

La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 67 | Octobre 2020
Trimestriel



Congrès International



- **Inspection visuelle : principaux constats des inspections de l'ANSM.**
- **Fiabilité de la lignée monocyttaire Mono-Mac-6 pour la détection des pyrogènes endotoxiniques et nonendotoxiniques.**
- **Determining a Strategy for Container Closure Integrity Testing of Sterile Injectable Products.**
- **Le travail en mode campagne, une avancée sur la productivité des isolateurs.**
- ...

Sommaire

N°67 // Octobre 2020

Édito I	3
Ils ont participé à ce numéro I Nos contributeurs	4
Billet d'humeur I Bienveillance	5
La Chronique I Vers une "Nouvelle Normalité", mais laquelle ?	6
Actualités A3P I Les nouveaux rendez-vous en 2020/2021	7
Réglementaire I Toutes les actualités	8
Technologie barrière I La campagne on y gagne !	10
Inspection Visuelle I Inspection visuelle : principaux constats des inspections de l'ANSM.	15
Validation de nettoyage I Validation des nettoyages des équipements de production : Contrôle visuel, habilitation du personnel au "visuellement propre".	20
Disinfection I A Refresher on Disinfectant Wet Contact Time.	25
Dispositifs médicaux I RDM et RDIV de l'UE : Les produits combinés désormais soumis au même degré de surveillance que les dispositifs médicaux autonomes.	27
Endotoxines I Fiabilité de la lignée monocyttaire Mono-Mac-6 pour la détection des pyrogènes endotoxiniques et nonendotoxiniques.	29
Microbiologie I Indicateurs biologiques, pousses aléatoires. Votre cycle de décontamination est-il réellement en cause ?	33
Container Closure Integrity I Determining a Strategy for Container Closure Integrity Testing of Sterile Injectable Products.	36
Control Strategy I Efficient Control Strategy enabled by structured Knowledge.	40
Microbiologie I Une solution performante pour les dénombrements en temps réel des colonies sur membranes dans l'analyse microbiologique.	46

La Vague

Revue trimestrielle N° 67 - Octobre 2020

• Éditeur
A3P Association
30, rue Pré Gaudry - 69007 Lyon
Tél. 04 37 28 30 40
Prix de vente au numéro : 10€

• Directeur de la Publication
Didier MEYER, Vice-Président A3P
E-mail : dgastonmeyer@gmail.com
• Rédactrice en Chef
Anne RIGOULOT
• Coordinateur
Frédéric ESTASSY
E-mail : festassy@a3pservices.com
• Conception & graphisme
Sophie TORGUE
E-mail : storgue@a3pservices.com

• Impression
VL développement
42000 Saint-Just-Saint-Rambert

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.

Adhérez à l'Association et profitez de tous les avantages !

Faites partie du **réseau A3P** et **recevez** tous les trimestres **sur votre bureau, la version papier** du magazine. En plus, depuis votre espace personnalisé sur le site A3P, vous pourrez bénéficier de tous les **contenus techniques, scientifiques et réglementaires**, accéder aux **annuaires adhérents et sociétés**, participer à des **événements privilégiés** et utiliser l'**application mobile**.

 <p>Tout le contenu des événements A3P conférences, ateliers, ...</p>	 <p>Réglementaire veille, warning letter, ...</p>	 <p>Tous les Guides Techniques & scientifiques</p>	 <p>Annuaire des membres du réseau</p>
---	---	--	--

Toutes les infos sur www.a3p.org/adhesion/



L'adhésion est nominative et annuelle de date à date de facturation (1, 2, 3 ans). Elle est valable dans tous les pays (Belgique, Espagne, Italie, France, pays du Maghreb et Suisse).

Edito

Par Sophie AMADIO - Membre du bureau A3P Association



Quelle étrange année... tous nos repères volent en éclat... et un plus particulièrement je dirais même que c'est le principal pour nous autres Humains... : **le contact** !

La **distanciation sociale** s'imisce partout : télétravail, entretien avec son superviseur via **Teams**, interviews professionnelles sur **Skype**, réunions clients **WhatsApp**, activités sportives en **visio** ou en solo, cours en tout genre via **e-learning**, apéro Zoom entre amis, appels téléphoniques dominicaux à nos anciens, courses hebdomadaires au drive... même notre shopping se fait désormais sur le web... Pourtant - et Gérard nous le répétait bien souvent -, **l'essence même de notre Association est l'Humain, le contact et la convivialité.**

Alors, dans ce contexte aux antipodes de nos valeurs, il existe une petite équipe qui, dès les tous premiers jours de ce qui allait révolutionner nos habitudes sociales, s'est mise à l'œuvre d'arrache-pied pour permettre à notre chère Association de préserver son cap, de maintenir les liens, de rester "**humaine**" !

Ils ne sont pas plus nombreux qu'une équipe de rugby :

on les appelle **A3P Services**, et ils sont au service de notre belle Association !

En temps normal, ce sont eux qui assurent notre gestion administrative, notre comm', la logistique de tous nos évènements. Mais là, ils ont dû redoubler d'efforts et d'idées, ils ont dû faire preuve d'une multitude d'initiatives pour permettre

à tous nos membres de **continuer à échanger**, à **partager** pour **faire vivre notre réseau** envers et contre ce nouveau mode de vie "social-contact-free"...

C'est ainsi que la majorité des évènements que nous avions prévu d'assurer cette année a été transformée en **évènements "virtuels"** dans la forme, mais pour autant bien concrets dans le fond : *les journées Stérilisation, les journées Eaux à Usage Pharmaceutiques, les rencontres de la Microbiologie (à ne pas manquer les 15 et 29 octobre prochains)*. De **nouveaux concepts de rencontre** et de partage ont été imaginés et proposés : *une succession de webinars nous permettant d'envisager ensemble l'impact de cette crise sanitaire sur les différents axes de nos activités quotidiennes à la loupe des chapitres des BPF (Chap.2, Chap.4 "Documentation", Chap.7 "Activités externalisées"... et à venir Chap. 5&6 "Production et QC" et Chap.3 "Locaux et Matériaux"...)* ; *d'autres rencontres, toujours sous le format de webinars, pour nous permettre de réfléchir ensemble et de débattre encore et encore sur l'Annexe 1 (il est toujours temps de vous y joindre, ces webinars Annexe 1 sont en cours de déroulement à l'heure où j'écris ces lignes...)*, un webinar eCompliance est prévu le 29 octobre prochain... Et bien sûr, notre irremplaçable **Congrès International A3P** qui aura lieu cette année, grâce à l'imagination et la persévérance d'A3P Services, en **sessions online du 17 au 19 novembre, puis du 24 au 26 novembre**. L'ensemble du programme initialement prévu a été préservé (*Annexe 1 - QRM pour les procédés parentéraux - Stratégies de contrôle*), même les ateliers seront assurés.

Cela promet, comme à l'habitude et malgré le contexte, une multitude d'occasions d'échanges, de partages d'expériences et de connaissances.

Alors, je tiens ici à remercier chaleureusement et du fond du cœur toute l'équipe A3P Services pour leur travail, étant eux-mêmes soumis aux contraintes de distanciation sociale, pour leur motivation, leurs efforts, leur assiduité.

Grâce à leur travail "dans l'ombre", A3P continue de remplir sa mission : assurer un réseau d'échanges et de partages au travers d'évènements, de GIC (Groupe de travaux d'Intérêt Commun), de formations en France et à l'international.

Merci à nos Contributeurs

Ils ont participé à ce numéro

Christophe Gamblin

THERAXEL

**Rédacteur de " Validation des nettoyages des équipements de production : Contrôle visuel, habilitation du personnel au « visuellement propre »"**

Titulaire d'un master scientifique et après plus de 15 ans d'expérience dans l'industrie pharmaceutique en tant que responsable contrôle qualité analytique avec une spécialisation dans la validation des nettoyages, Christophe est maintenant un expert qui accompagne les industriels dans la maîtrise de la contamination croisée. Membre de l'organisation ASTM, il participe à l'élaboration de nouvelles normes scientifiques sur le risque chimique dans l'industrie pharmaceutique et biotechnologie.

Walid El Azab

STERIS

**Rédacteurs de " A Refresher on Disinfectant Wet Contact Time."**

Walid El Azab is an industrial pharmacist, Qualified Person (QP), certified green belt and head of technical services at STERIS. His areas of expertise include upstream and downstream pharmaceutical operations and validation in non-sterile and sterile processes. Lecturer at the University of Liège and Brussels (Belgium) at the Faculty of Pharmacy and Medicine, he has published various articles and a book chapter on contamination control. Member of the ICG A3P Sterilization, Annex 1 and Rouging, he is also a member of CEA, PDA and ISPE Belgium.

Dave Shields is a Technical Services Manager for STERIS and has been with STERIS for ten years. He has expertise in disinfectant efficacy testing and microbiology. Dave has authored numerous industry publications, with a focus on disinfectants and disinfectant efficacy testing. He currently sits on the BSI CH/216 Chemical Disinfectants and Antiseptics committee.

Dave Shields

STERIS

Michel Hertschuc

AKTEHOM

**Rédacteurs de " Efficient Control Strategy enabled by structured Knowledge "**

Michel Hertschuh has over 20 years of experience in Pharmaceutical and Medical Device industry. He is a partner and co-founder of AKTEHOM, founded in 2005. His expertise is around the aseptic operations (technical and regulatory expertise), Technology Transfer, QbD approach, Project Management, regulatory compliance and facilities design reviews. Today, Michel manages the expertise in aseptic processes and biocontamination at AKTEHOM.

**Johanne Piriou**

AKTEHOM

Johanne Piriou has been working for over 15 years in the pharmaceutical industry as a consultant in different operational roles notably in transfer technology projects and start-up of new facilities (C&G, Process Validation, Process Robustness) as a specialist in process validation. She is now partner of AKTEHOM, leading the expertise in Control Strategy, QbD and Product Lifecycle Management at AKTEHOM.

**Derek Duncan**

LIGHTHOUSE INSTRUMENTS

Rédacteur de " Determining a Strategy for Container Closure Integrity Testing of Sterile Injectable Products"

Dr. Duncan began his career at the Dutch Institute for Atomic & Molecular Physics in Amsterdam. He moved into industry holding Product & Application Development positions. Currently at LIGHTHOUSE since 2003, Dr. Duncan is responsible for developing applications for process monitoring and finished product inspection. These include using headspace analysis for 100% container closure integrity testing, Iyo chamber moisture mapping, and automated media fill inspection.

**Elizma Parry**

MAETRICS

Rédacteur de " RDM et RDIV de l'UE : Les produits combinés désormais soumis au même degré de surveillance que les dispositifs médicaux autonomes."

Apportant plus de 25 ans d'expérience à l'équipe Maetrics, Elizma Parry est une professionnelle du secteur hautement qualifiée qui possède des compétences en leadership éprouvées, ainsi qu'une solide expérience de management dans les domaines de la sécurité clinique, de la réglementation et de la gestion de la qualité. Elle prend la tête de la Pratique clinique du cabinet, une équipe dédiée à la démonstration des preuves cliniques et à l'évaluation des performances pour la mise en conformité avec la réglementation internationale des dispositifs médicaux et des dispositifs de diagnostic in vitro (IVD). Avant de rejoindre Maetrics, elle a assuré la codirection provisoire d'un Organisme Notifié basé en Europe.

Laure Robert

MERCCK

Rédacteur de " Fiabilité de la lignée monocyttaire Mono-Mac-6 pour la détection des pyrogènes endotoxiniques et non-endotoxiniques"

Laure est Chef de produit chez Merck KGaA, responsable de la croissance et du développement d'une ligne de produit dédiée aux tests pyrogènes. Auparavant Laure a occupé d'autres postes à responsabilité au sein de l'industrie Pharmaceutique en tant que consultante et responsable de stratégie et de business development. Laure est Docteur en Pharmacie, diplôme obtenu à l'Université de Lille, auquel s'ajoute un Master en Business Management obtenu à l'EDHEC Business School.

Jules Bouliquot

BIOQUELL

Rédacteur de "Indicateurs biologiques, pousses aléatoires - votre cycle de décontamination est-il réellement en cause?"

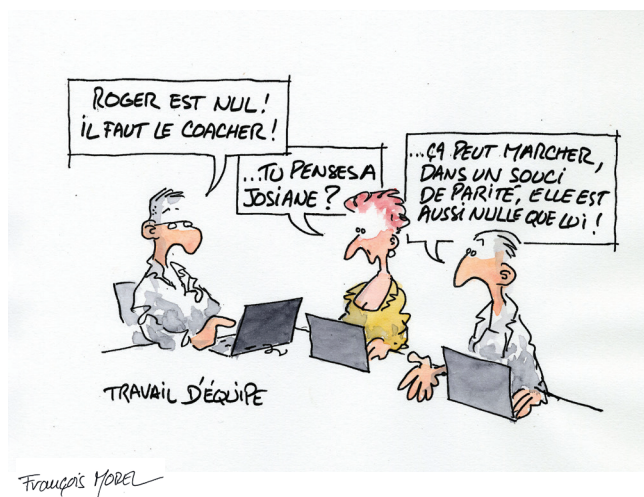
Jules Boulicot, ingénieur commercial au sein de l'entreprise de Bioquell, est expert en Désinfection de Surfaces par Voie Aérienne (DSVA). Il occupe un rôle majeur en gestion de projets et en intégration de solutions techniques dans les process critiques clients, pour de multiples acteurs majeurs de la production/R&D pharmaceutique et biotech (équipements et services).

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 Isabelle SARFATI - Membre du CA A3P

Bienveillance



Non sans une certaine responsabilité, me voilà rédactrice du billet d'humeur du numéro de La Vague sur le Congrès de Biarritz.

Quel thème puis-je aborder en cette période qui change de l'actualité COVID ? Un thème est revenu souvent en cette période dans les entreprises, dans le management, dans les médias : **la bienveillance**, comme un souhait, un espoir pour faire face à cette crise inconnue.

Est-ce que cette capacité est adaptée aux managements de l'industrie pharmaceutique dont l'exigence et la rigueur sont gages de qualité ?

Je me souviendrai toujours, lors d'une des premières présentations à un congrès A3P, que le sujet était l'humain au cœur de nos métiers. Il ne faut pas l'oublier, **l'humain reste la clé de la réussite des entreprises**. Et je suis convaincue que la bienveillance est aussi la clé de la réussite de nos métiers.

J'ai fait quelques recherches sur le sujet et ci-dessous quelques exemples de bienveillance :

être bienveillant c'est essayer tant que possible de diminuer le stress, lorsque celui-ci augmente, la performance diminue.

En excès, le stress a un impact négatif sur les équipes et donc un impact négatif sur les objectifs de l'entreprise. Faire redescendre le stress diminue les tensions et améliorer les relations.

Être bienveillant c'est encourager. Exprimer de la gratitude. C'est favoriser l'esprit d'équipe, les échanges et c'est surtout favoriser la confiance en soi et en l'autre.

C'est permettre aux collaborateurs d'être force de proposition, de s'exprimer et de voir germer des idées nouvelles.

Être bienveillant c'est faire de l'erreur une force.

Mon ancien directeur industriel répétait souvent "c'est en se trompant que l'on apprend, en réussissant on n'apprend rien". Et il ajoutait ensuite, en revanche ne pas faire 2 fois la même erreur.

Être bienveillant c'est avoir des phrases positives envers les autres.

Notre langue est riche mais dans notre quotidien on n'entend que du négatif : "ce n'est pas idiot ; tu n'as pas tort, ce n'est pas faux..." qui doivent devenir "c'est intelligent, tu as raison, c'est vrai..."

La bienveillance est un terme qu'il ne faut pas galvauder. C'est une attention quotidienne à toutes les petites choses qui pourrissent notre quotidien et que nous devons transformer pour y gagner du bien-être !

La Chronique

Par Patrick HIBON DE FROHEN - Membre du CA A3P

Vers une "Nouvelle Normalité", mais laquelle ?

Lors de ma dernière chronique, j'avais soumis à nos lecteurs, pour réflexion, ce slogan d'une célèbre ONG internationale : "Lets not go back to normal. Normal was the problem". Et si, ou puisque, la "Normalité" était le problème, certains industriels, en particulier du médicament, n'ont pas hésité à parler de "Nouvelle Normalité". Certes, mais laquelle ? En effet, au sein de l'industrie pharmaceutique mondiale, ce concept repose sur des valeurs très différentes.

Tout d'abord celui qui mêle à cela des velléités politiques que je résumerai ici par les **3C** : **Course**, **Confusion** et **Crédibilité**.

COURSE au premier laboratoire qui sortira le premier, un vaccin contre le SARS-CoV2, mais **CONFUSION** des genres, particulièrement aux Etats-Unis où il est prévu de le distribuer quelques jours avant l'élection présidentielle. Selon le New York Times, ces directives ont été annoncées par les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) et destinées aux responsables de la santé publique des cinquante Etats américains, "le jour même où D. Trump a déclaré à la nation américaine... qu'un vaccin pourrait arriver avant la fin de cette année". Et toujours selon les médias américains, en particulier le Guardian, le calendrier semble tellement ambitieux qu'il suscite l'inquiétude des experts sanitaires internationaux qui redoutent que l'approbation de la commercialisation d'un tel vaccin, qui n'ait pas fait l'objet d'essais cliniques idoines pour garantir son innocuité, soit motivée "par des considérations politiques à l'approche d'une élection présidentielle plutôt que par la science". Et **CRÉDIBILITÉ** altérée, selon le Washington Post qui note "la politisation de la FDA qui s'apprête à autoriser en urgence un vaccin contre le coronavirus avant qu'il ne soit approuvé" !

Et dans le même temps, les sites de production des produits de santé ont été sur d'autres valeurs : celles de **3C** bien différentes : **CRÉATIVITÉ**, **CAPABILITÉ** et **COURAGE**. Car ces sites, selon les concepts TUNA (Turbulent-Incertain-Novel-Ambiguous) ou VUCA (Volatility, Uncertainty, Complexity et Ambiguity), avaient compris le problème : l'environnement extérieur change rapidement et de manière imprévisible. Ce qui a fonctionné hier ne fonctionnera pas demain et les paramètres de *volatilité*, *incertitude*, *complexité* et *ambiguïté* sont de plus en plus présents dans nos vies...

