte par marquage fluorescent (type Hoechst) après une phase de culture de l'échantillon sur cellules indicatrices (Vero) permet de détecter des mycoplasmes non cultivables avec la méthode de bactériologie (notamment *M. hyorhinis* ATCC 29052). Elle permet aussi de mettre en évidence des mycoplasmes vivants par opposition à la PCR qui amplifie indifféremment l'ADN de mycoplasmes morts et vivants contenus dans un échantillon.

LES MYCOPLASMES DANS LES BIOTECH

Les cellules aujourd'hui sont devenues des outils indispensables pour produire un nombre croissant de produits bio-thérapeutiques : protéines recombinantes, anticorps monoclonaux, vaccins ainsi que les thérapies géniques et cellulaires. En parallèle, les tests cellulaires (Cell Based Assays) accompagnent le développement et la mise sur le marché de ces produits.

Une contamination mycoplasmatique en général non visible (pas de turbidimétrie) peut potentiellement provoquer de nombreux désordres dans la physiologie cellulaire (taux de croissance, rendement de production,...) sur un large spectre de cellules hôtes : humaines et animales (incluant les oiseaux, les mammifères et d'autres espèces potentielles : insectes, plantes). De plus certaines espèces de mycoplasmes sont pathogènes pour l'homme.

Le test réglementaire référencé dans les principales pharmacopées est une méthode de détection directe des mycoplasmes par culture pendant 28 jours sur des milieux spécifiques (Broth et Agar). Ce long délai de rendu de résultat pose problème pour des produits bio-thérapeutiques avec une courte période de vie comme par exemple la thérapie cellulaire. Cela pose aussi un autre problème car certaines espèces de mycoplasmes "poussent" très mal voire pas du tout sur ces milieux spécifiques.

Lors du déroulement des étapes successives de production, un contrôle "in-process" pour la détection des mycoplasmes par qPCR permet de limiter les risques de propagation d'une contamination sur les étapes suivantes et de prendre une décision rapide et sûre ("go/no-go") pour la suite du processus.

De surcroît, une contamination peut potentiellement avoir des conséquences sérieuses pour le laboratoire ou l'unité de production si on n'identifie pas rapidement la cause racine ("root cause").

Cette méthode de culture sur 28 jours peut aussi être inappropriée pour des échantillons cytotoxiques ou pour des échantillons "in-process" nécessitant un rendu de résultat rapide et sûr. C'est en partie pour ces raisons que certaines autorités réglementaires acceptent comme alternative l'utilisation du test de détection par PCR quantitative en temps réel au cas par cas. Cette acceptation nécessite une validation complète et documentée selon des guidelines spécifiques (Ph. Eur. 2.6.7).



Quels sont donc les challenges, les enjeux et les perspectives de la mise en place de ce test par PCR quantitative en temps réel en remplacement de la méthode classique ?

La plupart des autorités réglementaires : European and United States Pharmacopeia (Ph. Eur. & U.S.P.), US Code of Federal Regulations (CFR), FDA Points to Consider (PTC), the International Conference on Harmonisation (ICH), intègrent des documentations techniques sur les procédures requises pour la détection des mycoplasmes durant les différentes étapes de production.

Les principaux référentiels décrivant les méthodes de détection sont :

- EP 2.6.7, U.S.P. <63>
- Japanese Pharmacopoeia XV Information Chapter 14
- 21 CFR 610.30 for human viral vaccines
- US FDA's Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals
- 2010 Cell Substrates Guidance ainsi que pour les produits vétérinaires : 9 CFR 113.28 for Veterinary Products

Pour la validation du test, les principaux cadres réglementaires sont :

- EP 2.6.7, U.S.P.<1223>
- EP 5.1.6, 21 CFR §610.9
- JP XV General Notice 13

Ainsi pour rendre un résultat avec la méthode de PCR quantitative en temps réel, une validation doit être réalisée pour démontrer l'équivalence avec la méthode réglementaire par culture. La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur. 2.6.7) définit le design d'une telle étude avec des paramètres spécifiques à valider: LOD avec 10 CFU/ mL, spécificité et robustesse.

Le nouveau laboratoire SGS Life Science Services propose en routine et dans un environnement GMP dédié, la détection des mycoplasmes par la méthode qPCR et par la méthode sur cellules indicatrices Vero (marquage Hoechst). Ce nouveau service vient renforcer notre volonté d'offrir à nos clients des services complets et innovants pour leurs produits biologiques (thérapeutiques, diagnostiques, vétérinaires) tout en complétant nos services dédiés à l'ensemble de l'Industrie Pharmaceutique et BioPharmaceutique.

Pour démontrer que la sensibilité de la méthode qPCR est au moins égale à la méthode réglementaire, cette validation doit être réalisée dans un environnement contrôlé avec l'utilisation de souches mycoplasmes spécifiques. L'Agence Européenne indique en effet l'importance d'utiliser des stocks de mycoplasmes avec un ratio bas pour le rapport nombre de copie du génome /CFU (GC/CFU ratio) afin de comparer directement les LODs obtenues par les deux méthodes.

En résumé, le choix de la méthode de détection la plus adaptée dépend spécifiquement du produit biologique ainsi que de son procédé de fabrication. Une évaluation scientifique et technique est nécessaire pour déterminer la ou les méthode(s) la plus appropriée selon le type d'échantillon, il peut être nécessaire et pertinent d'utiliser deux méthodes. Ces considérations devront au final être potentiellement intégrées dans le dossier spécifique du produit biologique.

→

Contrôle microbien en temps réel

Aucun micro-organisme ne vous échappera !

L'analyseur de charge microbienne 7000RMS offre un suivi en continu 24h/24 des eaux pharmaceutiques (EP, PPI). La technologie avancée basée sur le laser offre une détection et une quantification immédiate des micro-organismes : elle permet ainsi de dépasser les limites des techniques traditionnelles fondées sur la croissance bactérienne.

Mettler-Toledo Analyse Industrielle,
30 Bd de Douaumont 75017 Paris

www.mt.com/7000RMS

METTLER TOLEDO

Comparaison des 3 principales techniques :

Ces différents critères sont donc importants à prendre en compte dans le développement et l'élaboration du "risk assessment" pour choisir la méthode la plus adaptée à chaque produit.

	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
qPCR Méthode la plus adaptée pour rendre des résultats rapides et sensibles	Rapidité, LOD basse (10 CFU/ml), automatisation de l'extraction lorsqu'elle est prévue.	Pas de distinction des mycoplasmes et morts. Dans le cas d'une faible contamination détectée par qPCR ou pour certains types d'échantillons, cet aspect peut être compensé par une phase préalable d'enrichissement sur cellules comme décrit dans Ph.Eur. 2.6.7.
CELLULES INDICATRICES (VERO) avec marquage Hoechst en complément et/ou en association AVEC LA qPCR	Permet de détecter des espèces de mycoplasmes non cultivables, relativement rapide (6-8 jours), amélioration potentielle dans certains cas de la sensibilité de la qPCR.	LOD de 100 CFU/ml décrite dans les Pharmacopées (même si en réalité, on peut valider une LOD plus basse pour certaines espèces).
CULTURE SUR MILIEU BROTH ET AGAR	Seul "avantage" est qu'il s'agit de la méthode standard avec une LOD admise de 10 CFU/ml.	Technique très longue (28 jours minimum) qui nécessite beaucoup de manipulations et lectures donc coûteuse. Certaines espèces de mycoplasmes ne poussent pas sur ces milieux.

Bibliographie :

- Hay, R.J., Macy, M.L., and Chen, T.R. Mycoplasma Infection of cultured cells. Nature (London), 229: 487-488, 1989.
- Volokhov DV1, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. Mol Cell Probes. 2011 Apr-Jun;25(2-3):69-77.
- European Pharmacopoeia, 7th Edition, Section 2.6.7, Mycoplasmas, 01/2008:20607 corrected 6.1.
- US Government (2010) Code of Federal Regulations, Title 21 Section 610.30. Test for Mycoplasma. Center for Biologics Evaluation and Research. Food and Drug Administration. Points to Consider in characterization of cell lines to produce biologics, 1993 and Title 21 Section 610.18: Cell lines used for manufacturing biological products.
- United States Pharmacopoeia (2010) General Chapter 63, "Mycoplasma Tests"
- Center for Biologics Evaluation and Research. Food and Drug Administration. Points to Consider in the Manufacture and testing of monoclonal antibody products for Human use, 1997.
- Center for Biologics Evaluation and Research. FDA. Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications, Feb 2010.
- Japanese Pharmacopoeia XV, 14. Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products. Supplement II (September 30, 2009).
- <1223>Validation of Alternative Microbiological Methods. In: United States Pharmacopoeia. 32nd ed.
- 5.1.6. Alternative Methods for Control of Microbiological Quality. In: European Pharmacopoeia. 6th ed. Strasbourg, FR: European Directorate for the Quality of Medicines; 2010.

Glossaire des Acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
CFR	Code of Federal Regulation
CFU	Unité Formant Colonie (Colony Forming Unit)
EP ou Ph. Eur	Pharmacopée Européenne
FDA	Food and Drug Administration
GC	Copie de génome (genome copy)
GMP	Good Manufacturing Practices (Bonnes Pratiques de Fabrication)
ICH	International Conference on Harmonisation
JP	Pharmacopée Japonaise
LOD	Limite de détection
PTC	Point To Consider
qPCR	quantitative Polymérase Chain Reaction
U.S.P.	Pharmacopée US

Environmental Monitoring Program: Hot topics in Microbiology & Best Practices.

Par Benoît RAMOND - Sanofi
Benoit.Ramond@sanofi.com

The manufacture of sterile pharmaceutical product requires specific attention regarding environment, premises and practice of the personnel. Regulations in place to be used by the Pharmaceutical Industry give requirements on the environmental monitoring program.

FDA with the publication of Warning Letters and 483 form shows that environmental monitoring procedure and practice of the personnel belong to top 10 of the gaps found during inspections.

This article, for the Environmental Monitoring program (EM) in aseptic processing as well in Conventional Clean Rooms (CCR) or using Isolator/RABS technologies: describes the main expectations of the regulations in place, presents the hot topics in microbiology and gives solutions for implementation of best practices.

From the gaps highlighted by FDA during inspections, the following Microbiology topics will be described: samples location justification, missing samples and data interpretation, trending system and CAPA system.



1. Regulations

1.1 Environmental Monitoring in CCR – Key Expectations

Regulations^[(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)] require the following key points to be performed during the EM for filling operations in CCR:

- Filling in aseptic processing in Conventional Clean Room (CCR) should be classified Class ISO 5 (Grade A).
- Surrounding room should be classified Class ISO 5 (Grade B at rest).
- Surrounding room should be maintained Class ISO 7 (Grade B in operation).
- Environmental Monitoring Program (EM) should be in operation.
- EM locations should be based on a formal risk analysis study and from the results.
- For CCR control of the personnel is required Gloves/Garment depend on the room class.
- For CCR Active Air Sample (AAS), Passive Air Sample (PAS) & Surfaces Monitoring (SM) should be performed.
- Surfaces should be monitored after completion of the working operation
- Gloves of the personnel should be monitored at each exit and after critical interventions
- Garment of the personnel (Grades A/B) should be monitored for each shift
- Limits for each sample type (Refer to EU/GMPs/Annex 1)
- Trending system using CRR (Refer to U.S.P.<1116>).

....>

1.2. Environmental Monitoring using Isolator/closed RABS technologies – Key Expectations

Regulations ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ require the following key points to be performed during the EM for filling operations using isolator or closed RABS technologies:

- Isolator should be classified Class ISO 5 (Grade A).
- Surrounding room should be classified Class ISO 8 (C/D).
- Environmental Monitoring (EM) should be in operation.
- EM locations should be based on a formal risk analysis study and from the results obtained both during Qualification Program & in Routine.
- For isolator control of the personnel is not required.
- For isolator AAS, PAS & Surfaces should be performed.
- Surfaces should be monitored after completion of the filling operation or campaign.
- Critical gloves & half-suits should be monitored at the end of each filling operation.
- Limits for each sample type (Refer to EU/GMPs/Annex 1).
- Trending system using CRR (Refer to U.S.P.<1116>).

2. Hot Topics in Microbiology & Best Practices

2.1 Samples Location Justification

Samples are generally described in the procedures for Environmental Monitoring program. But the exact location for each is not always clearly defined and/or justified.

FDA Warning Letter 2011: "Your Environmental monitoring program does not give assurance that environmental contaminants are reliably detected:

- Your practice of collecting samples from the gloves of operators from left & right hands on alternative days is unacceptable.
- Your SOP fails to include instructions for the location and duration of samples collected in the critical aseptic processing areas."

What are the expectations of the authorities?

FDA - Guidance for Industry - Aseptic Processing - 2004:

- "A vigilant and responsive personnel monitoring program should be established. Monitoring should be accomplished by obtaining surface samples of each operator's gloves on a daily basis, or in association with each lot. This sampling should be accompanied by an appropriate sampling frequency for other strategically selected locations of the gown. The quality control unit should establish a more comprehensive monitoring program for operators involved in operations which are especially labor intensive (i.e., those requiring repeated or complex aseptic manipulations)."
- "We recommend that this assessment include microbiological surface sampling of several locations on a gown (e.g., glove fingers, facemask, forearm, chest). Sampling sites should be justified. Following an initial assessment of gowning, periodic requalification will provide for the monitoring of various gowning locations over a suitable period to ensure consistent acceptability of aseptic gowning techniques."
- "The monitoring program should cover all production shifts and include air, floors, walls, and equipment surfaces, including the critical surfaces that come in contact with the product, container, and closures"
- "Written procedures should include a list of locations to be sampled."
- "Sample timing, frequency, and location should be carefully

selected based upon their relationship to the operation performed."

- "Samples should be taken throughout the classified areas of the aseptic processing facility (e.g., aseptic corridors, gowning rooms) using scientifically sound sampling procedures."
- "Air and surface samples should be taken at the locations where significant activity or product exposure occurs during production."
- "Critical surfaces that come in contact with the sterile product should remain sterile throughout an operation."
- "When identifying critical sites to be sampled, consideration should be given to the points of contamination risk in a process, including factors such as difficulty of setup, length of processing time, and impact of interventions."
- "All environmental monitoring locations should be described in SOPs with sufficient detail to allow for reproducible sampling of a given location surveyed."
- "Written SOPs should also address elements such as frequency of sampling, when the samples are taken (i.e., during or at the conclusion of operations), duration of sampling, sample size (e.g., surface area, air volume), specific sampling equipment and techniques, alert and action levels, and appropriate response to deviations from alert or action levels."
- "Surfaces - Environmental monitoring involves sampling various surfaces for microbiological quality. For example, product contact surfaces, floors, walls, and equipment should be tested on a regular basis."
- "Active Air Sampling - We recommend that such devices be used during each production shift to evaluate aseptic processing areas at carefully chosen locations."
- "Passive Air Sampling - Their value in critical areas will be enhanced by ensuring that plates are positioned in locations posing the greatest risk of product contamination."