Et il en a fallu de la **CRÉATIVITÉ**, en regard de cette pandémie pour laquelle aucune réelle prévision et donc anticipation n'étaient prévues, pour y faire face tant sur le plan humain que sur celui du système des organisations et garantir la



François Morel

fabrication et la mise à disposition des produits fabriqués, en limitant, voire en évitant, les ruptures.

Et les divers Webinars organisés par A3P et animés par des administrateurs comme la dynamique Anne Rigoulot, intitulés "**Webinar A3P crise et BPF**" au cours de ces dernières semaines l'ont bien montré, voire démontré, en particulier sur les chapitres 2, 4, 7 et autres en cours ou à venir (et qui porteront sur les chapitres production / QC et locaux / Matériels).

Citons, à titre d'exemples, la remise en cause de certains dogmes comme l'astreinte ou la présence physique sur site du pharmacien. Les autorités (ANSM) ont accepté après analyses des risques avec ou non pondération, la libération des lots à distance. Il en va de même pour les formations en e-learning sur des notions simples et essentielles sur lesquelles les retours sont excellents, ce qui va induire, inévitablement, une adaptation notable des prestations de certaines structures de formations continues. Quant aux audits et inspections en virtuel, y compris les audits fournisseurs en fonction de leurs criticités, il est envisagé de rendre pérennes ces dispositifs.

J'invite les adhérents (et celles et ceux qui ne le sont pas, à l'être !) à se connecter sur le site d'A3P et à prendre connaissance des synthèses exhaustives de ces différents ateliers.

Ainsi les différents services des sites de production ont su montrer la **CAPABILITÉ** de ces adaptations, et par voie de conséquence, un certain **COURAGE** pour bousculer des idées reçues, voire des dogmes que l'on croyait établis.

Et comme le dit si bien Pierre ANDRE, *Vice President, Quality Technical Operations, Chief Pharmaceutical Officer* chez Guerbet, à la lecture des 6M "Je pense que nous devons faire évoluer les 5M dans notre industrie qui a toujours du mal à s'adapter....".

Mais cette crise sanitaire a démontré que cela était possible, ce qui est très encourageant pour affronter la prochaine !

Rejoignez la
communauté A3P

Linkedin



Découvrez l'ensemble des programmes sur www.a3p.org



ECOMPLIANCE Innovations, Technologies, Réglementaire, ...

Webinars mensuels

Online / 29-10 & 12-11 & 16-12 & 20-01



CONGRÈS INTERNATIONAL A3P

Annex1

QRM for parenteral processes

Control Strategy : Process, Analytical & Life cycle

Visioconférences / Ateliers

Online / 17, 18, 19 & 24, 25, 26 novembre



EAU À USAGE PHARMACEUTIQUE

Conception

Maintenance Implémentation & validation

Réglementaire

Visioconférences / Webinars partenaires

Online / 2 & 3 décembre



REVISION OF GMP EU ANNEX1 V12 2020

Overview

Contamination Control Strategy (CCS)

Visioconférences

Online / 3 & 10 décembre

AUDITS GMP

Enjeux et gestion d'un audit GMP

Conférences

Crissier, Suisse / 3 décembre



BPF

Comment la crise du COVID implique l'application des BPF

Table ronde interactive

Online / 14 décembre, ...

Vos rendez-vous 2021 www.a3p.org

Cette crise sanitaire impacte notre activité et notre objectif premier qui est de mettre en relation les industriels et fournisseurs de l'industrie pharma en organisant des moments d'échanges et de travail en commun.

A3P met tout en oeuvre pour vous proposer de nouvelles formes d'événements ou de moyens de communication

Mais si nous pouvons assurer la continuité de notre mission, c'est grâce à vous.

Merci !

Règlementaire

À ne pas manquer !

Ce point réglementaire trimestriel proposé par la société AKTEHOM, présente les récentes évolutions réglementaires au regard du cycle de vie du produit. Cette sélection des parutions intervenues depuis la précédente édition se focalise sur les grandes thématiques impactant les métiers pharmaceutiques.

This quarterly regulatory point presents recent regulatory developments in terms of product lifecycle. Since the previous edition, this selection of publications focuses on the major themes impacting the pharmaceutical professions.

Analytique - Analytical

Origine	Titre	Type	Date
	Guideline for Elemental Impurities Q3D(R2)		
ICH	<i>Le projet de directive ICH Q3D (R2) sur les impuretés élémentaires, comprenant les extraits qui prennent en compte les révisions des annexes 2 et 3 suite aux corrections de l'exposition quotidienne autorisée (PDE) pour l'or, l'argent et le nickel, ainsi qu'une nouvelle annexe 5 sur les limites des impuretés élémentaires par voie cutanée et transcutanée, a atteint l'étape 2b du processus de l'ICH en septembre 2020 et entre maintenant dans la période de consultation.</i>	Draft	25/09/2020
	Publication de Pharmeuropa 32.3		
EP	<i>Tous les nouveaux textes et les textes révisés pour des raisons techniques sont publiés dans Pharmeuropa pour enquête publique. La date limite de réception des commentaires pour Pharmeuropa 32.3 est le 30 septembre 2020. En particulier, publication des projets suivants : 2.2.48. Spectroscopie Raman 2.4.35. Éléments extractibles dans les plastiques pour usage pharmaceutique 3.1.16. Polymères cyclooléfiniques 3.1.17. Copolymères cyclooléfiniques</i>	Draft	15/07/2020
	MHRA response and Strategy for the Application of Analytical Quality by Design concepts to pharmacopoeial standards for medicines		
MHRA	<i>Présentation des résultats de la consultation lancée en 2019 par la MHRA sur l'application des principes du Analytical Quality by Design (AQbD) aux normes de pharmacopée pour les médicaments.</i>	Report	12/08/2020

Développement - Development

Origine	Titre	Type	Date
	The Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses — Biopharmaceutics Applications for Oral Drug Product Development, Manufacturing Changes, and Controls - Guidance for Industry		
FDA	<i>Ce guide fournit des recommandations générales concernant le développement, l'évaluation et l'utilisation d'analyses pharmacocinétiques physiologiques (PBPK) pour les demandes de médicaments oraux. Les analyses PBPK utilisent des modèles et des simulations qui combinent la physiologie, la population, la substance médicamenteuse et les caractéristiques du produit pour décrire mécaniquement les comportements pharmacocinétiques (PK) et/ou pharmacodynamiques d'un produit médicamenteux.</i>	Draft	30/09/2020
	Setting Endotoxin Limits During Development of Investigational Oncology Drugs and Biological Products Guidance for Industry		
FDA	<i>Ce guide décrit les recommandations de la FDA aux promoteurs de nouveaux médicaments expérimentaux pour l'établissement de limites d'endotoxines pendant le développement de médicaments expérimentaux destinés à être utilisés en combinaison avec d'autres médicaments approuvés ou pour le co-développement de deux ou plusieurs médicaments expérimentaux. Le champ d'application de ce guide est limité aux médicaments anticancéreux, y compris les produits combinés et administrés par voie parentérale (sauf pour l'administration intraoculaire) pour traiter les cancers graves.</i>	Draft	28/07/2020
	Regulatory Considerations for Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products: Minimal Manipulation and Homologous Use - Guidance for Industry		
FDA	<i>Ce guide vise à améliorer la compréhension par les parties prenantes des définitions de la manipulation minimale du 21 CFR 1271.3 (f) et de l'utilisation homologue du 21 CFR 1271.3 (c).</i>	Final	20/07/2020

Inspection – Inspection

Origine	Titre	Type	Date
	Audit Checklist – Interpretation Guide		
PICS	<i>Guide d'interprétation ayant pour but de faciliter la compréhension de chaque indicateur, d'harmoniser les attentes et d'améliorer la cohérence lors de l'évaluation du programme de conformité réglementaire des bonnes pratiques de fabrication d'une autorité compétente.</i>	Final	01/09/2020
	Good reliance practices in regulatory decision-making for medical products: high-level principles and considerations		
ICH	<i>Ce document est destiné à fournir des orientations high level, des définitions, des concepts clés et des considérations afin de guider les mécanismes et activités de reliance, des exemples illustratifs d'approches et des conclusions. Il sera complété par une boîte à outils composée de guides de pratique, d'études de cas et d'un répertoire d'exemples plus complet.</i>	Draft	/08/2020

Fabrication – Manufacturing

Origine	Titre	Type	Date
	Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs - Guidance for Industry		
FDA	<i>Ce guide recommande les mesures que les fabricants d'API et de produits pharmaceutiques devraient prendre pour détecter et prévenir les niveaux inacceptables d'impuretés de nitrosamine dans les produits pharmaceutiques. Le guide décrit également les conditions susceptibles d'introduire des impuretés de nitrosamine.</i>	Final	02/09/2020
	Guideline on the quality of water for pharmaceutical use		
EMA	<i>La ligne directrice a été mise à jour pour refléter les changements dans la Pharmacopée européenne, y compris la monographie révisée pour l'eau pour préparations injectables autorisant des méthodes autres que la distillation pour produire de l'eau de qualité injectable. La ligne directrice a également été mise à jour pour refléter les attentes actuelles concernant la qualité minimale acceptable de l'eau utilisée dans la fabrication de substances actives et de médicaments à usage humain et vétérinaire. La ligne directrice mise à jour entrera en vigueur le 1er février 2021.</i>	Final	20/07/2020
	Overview of comments received on the draft 'Guideline on the quality of water for pharmaceutical use' (EMA/CHMP/CVMP/QWP/496873/2018)		
EMA	<i>Synthèse des commentaires reçus par l'EMA lors de la période de consultation du draft du guideline sur la qualité de l'eau à usage pharmaceutique.</i>	Final	20/07/2020

Dispositifs Médicaux - Produits Combinés

Origine	Titre	Type	Date
	Multiple Function Device Products: Policy and Considerations - Guidance for Industry		
FDA	<i>Ce guide explique l'approche et la politique réglementaires de la FDA pour tous les produits de dispositifs multifonctions.</i>	Final	29/07/2020

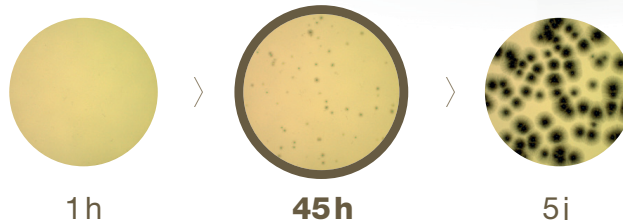
interscience

ScanStation

Station d'incubation et de comptage de colonies en temps réel

Obtenez des résultats anticipés

DATA INTEGRITY | 21 CFR PART 11 | AUDIT TRAIL

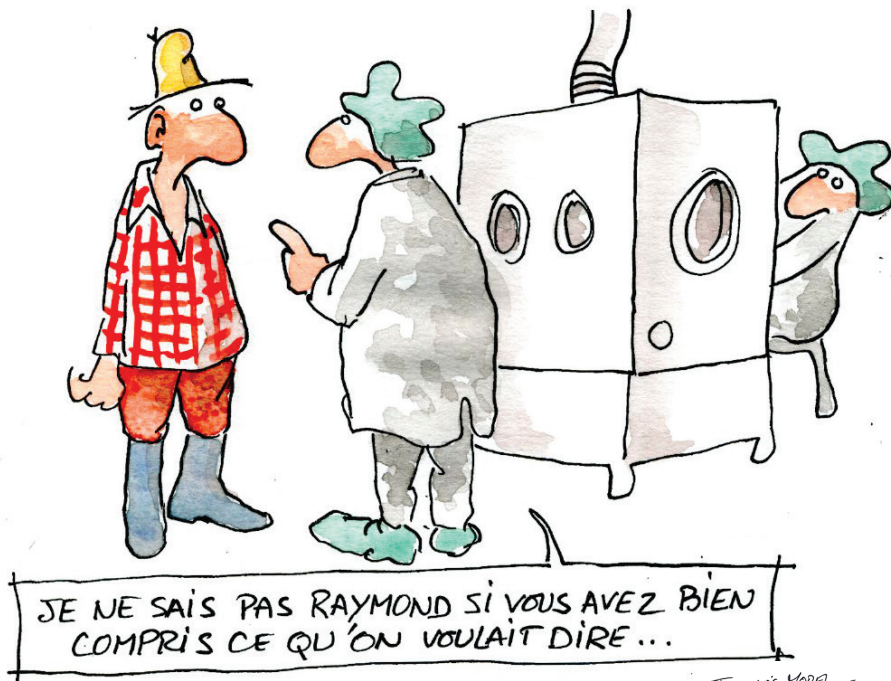


Suivi en temps réel des analyses et résultats anticipés dès 45 heures au lieu de 5 jours pour *Aspergillus brasiliensis* sur gélose Sabouraud

La campagne on y gagne ! Le travail en mode campagne, une avancée sur la productivité des isolateurs.

Par le GIC A3P Technologie Barrière

Dans l'industrie pharmaceutique, le travail en mode campagne se définit par la conservation du matériel (autre que celui en contact avec le produit) et de l'environnement pendant la durée de la campagne et pour un nombre de lots défini.



En d'autres termes :

- Le circuit de remplissage en contact produit (tuyaux, aiguilles, pompes, ...) est remplacé, nettoyé et stérilisé entre chaque lot ;
- Le matériel en contact avec les articles primaires (bouchons, joint de piston, etc.) est conservé pendant toute la durée de la campagne et pour le nombre de lots réalisables dans une campagne (bols, rampes, ...) ;
- L'environnement de remplissage est conservé pour toute la durée de la campagne et pour le nombre de lots réalisables dans une campagne.

Le mode campagne n'est pas spécifique à l'utilisation d'isolateurs, il peut être utilisé également sur des lignes RABS (Restricted Access Barrier System).

1. De l'intérêt de passer en mode campagne

Les illustrations figures 1 et 2 permettent de visualiser les bénéfices de productivité du passage en mode campagne en doublant la capacité de remplissage d'une ligne de production sous isolateur. Le tableau 1 permet de quantifier le gain de temps possible grâce au mode campagne. Et en détail avec les figures 1 & 2, les séquences des opérations de production en isolateur de 10 lots sans et avec le mode campagne.

Nbre de lots	Heures nécessaires SANS mode campagne	Heures nécessaires AVEC mode campagne	Gain %
1	47	47	0,0%
2	94	67	28,7%
10	470	227	51,7%
20	940	427	54,6%

Tableau 1 : évaluation des gains en fonction du nombre de lots par campagne

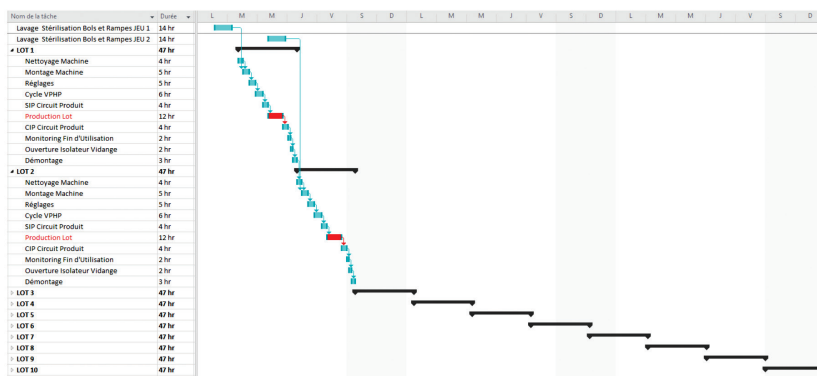


Figure 1 : 10 lots sans mode campagne

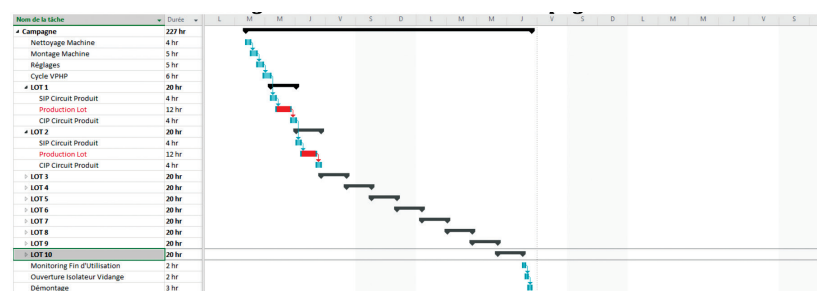


Figure 2 : 10 lots avec mode campagne

Le travail en mode campagne permet de **mutualiser les activités** et donc de gagner du temps mais les risques sont alors partagés par tous les lots de la campagne ; les parties sous isolateur de la ligne de production se doivent d'être suffisamment fiables pour ne pas être obligé d'interrompre la campagne, à cause d'un incident qui nécessiterait l'ouverture de l'isolateur pour sa résolution (casse mécanique, désaccouplement, ...).

L'exploitation en mode campagne doit (au mieux) être prise en compte pour le choix/design de la remplisseuse. Ceci permettra d'avoir une machine capable de tenir les objectifs du nombre de lots à produire dans une campagne sans limitation de contraintes mécanique, de changement de format, de nombre de matériel/consommables pour le monitoring présent en début de campagne, ... Les risques principaux liés à l'utilisation d'isolateurs sont rappelés dans les encadrés, ils ne sont pas spécifiques au mode campagne.

2. Comment passer en mode campagne ?

La durée de la campagne et le nombre de lots sont fondés sur la capacité industrielle souhaitée.

La durée de la campagne correspond à la performance environnementale de l'enceinte close qui est validée par EMPQ (Environmental Monitoring Performance Qualification). Elle est validée par 3 exercices d'EMPQ réalisés pendant et à l'issue de 3 campagnes de la durée cible. L'activité "aseptique" (interventions) réalisée durant chacune de ces campagnes doit être représentative de l'activité "aseptique" nécessaire lors d'une campagne de production.

Le nombre de lots d'une campagne est validé par 3 campagnes d'APS (Aseptic Process Simulation) initiales comportant (ou représentant) le nombre de lots souhaité. L'activité "aseptique" réalisée durant chacune de ces campagnes doit être représentative de l'activité "aseptique" qui sera réalisée lors d'une campagne de production. L'activité "aseptique" des APS sera supérieure à l'activité "aseptique" réalisable sur un lot de production (nombre pour chaque type d'interventions).

Lors de la validation initiale de la durée et nombre de lots, les APS et EMPQ sont généralement réalisés conjointement. En théorie, deux méthodes sont envisageables : **méthode en 1 fois ou méthode par itération**.