ISO 13408 – Part 1:

"Gloved fingerprints of personnel present in the direct support zone and/or critical processing zone shall be monitored daily.
At defined intervals samples from the gowns shall also be taken (e.g. both forearms, chest, hood).
NOTE: The frequency of sampling of gowns and gloves is based on the nature of the activities performed."

ISO 14698 – Part 1:

"The following are examples of elements to be considered: Choice of the sampling location, taking account of the location and function of the risk zone."

PDA/TR N°13:

"A documented risk assessment for the selection of each process should be made some examples of risk factors to consider in selecting sites for surveillance are as follow:

1. Sites or processes in which microbial contamination would most likely have an adverse effect on product quality
2. Sites that would most likely demonstrate the heaviest microbial proliferation during actual production
3. Whether site selection should involve a statistical design or should be made on the basis of grid profiling
4. Whether routine monitoring sites should be rotated
5. Sites that represent the most inaccessible or difficult areas to clean and disinfect

- 6. Modes of microbe dispensal in the environment
- 7. Sampling at a given site that may disturb the environment sufficiently to cause erroneous data to be collected or to contaminate product."

U.S.P.<1116>:

- "Monitoring locations should be determined based upon a assessment of risk."
- "Locations considered should include those in proximity of the exposed product, containers, closures, and product contact surfaces."
- "The user should conduct a prospective risk analysis and develop a rationale for the sampling locations and frequencies for each controlled environment."

EC/GMPs/Annex 1:

"Clean rooms and clean air devices should be routinely monitored in operation and the monitoring locations based on a formal risk analysis study and the results obtained during the classification of rooms and/or clean air devices."

How to justify samples location?

Apply a risk based approach for the analysis methodology combining:

- Process knowledge and understanding including support with smoke test studies
- Evaluation of process criticality
- Critical control points (CCP) definition and location
- Sampling plan program description



Figure 3

The risk analysis evaluation approach should follow the following steps:

- a/ Identify the potential sources/causes of contamination:
 - Ishikawa fishbone diagram (Figure 3),
 - Smoke test studies,
 - Data from the initial EM Qualification.
- b/ Risk assessment: Levels of Severity and Occurrence evaluation tables and quotation for each intervention at risk.
- c/ Mapping of potential sources/causes of contamination with risk evaluation for each process operation: Critical Control Points (CCPs) approach & Total environmental risk evaluation.

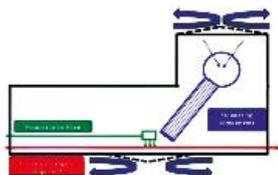


Figure 4 describes an aseptic filling process in CCR with the following flows:
 - Product to be filled
 -Primary packaging components (sterile & pyrogen free vials after direct transfer from the oven)
 - Stoppering components after transfer by the personnel from sterile bags.

Figures 4, 5 & 6 describe an example of definition of the samples locations from an aseptic filling process including closure of vials with rubber stoppers.

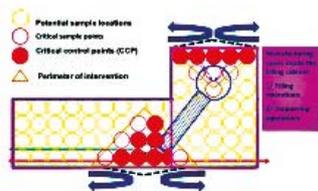


Figure 5 describes the potential samples locations where a sample point is defined normally not more than 1 foot dimension (FDA requirement) away from the work site, within the airflow, and during filling/closing operations versus their respective areas in the perimeter of intervention of the personnel (orange triangles). All critical control points (CCP) are defined as full red spots.

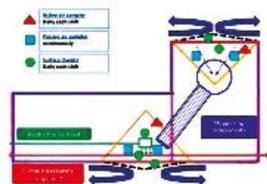


Figure 6 describes the exact samples location for all samples types (Active air Sampling using an impaction system, Passive air Sampling using sedimentation settle plates 90mm, Surface Monitoring using contact plates 25cm²).

2.2. Missing Samples

FDA – Warning Letter 2011: "Your firm has not thoroughly investigate any unexplained discrepancies, for example for missing environmental samples."

FDA – Warning Letter 2012: "Approximately 846 EM samples were not collected in the grades A & C areas from March 2010 to Feb 2012. This substantial number of missed samples suggests a pattern that raises concerns regarding your environmental program. Collecting scheduled EM samples is critical aspect of any environmental control program at an aseptic manufacturing facility. "

What is the expectation of the authorities?

FDA: Missing samples is a deviation.

What to do?

If immediately concerned:

- This incident must be managed as a deviation involving the performance of an investigation.
- Evaluate the impact of the batch.
- In grades C & D the impact should be low. But in grades A & B surround A the impact is high up to batch destruction.
- Review of the other results and trend at the same location on a period of time.
- Review of the results of the other location the day of the missing sample.
- If the origin is a damage of the plate, a solution could be

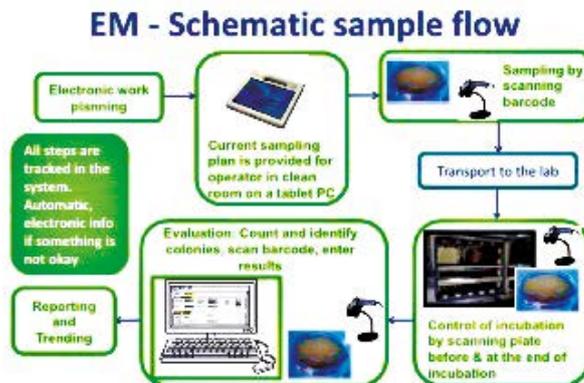


Figure 7 – E M Schematic sample flow to keep full traceability of each sample.

incubation of this plate with an information of the risk to have contamination because of this damage. If important growth with result different from the trend, evaluate after investigation the possibility for invalidation.

- A CAPA must be defined and scheduled including an action for traceability of all samples and the possibility to know the status of each sample at each critical step such as sampling, transfer, incubation, reading (Refer to *Figure 7*).

It's essential to keep and manage the all traceability of the sampling program from the initial step (preparation of samples devices), the incubation operations, to the final step (results and data interpretation)

Figure 7 gives an example of the management of the samples including the use of a tablet PC and a scanning bar code system.

2.3. Data Interpretation – Trending System & CAPA

Interpretation of the EM results should be described in a procedure but Trends are not always easy to evaluate.

Health Canada -2012: "The approach to EM trending was quite broad and was not necessarily sensitive enough to identify localized trends, nor would it necessarily identify trends for specific objectionable organisms."

What are the expectations of the authorities?

ISO 14698 – Part 1:

"To assist in interpretation, results shall be reviewed over extended periods to determine trends. Based on the review of these investigations and specific testing results, decisions shall be made on the significance of unusual results, and the acceptability of the operations or products processed under those conditions."

ISO 14698 – Part 2:

"Management of microbiological results from risk zones should take the following factors into account: ...;

- trend analysis; ..."

"Data coming from a single sample are often not significant; furthermore, microbiological monitoring techniques may have serious shortcomings that result in a high degree of variability. Therefore, graphic presentation of the results collected over a period of time may be useful in distinguishing sampling variation from trends, or in indicating that a significant change has occurred, even though the results fall within the specified limits. "

ISO 13408 – Part 1:

"Environmental data (both counts and the type of microbial isolates) shall be analysed for trends on a routine basis."

"A trend report giving an overview of all environmental observations and trends shall be issued in fixed intervals."

"Trend reports should include data generated by location, shift, room, operator or other parameters. When indicated by individual excursions and/or trend data, an investigation shall be initiated."