Prenons l'exemple d'une machine dont le circuit de remplissage est nettoyable et stérilisable en place et dont l'objectif dicté par la capacité industrielle serait d'opérer des campagnes de 9 lots sur une durée de 22 jours. Voir figure 3. Les figures 4 et 5 montrent l'enchaînement des différentes activités permettant de réaliser les validations dans chacune des méthodes. En APS, les CIP (Cleaning In Place) et SIP (Sterilization In Place) entre 2 "lots" d'APS ne sont pas réalisés, seule la déconnexion, reconnexion du circuit de remplissage est réalisée.

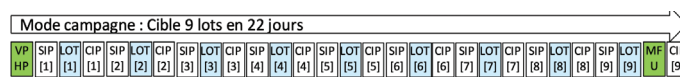


Figure 3 : cible 9 lots en campagne de 22 jours

Notons que si la machine comporte un circuit de remplissage à usage unique, on pourra choisir :

- de remplacer/jeter le circuit de remplissage entre chaque "lot" d'APS pour évaluer l'impact des manipulations de montage et de démontage sur l'environnement de l'isolateur ;
- ou simplement de déconnecter et reconnecter le même circuit ; ce en fonction de la complexité et du risque lié aux manipulations.

3. Méthode "en 1 fois"

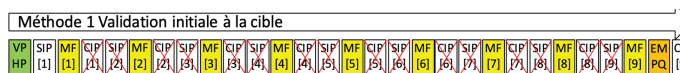


Figure 4 : méthode "en 1 fois"

Elle permet de valider directement la cible, et a priori peut paraître plus rapide. Il faut cependant prendre en compte une phase "d'apprentissage" de la machine pendant laquelle les pratiques de réglage ne seront pas optimisées et conduiront à des interruptions de la campagne à la suite d'un incident nécessitant l'ouverture de l'isolateur pour sa résolution.

La validation par la méthode "en 1 fois" ne pourra être établie que par la réalisation consécutive de 3 campagnes de 22 jours de remplissage de 9 lots de Media ce qui paraît difficilement atteignable du "premier coup" (risque d'interruption de campagne comme cité ci-dessus). Pendant toute cette période, aucun lot commercial ne peut être produit.

4. Méthode "par itération"

Elle permet :

- de réaliser les lots de validation de produit plus rapidement,
- de soumettre plus rapidement aux autorités,
- de réduire l'impact des "casses" (ou interruptions sans redémarrage immédiat possible) campagne prématurées sur le plan de production des premières années.

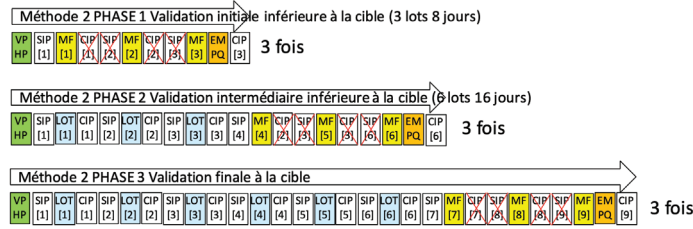


Figure 5 : méthode "par itération"

Dans cette méthode "par itération", les APS de routine sont utilisés pour permettre d'établir les données nécessaires à l'augmentation de la durée de campagne et du nombre de lots. Sachant qu'un APS de routine est réalisé tous les 6 mois, il ne faut pas plus d'un an et demi pour implémenter une augmentation de la durée de campagne et du nombre de lots. De plus, si la stratégie d'augmentation du nombre de lots et de durée de campagne est soumise en même temps que la soumission initiale, la simple transmission des nouvelles données permet de mettre en application sans besoin de réponse préalable des autorités.

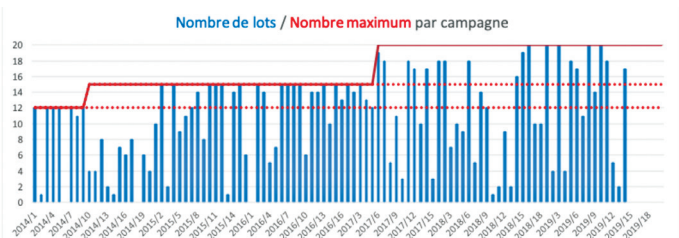


Figure 6 : exemple d'augmentation de nombre de lots par campagne "par itération". Données Historiques de production pour une durée maximum de 16 puis 22 jours

5. Comment documenter en mode campagne ? Dossier de campagne versus dossier de lot.

Des données générées en mode campagne étant "partagées" par plusieurs lots, il est (d'expérience) plus facile d'organiser la documentation en différents dossiers. Le dossier de lot regroupera les données spécifiques au lot et le dossier de campagne regroupera l'ensemble des données partagées par tous les lots d'une même campagne. Les données compilées dans le dossier de campagne sont celles correspondant aux activités jaunes. Les données compilées

dans le dossier de lot sont celles correspondant aux activités orange (1 dossier par lot).

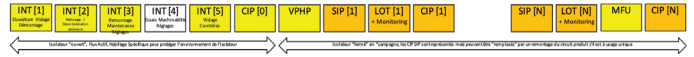


Figure 7 : dossiers de lot et dossier de campagne

Les données liées à l'isolateur lui-même pendant la durée de la campagne (nombre de lots, durée, connexions d'équipements, monitoring environnemental, pressions, température, ...) sont liées au dossier de campagne de même que les résultats des tests d'intégrité des gants. Aucun lot produit dans une campagne ne pourra être libéré sans que le dossier de campagne ne soit complet et conforme.

6. La gestion des imprévus

Et comme tout ne se passe pas toujours sans incident, il faut anticiper les comportements à adopter en cas d'évènements particuliers qui pourraient remettre en cause l'asepsie de l'isolateur :

- gant troué, chute porte RTP (Rapid Transfer Port),
- fuite de liquide lors du Clean In Place (Nettoyage en place),
- fuite d'air,
- "découvrement" de surfaces "moins exposées" à l'H₂O₂,
- toute altération des conditions de pression-température-humidité pouvant affecter l'environnement de l'isolateur,
- etc

Pour chacun des cas envisagés, un arbre décisionnel devra être élaboré pour pré analyser les pistes de causes et les conséquences sur le lot et/ou la campagne (spécifier si des prélèvements supplémentaires sont à réaliser, si la campagne doit être arrêtée, ...) Ceci évitera les risques suivants :

- Ne pas se poser des questions que lorsque l'évènement arrive ;
- Répondre différemment à chaque occurrence ;
- S'apercevoir que l'on aurait voulu réaliser un prélèvement que l'on ne peut plus faire.

Conclusion

Le mode campagne permet la rentabilisation rapide d'une ligne sous isolateur, sans dégradation de la Qualité des unités produites. Il permet de produire plus et limite le vieillissement des élastomères par une fréquence moindre d'exposition à l'H₂O₂. Le mode campagne n'est pas un concept futuriste, il est employé depuis longtemps dans de nombreux sites et a démontré son efficacité.

Rendez-vous les 27 & 28 octobre, pour participer aux visioconférences dédiées aux Technologies Barrières.

Programme & inscription
www.a3p.org/evenements

- # Ready to comply with Annex 1?
- # Isolator aseptic handling and processing of toxic material
- # New trends and technologies in working with isolators

Barrier Technologies
 October 27 & 28, 2020 Online

Encadré de rappel : Risques associés au travail campagne... mais pas que !

RISQUE N°1

La qualité du nettoyage pré-décontamination

Un nettoyage/désinfection, scrupuleux de toutes les surfaces internes de l'isolateur, doit être réalisé préalablement à la décontamination par évaporation en phase vapeur de H₂O₂ (VPH) de l'intérieur de l'enceinte. Cette opération nettoyage "mécanique" permet de retirer les "salissures" et de réduire ainsi la contamination d'origine biologique. Les résidus d'agent de nettoyage ou de désinfectants peuvent eux-mêmes présenter des risques lors de la bio-décontamination de l'enceinte s'ils ne sont pas éliminés de façon efficace. Il convient, à l'issue de ce nettoyage/désinfection, de gérer le statut "propre" de l'isolateur mais aussi les conditions de perte de ce statut et les actions nécessaires pour le retrouver.

RISQUE N°2

Les contaminations en intercampagne

L'intercampagne est la période de temps qui s'écoule entre la fin d'une campagne et la campagne suivante ; durant cette période, l'isolateur subit les opérations de démontage, maintenance, remontage de la ligne de remplissage.

Des contaminations particulière et microbiologique peuvent être causées par ces activités de maintenance, préparation montage de ligne, ... d'où l'absolue nécessité de définir et d'afficher les "Bonnes Pratiques d'Intercampagne" et de bien former le personnel intervenant. Lorsque les portes doivent être ouvertes pendant l'intercampagne : les ventilateurs de l'isolateur fonctionnent. Lors de cette session de travail, le personnel en contact avec l'intérieur de l'isolateur : est limité en nombre,

est dédié à cette activité lors de sa présence dans la zone, porte des protections adaptées (protection de la tête, masque, gants stériles, lunettes,...) pour limiter l'introduction de particules lors des activités dans l'isolateur. Dans un esprit de préservation de la propreté particulière de l'isolateur, tout matériel entré dans un isolateur pendant une intercampagne doit être au préalable lavé / décontaminé pour limiter la biocharge potentielle.

Glossaire

APS	Aseptic Process Simulation (Test de répartition simulée)
CIP	Cleaning in Place (Nettoyage en place)
EMPQ	Environmental Monitoring Performance Qualification
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HEPA	High Efficiency Particulate Air
MF / MFT	Media Fill Test ou APS (Test de répartition simulée)
MFU	Monitoring de Fin d'Utilisation
RABS	Restricted Access Barrier System
RTP	Rapid Transfer Port
VPH	Vapor Phase Hydrogen Peroxyde (Peroxyde d'hydrogène gazeux)
SIP	Sterilization In Place (Stérilisation en place)



Together one step ahead

We at SKAN support you not only during the development process of your product but also provide you with a comprehensive life cycle support. Together with our experts and our unmatched isolator technology you will be able to optimize your processes. You will experience a carefree cooperation thanks to our longstanding experience with documentation and profound knowledge of the current FDA, EMA requirements.

You will find further information at www.skan.ch



confarma



**De nouvelles
capacités de laboratoires
disponibles pour vos projets :**

- une surface triplée pour l'analyse de vos produits injectables et stériles,
- une zone dédiée aux analyses environnementales de votre production.

Confarma vous accompagne de votre routine à vos projets les plus complexes et innovants en microbiologie, en biologie cellulaire et en physico-chimie.

Découvrez-nous sur www.confarma.fr

Certified according to GMP, cGMP (FDA), GLP, ISO 9001, ISO 17025, ISO 14001, OHSAS 18001

CONFARMA France SAS - ZI rue du Canal d'Alsace - 68490 HOMBOURG
Tél. +33 (0) 3 89 83 37 20 Fax +33 (0) 3 89 83 37 29 E-Mail info@confarma.fr

Inspection visuelle : principaux constats des inspections de l'ANSM.

Par Gabriel BERBARI - ANSM

Gabriel.BERBARI@ansm.sante.fr>

La présence de particules visibles dans les préparations parentérales a longtemps été et demeure un sujet de préoccupation majeur pour les industriels et les autorités de santé. En effet, la présence de particules visibles dans une préparation parentérale peut remettre en cause sa sécurité⁽¹⁾. Par conséquent, il est attendu que la présence de particules visibles soit réduite autant que possible dans l'ensemble des préparations parentérales.



L'évolution récente des textes normatifs et réglementaires montre l'intérêt actuel pour le renforcement de l'inspection visuelle, ou « mirage », des médicaments injectables qui est une étape fondamentale pour la sécurisation de leur production^(1,4,5).

Les rappels de lot pour la présence de particules dans les préparations parentérales représentent un contingent important en France. Ainsi, en 2016, ils ont été à l'origine de 10% de l'ensemble des rappels de lots des préparations parentérales, 17 % pour 2017 et 20% pour 2018.

L'ANSM a réalisé une étude afin d'évaluer l'état actuel des pratiques d'inspection visuelle des sites fabricants de préparations parentérales ou de médicaments de thérapie innovante (MTI) pour lesquelles elle réalise des inspections selon l'annexe 1 des bonnes pratiques de fabrication (BPF)⁽²⁾ ou les bonnes pratiques de fabrication des médicaments de thérapie innovante (BPF-MTI) le cas échéant⁽³⁾.

1. Méthodologie de l'étude

L'étude a consisté à effectuer une revue de l'ensemble des rapports d'inspection des établissements pharmaceutiques fabricants de préparations parentérales sur la période de janvier 2016 à juin 2019 de manière à disposer de données sur les écarts d'inspection relevés. Une différenciation entre les sites fabricants de médicaments chimiques et les sites fabricants de médicaments biologiques (60 sites fabricants de médicaments biologiques et 44 sites fabricants de médicaments chimiques) a été réalisée afin de rechercher des éventuelles spécificités en fonction du domaine considéré. L'ensemble des écarts relevés dans les rapports d'inspection (critique, majeur et autre) ont été pris en compte et

....→

les suites administratives éventuelles ont été étudiées dans le cas où des écarts critiques ou majeurs avaient été relevés.

Les établissements concernés par l'étude réalisée étaient situés aussi bien en France (90%) qu'à l'étranger (10%) dans le cadre d'inspections réalisées pour le compte de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) ou en support de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Pour les médicaments biologiques, une grande diversité des établissements a été observée, tels que les fabricants de MTI, de vaccins, des établissements réalisant le fractionnement du plasma, et comprenaient des structures privées ou publiques.

Dans le but d'analyser les résultats obtenus et d'identifier les problématiques les plus fréquemment rencontrées dans les différents rapports d'inspection, huit sous-catégories (1. Procédés, 2. Documentation, 3. Analyse de tendance, 4. Habilitation du personnel, 5. Environnement (Conditions) de mirage, 6. Défauts et défauts, 7. Niveau de qualité Acceptable (NQA), 8. Qualification/validation des machines automatisées) ont été définies. Il est toutefois important de souligner qu'un même écart peut avoir été rattaché à plusieurs sous-catégories, quand des problématiques différentes y sont rapportées. De plus, la criticité des écarts a également été étudiée de manière à définir les sous-catégories génératrices des écarts d'inspection les plus critiques.

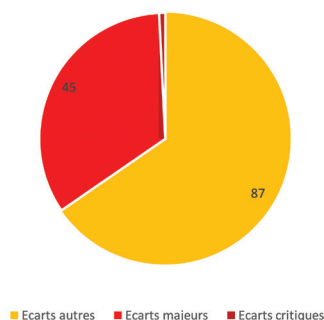
Sur la période étudiée, 161 inspections BPF ont été réalisées, qui ont concerné 104 établissements différents, certains établissements ayant fait l'objet de réinspections.

Les références opposables en vigueur suivantes, au moment de l'étude, ont été utilisées pour la recherche des écarts relevés en lien avec l'inspection visuelle : BPF Ligne Directrice 1 point 124, la Pharmacopée européenne 2.9.20, BPF-MTI 9.85 et BPF-MTI 2.42. Cependant, il faut souligner que les BPF-MTI sont applicables depuis mai 2019 et peu d'écarts ont été relevés selon cette référence réglementaire au moment de l'étude.

2. Résultat de l'étude

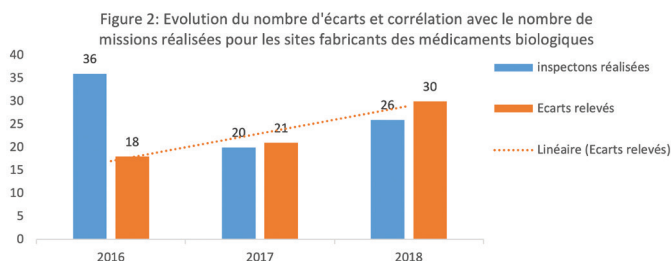
133 écarts ont été relevés en lien avec l'inspection visuelle pour 75 inspections, soit une moyenne approximative de 2 écarts par inspection. Au total, 51 établissements sur les 104 établissements inspectés ont eu des écarts relatifs à l'inspection visuelle, soit près de la moitié des sites inspectés. La répartition des écarts en fonction de leur criticité est la suivante : 87 écarts autres, 45 écarts majeurs et 1 écart critique (figure 1).

Figure 1: Répartition des écarts en rapport avec l'inspection visuelle par criticité



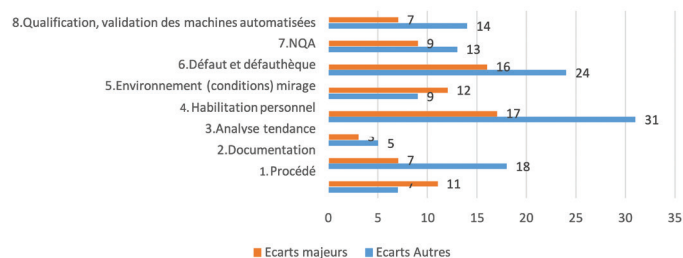
133 écarts ont été relevés en lien avec l'inspection visuelle pour 75 inspections, soit une moyenne approximative de 2 écarts par inspection. Au total, 51 établissements sur les 104 établissements inspectés ont eu des écarts relatifs à l'inspection visuelle, soit près de la moitié des sites inspectés. La répartition des écarts en fonction de leur criticité est la suivante : 87 écarts autres, 45 écarts majeurs et 1 écart critique (figure 1).

L'évolution du nombre d'écarts par année pleine de 2016 à 2018 pour les sites fabricants de médicaments biologiques (figure 2) montre une augmentation du nombre d'écarts qui n'est pas corrélée au nombre de missions réalisées. Il en est de même pour les sites fabricants de médicaments chimiques où une augmentation sensible est également observée et qui n'est pas corrélée au nombre de missions réalisées.



La répartition des écarts par sous-catégorie (figure 3) montre que les sous-catégories 4 "habilitation du personnel" et 6 "défauts/défauts" ressortent clairement comme les problématiques majoritaires relevées lors des inspections BPF. La répartition de la criticité des écarts par criticité révèle que les sous-catégories 1 "procédés" et 5 "environnement" (conditions) de mirage présentent une proportion élevée d'écarts majeurs suivies par la sous-catégorie 3 "analyses de tendance".

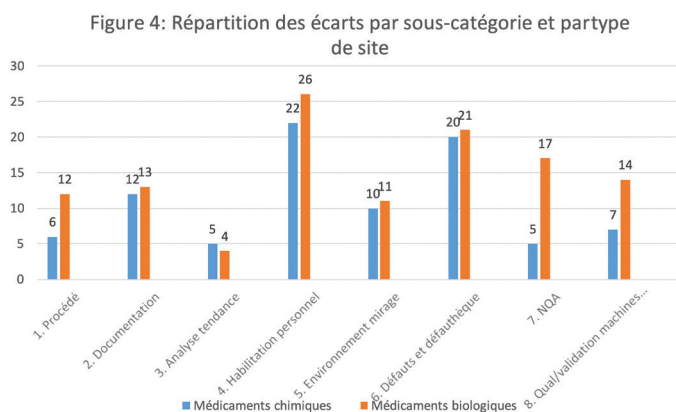
Figure 3: Répartition des écarts par sous-catégorie et criticité des écarts par sous-catégorie



La répartition des écarts par sous-catégorie en fonction du type de site (chimique ou biologique) est légèrement différente (figure 4). Les sites fabricants de médicaments biologiques ont un plus grand nombre d'écarts en rapport avec les procédés, le NQA et la qualification/validation des machines automatisées.

Cette différence peut s'expliquer en grande partie par une plus forte automatisation de l'inspection visuelle pour les sites fabricants

des médicaments biologiques par rapport aux sites fabricants des médicaments chimiques.



Les suites administratives (rappel à la loi, lettre préalable à injonction et injonction) associées aux différents écarts majeurs et critiques relevés lors de la période étudiée ont également été étudiées. Parmi les 75 inspections pour lesquelles il a été relevé au moins un écart en lien avec l'inspection visuelle, 23% ont donné lieu à des suites administratives et il s'agissait de lettres d'injonction dans la moitié des cas. Il est à souligner que les actions correctives en lien avec l'inspection visuelle peuvent s'étendre dans le temps (de 9 à 12 mois) car elles nécessitent très souvent une remise en question profonde des procédés d'inspection visuelle à partir du moment où les fondamentaux méthodologiques doivent être modifiés.

3. Discussion

La sous-catégorie 1 "**Procédés**" regroupe l'ensemble des écarts en lien avec les fondamentaux de l'inspection visuelle et qui reflètent la stratégie globale de l'inspection visuelle adoptée par le site concerné. Les rejets de l'inspection visuelle qui sont remirés une nouvelle fois sans justification et l'évolution du taux de faux-rejets qui n'est pas maîtrisée au cours de l'inspection visuelle représentent les écarts les plus communément retrouvés dans cette sous-catégorie.

En effet, le remirage des rejets issus d'une première inspection visuelle ne pourrait se faire sans la justification de la pertinence de ces rejets ⁽⁴⁾. La présence de bulles ou d'autres artéfacts dans le produit communément revendiqués comme étant à l'origine de potentielles opérations de remirage, doivent être démontrés et ceci, pour chaque produit miré. Un taux de faux-rejets évolutif dans le temps doit être considéré comme un critère qualitatif car il peut également être l'élément précurseur d'une configuration non viable du procédé d'inspection visuelle et d'un défaut de paramétrage, voire même d'un défaut de qualification de l'équipement d'inspection visuelle.

La sous-catégorie 2 "**Documentation**" regroupe l'ensemble des écarts en lien essentiellement avec des défauts de traçabilité des opérations d'inspection visuelle. Par conséquent, cette sous-catégorie n'est pas spécifique à l'inspection visuelle et ne sera pas davantage commentée dans le cadre de cette étude.

La sous-catégorie 3 "**Analyse de tendance**" regroupe l'ensemble des

écarts en lien avec le suivi de l'évolution des défauts relevés pour chacun des produits étudiés. Ces analyses de tendance sont attendues par type de produit considéré, le regroupement de plusieurs produits différents dans une même analyse de tendance n'étant pas opportun sauf justification solidement établie.

L'objectif de ces analyses de tendance étant d'alerter suffisamment en amont de toute dérive du système d'inspection en place ⁽⁵⁾, il est attendu par conséquent l'établissement de niveaux d'alerte et d'action pour les différentes catégories de défauts et par produit de manière à mettre en place les actions correctives et préventives nécessaires avant le dépassement du seuil d'action. En cas de dépassement des limites d'alerte et d'action, une recherche de causes les plus probables devra être réalisée et les actions correctives nécessaires devront être déployées avant la reprise des opérations d'inspection visuelle.

La sous-catégorie 4 "**Habilitation du personnel**" est la sous-catégorie présentant le contingent le plus important d'écarts dans le cadre de cette étude. La problématique principale relevée est en lien avec une cadence d'inspection visuelle appliquée en production mais pour laquelle il n'existe pas ou très peu d'éléments issus de la qualification des opérateurs de production permettant de la justifier.

De plus, très souvent les conditions de qualification ne prennent pas en compte les conditions de "fatigue" des opérateurs en fin d'équipe ⁽⁵⁾ ainsi que les temps de pause définis qui doivent aussi être justifiés. L'autre problématique relevée est en lien avec des conditions d'habilitation des opérateurs, où les critères d'acceptation ne sont pas établis ou insuffisamment établis : par exemple le nombre d'unités non conformes à détecter parmi les conformes, le pourcentage de détection des défauts critiques et majeurs lors de l'habilitation et le nombre d'essais ("runs") de qualification initiale et périodique.

La sous-catégorie 5 "**Environnement (conditions de mirage)**" regroupe les écarts en lien avec des paramètres d'inspection visuelle qui sont non définis ou insuffisamment définis au cours de la production. Il s'agit par exemple, de paramètres de recettes pour des équipements d'inspection visuelle semi-automatique qui ne sont pas figés au cours de la production, d'absence de vérification de la vitesse de transfert des unités mirés pouvant avoir un impact sur la reproductibilité des opérations de mirage et de paramètres de rotation des unités à inspecter qui sont déterminés en qualification mais non fixés en production de routine. Les conditions optimales de luminosité et la vérification (métrologique notamment) sur une base régulière des paramètres de luminosité font également partie des écarts régulièrement relevés dans cette sous-catégorie.

La sous-catégorie 6 "**Défaut et défauts**" est la deuxième sous-catégorie, après l'habilitation du personnel, qui présente le nombre le plus important d'écarts relevés dans le cadre de cette étude. De manière générale, les défauts à rechercher lors de l'inspection visuelle dans un produit donné sont les défauts connus pour ce produit (au cours du développement du produit et collectés lors de la production en routine), répondant à la définition "après la répartition, les produits à usage parentéral doivent subir un contrôle individuel destiné à détecter tout corps étranger ou tout autre défaut" comme précisé dans les BPF ^(2,5). Les défauts tels que l'opalescence, coloration, turbidité ou présence de précipité communément listés dans les défauts critiques et devant être recherchés dans le cadre de l'habilitation du personnel et la qualification des équipements de mirage semi-automatique

et automatique le cas échéant, ne sont pas toujours efficacement recherchés en inspection visuelle automatique alors que ces mêmes défauts sont détectés aisément en inspection manuelle. En ce qui concerne les défauts, les défauts représentés ne sont pas toujours préférentiellement collectés de la production mais majoritairement créés ce qui peut apporter un biais lors de l'habilitation des opérateurs de production et la qualification des équipements de mirage. Il est communément admis que certains défauts ne pourront pas être collectés à partir de la production, du fait de leur rareté par exemple, et devront le cas échéant faire l'objet d'une justification. Dans le cas où les défauts sont créés, les modalités de création et de constitution des défauts devront être définies ainsi que les modalités de leur maintien dans le temps.

La sous-catégorie 7 "**NQA (Niveau de Qualité Acceptable)**" représente les écarts en lien avec un contrôle supplémentaire (après l'inspection individuelle de chaque contenant) souvent réalisé selon un plan d'échantillonnage reposant sur un effectif d'échantillon et une valeur d'acceptation déduits des tableaux définis dans la norme ISO2859-1 ou par une autre méthode statistique ⁽¹⁾. Il est essentiel de définir des limites de NQA pour chaque catégorie de défauts et en cas de dépassement des limites de NQA, une investigation devra être ouverte. L'effectif de l'échantillon pris en compte pour le calcul du NQA devra aussi reposer sur la quantité d'unités réellement produites. En cas de réinspection visuelle et après ouverture d'une investigation, il est attendu qu'un contrôle avec un NQA renforcé (de niveau III par exemple) soit réalisé par un opérateur n'ayant pas participé à l'inspection initiale du lot, de manière à assurer l'indépendance du contrôle renforcé réalisé par rapport au contrôle initial.

Enfin, la sous-catégorie 8 "**Qualification et validation des machines automatisées**" regroupe la qualification des machines semi-automatisées et automatisées ainsi que la validation des procédés d'inspection visuelle. L'inspection visuelle semi-automatisée ou entièrement automatisée peut être réalisée sous réserve de validation par rapport à l'inspection manuelle, qui reste la référence de l'inspection visuelle ⁽⁵⁾. Par conséquent le passage de l'inspection visuelle manuelle vers les procédés semi-automatisés ou automatisés, par comparaison notamment des résultats obtenus lors du mirage automatisé par rapport au mirage manuel (« Knapp test ») ⁽⁶⁾, doit faire l'objet d'une grande vigilance. Par exemple, pour les défauts de type particule, il sera important de définir le seuil pour la taille de particule détectable par les opérateurs de production selon des données vérifiables et qui servira de ligne de base pour la qualification des équipements automatisés. Les écarts les plus communément rencontrés dans cette sous-catégorie concernent des capacités de détection du mirage automatique qui ne sont pas au moins égales au mirage manuel, des tests de comparaison entre le mirage manuel et le mirage automatisé qui n'incluent pas l'ensemble des types de défauts rencontrés en production ou le rationnel d'inclusion des défauts qui n'est pas explicité ou enfin, un taux de faux-rejets en qualification de performance de l'équipement semi-automatisé ou automatisé qui n'est pas maîtrisé ⁽¹⁾. Il est à souligner que les écarts relevés dans cette sous-catégorie nécessitent bien souvent des actions correctives de fond pouvant prendre plusieurs mois car elles nécessitent très souvent une remise en question de l'ensemble des procédés d'inspection visuelle.

Conclusion

L'inspection visuelle présente, comme nous l'avons vu, un pourcentage important de déficiences relevées au cours des inspections BPF. Malgré les avancées technologiques de détection des défauts et l'automatisation des opérations de mirage,

les fondamentaux du mirage ne doivent pas être pour autant négligés. L'évolution récente des textes normatifs et réglementaires devrait améliorer grandement la compréhension des attentes des autorités de santé en matière d'inspection visuelle.

L'observation en routine des opérations de mirage manuel et automatisé doit conduire à un certain nombre d'interrogations essentielles, telles que :

- Le contrôle individuel à 100% permet-il la détection de tout corps étranger ou tout défaut ? (pour les défauts connus par l'industriel) ; l'inspection visuelle manuelle est-elle toujours la référence utilisée pour les opérations de mirage semi-automatique et automatique ; et plus particulièrement pour des équipements anciennement qualifiés ?
- La formation et l'habilitation du personnel ont-elles été réalisées selon des cadences établies en qualification et appliquées en production ?
- L'ensemble des défauts a-t-il été collecté dans la mesure du possible de la production, et dans le cas contraire, existe-t-il une justification pour la création des défauts ?
- La gestion des défauts et la création des défauts le cas échéant, font-elles l'objet de procédures détaillées et applicables ? Quid de leur maintien dans le temps ?
- Le comparatif ("Knapp test" ou équivalent) entre le mirage manuel et automatique est-il robuste ? Les résultats sont-ils cohérents ? Les défauts intégrés dans le "Knapp test" ont-ils fait l'objet d'une justification et sur quelles bases ?
- Une réhabilitation annuelle des opérateurs ainsi qu'une requalification périodique des équipements sont-elles prévues et sur quelles bases ?

Enfin, il est important de souligner que, dans cette étude, nous nous sommes essentiellement attachés aux méthodes de détection des défauts déjà existants en production, il est important de rappeler que la prévention de l'apparition des défauts revêt une grande importance et que l'inspection visuelle est un processus complet qui doit prendre en compte chacune des étapes de production (matières premières, articles de conditionnement, conditions de production, etc.) susceptibles de générer des particules et de mettre en place les moyens de les prévenir.

Références

- | | |
|--|--|
| <p>[1] European Pharmacopoeia, Recommendations on testing of particulate contamination : visible particles (5.17.2.) (Draft for consultation) 2019</p> <p>[2] EMA, Eudralex volume 4 Annex 1 2008</p> <p>[3] EMA, Eudralex volume 4 Part 4 GMP Requirements for Advanced Therapy Medicinal Products</p> <p>[4] USP (1790) Visual Inspection of</p> | <p>injections 2017</p> <p>[5] EMA, Eudralex volume 4 Annex 1 (Draft for consultation) 2020</p> <p>[6] Julius Z. Knapp and Harold K. Kushner, Generalized Methodology for Evaluation of Parenteral Inspection Procedures, Journal of Parenteral Drug Association, January-February, 1980, Vol 34, No 1.</p> |
|--|--|



**Façonner un environnement durable
dès maintenant,
c'est accompagner les industries des
sciences de la vie en proposant des
solutions innovantes et des services de
qualité**

SUEZ lance Sievers **Eclipse***, sa nouvelle plateforme révolutionnaire de test des Endotoxines Bactériennes. Sa technologie unique simplifie et fiabilise l'analyse tout en assurant une complète conformité aux pharmacopées et une efficacité maximale. Sievers Eclipse réduit de 90% la consommation de lysat afin de préserver durablement la ressource naturelle, la limule et sa biodiversité.

*marque déposée de SUEZ;
peut être déposée dans un ou plusieurs pays



Validation des nettoyages des équipements de production : Contrôle visuel, habilitation du personnel au "visuellement propre".

Par Christophe GAMBLIN - THERAXEL
christophe.gamblin@theraxel.fr

Le nettoyage des équipements de fabrication est un aspect fondamental des GMPs afin d'éviter toute contamination croisée des produits pharmaceutiques au cours de leur fabrication. La validation des processus de nettoyage est requise depuis longtemps dans les industries cGMP et est reconnue comme une activité importante pour maîtriser le risque de contamination des produits et ainsi assurer leur qualité mais surtout assurer la sécurité des patients.



Les validations de nettoyage tendent à prouver que les méthodes de nettoyage sont efficaces, fiables, robustes et capables d'éliminer des contaminations jusqu'à un niveau fixé.

Une inspection visuelle des équipements est requise par la réglementation après les étapes de nettoyage mais aussi avant le début de la production. L'inspection visuelle fait partie du nettoyage de routine et constitue le premier critère de validation du nettoyage. Les résultats de cette inspection doivent être jugés acceptables avant de pouvoir prélever des échantillons par écouvillonnage ou par d'autres méthodes sur l'équipement nettoyé en vue d'une confirmation analytique.

Depuis les années 90, plusieurs publications^{(1), (2), (3), (4), (5), (6)} ont abordé le thème de l'étude de l'inspection visuelle annonçant que la limite de détection se situerait dans un range de concentration allant d'environ 1 µg/cm² à plus de 10 µg/cm² selon les produits étudiés et les

conditions de contrôles. La réglementation US⁽⁷⁾ requiert "une inspection des équipements de fabrication immédiatement avant utilisation". Le PIC/S⁽⁸⁾ conseille de réaliser "une étude de contamination sur surface afin de déterminer la concentration à laquelle la plupart des ingrédients sont visibles". Le dernier texte de l'EMA Q&A 8⁽⁹⁾ précise que dans le cadre du contrôle des nettoyages après validation et dans certains cas précis "le personnel réalisant les inspections visuelles doit recevoir une formation spécifique et un contrôle régulier de l'acuité visuelle. Et que l'habilitation doit être prouvée par des essais pratiques". Cette technique est donc importante à prendre en considération et il est primordial de pouvoir justifier que ces contrôles sont réalisés dans de bonnes conditions. Elle doit être encadrée par un système qualité adéquat.

L'inspection visuelle doit être réalisée sur les surfaces des équipements en contact direct et indirect avec le produit et requiert que ces

surfaces soient visiblement accessibles. Dans le cas où les surfaces ne sont pas visuellement accessibles, il est recommandé de pouvoir démonter l'équipement pour y accéder ou d'utiliser des sources lumineuses, miroirs ou endoscopes. Les résidus ou défauts recherchés peuvent être de différentes sources : produits précédents, agents de nettoyage, contamination microbienne, usure de l'équipement (ex : rayure, rouging, etc.), matières étrangères, liquides techniques (types huiles ou graisses), résidus de solvant de rinçage (ex : eau résiduelle), etc.

En routine, cette inspection visuelle est réalisée sur les équipements par une multitude de personnes en cours ou en fin d'utilisation, après un nettoyage automatique (nettoyage en place), semi-automatique ou manuel, sur des grandes surfaces ou sur des petites pièces nettoyées en laveur. Ces contrôles sont tracés le plus souvent dans des checklists laissées sur l'équipement jusqu'à utilisation, puis jointes au dossier de lot et dans des documents qualité internes au site afin de justifier que les équipements sont propres et utilisables pour une prochaine production. En début de production, les équipes réalisent aussi un contrôle visuel des équipements. Ces informations sont aussi tracées dans les dossiers de lot et dans des carnets de bord d'équipements ou de zones de production. La plupart du temps, un premier contrôle est réalisé en fin de nettoyage par une personne et juste avant la réutilisation de l'équipement par une seconde personne différente de la première. Les équipes qualité et qualification/validation inspectent aussi régulièrement les équipements dans le cadre de leurs activités. Très souvent, la formation et l'habilitation au contrôle visuel de ces personnes ne sont pas tracées de façon convenable et considérées comme une activité critique lors des habilitations et fait souvent partie de la formation et l'habilitation globale au poste de travail.

De même, dans le cadre de la mise en place des validations de nettoyage, les préleveurs qui réalisent les écouvillonnages, les prélèvements des eaux de rinçage ou les prélèvements microbiologiques sont spécifiquement formés et habilités de façon officielle (ex : essais de recouvrement en laboratoire). L'habilitation au contrôle visuel devrait alors être référencée et réalisée au même titre que les autres habilitations effectuées sur le site et considérées comme aussi importantes.