"Examples of trends leading to an investigation include:

- a) A trend towards higher numbers of microorganisms at a sampling site;
- b) Repeated occurrence of microorganisms not often encountered."

FDA/G for I/Aseptic Proc./2004:

"Adverse trends:

Because false negatives can occur, consecutive growth results are only one type of adverse trend. Increased incidence of contamination over a given period is an equal or more significant

trend to be tracked. In the absence of any adverse trend, a single result above an action level should trigger an evaluation and a determination about whether remedial measures may be appropriate. In all room classes, remedial measures should be taken in response to unfavorable trends. The quality control unit should provide routine oversight of near-term (e.g., daily, weekly, monthly, quarterly) and long-term trends in environmental and personnel monitoring data. "

"Trend reports should include data generated by location, shift, room, operator, or other parameters"

"The quality control unit should be responsible for producing specialized data reports (e.g., a search on a particular isolate over a year period) with the goal of investigating results beyond established levels and identifying any appropriate follow-up actions. Significant changes in microbial flora should be considered in the review of the ongoing environmental monitoring data."

PDA/TR N°13:

«Routine review and analysis of environmental monitoring data for trends at an appropriate frequency is essential to aid in the interpretation of process stability and assess overall environmental control performance. »

"Recovery rate may be used for trending and control of the overall microbial load in the classified environment, equipment surfaces, material, and garment (Refer to U.S.P.<1116>)."

"The recommended recovery rate for ISO 5 environments can be achieved; ... »

"It is recommended that companies develop their own recovery rate criteria for ISO 6, 7 and 8 environment depending on the activities and processes conducted in these areas. "

U.S.P. <1116>:

"The analysis of contamination trends in an aseptic environment has long been a component of the environmental control program."

"Because of the inherent variability of microbial sampling methods, contamination recovery rates are a more useful measure of trending results than is focusing on the number of colonies recovered from a given sample. "

Table describing contamination recovery rates for aseptic processes.

"Trend Analysis: Data from a routine microbial environmental monitoring program that can be related to time, shift, facility, etc. This information is periodically evaluated to establish the status or pattern of that program to ascertain whether it is under adequate control. A trend analysis is used to facilitate decision-making for requalification of a controlled environment or for maintenance and sanitization schedules. "

How to build a trend analysis system considering the severity and the occurrence of the microbial contamination in the objective to evaluate its risk for the process, the product, the patient?

Written procedures should be established, detailing data review frequency and actions to be taken. The quality control unit should provide routine oversight of near-term (e.g., daily, weekly, monthly, quarterly) and long-term trends in environmental and personnel monitoring data.

Because of the limited accuracy and precision of microbial growth and recovery assays, analysts can consider the frequency with which contamination is detected rather than absolute numbers

of cfu detected in any single sample. Implementation of the Contamination Recovery Rate (CRR) based on the following calculation:

$$\text{CRR} = \frac{\text{Number of results with positive growth}}{\text{Total number of samples}}$$

The objective of each user should be to use CRRs to track ongoing performance and to refine the microbiological control program to foster improvement.

Action should be required when the CRR trends above the recommendations (U.S.P.<1116>) for a significant time.

Corrective actions may include but are not limited to the following:

- Review the sanitization program, including cleaning procedure, application methods, and frequencies
- Reinforcement of personnel training
- Increased surveillance of personnel practices
- Review of microbiological sampling methods, techniques, frequency, number of samples.
- When higher-than-typical recovery levels for gloves contamination are observed, additional action should be defined including the evaluation of gloves integrity (isolator technology).

As a conclusion regulation does not always detail all requirements for Environmental Monitoring Program. Nevertheless whatever the case each individual practice in place must be justified supported when possible by a risk based approach.

When "hot topics" in Microbiology emerge from return of inspections from authorities or/and during self-inspection, it should be a good opportunity to evaluate the local performance for a challenge to access to "best practices".

Bibliographie :

- (1) European Community - EudraLex - The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4 - EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use - Annex 1 - Manufacture of Sterile Medicinal Products.
- (2) FDA - Guidance for industry - Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practices - September 2004.
- (3) U.S.P.<1116> - Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments.
- (4) ISO 14644-1 - Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness
- (5) ISO 14698-1 - Cleanrooms and associated controlled environments Biocontamination control - Part 1: General principles and methods.
- (6) ISO 14698-2 - Cleanrooms and associated controlled environments Biocontamination control - Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination data.
- (7) ISO 13408-1 - Aseptic processing of health care products - Part 1: General requirements.
- (8) PDA - TR N°13 (Revised) – Fundamentals of an Environmental Monitoring Program – 2014.



L'alliance des compétences au service de la qualité

- Développement et contrôle qualité
- Physico-chimie et microbiologie
- Stockage et études de stabilité
- Études précliniques et cliniques vétérinaires
- Support technique et réglementaire
- Pré et post AMM
- Conseil et formation



www.acmpharma.com



www.cebiphar.com



www.ups-consultants.com



I love

J'aime mon système de filtration car il évite la contamination secondaire.

#passionforscience

Microsart® @media et @filter.
Sécurisé car s'utilise sans le toucher.

Évitez les contaminations secondaires lors de vos contrôles microbiologiques grâce au design unique des boîtes de milieux de culture. Après la filtration, transférez la membrane sans la toucher avec une pince, sur le milieu de culture. Verrouillez le couvercle et incubez. C'est terminé.

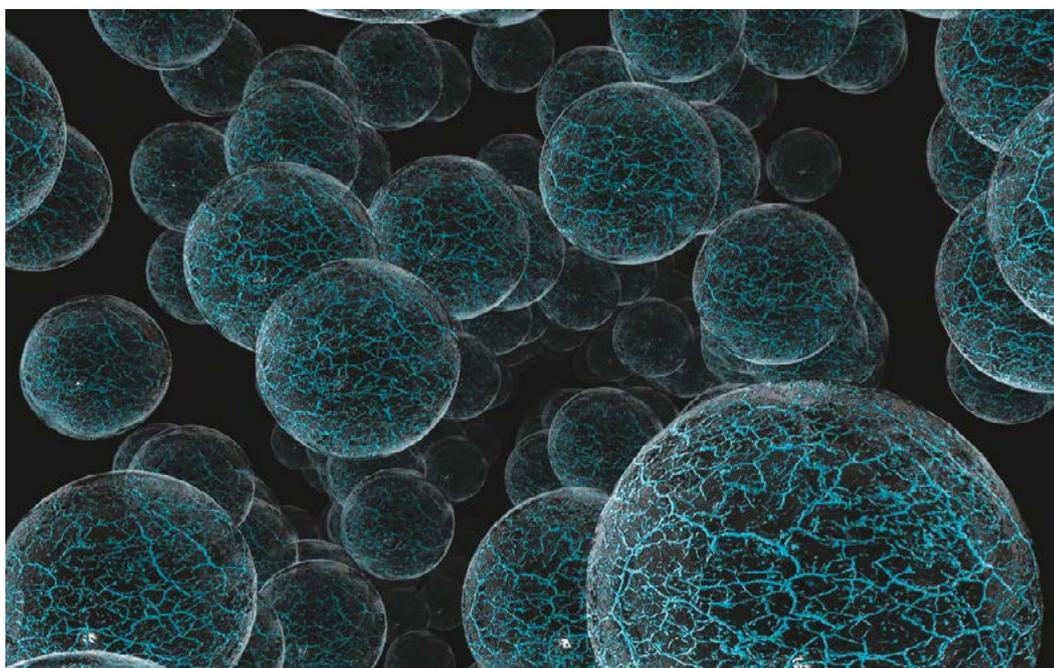


Partagez votre #passionforscience sur
www.passionforscience.com

Quel est l'impact des désinfectants sur les contrôles d'environnement ?

Par Laurent LEBLANC - bioMérieux
laurent.leblanc@biomerieux.com

Le programme de contrôle de l'environnement est l'un des éléments indispensables de la maîtrise de la qualité des environnements des productions pharmaceutiques, il est donc essentiel d'employer des solutions de suivi capables de détecter toute dérive pouvant entraîner la perte de cette maîtrise. Concrètement le contrôle de l'environnement repose majoritairement sur l'utilisation de milieux de culture gélosés qui doivent permettre de recouvrir chaque éventuel microorganisme vivant mais également neutraliser la présence de résidus de désinfectants pouvant inhiber la croissance de certaines souches tout en favorisant une pousse suffisante pour être vue par un opérateur.



De la performance de ces milieux dépend la qualité des résultats des contrôles et bien évidemment de la pertinence des analyses de tendance qui en découlent. Mais valider des milieux de culture pouvant récupérer les germes stressés de l'environnement dans une salle propre n'est pas une chose si aisée ! Pour mieux comprendre l'interaction entre milieux de culture et désinfectants dédiés au contrôle de l'environnement nous avons étudié les propriétés des biocides les plus communément utilisés dans l'industrie pharmaceutique et proposé une méthodologie pour évaluer leur impact sur la performance de ces milieux.

La fabrication des médicaments dans un environnement aseptique reste une tâche complexe. Le maintien de la qualité des zones de production passe par le respect de nombreuses procédures dont celles relatives au nettoyage et à la décontamination et bien évidemment par l'emploi de différents biocides. Le choix du bon désinfectant s'avère donc crucial pour garantir la bonne maîtrise de la biocharge. Tout cela est nécessaire mais n'est cependant pas suffisant. Il reste ensuite à s'assurer du niveau de propreté des surfaces et pour réaliser ce travail, l'emploi de milieux de cultures gélosés est largement répandu dans le monde des industriels de la pharmacie. Ces milieux, généralement au format de géloses contact, sont chargés de faire croître les potentiels microorganismes présents et évaluer la contamination des surfaces. Ils vont être confrontés directement à ces désinfectants. Mais comment estimer la compatibilité entre désinfectant et milieu de culture sans pour cela faire de lourdes validations ?

Commençons par nous intéresser aux différents biocides utilisés dans l'industrie pharmaceutique.

Chemical Entity	Classification	Example
Aldehydes	Sporicidal agent	2% Glutaraldehyde
Alcohols	General purpose disinfectant, antiseptic, antiviral agent	70% Isopropyl alcohol, 70% alcohol
Chlorine and sodium hypochlorite	Sporicidal agent	0.5% Sodium hypochlorite
Phenolics	General purpose disinfectant	500 µg per g Chlorocresol, 500 µg per g chloroxylenol
Ozone	Sporicidal agent	8% Gas by weight
Hydrogen peroxide	Vapor phase sterilant, liquid sporicidal agent, antiseptic	4 µg per g H ₂ O ₂ vapor, 10%–25% solution, 3% solution
Substituted diguanides	Antiseptic agent	0.5% Chlorhexidine gluconate
Peracetic acid	Liquid sterilant, vapor phase sterilant	0.2% Peracetic acid, 1 µg per g peracetic acid
Ethylene oxide	Vapor-phase sterilant	600 µg per g Ethylene oxide
Quaternary ammonium compounds	General purpose disinfectant, antiseptic	200 µg per g Benzalkonium chloride
β-Propiolactone	Sporicidal agent	100 µg per g - β Propiolactone

General Classification of Antiseptics, Disinfectants, and Sporicidal Agents - U.S.P. <1072> Disinfectants and antiseptics

Le choix des désinfectants est une tâche complexe. Il existe différents textes qui peuvent guider les industriels dans leurs choix. L'U.S.P. <1072>¹ propose une classification intéressante des molécules ayant des propriétés antimicrobiennes en indiquant la ou les cibles visées et donne des exemples de concentrations effectives.

L'ASTM² oriente également les industriels de la pharmacie vers la sélection d'un ou deux désinfectants et d'un sporicide mais surtout vers l'utilisation de formulations incorporant plus d'un type d'agents chimiques pour ainsi obtenir le meilleur équilibre entre la performance de désinfection et une agression limitée des surfaces à traiter. L'ASTM souligne que les produits utilisés dans les désinfectants ayant des spectres d'activité pouvant varier, les mélanges permettent ainsi de garantir une efficacité la plus large possible. Par voie de conséquence, la majorité des désinfectants présents sur le marché est un mélange de plusieurs molécules actives.

Nous voyons que trouver le bon produit n'est pas une chose simple et à cette difficulté vient s'ajouter la nouvelle directive européenne REACH qui va grandement limiter l'introduction de nouvelles molécules, voire de remettre en question l'emploi de certaines d'entre elles comme les biguanides par exemple.

Il faut donc envisager une complexification croissante des formulations désinfectantes et bien évidemment un challenge de neutralisation accru pour les milieux de culture.

Quel est l'impact des désinfectants sur le contrôle d'environnement ?

Les fournisseurs de biocides proposent une grande variété de formulations avec les différents agents précédemment cités. Mais en fonction de la famille du composé chimique ou de sa concentration lors de son utilisation, la quantité résiduelle de ces produits peut

fortement varier. On peut classer les composés chimiques en 2 grandes catégories : les composés qui laissent des résidus et ceux qui n'en laissent pas.

Désinfectant	Propriété		
	Irritation	Corrosif	Résidus
Alcool	Moyen	Faible	Non
Aldéhydes	Très élevé	Elevé	Oui
Surfactants amphotères	Faible	Faible	Oui
Biguanide	Faible	Faible	Oui
Hypochlorites	Elevé	Elevé	Oui
H₂O₂ / Acide peracétique	Elevé	Moyen	Non
Composés phénols	Elevé	Moyen	Oui
Amonium quaternaires	Faible	Faible	Oui

Source: Shield Medicare - Cleanroom Technology 10/2005

Pour élaborer notre modèle, nous avons sélectionné différents désinfectants communément utilisés par l'industrie pharmaceutique et, en se basant sur leur formulation, réalisé un classement sur leur propension à laisser des résidus sur les surfaces.

Quatre catégories de scores de résidus (S_R) ont été créées en fonction de la probabilité que le désinfectant laisse des résidus sur les surfaces (de $S_R = 0,5$ faible jusqu'à $S_R = 2$ très élevé, voir tableau).

Nous avons ensuite évalué leur performance antimicrobienne sur un panel de microorganismes varié intégrant 3 souches de la Pharmacopée (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) et 4 souches sensibles issues d'isolats de salles blanches de l'industrie pharmaceutique (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus pumilus*, *Corynebacterium striatum*, *Penicillium commune*). Pour cela, un volume de 500 μ l de désinfectant (à la concentration retenue) a été déposé sur des géloses standard sans neutralisant. Après séchage, ces milieux ont été inoculés avec les souches du panel à une concentration entre 10 et 100 U.F.C. et les milieux incubés. Les taux de recouvrement sont finalement calculés.

Désinfectant prêt à l'emploi	Score de résidus (S_R)	Concentration retenue
A	Très élevée (2)	Pur
B	Très élevée (2)	1/10
ASF	Elevée (1,5)	Pur
C	Elevée (1,5)	Pur
V	Moyenne (1)	Pur
Javel	Moyenne (1)	Pur
Peroxyde d'hydrogène	Faible (0,5)	1/10
Alcool isopropylique 70%	Faible (0,5)	Pur

La concentration retenue représente la concentration permettant de récupérer au minimum une faible pousse sur au moins une souche du panel.