Cet article détaille une des approches possibles de la mise en œuvre, la gestion et le suivi de l'habilitation des équipes aux inspections visuelles dans le cadre des validations de nettoyage et contrôle de routine des équipements. Il décrit les grandes lignes d'une approche qui peut être adaptée, optimisée et modifiée de façon à pouvoir s'appliquer aux procédés internes de chaque site. Cette habilitation ne peut pas justifier le fait que seule l'inspection visuelle est prise en compte pour statuer sur la conformité des nettoyages. Cette habilitation permet de justifier que le personnel formé sera capable de détecter visuellement une contamination de surface inférieure à la limite de contamination acceptable, définir le statut propre des équipements et dans ce sens, confirmer que le risque de contamination croisée des équipements est maîtrisé.

Il faut différencier la qualification des principes d'inspection visuelle de l'habilitation du personnel. L'habilitation des équipes est l'étape finale

de la mise en place de la stratégie globale d'inspection visuelle. Il va falloir au préalable déterminer les limites d'acceptation des résidus sur les surfaces des équipements, puis déterminer la limite de détection visuelle avant de pouvoir mettre en place le processus d'habilitation des équipes. La qualification des principes d'inspection visuelle devrait être validée avant la réalisation des essais d'habilitation des équipes ⁽¹⁰⁾.

L'implémentation de l'habilitation à l'inspection visuelle nécessite une organisation transverse. Elle est réalisée sur de petits groupes de personnes (opérateurs de production, préleveurs, etc.) et sous la responsabilité du service Assurance Qualité. Le test est développé la plupart du temps par le laboratoire qui possède les moyens de mener à bien la mise en place de ces tests (produits, solvant, coupons des différents matériaux, etc.).

En routine, l'inspection visuelle est différente quand le contrôle est effectué sur de petites pièces qui peuvent être placées dans des conditions idéales de test (angle, luminosité, distance) contrairement au contrôle réalisé sur des équipements volumineux et fixes dont les paramètres de contrôle seront plus restrictifs (angle fixe et non optimal par rapport à la lumière, luminosité faible à l'intérieur de tubes ou grands contenants et distance éloignée des surfaces). Afin d'homogénéiser l'approche de qualification et d'habilitation, les tests sont réalisés sur des coupons de taille définie (ex : coupon de 100 cm²), de matière et de qualité de surface le plus proche possible des matériaux rencontrés en production. Les tests sont classiquement réalisés avec des coupons en inox, verre et téflon.

Les critères d'acceptation de l'inspection visuelle doivent être définis pour tout contaminant potentiellement présent sur les équipements : résidus de substances actives, de produits finis ou agents de nettoyage. Il n'est pas nécessaire de réaliser les tests de "visuellement propre" pour la contamination microbienne car cette dernière est étroitement liée aux résidus d'autres produits qui resteraient sur les surfaces.

1. Détermination de la limite résiduelle détectable (VRL)

La première étape de la stratégie d'inspection visuelle est la définition de la limite résiduelle détectable, c'est-à-dire la plus petite concentration de produit qui peut être repérable par l'œil humain à la surface d'un matériau. Le marqueur à utiliser en priorité pour ces tests est le produit issu de l'analyse de risque "Worst case" détaillé dans la stratégie des validations de nettoyage (ex : plan maître de validation de nettoyage), c'est-à-dire la matière première, substance active, produit fini ou résidu le plus dur à nettoyer de chaque famille de produit définie. Si la mise en œuvre du produit fini contenant la substance active la plus difficile à nettoyer est plus facile à mettre en œuvre, alors ce produit fini peut être utilisé pour les tests et inversement. Le choix du contaminant pour réaliser l'étude doit être justifié.

Plusieurs concentrations doivent être étudiées. Il est nécessaire de déterminer dans un premier temps la limite d'acceptation de surface (Limit acceptance surface : LAS qui est évaluée en µg/cm²) selon les approches toxicologiques et thérapeutiques des produits fabriqués. Ces critères d'acceptation sont normalement définis lors de la mise en place des validations de nettoyage et dont la valeur est calculée selon

→

les préconisations du plan maître de validation de nettoyage. Dans un second temps, la limite de détection visuelle VRL (visual residual limit en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) doit être définie. Il est préconisé de déposer, sur coupon des différents matériaux, des concentrations plus ou moins diluées de la concentration LAS et jusqu'à une concentration très faible (ex : plusieurs dilutions successives au 1/10e ou au 1/2e). Ces concentrations sont à définir et à ajuster par l'équipe mettant en œuvre le test sur site. Un nombre de coupons suffisant doit être mis en œuvre afin d'avoir une représentativité de la gamme de concentration étudiée : une dizaine de plaques au minimum est convenable.

Le dépôt est réalisé préférentiellement à l'aide d'un spray pour qu'il soit homogène sur la surface du coupon et entre les coupons. Le dépôt à l'aide d'une pipette peut provoquer des amas de produit qui sont difficilement répétables d'un dépôt à l'autre. Les dépôts doivent être secs et réalisés le plus proche possible des tests de visualisation. Il est possible de réaliser au préalable une étude de stabilité de l'aspect visuel des résidus sur les surfaces afin de pouvoir garder les coupons surchargés un temps défini après dépôt.

Il est conseillé de réaliser le test dans des conditions de luminosité proches de celles rencontrées en zone de production. La luminosité peut être relevée dans les différentes zones de production et un range de luminosité peut être pris en considération pour réaliser les tests de qualification et d'habilitation.

Les coupons peuvent être disposés par ordre décroissant de concentration sur une surface plane, avec une luminosité proche de celle des zones de production. Relever et reporter la luminosité au niveau de chaque coupon sur les fiches de résultats avant le test.



Figure 1: Exemple de gamme de concentration pouvant être étudiée pour la définition de la VRL

Un nombre suffisant (le plus grand possible) de personnes doit effectuer le contrôle de ces coupons afin d'avoir une représentativité des résultats. Il est possible de faire intervenir des personnes de différents services, différents âges, de différentes anciennetés au sein de l'entreprise et portant ou non une correction ophtalmique afin d'avoir le plus grand éventail possible de personnes. Le personnel ne doit pas être spécialement formé à l'inspection visuelle pour réaliser ce test. La visualisation doit être réalisée dans des conditions proches de celles des zones de production. Les paramètres importants à considérer sont : La distance de vue (d) ; L'angle de vue (α) ; La luminosité (L_x).

Ces paramètres de visualisation doivent être au maximum maintenus identiques pour toutes les personnes réalisant le test.

Il est conseillé de réaliser les tests de détermination de la VRL plusieurs fois (par exemple 3 fois) et si possible sur des jours différents afin d'avoir une représentation plus robuste des résultats.

La concentration limite de détection visuelle (VRL) est établie comme

étant la concentration la plus faible détectée par 100 % des opérateurs. La comparaison de la concentration VRL à la concentration LAS permet de déterminer si la limite d'acceptation des résidus sera détectable sur les surfaces des équipements par le personnel réalisant les contrôles.

- Dans le cas où la concentration $VRL > LAS$, il sera difficile au personnel réalisant les inspections visuelles de détecter la limite de contamination acceptable sur les surfaces en production. Dans ce cas, il est absolument nécessaire de compléter le contrôle visuel par des méthodes analytiques ayant une détectabilité convenable par rapport à la limite LAS.
- Dans le cas où la concentration VRL est proche de la concentration LAS, il est tout de même recommandé de compléter le contrôle visuel par un contrôle analytique ayant une détectabilité convenable.
- Dans le cas où la concentration $VRL \leq LAS$ (idéalement au-delà d'un facteur 100) (11), le contrôle visuel du personnel sera assez sensible pour détecter la limite de contamination acceptable sur les surfaces. L'habilitation des équipes est alors réalisable par rapport à ces paramètres.

2. Habilitation du personnel

Le but de cette habilitation n'est pas de disqualifier le personnel qui ne réussit pas le test (telle une discrimination opérationnelle) mais d'apporter une formation adéquate pour que tout le monde soit capable de contrôler des surfaces après nettoyage et avoir un contrôle efficace sur l'état de propreté des surfaces.

Avant la réalisation des tests d'habilitation, le personnel doit suivre une formation adéquate sur l'inspection visuelle. Elle peut se dérouler de la façon suivante :

- Lecture des procédures détaillant la réalisation des inspections visuelles,
- Sensibilisation aux types de résidus potentiellement présents après nettoyage sur les surfaces et qui devront être recherchés lors des contrôles,
- Sensibilisation aux équipements. C'est-à-dire connaître les surfaces des équipements qui seront contrôlées, et connaître les surfaces difficilement accessibles ou les surfaces nécessitant l'utilisation d'appareil d'aide à l'inspection (endoscope, miroir, etc.),
- Prendre connaissance des tests qui vont être réalisés lors de l'habilitation et les différentes concentration recherchées (VRL, LAS),
- Visualiser des coupons pollués témoins afin d'avoir un recul sur les tests d'habilitation.

Les procédures décrivant l'inspection visuelle doivent être les plus détaillées possible, pouvant inclure des photos, schémas, accessoires et position de contrôle et être compréhensibles afin d'assurer la reproductibilité des contrôles.

De la même façon que la définition de la concentration VRL, des coupons doivent être souillés à l'aide du même produit. Les dépôts doivent être homogènes et secs pour la réalisation des tests.

Les concentrations doivent être adaptées dans l'optique de la



LAS 01	LAS 02	LAS 03	LAS 04	LAS 05	LAS 06	LAS 07	LAS 08	LAS 09	LAS 10
50% LAS 01	50% LAS 02	50% LAS 03	50% LAS 04	50% LAS 05	50% LAS 06	50% LAS 07	50% LAS 08	50% LAS 09	50% LAS 10
Blanc 01	Blanc 02	Blanc 03	Blanc 04	Blanc 05	Blanc 06	Blanc 07	Blanc 08	Blanc 09	Blanc 10

réalisation d'un test d'habilitation par rapport à la limite d'acceptation LAS.

Il est conseillé de réaliser les tests avec des coupons souillés à la concentration limite (LAS) et d'autres coupons souillés à une autre concentration qui sera entre la LAS et la concentration limite de détectabilité (VRL). Exemple : 50 % de la LAS ou (VRL+LAS)/2.

Un nombre suffisant de coupons doit être utilisé afin d'avoir une représentativité des résultats (au minimum 10 coupons de chaque concentration). Des coupons blancs sont préparés par dépôt d'une quantité de solvant pur (correspondant à la quantité de solvant contenu dans la solution de concentration LAS (exemple : eau purifiée ou eau PPI).

Les coupons doivent être identifiés de façon à ce que la personne réalisant le test ne puisse pas détecter le statut du coupon (Propre/sale) et déposés sur une surface plane. Dans le cadre de l'habilitation, les coupons doivent être déposés sur la surface de manière randomisée. La luminosité doit être relevée au niveau de chaque coupon à l'aide d'un luxmètre. Chaque personne participant à l'habilitation doit vérifier chaque coupon l'un après l'autre dans des conditions de contrôle définies dans la procédures associée (angle, luminosité, distance) et reporter sur une fiche de test le statut de chaque coupon contrôlé : "sale" ou "propre". Seulement 2 entrées (sale/propre) sont acceptées. Il n'est pas nécessaire de déterminer si certains coupons sont moins ou plus sales que d'autres. Les coupons souillés à la concentration LAS doivent normalement être identifiés comme sales. Les coupons souillés à la concentration LAS/2 doivent aussi être identifiés comme sales si cette concentration est supérieure à la VRL. Les coupons blancs doivent être identifiés comme propres.

Chaque fiche de test est ensuite étudiée et les résultats sont résumés en reportant :

- le pourcentage de détection de coupons sales par rapport aux nombre de coupons réellement sales,
- un pourcentage de détection de coupons propres par rapport aux nombre de coupons réellement propres.

3. Critères d'acceptation

Les résultats attendus suite aux tests d'habilitation du personnel : Tous les coupons surchargés soient détectés comme "sales" : 100 % des coupons considérés sales. Tous les coupons blancs soient détectés comme "propres" : 100 % des coupons considérés propres.

Le terme "propre" est défini comme une absence de résidu visuellement détectable.

- Si un coupon "propre" est identifié comme "sale", cela ne doit pas être considéré comme un échec à l'habilitation. Cela peut être dû à une erreur de prudence ou à un léger défaut de surface du coupon en question et ces erreurs peuvent être acceptées. Si plusieurs erreurs (nombre à définir sur chaque site) de ce type sont commises par la

personne habilitée, il est alors tout de même important de réaliser une sensibilisation avant de confirmer l'habilitation.

- Si un coupon "sale" est identifié comme "propre", alors l'habilitation peut être considérée comme un échec car un équipement visuellement sale pourrait être considéré comme propre et libéré pour une fabrication ultérieure. L'équipement pourrait être utilisé pour fabriquer un produit différent et pourrait être à l'origine d'une contamination croisée entre les fabrications. Dans ce cas précis, la personne devra faire l'objet d'une sensibilisation au contrôle visuel, qui peut être réalisée par le contrôle des coupons utilisés pour l'habilitation à une distance plus proche que celle du test. Cette sensibilisation peut être aussi réalisée par une relecture et/ou une formation individuelle sur la procédure de contrôle. Le test pourra être réitéré afin de confirmer l'habilitation de la personne. Chaque site doit évaluer si la personne est capable de réaliser un contrôle visuel et gérer cette habilitation de la façon la plus déontologique possible.

4. Suivi de l'habilitation

Suite à l'habilitation des équipes, il est nécessaire de contrôler régulièrement si des dérives sont présentes lors des contrôles visuels. Pour cela, il est recommandé d'auditer régulièrement les équipes lors de la réalisation des contrôles et de participer à des tests de contrôle visuel sur coupon comme détaillé dans le paragraphe précédent. La fréquence de contrôle dépend des pratiques de chaque site. Si seule l'inspection visuelle est utilisée dans le cadre de contrôle de nettoyage après la validation des procédés de nettoyage, alors le personnel devra subir un contrôle de son acuité visuelle de manière régulière (EMA Q&A8)⁹.

Conclusion

La stratégie d'habilitation à l'inspection visuelle dans le cadre des validations de nettoyage ou contrôle de routine des nettoyages est un point très important à considérer et très souvent oubliée ou réalisée de manière très succincte, voire approximative. Plusieurs groupes scientifiques travaillent actuellement à l'élaboration d'un procédé d'habilitation complet prenant en compte des études statistiques et des tests élargis pour définir les techniques d'habilitation. Cet article a présenté une des possibilités pour la mise en œuvre, la justification et l'encadrement de l'inspection visuelle et ce d'une façon simple et rapide.

Selon le dernier texte de l'EMA Q&A8⁹, dans certains cas précis, le contrôle visuel pourrait être utilisé seul pour statuer de la propreté de l'équipement en routine après validation de nettoyage (EMA Q&A7⁹). Dans ce cas, la mise en place d'une stratégie d'habilitation visuelle robuste et efficace devra être mise en œuvre et sera attendue par les autorités de santé.

Références

1. Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations. Fourman, G. L. and Mullen, M. V. 4, 1993, Pharmaceutical Technology, Vol. 17, pp. 54-60.
2. Bestimmung der Sichtbarkeitsgrenzen von pharmazeutischen Feststoffen auf Edelmetalloberflächen. Buscalferri, Frank, Lorenzen, Sabine, Schmidt, Michael, Schwarm, Hans-Martin, Anhalt, Ehrhard, et al. 6, 2000, Pharm. Ind., Vol. 62.
3. Cleaning Validation: An Overall Perspective. Jenkins, K. M. and Vander Weilen, A. J. 4, 1994, Pharmaceutical Technology, Vol. 18, pp. 60-73.
4. Visible-Residue Limit for Cleaning Validation and its Potential Application in Pharmaceutical Research Facility. Forsyth, Richard J., Van Nostrand, Vincent, and Martin, Gregory P. 10, 2004, Pharmaceutical Technology, Vol. 28.
5. Using Visible Residue Limits for Introducing New Compounds into a Pharmaceutical Research Facility. Forsyth, Richard J. and Van Nostrand, Vincent. 10, 2005, Pharmaceutical Technology, Vol. 29.
6. Validation of Visual Inspection as an Analytical Method for Cleaning Validation. Desai, Parth and Walsh, Andrew. 2017, Pharmaceutical Online.
7. U.S. Food and Drug Administration. 21 CFR 211.67 (b).
8. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S).
9. European Medicines Agency (EMA). Questions and answers on implementation of risk-based prevention of cross-contamination in production and 'Guideline on setting health-based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities. 2018. EMA/CHMP/CVMP/SWP/246844/2018.
10. Justification and Qualification of Visual Inspection for use in Cleaning Validation for a Low Risk, Multi-Product Facility. Walsh, Andrew, Liu, Dongni (Nina), and Ovais, Mohammad. August 2018, Pharmaceutical Online.
11. Walsh, Andrew, et al. An MSSR-Derived Scale For Assessing Detectability Of Visual Inspection.
12. ASTM International. Standard Guide for Science-Based and Risk-Based Cleaning Process Development and Validation. [Online] 2018. doi: <https://doi.org/10.1520/E3106-18E01>. doi: <https://doi.org/10.1520/E3106-18E01>.
13. Agency, European Medicines. Questions and answers on implementation of risk-based prevention of cross-contamination in production and 'Guideline on setting HBEL for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities. 2018.

Glossaire

GMP: Good Manufacturing Practices

cGMP: Current Good Manufacturing Practices

LAS : Limit Acceptance Surface ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

VRL : Visual Residual Limit ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)



STERIS

Life Sciences

Faire avancer la science pour le contrôle de la contamination

Le désinfectant Vesta-Syde® SQ 128 prêt à l'emploi a une excellente efficacité sur les moisissures tout en étant applicable en une étape seulement avec un niveau très faible de résidus.

En parallèle des excellents produits de désinfection STERIS, notre service technique délivre pour l'industrie une connaissance scientifique reconnue, des articles scientifiques très pointus et participent au développement des sociétés savantes les plus importantes pour notre industrie.

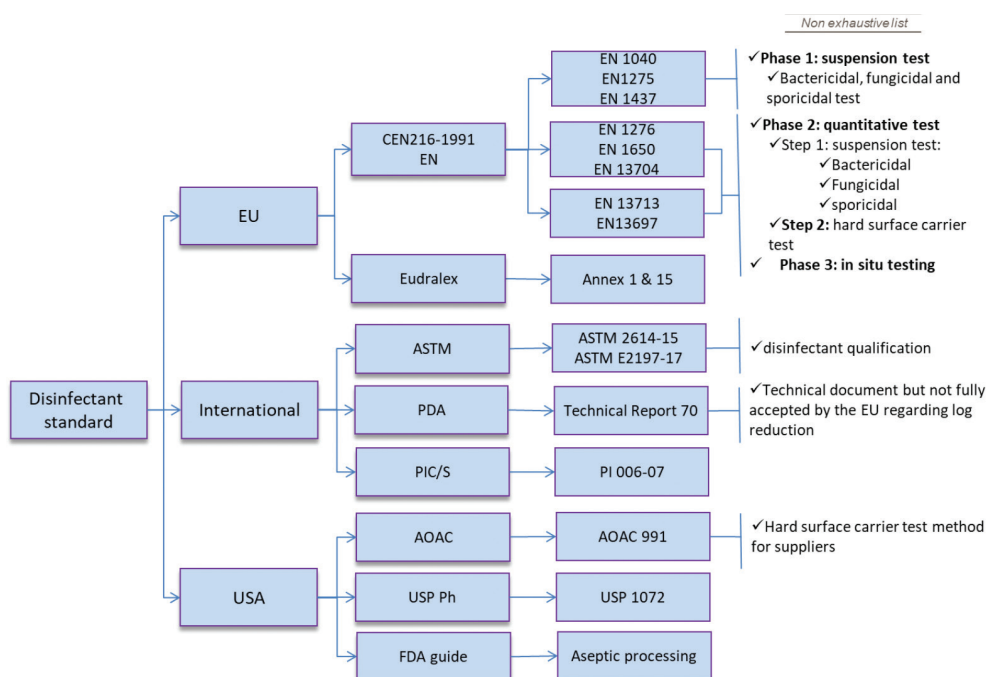
A Refresher on Disinfectant Wet Contact Time.

By Walid EL AZAB & Dave SHIELDS - STERIS

walid_elazab@steris.com,

This article emphasizes the importance of wet contact time for effective disinfection.

Wet contact time is one of the critical parameters in choosing a disinfectant (a chemical agent used for microbial reduction purposes, e.g., sporicide, sanitizer) for use in a classified area. Disinfectant contact time is commonly known as “wet contact time”, “contact time,” “dwell time,” or “action time.”



The appropriate wet contact time is determined during the disinfectant qualification (coupon studies), by demonstrating an effective \log_{10} (log) reduction of microorganisms against a specified wet contact time. Therefore, the minimum contact time is the time needed for the disinfectant to achieve the necessary log reduction^(1,2). Consequently, the facility surfaces need to remain wet with the disinfectant for the contact time that was qualified during the *in vitro* coupon studies^(2,3). The regulatory guidance and industry technical documents⁽⁴⁻⁹⁾ require (bio)pharmaceutical manufacturers to qualify a disinfectant wet contact time (*in vitro testing*). Manufacturers are also required to validate the disinfection process by utilizing the qualified disinfectant wet contact time in the real world (*in situ testing*) to demonstrate the effectiveness of the cleaning and disinfection program. See Figure 1 above.

1. Disinfectant Wet Contact Time

Disinfectant manufacturers must register their disinfectants based upon a specific wet contact time, microbial kill, and disinfectant concentration in compliance with the relevant authority's regulations. Pharmaceutical manufacturers must demonstrate disinfectant efficacy on their cleanroom's surfaces. Different surface coupons representative of surfaces in the cleanrooms are used to qualify the disinfectants. The qualification of the disinfectant is based on the wet contact time, log reduction acceptance criteria, disinfectant concentration, water quality, surface types, and the microbial kill. The wet contact time during *in vitro* testing generally depends on the:

- Microbial kill
- Disinfectant formulation
- Disinfectant concentration
- Cleanroom Surface

The wet contact time and the inactivation of microorganisms in the cleanroom (real-world setting)

→

generally depends on the:

- Temperature and humidity in the cleanroom
- Air exchange in the cleanroom
- Application technique (e.g., vaporization, spraying, mopping, wiping)
- Surface cleanliness
- Time for the disinfectant to dry.

These parameters are generally not tested during the disinfectant qualification (in vitro). Therefore, it is required to demonstrate that these parameters do not affect the disinfectants' efficacy in the cleanroom⁽⁴⁻⁹⁾.

2. Scientific and Regulatory Perspective

West et al. evaluated the bactericidal activity of registered disinfectants after the disinfectant dried on the surface and found that there was no additional bactericidal efficacy after the surface dried⁽¹⁰⁾. Parenteral Drug Association Technical Report 70 (PDA TR 70) Fundamentals of Cleaning and Disinfection Programs for Aseptic Manufacturing Facilities, defines contact time as, "The minimum amount of time that a sanitizer, disinfectant, or sporicide must be left in complete (wet) contact with the surface to be treated in order to be effective."⁽⁹⁾ PDA TR 70 also states, "Provided the appropriate chemical agent is used, the key to disinfection in the cleanroom is to ensure that the surface remains wetted for a sufficient period of time for the chemical to accomplish its mode of activity."⁽⁹⁾ PDA TR 70 also directly connects the wet contact time qualified during the in vitro coupon studies with the wet contact time in practical application in an aseptic manufacturing facility, through the following statement: "Curtain surfaces should be sprayed or wiped with an efficacious disinfectant or sporicide and allowed to remain wetted for the contact time validated in the antimicrobial effectiveness studies."⁽⁹⁾ Furthermore, the U.S. Center for Disease Control (CDC) defines contact time as, "Time a disinfectant is in direct contact with the surface or item to be disinfected. For surface disinfection, this period is framed by the application to the surface until complete drying has occurred."⁽¹⁰⁾

A 2018 U.S. Food and Drug Administration (FDA) Form 483 observation stated, "Specifically, your firm did not have adequate contact time for the (b)⁽⁴⁾ ((b)(4) solution) or the (b)⁽⁴⁾ for use as a sporicidal. Your technician sprays the solution onto a sterile wipe and then wipes down the surface of the ISO 5 hood, amounting to a contact time (surface being wet) of less than (b)⁽⁴⁾," specifying that contact time is the time that the surface remains wet⁽¹¹⁾. Additionally, a 2019 FDA Form 483 observation stated, "...inadequate amount of cleaning/sanitizing agent ((D) (4)) was used to ensure an appropriate wet contact time on floors."⁽¹²⁾ Consequently, when the disinfectant dries on the surface before the qualified wet contact time is achieved, a reapplication of the disinfectant should be performed, to ensure that appropriate microbial control is maintained and that regulatory expectations are met.

For these reasons, it is not relevant to consider dry contact time to be equivalent to the wet contact time. If the validated wet contact time does not need to be achieved in practical application, this stance implies that the contact time is potentially indefinite (or at best, unknown). This stance also implies that the contact time continues until a level of degradation of active ingredients occurs to a minimum effective concentration, or until the disinfectant is rinsed from the surface. If a minimum wet contact time is not achieved consistently, then the pharmaceutical manufacturer does not have sufficient control of a critical process, which violates cGMP principles and increases the risk to the medicinal product and, subsequently, to patients. Disinfectant chemical reactions need water as a solvent to allow the reaction to occur, which demonstrates why the wet contact time is paramount to ensuring that microorganisms are inactivated.

Conclusion

It is clear from a scientific, regulatory expectation, and critical process control perspective, that achieving a minimum wet contact time is essential for maintaining an effective disinfection process and preventing microbial contamination proactively. The validated wet contact time allows for demonstrated, effective inactivation of microorganisms in the cleanroom, irrespective of cleanroom parameters or application techniques, that may affect the duration of time the surface stays wet on the cleanroom surface. Disinfectant activity is halted or significantly reduced when insufficient liquid is present, and it is not possible to adequately control the disinfection process, without a minimum wet contact time. Consequently, if a minimum wet contact time is not achieved, the disinfection process effectiveness is not assured, and the manufacturer's risk is increased.



References

- 1 Sandle T., *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, Woodhead publishing p.191
- 2 Sandle T., *Cleaning and disinfection*. Accessed on the 28 June 2018: <http://182.160.97.198:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1014/Chapter%2015-Cleaning-and-disinfection.pdf?sequence=17>
- 3 Sandle T., *Selecting of Cleanroom Disinfectants*, Lavague 42, edition June 2014
- 4 EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines, Annex 1, *Manufacture of Sterile Medicinal Products*, 2008
- 5 EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines, Annex 1 *Manufacture of Sterile Medicinal Products*, Draft 2020 V12
- 6 PI 007_6: "validation of aseptic processes"
- 7 FDA, *Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice*, 2004
- 8 United States Pharmacopeia (USP) 42 <1072> *Disinfectants and Antiseptics*, 2019
- 9 Parenteral Drug Association Technical Report 70 *Fundamentals of Cleaning and Disinfection Programs for Aseptic Manufacturing Facilities*, 2015
- 10 West AM, Teska PJ, Haley FO (2019), *There is not additional bactericidal efficacy of environmental protection agency registered disinfectant towellettes after surface drying*, *American Journal Infection Control*, 47:27-32
- 11 U.S. Food and Drug Administration, Form 483 <https://www.fda.gov/media/114920/download> Accessed 25FEB2020
- 12 U.S. Food and Drug Administration, Form 483 <https://www.fda.gov/media/131131/download> Accessed 25FEB2020

RDM et RDIV de l'UE

Les produits combinés désormais soumis au même degré de surveillance que les dispositifs médicaux autonomes.

Par Elizma PARRY - MAETRICS
information@maetrics.com

Tous les fabricants de dispositifs médicaux mettant des produits sur le marché dans l'UE connaissent l'énorme portée du nouveau règlement sur les dispositifs médicaux (RDM) et / ou du règlement de diagnostic in vitro (RDIV) sur l'environnement réglementaire européen. L'impact que ces changements réglementaires peuvent avoir sur les sociétés pharmaceutiques et leurs produits est cependant moins évident.



Glossaire

RDM : Réglementation relative aux dispositifs médicaux	Dispositifs médicaux autonomes : Lorsqu'on parle de dispositifs médicaux autonomes, cela fait référence aux dispositifs médicaux qui ne présentent pas d'éléments médicamenteux, c'est-à-dire qu'ils ne font pas partie de la catégorie de produits combinés.
RDIV : Réglementation relative aux dispositifs in vitro	
Produits combinés : Les produits combinés peuvent être composés de toute combinaison de dispositif, médicament ou produit biologiquement actif.	

Bien que la nouvelle réglementation concerne principalement les fabricants de dispositifs médicaux, les sociétés pharmaceutiques ne devraient pas présumer être exemptés du resserrement du contrôle clinique qui balaie l'Europe. S'ils fabriquent des produits combinés ou des diagnostics compagnons, les entreprises pharmaceutiques devront se familiariser avec les exigences avant l'entrée en vigueur de nouvelles réglementations en mai 2021 pour le RDM et un an plus tard, en mai 2022 pour le RDIV. Dans cet article, Elizma Parry, directrice de Global Clinical Practice chez Maetrics, offre des conseils pratiques aux entreprises souhaitant obtenir un nouveau marquage CE pour un dispositif médical. Avec peu de temps à perdre avant le point de non-retour, les fabricants de produits pharmaceutiques doivent rapidement entreprendre la première d'une série d'étapes préparatoires s'ils souhaitent parvenir à une conformité sans heurt et en temps opportun et continuer à mettre leurs produits sur le marché

de l'UE.

Dans l'Union européenne, les produits combinés sont réglementés en tant que médicaments ou dispositifs médicaux, selon le composant ayant la fonction auxiliaire. Les stylos injecteurs d'insuline et les inhalateurs-doseurs, par exemple, contiennent un composant de dispositif médical qui sert de système d'administration du composant médicamenteux intégré - rendant son rôle accessoire au médicament. Ce type de produit combiné est actuellement réglementé en tant que médicament en vertu de la directive 2001/83/CE de l'UE relatif aux médicaments à usage humain, concentrant ainsi son examen principalement sur la formulation médicinale du produit. Comblant le vide réglementaire qui existait pour les produits combinés dans le cadre des directives précédentes, le RDM de l'UE ne laissera aucun dispositif médical à l'abri d'un contrôle strict, que sa fonction soit centrale ou accessoire au produit. À partir de mai 2021, les produits combinés

devront satisfaire aux exigences énoncées à l'article 117 du RDM de l'UE, qui modifie l'annexe I de la directive relatif aux médicaments à usage humain. Ce remaniement émane de la complexité croissante des produits combinés et de la nécessité de réglementer les composants des dispositifs auxiliaires avec le même contrôle que les dispositifs médicaux autonomes. Il faut noter que tous les produits composés à la fois d'un élément médicinal et d'un élément de dispositif ne constitueront pas nécessairement un produit combiné - uniquement ceux pour lesquels les deux parties sont indispensables à un bon fonctionnement du produit.

Ainsi, le RDM aura une incidence particulièrement importante sur les sociétés pharmaceutiques fabriquant des produits combinés avec des dispositifs médicaux auxiliaires, car cela représentera un ajustement plus important pour eux que pour les fabricants de produits déjà réglementés en tant que dispositifs médicaux. Les sociétés pharmaceutiques non habituées peuvent manquer de données nécessaires pour soumettre un rapport d'évaluation clinique et peuvent avoir à assumer la tâche coûteuse et longue de collecter des données cliniques supplémentaires pour le composant dispositif. Il est encouragé que les entreprises investissent dans ces ressources la toute première fois afin de faciliter la mise à jour continue des données cliniques à l'avenir.

De même, les fabricants de produits combinés auront à s'adresser à un organisme notifié désigné pour les dispositifs médicaux, peut-être même pour la première fois. Étant donné que l'Europe manque actuellement d'organismes notifiés pour examiner la documentation technique, il est probable que ceux en activité auront du mal à suivre la demande. Aujourd'hui, il n'y a que 13 organismes notifiés désignés dans le cadre du RDM de l'UE, et des retards dans le processus d'approbation risquent donc de s'ensuivre. À moins d'un an de l'échéance du RDM de l'UE, les fabricants sont vivement encouragés à soumettre leur documentation le plus tôt possible afin de ne pas dépasser la date limite.

Le diagnostic compagnon sera également affecté par l'évolution du paysage réglementaire, qui relève désormais de la compétence du

RDIV. Les diagnostics compagnons seront classés sous une nouvelle classification RDIV dans la deuxième catégorie de risque, la classe C, et seront donc soumis à un niveau élevé de surveillance clinique, en particulier pour les sociétés pharmaceutiques développant leurs propres diagnostics compagnons. Étant donné le codéveloppement du dispositif de diagnostic in vitro avec son médicament associé, l'organisme notifié devra également assurer la liaison avec une autorité compétente en matière de médicaments.

Le monde du RDIV est davantage touché par la pénurie d'organismes notifiés, puisqu'il existe seulement 3 organisations désignées actuellement. Les sociétés pharmaceutiques font donc la queue non seulement pour recevoir la certification d'un organisme notifié, mais aussi pour attendre que ces organismes notifiés soient désignés dans le cadre du RDIV. En ce sens, il est conseillé aux fabricants d'aller plus loin que de simplement soumettre leur documentation à temps et de contacter les organismes notifiés en attente de désignation par leur autorité nationale compétente pour leur domaine de produit spécifique. Cela contribuera à garantir aux entreprises une place en première ligne.

Dans le cadre du RDM et RDIV, une réglementation plus stricte des produits combinés et des diagnostics compagnons sera appliquée, et les sociétés pharmaceutiques devront respecter les mêmes exigences que les fabricants de dispositifs médicaux, en ce qui concerne le composant dispositif. Cela étant dit, ils n'auront probablement pas l'expérience dont disposent les sociétés de dispositifs médicaux en matière de rassemblement de la documentation nécessaire et de liaison avec un organisme notifié, et devraient donc prévoir un délai supplémentaire pour compléter ces étapes. Seules les entreprises prêtes à faire face aux conséquences négatives d'un délai non respecté, à savoir le retrait potentiel de leurs produits des marchés européens et les pertes de réputation dévastatrices pour l'entreprise, devraient ignorer l'importance cruciale de se préparer au respect des nouvelles exigences. En revanche, celles qui y consacrent suffisamment de temps et de ressources pourront bénéficier d'une période de transition toute en douceur et éviter toute mauvaise surprise.

Introducing MeCo

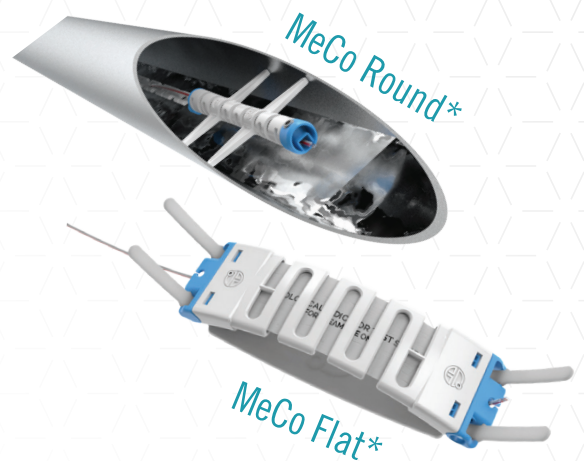
improved SIP validation results



Provide consistency between cycles by **enabling controlled, reproducible placement** of the biological indicator (BI) and thermocouple (TC) together.

Increase robustness by providing ability to easily reach **most difficult to sterilize locations** per EP 9.2, ISO 17665-1 Annex D, ISO 11138-7.

Reduce contamination with **secure placement** which eliminates loss or shredding of the BI and reduces stress on the TC.