A partir des taux obtenus pour toutes les souches, un premier score sur la performance antimicrobienne (S_A) peut être donné.

$$S_A = 1 - (\text{Moyenne des taux de recouvrement du panel})$$

si la concentration retenue est pure

$$S_A = 2 - (\text{Moyenne des taux de recouvrement du panel})$$

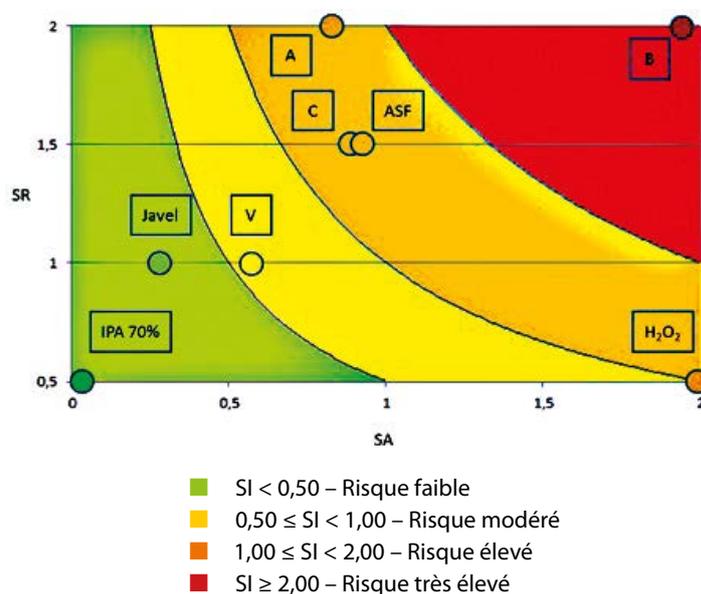
si la concentration retenue est 1/10

S_A est une valeur comprise entre 0 et 2.

Le score final de l'impact du désinfectant (S_I) sur le milieu est alors calculé en multipliant S_R et S_A . Ce score d'impact est une estimation du risque que représente un désinfectant en termes de neutralisation et donc d'induire des mauvais taux de récupération des microorganismes de l'environnement et une analyse de tendance non représentative de la réalité.

Désinfectant	S_A	S_R	S_I
A	0,88	2	1,76
B	1,87	2	3,74
ASF	0,95	1,5	1,43
C	0,90	1,5	1,35
V	0,58	1	0,58
Javel	0,24	1	0,24
Peroxyde d'hydrogène	1,99	0,5	1,00
Alcool isopropylique (IPA) 70%	0,03	0,5	0,02

Une représentation graphique de S_I permet de visualiser rapidement l'impact potentiel du désinfectant sur la performance de croissance d'un milieu de culture.



Il est intéressant de noter que l'alcool isopropylique ressort comme un désinfectant qui ne présentera pas un impact majeur. A contrario, le désinfectant B devra faire l'objet d'une évaluation sérieuse avec les neutralisants présents dans la gélose utilisée pour le contrôle de l'environnement. En effet le risque d'avoir une forte concentration de résidus avec un fort pouvoir antimicrobien est très élevé, le pouvoir de neutralisation du milieu de culture utilisé devra donc être adapté à ces niveaux pour permettre le développement des potentiels microorganismes encore viables mais inhibés par ces résidus.

---->

Les résultats pour le peroxyde d'hydrogène et le désinfectant A démontrent qu'il n'y a pas de corrélation entre la quantité de résidus et le risque sur le milieu de culture puisque 4 désinfectants ayant pourtant des niveaux résiduels très différents se retrouvent tous dans la catégorie de risque élevé. L'H2O2 restant le composé testé dans le panel ayant le plus fort pouvoir antimicrobien mais qui présente aussi le moins de résidus.

Discussion

Le contrôle de la biocontamination des salles propres passe par la validation des désinfectants puis des milieux de culture. De la connaissance des interactions et de la validation de leur compatibilité entre ces deux produits dépendent les résultats des contrôles d'environnement. Cependant il n'existe pas de guide de concordance entre les fournisseurs de biocide et de milieux de culture. Nous avons alors cherché à élaborer un modèle simple pour mesurer, au-delà de la performance de désinfection, l'impact des formules désinfectantes sur les milieux de culture. Ce modèle ne remplace pas une validation mais est un outil de mesure efficace des risques.

Cette méthodologie peut permettre également une aide dans le choix des milieux de culture qui devront être employés. Différentes formules de milieux de culture sont disponibles sur le marché avec des niveaux de neutralisation variables. Certaines géloses sont proposées avec 2 neutralisants (lécithine et polysorbate 80) ou bien 4 (lécithine,

thiosulfate, histidine et polysorbate 80) et il existe également des nouvelles gammes de géloses avec des neutralisants renforcés. L'application de la méthodologie peut permettre une première orientation sur la performance de neutralisation attendue en fonction de l'échelle de risque du désinfectant. Aujourd'hui, la plupart des formulations proposées par les fournisseurs de milieux incluent 4 neutralisants, ce qui semble correspondre à la majorité des besoins de neutralisation.

Cependant nous voyons que les nouveaux biocides proposent des formulations de plus en plus complexes et comme pour l'exemple du désinfectant B, ils représentent un risque plus élevé de mauvaise neutralisation.

En conséquence, la recherche de milieux à plus large spectre de neutralisation deviendra inévitable pour assurer des résultats de contrôles d'environnements pertinents.

Glossaire des acronymes :

ASTM : American Society for Testing and Materials

IPA : Alcool isopropylique

REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals

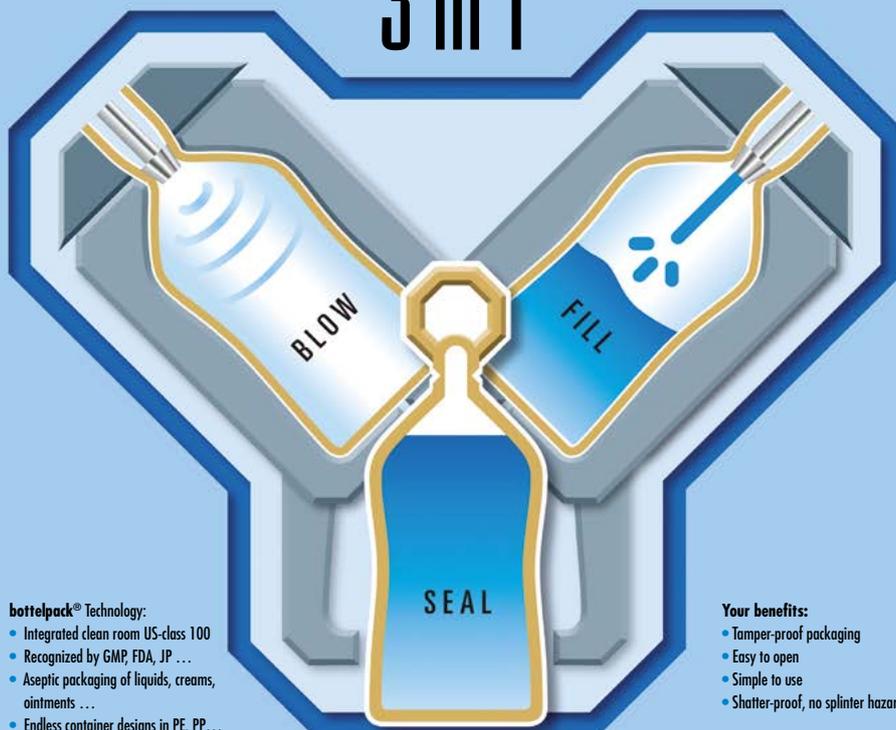
USP : United States Pharmacopoeia

bottelpack®

BLOW-FILL-SEAL TECHNOLOGY

Advanced aseptic packaging in one operation cycle
Reliable – Simple – Cost-Effective

3 in 1



bottelpack® Technology:

- Integrated clean room US-class 100
- Recognized by GMP, FDA, JP ...
- Aseptic packaging of liquids, creams, ointments ...
- Endless container designs in PE, PP...

Your benefits:

- Tamper-proof packaging
- Easy to open
- Simple to use
- Shatter-proof, no splinter hazard

rommelag ag

P.O. Box · CH-5033 Buchs, Switzerland
Phone: +41 62 834 55 55 · Fax: +41 62 8345500
E-mail: mail@rommelag.ch

rommelag Kunststoff-Maschinen Vertriebsgesellschaft mbH

P.O. Box 1611 · D-71306 Waiblingen, Germany
Phone: +49 7151 95811-0 · Fax: +49 7151 15526
E-mail: mail@rommelag.de

rommelag USA, Inc.

27905 Meadow Drive, Suite 9
Evergreen CO 80439, USA
Phone: +1.303. 674.8333 · Fax: +1.303.670.2666
E-Mail: mail@rommelag.com

rommelag Trading (Shanghai) Co., Ltd.

Room 1501 Xinyin Building
No. 888 Yishan Road · 200233 Shanghai, P.R.China
Phone: +86 21 6432 0166 · Fax: +86 21 6432 0266
E-mail: romcn@rommelag.com

Current U.S.P. Perspectives on Microbial Identification

Par Radhakrishna S. Tirumalai, Ph.D. - United States Pharmacopeial Convention
RST@usp.org

Microbial Identification is the determination of the broad group (e.g., bacteria, yeast, or mold) or narrow group (e.g., genus and/or species) to which a microorganism belongs to.

Microbial characterization is the use of colony growth, cellular morphology, differential staining, and key diagnostic features to characterize a laboratory isolate for trending and investigative purposes without identification, example, nonpathogenic *Staphylococci*.

Microorganisms, if detected in drug substances, excipients, water for pharmaceutical use, the manufacturing environment, intermediates, and finished drug products, typically undergo characterization. This may include identification and strain typing, as appropriate.



The need for microbial identification is specifically cited in several U.S.P. general test chapters such as *Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms* (62). This chapter indicates a requirement for confirmatory identification tests for organisms that grow on selective or diagnostic media and demonstrate defined morphological characteristics.

U.S.P. general test chapter *Sterility Tests* (71) allows for invalidation of the test, if after identification of the microorganisms isolated from the test, the growth of this (or these) species may be unequivocally ascribed to faults with respect to the material and/or the technique used in conducting the sterility test procedure. U.S.P. general information chapter.

The manufacturing area is also a concern for microbial identification. Environmental monitoring of cleanrooms provides an indication of the state of control of a facility. Control is assessed in terms of trends analysis. There are two important types of trend analysis: microbial count and the types of microorganisms isolated. *Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments* (1116) recommends that microbial isolates be identified at a rate sufficient to support the environmental monitoring program.

Furthermore, there is also considerable cGMP emphasis upon screening for objectionable microorganisms. The impact of microorganisms upon product quality attributes will depend on the product, its intended or potential application, the method of manufacture, and subsequent treatment.

→

Identification Methods

Microorganisms are present in a variety of milieu in the pharmaceutical manufacturing environment. The first step in identification is to isolate a pure colony for analysis. This purification is normally accomplished by subculturing one or more times on solid media to ensure purity, each time streaking for single colonies. For many types of investigations and routine surveying of manufacturing environmental bioburden, few tests such as Gram-staining, Spore staining and biochemical screening tests such as oxidase, coagulase and catalase tests, can provide sufficient information for ongoing evaluation. However, when circumstances dictate greater in-depth assessment, identification to the genus, species, or strain level can yield valuable insights about the nature and source of the bioburden. Also, microbial identification to the species and even strain level can be critical in assessing and mitigating risk from microbial contamination.

Identification methods can be divided into two groups: phenotypic and genotypic. **Phenotypic methods** use expressed gene products to distinguish among different microorganisms. Examples include methods based on carbon utilization and biochemical reaction, as well as fatty acid profiles by gas-liquid chromatography and whole-cell composition by MALDI-TOF mass spectrometry. Generally, these methods require a relatively large number of cells in pure, monoclonal culture. Recovery and growth methods for microbial enumeration and identification are limited by the length of incubation and the fact that many organisms present in the environment are not recovered by general microbiological growth media. Phenotypic microbial identification methods are successfully used in food, water, clinical, and pharmaceutical microbiological testing laboratories. Phenotypic microbial identification methods provide information that enables microbiologists to make informed decisions regarding product risk and to recognize changes in environmental microflora. In many quality control investigations, phenotypic identification alone is sufficient and will enable scientists to conduct a thorough investigation and to recommend appropriate corrective actions as needed.

Genotypic microbial identification methods are theoretically more reliable because nucleic acid sequences are highly conserved in most microbial species. Applicable genotypic methods include DNA-DNA hybridization, PCR, 16S and 23S rRNA sequencing, multilocus sequence typing (MLST), pyrosequencing, DNA probes, and analytical ribotyping. They generally require more expensive analytical equipment and supplies. Often these analyses are conducted by contract laboratories, government laboratories, universities, research institutes, or specialized laboratories within industrial firms. Therefore, the use of genotypic identification methods is typically limited to critical microbiological investigations such as product failure investigations.

Genotypic or Nucleic acid-based methods can also be used to screen for specific microorganisms. The steps associated with this activity are sample collection, nucleic acid extraction, target amplification, hybridization, and detection. The problem of amplifying DNA from nonviable bacterial cells can be overcome by using reverse transcription to convert rRNA that is transitional, hence related to viability, to DNA for PCR amplification. Issues include the detection of microbial variants, limits of detection, matrix effects, positive cutoff verification, instrument and system carry-over, diagnostic accuracy, and reproducibility.

Strain Typing is an integral part of epidemiological investigations in clinical and public health microbiology. Methods including pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, arbitrarily primed polymerized chain reaction, and whole genome ordered restriction or optical mapping can be used to demonstrate that microbial species are the same strain and most likely are from a common source.

With identification systems, verification of the identity of the species should be evaluated and the level of agreement should be considered. Typically greater than 90% agreement can be achieved with samples of microorganisms that are appropriate for the identification system. The hierarchy of microbial identification errors in descending order of impact is ⁽¹⁾ misidentification to genera, ⁽²⁾ misidentification to species, and ⁽³⁾ no identification. Misidentification could lead to inappropriate corrective and preventive actions and product disposition.

A microbial identification system may not be able to identify an isolate because the organism is not included in the database, the system parameters are not sufficiently comprehensive to identify the organism, the isolate may be nonreactive in the system, or the species may not have been taxonomically described. Such isolates can be sent to the supplier of the microbial identification system for additional study and, if appropriate, added to the database. Alternatively, genotypic identification tests can be conducted, and the species can be added to an in-house database. Misidentification is more difficult to determine, but any microbial identification should be reviewed for reasonableness in terms of the microorganism's morphology, physiological requirements, and source of isolation. The most important verification tests are accuracy and reproducibility. Other measurements are sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value.