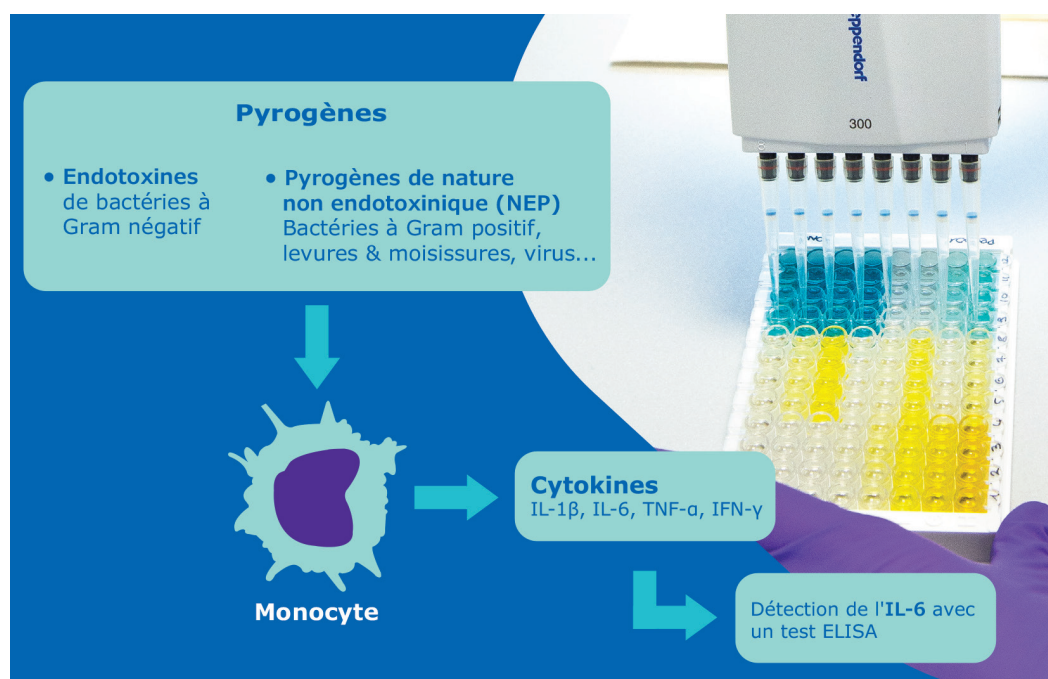


*For use with Mesa Spore Strip Biological Indicators

Fiabilité de la lignée monocyttaire Mono-Mac-6 pour la détection des pyrogènes endotoxiniques et non-endotoxiniques.

Par Laure ROBERT-MERCK
laure.robert@merckgroup.com

Le test de détection de pyrogènes fait partie des tests libératoires obligatoires pour les médicaments stériles à usage parentéral. A ce jour, les deux méthodes de test majoritairement utilisées sont le test de détection des endotoxines bactériennes et le test pyrogène sur lapin. Une autre méthode de test de détection de pyrogène, le test d'activation monocyttaire (MAT), s'appuie sur l'utilisation de cellules monocytaires humaines pour reproduire la réaction pyrogénique de l'Homme *in vitro*.



Le MAT peut s'appuyer sur l'utilisation de sang total, de monocytes isolés ou encore de la lignée cellulaire Mono-Mac 6 (MM6). La lignée cellulaire MM6, validée pour son utilisation pour le test MAT et listée parmi les sources de monocytes valides pour le MAT dans la Pharmacopée Européenne a parfois été remise en question pour sa capacité à détecter les pyrogènes de nature non endotoxinique (NEPs). Pour démontrer sa performance, des tests ont été réalisés sur un panel de ligand pour l'ensemble des récepteurs monocytaires Toll-Like (TLRs).

1. Mécanisme d'action des pyrogènes

Les pyrogènes déclenchent une réaction de fièvre par l'activation du système immunitaire inné, et plus précisément par l'activation des monocytes. Ces globules blancs reconnaissent les antigènes grâce à leurs récepteurs appelés récepteurs de reconnaissance de motifs (pattern recognition receptors, PRR). L'activation de ces récepteurs entraîne une production de pyrogènes endogènes comme les cytokines, qui ont un effet direct sur la régulation de la température corporelle au niveau de l'hypothalamus.

Les substances pyrogènes, provenant de sources variées (bactéries, virus, levures et moisissures), sont reconnues par un type de PRR spécifique appelé récepteurs toll-like (toll-like receptor, TLR) exprimés par les monocytes. Les composants de la paroi cellulaire bactérienne sont reconnus par des TLRs de surface, alors que les acides nucléiques sont reconnus par des TLRs intracellulaires.

La diversité des récepteurs TLR ainsi que la spécificité de chaque sous-type de TLR pour différents ligands suggèrent que la réaction de fièvre observée chez l'homme peut être provoquée non seulement par le lipopolysaccharide (LPS), mais aussi par de nombreuses autres substances

provenant de bactéries à Gram négatif et positif, de virus, levures, moisissures ou encore parasites.

Les pyrogènes sont généralement classifiés en deux groupes : les endotoxines (LPS des bactéries à Gram négatif) et les pyrogènes de nature non endotoxinique (non-endotoxin pyrogens, NEPs).

2. Détection des pyrogènes

Les substances pyrogènes présentes dans les produits pharmaceutiques injectables peuvent induire une réaction fébrile grave après administration. Ainsi, il est obligatoire de tester ces produits injectables avant libération en vérifiant l'absence de pyrogènes pour garantir la qualité du produit et la sécurité du patient.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes de test sont disponibles pour la détection des pyrogènes dans les échantillons pharmaceutiques. La méthode majoritairement utilisée reste le test de détection des endotoxines bactériennes (Bacterial Endotoxin Test, BET), malgré sa spécificité pour un contaminant unique, le LPS, provenant des bactéries à Gram négatif et ciblant le TLR4 des cellules monocytaires. Pour assurer la détection d'une large gamme de contaminants pyrogéniques, le test pyrogène sur lapin (Rabbit Pyrogen Test, RPT) peut être utilisé. Cependant, sa faible robustesse et la nécessité de recourir à l'usage d'animaux pour réaliser le test lui confèrent des inconvénients notoires qui vont à l'encontre des lignes de conduite du concept 3R (Réduction, Remplacement, Recyclage / remplacer, réduire, affiner) présent dans la pharmacopée européenne.

Le test d'activation monocytaire (MAT) reste à ce jour la seule méthode permettant d'évaluer la pyrogénicité d'un échantillon par un test in vitro, en utilisant des cellules monocytaires humaines. Ce test permet de reproduire la réaction immunitaire du corps humain : en présence de pyrogènes, les monocytes sont activés et produisent des cytokines comme l'interleukine-6, qui peuvent ensuite être quantifiées avec un test ELISA.

Pour réaliser un test MAT, plusieurs sources de monocytes humains peuvent être utilisées : le sang total, des monocytes isolés du sang ou encore une lignée cellulaire de monocytes. A ce jour seule la lignée cellulaire Mono-Mac-6 (MM6) a été validée pour son usage dans le test MAT. Toutes ces sources de monocytes sont citées dans le chapitre 2.6.30 (MAT) de la Pharmacopée Européenne comme des sources valides pour le MAT. Cependant, l'utilisation de la lignée cellulaire a parfois été remise en question concernant sa capacité à détecter des pyrogènes de type non endotoxinique (NEPs).

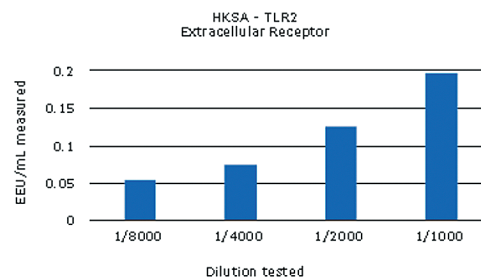
3. Fiabilité des cellules MM6 pour la détection de NEPs

Plusieurs tests ont été réalisés afin de démontrer la capacité des cellules MM6 à détecter un panel de ligands ciblant l'ensemble des TLRs de surface et intracellulaires. Pour réaliser ces tests, le système PyroMAT®, un kit prêt à l'emploi, a été utilisé.

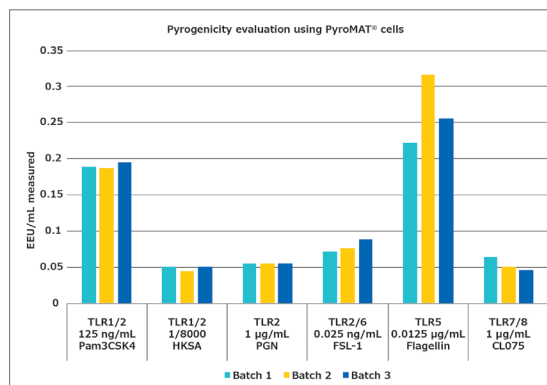
Nous avons choisi une liste variée de ligands pour avoir un panel le plus large possible, en addition avec ceux cités dans le chapitre 2.6.30 de la section 6-3 de la pharmacopée. Un total de dix ligands a été évalué afin de couvrir l'intégralité des TLRs monocytaires :

Sample	NEP	TLR
1	Pam3CSK4	1/2
2	HKSA	2
3	PGN	2
4	FSL-1	2/6
5	Poly-IC	3
6	Flagellin	5
7	Imiquimod	7
8	CL075	7/8
9	ODN2006	9
10	MDP	NOD2

Avant de réaliser cette étude, la concentration de test de chaque ligand a été déterminée et choisie afin de correspondre à la gamme de quantification de la méthode de test. Par ailleurs, les ligands ont été testés pour vérifier l'absence de contamination en endotoxines. Les différents ligands ont ensuite été évalués à plusieurs doses afin de déterminer leurs limites de détection respectives dans le test MAT. Pour cela, au moins quatre dilutions de chaque NEP ont été testées individuellement. Un exemple de résultat obtenu avec l'échantillon de HKSA est présenté ci-dessous* :



Les différents NEPs testés ont tous été détectés, avec des valeurs supérieures au seuil de détection du test. Les ligands MDP et ODN2006 ont pu être détectés mais pas quantifiés, leur concentration calculée étant inférieure à la limite de quantification du test, 0.05 EU/mL. De manière générale, les NEPs reconnus par un récepteur cellulaire membranaire ont montré une augmentation dose-dépendante de la pyrogénicité. Cette relation dose-dépendante s'est trouvée moins marquée pour les pyrogènes ciblant des récepteurs intracellulaires. Cela indique que le processus d'internalisation de la molécule est un facteur important pour la réaction pyrogène et que la quantification des NEPs à action intracellulaire peut être affectée par l'internalisation du ligand. Après avoir déterminé les concentrations en NEPs adaptées pour le test d'activation monocytaire, la stabilité de la réaction avec différents lots de cellules PyroMAT® a été évaluée. Pour cette évaluation, seuls les pyrogènes provoquant une réponse dose-dépendante ont été utilisés. En effet cette condition est nécessaire pour observer une influence éventuelle de la réactivité cellulaire sur la quantification du contaminant. Les résultats sont décrits ci-dessous :



Les différents lots de cellules ont montré la même réactivité aux ligands testés, confirmant la stabilité et la standardisation de la réactivité de la lignée cellulaire Mono-Mac-6.

4. Effets synergétiques potentiels de combinaisons de pyrogènes

Les tests réalisés avec un contaminant pyrogénique peuvent amener un biais car les contaminations dans les produits pharmaceutiques ou les dispositifs médicaux proviennent rarement d'un pyrogène unique. Même lorsqu'un microorganisme unique contamine un produit, plusieurs récepteurs TLRs peuvent être impliqués, ciblant différents éléments de la paroi cellulaire (eg, dans le cas d'une bactérie à flagelle). Un avantage majeur du test MAT est sa capacité à évaluer la réponse immunitaire globale des cellules monocytaires, résultant en une évaluation efficace de la pyrogénicité d'un mélange de pyrogènes chez l'Homme.

Ce phénomène de synergie potentielle a été analysé en ajoutant une faible quantité d'endotoxine (limite de détection) de l'essai à différents ligands précédemment testés, eux aussi en faible quantité (limite de détection). Les résultats révèlent un effet synergétique pour certains pyrogènes, qu'ils soient reconnus par des récepteurs membranaires ou intracellulaires. Cet effet n'a pas été observé pour l'imiquimod. L'effet de synergie est également dépendant de la dose d'endotoxine ajoutée aux NEPs. Cela peut donc être à l'origine d'une non-linéarité importante des résultats obtenus avec plusieurs dilutions d'un même échantillon contaminé par plusieurs pyrogènes. Cela renforce donc l'importance de tester, tant que possible, la dilution la plus faible (concentration élevée) de l'échantillon pour laquelle il n'y a pas d'interférence avec la méthode de test. Cette dilution doit être définie lors de la validation spécifique au produit.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que les cellules Mono-Mac-6 utilisées dans le système PyroMAT® peuvent détecter un panel de ligands pour les TLRs, y compris intracellulaires. Le MAT avec le système PyroMAT® permet d'obtenir une réaction reproductible pour le standard endotoxine et les NEPs.

De plus, il permet d'apprécier une activation synergétique de multiples TLRs en présence par exemple d'endotoxine et d'un autre ligand NEP. Cet essai permet donc de détecter une contamination provenant de pyrogènes isolés ou en combinaisons afin de prédire la réponse pyrogène du système immunitaire humain.

Glossaire

NEP : Non Endotoxin Pyrogens, endotoxines (non pyrogènes) comme les virus, levures ou particules.

TLR : Récepteurs Toll like qui avertissent

le système immunitaire de potentielles infections.

Références

1. European Pharmacopoeia, chapter Monocyte activation test (2.6.30)
2. Akira, S. et al. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
3. Beutler, B.A. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood* 113, 1399-1407.
4. Kawai and Akira 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637-650.
5. Henderson, B. and Wilson, M. 1996. Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. *Cytokine* 8, 269-282.
6. Takeuchi, O. et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169, 10-14 (2002).
7. Wylie, D. H. et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J. Immunol.* 165, 7125-7132 (2002).
8. Aliprantis, A. O. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor 2. *Science* 285, 736-739 (1999).
9. Takeuchi, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive cell wall components. *Immunity* 11, 443-451 (1999).
10. Schwadner, R. et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274, 17406-17409 (1999).
11. Schwadner, R. et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274, 17406-17409 (1999).
12. Means, T. K. et al. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 163, 3920-3977 (1999).
13. Hajjar, A. M. et al. Cutting Edge: Functional interactions between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. *J. Immunol.* 166, 15-19 (2001).
14. Coelho, P. S. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- γ -primed macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 71, 837-844 (2002).
15. Opitz, B. et al. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF- κ B translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 22041-22047 (2001).
16. Massari, P. et al. Cutting edge: Immune stimulation by *Neisseria porins* is Toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J. Immunol.* 168, 1533-1537 (2002).
17. Werts, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunol.* 2, 346-352 (2001).
18. Hirschfeld, M. et al. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 69, 1477-1482 (2001).
19. Underhill D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401, 811-815 (1999).
20. Asea, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277, 15028-15034 (2002).
21. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738 (2001).
22. Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282, 2085-2088 (1998). The first report that TLR4 is involved in the recognition of bacterial components.
23. Kawasaki, K. et al. Mouse Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by taxol. *J. Biol. Chem.* 275, 2251-2254 (2000).
24. Kurt-Jones, E. A. et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol.* 1, 398-401 (2000).
25. Rassa, J. C. et al. Murine retroviruses activate B cells via interaction with Toll-like receptor 4. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 2281-2286 (2002).
26. Bulut, Y. et al. Chlamydia heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol.* 168, 1435-1440 (2002).
27. Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. & Kolb, H. Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* 164, 558-561 (2000).
28. Vabulas, R. M. et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107-15112 (2002).
29. Okamura, Y. et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229-10233 (2001).
30. Termeer, C. et al. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195, 99-111 (2002).
31. Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y. & Platt, J. L. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 168, 5233-5239 (2002).
32. Smiley, S. T., King, J. A. & Hancock, W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167, 2887-2894 (2001).
33. Hayashi, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature* 410, 1099-1103 (2001).
34. Takeuchi, O. et al. Discrimination of bacterial lipopeptides by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13, 933-940 (2001).
35. Schwadner, R. et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274, 17406-17409 (1999).
36. Ozinsky, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 13766-13771 (2000).
37. Hemmi, H. et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunol.* 3, 196-200 (2002).
38. Heil, F. et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33, 2987-2997 (2003).
39. Heil, F. et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33, 2987-2997 (2003).
40. Heil, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529 (2004).
41. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531 (2004).
42. Jurk, M. et al. Human TLR or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunol.* 3, 499 (2002).
43. Heil, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529 (2004).
44. Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745 (2000).
45. Zhang, D. et al. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526 (2004).
46. *Science* 303, (5663):1526-9.
47. Uematsu S., Akira S. (2008) Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands. In: Bauer S., Hartmann G. (eds) Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 183. Springer, Berlin, Heidelberg. Manufacturing Practice, 2004



DEFENSE !

Avec 30 ans d'expérience dans la fabrication de produits pour la maîtrise de la contamination en salles blanches, nous pouvons vous aider à mettre en place la défense la plus efficace contre la contamination microbienne, y compris le virus SARS-CoV-2.

Nos désinfectants pour salles blanches ont prouvé leur efficacité contre les virus et sont maintenant disponibles dans des formats économiques pour les zones non classifiées. Pour en savoir plus, consultez notre site www.contecinc.com/eu



CONTEC

WHATSOEVER IT TAKES™

Indicateurs biologiques, pousses aléatoires. Votre cycle de décontamination est-il réellement en cause ?

Par Jules BOULICOT - BIOQUELL SAS

Il n'est pas rare, lors des qualifications de performances d'un système de décontamination, d'observer des pousses suite à l'incubation d'indicateurs biologiques. Les investigations menées, suite à ces non-conformités, sont souvent longues, et aboutissent généralement à une remise en cause du cycle développé.

Avez-vous pensé aux 'Rogues BI'?



1. Qu'est-ce qu'un 'Rogue BI'?

Un indicateur dit 'Rogue', ou 'coquin' dans la langue de Molière, est dit d'un indicateur montrant des signes de pousse inexplicables et incohérents après incubation, lors des phases de qualification de performances, ou de développements de cycles. Ces pousses n'ont généralement pas d'explications rationnelles, ne sont pas constantes au fil des cycles réalisés, et surtout vont parfois contre toute logique de résultat attendu. Ces résultats incohérents font perdre du temps lors des investigations menées afin de les expliquer, et retardent les mises en route, ou remise en route, des équipements de production.

Voici quelques pistes à étudier dans les cas où des résultats d'indicateurs biologiques, paraissent étranges et difficilement explicables.

2. Conséquences des rogues lors d'un développement de cycle.

Elles peuvent être très vastes. Sans cycle de décontamination valide, la production ne peut être lancée ou redémarrée suite à des requalifications, impliquant des coûts importants pour les industriels, sans oublier les problèmes que pourront soulever les autorités réglementaires lors d'audits.

Certains fabricants d'indicateurs, recommandent l'utilisation de triplicats d'indicateurs lors des qualifications (3 indicateurs à la même position), suggérant ainsi que si 1 indicateur pousse sur les 3 à cette position, celle-ci est de fait validée. Bioquell n'est pas tout à fait en accord avec ce procédé. Un témoin positif ne peut être simplement ignoré. La politique de Bioquell à ce sujet est de répéter différents cycles afin de s'assurer que cette pousse est imputable soit au cycle développé, soit à la qualité de l'indicateur biologique utilisé.