The concept of **Polyphasic Taxonomy** that refers to assembly and use of many levels of information, e.g., microbial characterization, phenotypic and genotypic data, and origin of the microorganisms, can be successfully applied to microbial identification. This avoids decisions made solely using genotypic data that make no sense when the microbial characteristics, testing history, and source of isolation are considered.

Bibliographie :

- 1) U.S.P. <1113> Microbial Characterization, Identification and Strain Typing. U.S.P. 38-NF 33 (2015), page 1180
- 2) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, 2003.
- 3) O'Hara, C.M., M.P. Weinstein, and J.M. Miller. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. ASM Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, 2003.
- 4) Cumitech 31. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Elder, B.L., S.A. Hansen, J.A. Kellogg, F.J. Marsik, and R.J. Zabransky, ASM, February 1997.
- 5) J.E. Clarridge III. The Impact of 16S rRNA Gene Sequencing Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Clin. Microbiol. Rev. 17 (2) 840-862, 2004.
- 6) Gillis, M., P. Vandamme, P. De Vos, J. Swings and K. Kersters. Polyphasic Taxonomy. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, 2003.

L'agenda

Événements A3P 2016



PROGRAMMES ET INSCRIPTION
SUR WWW.A3P.ORG

Actualités

La Vague



ABONNEZ-VOUS !
Chaque trimestre, recevez votre magazine à l'adresse de votre choix

Toutes les infos sur www.a3p.org

Relisez tous les numéros précédents sur www.a3p.org/ rubrique La Vague

Vous souhaitez communiquer ?

Le Mediakit 2016 est disponible sur simple demande

sur www.a3p.org rubrique contact.

La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS



4 numéros par an sur votre bureau

Articles techniques et scientifiques : technologies barrières, lyophilisation, bioproduction, particules, sous-traitance, Blow Fill Seal, maîtrise de la contamination, process, BPF, qualité, SI



Distribution en France, Suisse, et Belgique



www.a3p.org



Ligne éditoriale 2016

Janvier N°48 : **Microbiologie**

Avril N°49 : **Bioproduction**

Juin N°50 : **IT Automation**

Septembre N°51 : **Thèmes Congrès International A3P de Biarritz 2016**

POUR VOTRE RECHERCHE NOUS INVESTISSONS

**LA MICROBIOLOGIE
AU CŒUR
DE NOTRE NOUVEAU
LABORATOIRE**



SGS Life Science Services est reconnu pour son expérience analytique dans le développement, le transfert et la validation de méthodes ainsi que le contrôle de la qualité des médicaments et de ses matières premières.

D'une surface totale de 2 100 m², situé à proximité immédiate des principaux hubs logistiques, notre nouveau laboratoire BPF situé à Villeneuve-la-Garenne (92) a pour objectif de réduire le délai de traitement des échantillons, grâce à une efficacité opérationnelle accrue, mais aussi de soutenir ses clients dans les analyses microbiologiques en environnement contrôlé (contrôle de stérilité, contamination microbienne...). Avec un réseau international de 18 laboratoires de contrôle qualité, de bioanalyse, de sécurité virale et de caractérisation cellulaire situées dans 12 pays, SGS, votre partenaire Santé-Qualité, vous propose des solutions performantes personnalisées.

Pour plus d'informations : 01 41 06 95 85 - fr.pharmaqc2@sgs.com - www.sgsgroup.fr/lifescience

SGS EST LE LEADER MONDIAL DE L'INSPECTION, DU CONTRÔLE, DE L'ANALYSE ET DE LA CERTIFICATION

WHEN YOU NEED TO BE SURE

SGS



Près de 30 sujets abordés,
répartis en 5 domaines spécifiques au "Propre et Stérile"
animés par 15 experts reconnus dans chacun de leur domaine
durant plus de 40 journées du 1^{er} semestre 2016.

MARS 2016				
	PROC01	Lyophilisation 1 (initiation) : bonnes pratiques et bases de la lyophilisation	8 & 9 mars	Dominique SIERAKOWSKI
	SI01	Cloud Computing et réglementation pharmaceutique	10 mars	Jean-Louis JOUVE
	QUAL01	Qualification d'une boucle d'eau purifiée	17 mars	E. PETAT & S. RINGA
	MC01	Les contrôles d'environnement en Z.A.C. : " Réglementation et méthodes pour garantir la recevabilité des contrôles "	22 & 23 mars	Philippe BOURBON
	BPF01	BPF et BPD – Produits biologiques et des médicaments de thérapie innovante	24 mars	Roland GUINET
	BPF02	Procédés aseptiques : simulation et filtration stérilisante	30 & 31 mars	Roland GUINET
AVRIL 2016				
	BPF03	Gestion du risque qualité (ICH Q9) des procédés aseptiques	5 & 6 avril	Roland GUINET
	MC02	Validation des procédés de nettoyage des équipements de production en industrie pharmaceutique	7 & 8 avril	Pierre DEVAUX
	PROC02	Lyophilisation 2 : développement et perfectionnement des connaissances	12 & 13 avril	Dominique SIERAKOWSKI
	MC10	Analyse du risque particulière dans les produits stériles et injectables	13 & 14 avril	Alain EUZEN
	MC03	Determining Particulate Matter in Liquids: Parenteral & Ophthalmic Products	19 avril	Desmond HUNT
	SI02	Audit et inspection des Systèmes Informatisés : outils et méthodes	20 avril	Jean-Louis JOUVE
	MC05	Essentials of Testing and Control of Microbial Quality of Nonsterile Drug Substances and Products	26 avril	R. TIRUMALAI
	MC04	Essentials of U.S.P. Microbiology	27 avril	R. TIRUMALAI
	MC06	La nouvelle version de la norme ISO 14644-1 : Quels changements?	28 avril	Philippe DUHEM
MAI 2016				
	PROC04	Maîtriser les principes de la culture LEAN pour vous et par vous !	11 & 12 mai	Ronan LE FLOC'H
	SI03	Validation des Systèmes Informatisés efficace et efficiente	19 mai	Jean-Louis JOUVE
	PROC05	Stérilisation par la chaleur : principes, validation et production	24 & 25 mai	Dominique SIERAKOWSKI
	MC09	Analyse du risque sur les étapes critiques de procédés stériles, aseptiques ou à contamination contrôlée	24 & 25 mai	Alain EUZEN
	QUAL02	Bioassay Design, Development and Validation	26 mai	Nancy SAJJADI
	BPF04	Mise à jour réglementaire et état de l'art pour la fabrication des produits pharmaceutiques stériles	31 mai	Roland GUINET
JUIN 2016				
	PROC06	Spécificités du marché pharmaceutique japonais	1 juin	Eric LATOUR
	PROC07	Travail en campagne en isolateurs de production	2 juin	Eric LATOUR
	PROC08	Le Lean : poison ou potion ? Le management du bon sens au service de la qualité	8 & 9 juin	Vincent HOULLIERE
	PROC03	Lyophilisation 3 : Expertise et maîtrise des procédés et de la qualité	14 & 15 juin	Dominique SIERAKOWSKI
	SI04	Évaluation des fournisseurs IT / IS : outils et optimisation	16 juin	Jean-Louis JOUVE
	BPF05	L'annexe 1 des GMP Eu	21 & 22 juin	Roland GUINET
	MC07	Élaboration d'un programme de bio-nettoyage en salles propres en environnement BPF	23 juin	Pierre DEVAUX
	MC08	Maîtrise de la contamination en Z.A.C. (stérile et non stérile)	28 & 29 juin	Pierre DEVAUX

Informations & inscriptions sur www.a3p.org