3. À quoi les rogues sont-ils dus ?

Bioquell a réalisé une étude impliquant plusieurs industriels commercialisant ces indicateurs, en observant les coupons grâce à un MEB (microscope électronique à balayage). Il est en effet difficile d'étudier les causes amenant à des indicateurs rogues, puisque cela implique de les détruire (mise en incubation). Il faut donc pouvoir les observer avant de les incuber. Les résultats obtenus suggèrent que ces rogues peuvent être induits par quelques problématiques particulières.

3.1 Milieu présent dans l'inoculum (Image 1)

Généralement causé par un mauvais nettoyage de la suspension bactérienne, avant inoculation sur le disque inox. Le milieu de culture va alors protéger les spores de tout contact avec le produit biocide pendant le cycle de décontamination, qui ne pourra passer cette barrière protectrice. Les spores vont donc survivre et pousser lors de leur incubation.

3.2 Disque inox abimé (Image 2)

Le support est un élément constitutif crucial de l'indicateur, et les dommages sur le disque peuvent aider les spores à survivre. Ces dommages sont souvent des éraflures, ou des enclaves sur la surface du disque, où les spores peuvent trouver refuge, et ainsi être protégés lors du cycle.

3.3 Agglomération ou multicouche (Image 3)

La plupart des fabricants d'indicateurs insisteront sur l'importance d'une couche unique et une répartition uniforme de la charge microbienne sur le disque. En effet, l'empilage des couches de spores induit une résistance importante de l'indicateur, puisque le biocide ne pourra passer au travers des multiples couches microbiennes, laissant ainsi non exposées les couches de micro-organismes les plus profondes (~biofilm).

4. Quels sont les symptômes typiques des rogues Bi's ?

4.1 Incohérence des résultats au fil des cycles

L'effet le plus significatif et perturbant dans l'étude des indicateurs rogues, est sans doute l'incohérence des résultats obtenus tout au long des cycles réalisés, notamment lors d'une QP.

Rappel : *Nous supposons ici qu'un seul et unique lot d'indicateurs biologiques est utilisé. Si plusieurs lots d'indicateurs biologiques sont utilisés, notamment lors de qualification de performances, ou toute autre requalification saisonnière, les résultats ne sont pas exploitables.*

Cas 1 : Inconstance des résultats sur plusieurs cycles identiques dont les paramètres sont contrôlés et monitorés:

Il peut arriver que sur 3 runs consécutifs, avec le même cycle de référence, et dans des conditions environnementales identiques, les résultats montrent des incohérences notables.

Par exemple : Pousse sur le cycle 2 d'une position qui ne montre pas de signe de pousse aux cycles 1 et 3

- Une autre position montre une pousse seulement au cycle 1
- Une dernière position développe une croissance aux cycles 1 & 3

Après vérification que les cycles réalisés ont bien été identiques en tous points, et que les paramètres environnementaux sont bien respectés, cette variation de résultats peut être expliquée par la présence de rogues Bi's.

Cas 2 : Indicateurs positifs avec des cycles plus forts, censés être plus efficaces:

Suite à une série infructueuse de tests entraînant des résultats non valides lors de qualifications, le réflexe est bien souvent de renforcer le cycle de décontamination. Quel désastre de s'apercevoir que de nouvelles positions sont positives. Un cycle plus fort, est normalement censé éliminer les positions non conformes observées lors des cycles plus faibles, et non pas apporter de nouvelles incertitudes. Il n'est donc pas logique que de nouvelles positions soient positives alors qu'elles ne l'étaient pas avec les cycles précédents plus faibles.

4.2 Pousses non immédiates

Habituellement, un indicateur positif montre des signes de croissance assez rapidement (j+1 ou j+2) après incubation. Il est plus rare de voir des indicateurs montrer des signes de croissance à j+5 ou j+6. Cela peut être significatif d'indicateurs 'rogues'. En effet, certaines des causes de rogues observées ci-dessus, montrent qu'ils peuvent parfois être induits par des superpositions de couches de spores, ou par des anfractuosités dans le support, permettant aux spores de se protéger. Il est donc possible que le phénomène de pousSES à j+5 ou j+6, démontre cet effet de protection artificiel des spores non atteintes par la décontamination. L'apparition de positifs en fin de période d'incubation peut s'expliquer par le fait que les couches supérieures de spores détruites mettent du temps à repasser en suspension dans le bouillon, avant de laisser place aux spores non détruites dans les sous-couches protégées. Le milieu de culture met donc plus de temps à atteindre ces spores toujours actives, d'où une latence importante observée lors de l'incubation.

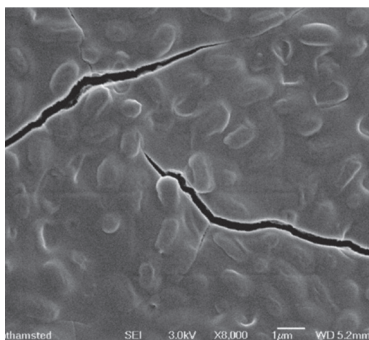


Image 1. Spores emprisonnés dans le milieu de culture solide

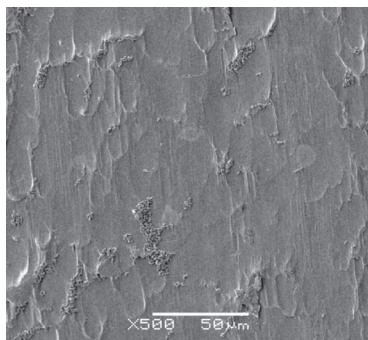


Image 2. Dommage sur la surface du disque inox.

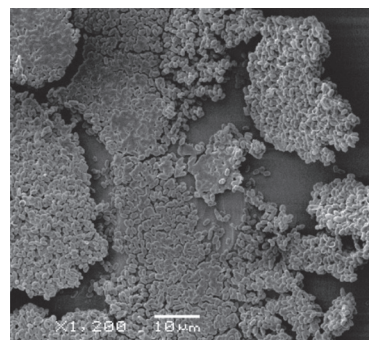


Image 3. Micro-organismes en multicouches.

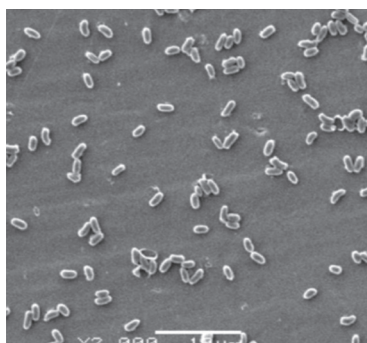


Image 4. Distribution propre, régulière et homogène des spores répartis sur le disque inox.

4.3 Comment devrait se présenter un indicateur vu au microscope afin de réduire les risques de rogues ? (Image 4)

L'approche de Bioquell sur la prévention des rogues, commence par le soin apporté à la préparation de l'inoculum bactérien. Plusieurs méthodes de nettoyage et rinçage sont pratiquées, pour assurer l'élimination totale du milieu de culture et des cellules végétatives avant inoculation sur le disque inox. Des photos de l'inoculum sont également prises afin de pouvoir réaliser des comparaisons de lots.

Une nouvelle procédure a également été adoptée pour tester les indicateurs Bioquell. Le test KM100, observe la résistance des lots, aidant ainsi à identifier les lots plus résistants que les autres. Le but ici, est d'identifier les lots ayant une résistance de référence (valeur-D) la plus proche possible de celle que Bioquell préconise lors de l'utilisation de ses systèmes de décontamination.

Bioquell prend également des clichés MEB d'un échantillon d'indicateurs, sur tous les lots commercialisés, afin de contrôler la répartition et la qualité des indicateurs libérés. Ces images sont disponibles sur demande pour les clients Bioquell, afin de les aider dans leurs démarches qualité. Ce test n'est pas un critère de libération de lots, puisque seule une petite partie de la production est testée, mais contribue aux critères qualité Bioquell.

Néanmoins, et malgré tous les efforts entrepris dans la fabrication des indicateurs, il existera malheureusement toujours des rogues. En effet, les indicateurs sont fabriqués à partir d'un matériel biologique vivant qu'il est difficile de totalement contrôler. Le but de Bioquell est de réduire au maximum la part des rogues au sein des lots commercialisés.

**WATSON
MARLOW**

Fluid Technology Group

RELEVEZ LES DÉFIS DU

DÉVELOPPEMENT DE VACCINS

Échangez avec nos experts techniques

wmftg.com/fr/industry/biopharm/

Determining a Strategy for Container Closure Integrity Testing of Sterile Injectable Products.

By Derek DUNCAN - LIGHTHOUSE INSTRUMENTS B.V.
dduncan@lighthouseinstruments.com

Container closure integrity (CCI) plays an important role in maintaining the sterility and stability of sterile injectable products. The defects which cause a sterile vial to leak are not necessarily defects that will be detected by a visual inspection process. Examples of such defects are defects that are hidden by the crimp, microscopic cracks & scratches in the glass, or temporary defects such as stopper pop-up that result in temporary container leakage.



New regulatory guidance has recently triggered changes in industry best practices in the area of CCI testing (CCIT). This article summarizes the current state of container closure integrity testing in the pharmaceutical and biopharmaceutical industries and outlines possible approaches for developing a CCIT strategy. Concrete industry case studies are presented as examples.

1. Regulatory environment for container closure integrity

Historically, good container closure integrity has been linked to the maintenance of sterility. A container that loses, or does not have, good closure integrity is at risk for microbial contamination. However, the context of container closure integrity has become broader over the years. An increasing number of formulations have some sensitivity to oxygen and need to be packaged under an inert atmosphere. Freeze-dried product requires protection against water vapor and is often packaged at a partial vacuum to help with reconstitution and/or seating of the stopper. Live viral vaccines and gene and cell-based therapies require deep cold storage temperatures (-80 °C down to cryo) which can introduce risk to the sealing performance of the packaging components^[1].

Increasingly, good container closure integrity is necessary not only for the maintenance of sterility but also to maintain critical headspace gas conditions for stability of the formulation. Note that, quite generally, a container that is gas-tight will also be tight against microbial ingress. Therefore, the requirement to maintain headspace gas conditions imposes higher standards on CCI than the requirement to maintain sterility. In light of the importance of CCI for product sterility and stability, recent regulatory guidance has placed an increasing emphasis on container closure integrity concepts. The current USP <1207> chapter titled 'Package Integrity Evaluation – Sterile Products' was implemented in late 2016 and represents the most thorough guidance document to date on container closure integrity concepts for sterile injectable products. The chapter gives an overview

→

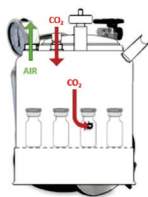
Headspace Gas Ingress Testing for CCI

Objective

- Develop an approach similar to blue dye but better
- Method must reliably detect critical leaks

Proposed Headspace Gas Ingress Test Method

- Samples placed in CCI Test Vessel
- Vessel pressurized with X bar of CO₂ for Y min
- Samples removed and tested for headspace CO₂



Gas bath instead of blue dye bath

Figure 1: Schematic showing the headspace gas ingress approach for CCIT

of CCI testing technologies and approaches for a CCI control strategy over the product life cycle. Traditional CCIT methods, such as microbial challenge tests or blue dye ingress tests, are described as methods associated with probabilistic outcomes having some uncertainty in the results which, in turn, makes such methods difficult to quantitatively validate for the detection of critical leaks [2]. The chapter also makes clear that container closure integrity testing should be performed throughout the product life cycle. Deterministic CCIT methods based on non-destructive analytical measurements can be used to generate science-based CCI data that, coupled with a risk-based approach, enables informed decisions about a CCIT strategy in commercial manufacturing.

More recently, a second draft revision of the EU Annex 1 requirements for sterile product manufacturing was released in February, 2020 [3]. Container closure integrity testing was an important topic of discussion for the revision and the draft text contains new requirements for CCI testing in manufacturing. Other world regulatory bodies, Russia and South Korea for example, have also been putting increasing emphasis on CCI control for finished sterile products. It is clear from these recent developments that regulators want to see improved industry practices in the area of CCI testing.

2. Container closure integrity test methods

The USP <1207> chapter provides an overview of CCI testing technologies and categorizes them as being deterministic or probabilistic (see Table 1 below). The chapter emphasizes that this overview of CCI testing technologies is not exhaustive but is a summary of technologies that have been implemented for CCI testing in the pharmaceutical industry and that are described by a body of peer-reviewed literature.

Deterministic	Probabilistic
Electrical conductivity and capacitance (high voltage leak detection)	Bubble emission
Laser-based gas headspace analysis	Microbial challenge, immersion exposure
Mass extraction	tracer gas detection, sniffer mode
Pressure decay	Tracer liquid (blue dye ingress)
Tracer gas detection, vacuum mode	
Vacuum decay	

Table 1: CCIT technologies described in USP <1207>

It is important to distinguish between CCI technologies and CCI test methods. Once a leak testing technology has been chosen as the basis for a test method, the chapter emphasizes the need to perform method development studies generating data that demonstrates detection of a critical leak for a specific product container configuration using defined test method parameters: 'After a methodology has been selected for use, the test equipment operation and performance is qualified. Test method parameters are optimized during method development and confirmed during validation. Thus, a final leak test method is specific to a particular container-closure or product-package system.' [2] Another point emphasized in the chapter is that 'no one test is appropriate for all packages or for all leak testing applications'. The chapter and its three sub-sections describe a framework in which appropriate CCI

Headspace Gas Ingress Testing for CCI

- Gas ingress testing using CO₂ overpressure easily identifies positive controls.
- Empty vials show almost total headspace gas exchange (600 – 700 torr of CO₂) with the chosen CCIT vessel cycle.

- Filled vials with defects below the liquid (water) fill are also all detected.
- Method development studies should investigate if there are product interference effects

Robust CCI method development and method validation can be done to define appropriate test methods with this approach.

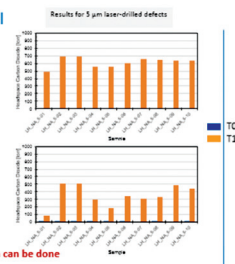


Figure 2: Example of robust CCIT method development data demonstrating detection of a critical leak

test methodologies are chosen, optimized per product configuration, and a robust validation of the method for detecting a critical leak is performed. In selecting a methodology, 'deterministic leak test methods are preferred over probabilistic methods when other key method selection criteria permit'. Package integrity data is generated over the product life cycle and serves as input for an ongoing database of CCI data (the package integrity profile) which then serves as a risk management tool to ensure that CCI of finished product meets the product quality requirements. The framework described in the chapter is currently driving changes in industry best practices for CCI testing, including:

- Implementation of a 'toolbox' of CCI test methods optimized and chosen on a per product configuration basis rather than the application of a single legacy test method in a one-size-fits-all approach.
- Generation of science-based data in robust CCI product and process studies and in method development & validation studies which demonstrate the detection of a critical leak.

Example: CCIT method development using headspace gas ingress

A general approach for CCIT was developed that both resembled and improved upon the blue dye ingress test. A key objective was to develop a method that would reliably detect critical leaks and to move away from the visual, somewhat subjective, inspection by the operator in a blue dye test. For this headspace gas ingress approach, samples are placed into a CCIT vessel which can be pressurized with a tracer gas (e.g., carbon dioxide). If a container has a leak defect, the carbon dioxide gas will ingress into the container (see Figure 1). After the sample conditioning cycle with pressurized CO₂, the samples are removed from the vessel and defective vials are identified by using headspace analysis to detect elevated CO₂ levels. Several tests were conducted using filled and empty vials in which 5-µm holes were drilled into the body of the vial and then placed in a CCIT vessel pressurized with CO₂. Following a 30-min sample conditioning cycle, a significant amount of CO₂ had ingressed into the defective vials.

Figure 2 shows the resulting data of tests conducted with empty vials and vials filled with water. The data illustrates that robust CCI method development and method validation can be done to define appropriate CCIT methods using this approach. Headspace gas ingress testing for CCI uses a 'gas bath' instead of a blue-dye molecule bath and detection of any leak is accomplished with a non-destructive analytical headspace measurement.

Statistical sampling and generating science-based CCI data

A topic of current discussion is how much CCI testing should be required, especially for commercial batches of finished sterile products. Despite the general consensus that CCI is a critical quality parameter for finished sterile products, the industry has historically expended much more effort on testing for particle contamination than for CCI. Visual inspection to detect particulate contamination has been a requirement for many years with 100% inspection of finished parenteral products being done manually or by automated inspection platforms. In the context of risk to the patient, a loss of container closure integrity would, in general, be assessed as being just as critical as particle contamination.

The current EU Annex 1 guidelines require 100% leak testing for

certain types of product containers: 'Containers closed by fusion, e.g. glass or plastic ampoules, should be subject to 100% integrity testing'^[4]. This requirement is a result of

the fact that the inherent failure rate of the sealing process for these types of containers cannot be sufficiently controlled. The ongoing draft revision of the EU Annex 1 guidelines again states the requirement of 100% integrity testing for fused containers and adds the following requirements for all other types of containers: 'Samples of containers closed by other methods should be taken and checked for integrity using validated methods. The frequency of testing should be based on the knowledge and experience of the container and closure systems being used. A scientifically valid sampling plan should be utilized. The sample size should be based on information such as supplier approval, packaging component specifications and process knowledge. It should be noted that visual inspection alone is not considered as an acceptable integrity test method.'^[3] There are several interesting discussion points about CCI requirements in this version of the draft revised EU Annex 1 text:

- The frequency of CCI testing in manufacturing is not mandated but should be defined based on 'knowledge and experience of the container and closure systems'.
- The sample size is also not mandated but should be based on 'information... and process knowledge'.

If one equates 'knowledge of the container, closure systems, and process' to mean 'data on the container, closure systems, and process', one comes to the conclusion that scientific CCI studies should be conducted earlier in the product life cycle to justify the CCI testing strategy in manufacturing. In other words, there is an implicit requirement on packaging and process development to generate robust scientific CCI data in support of manufacturing's efforts to be compliant. If CCI studies generate data showing a high-risk package or process, then a more robust CCI testing strategy should be implemented in manufacturing and vice versa. This follows Quality by Design concepts, namely combining prior knowledge and experimental data from systematic development studies to define a design space for the commercial process ensuring robust quality as well as the implementation of an appropriate control strategy.

Another interesting point of discussion is the language referring to CCI and visual inspection. Some production facilities point to the 100% visual inspection process to justify meeting current CCIT guidance such as the following from the Food and Drug Administration: 'A container closure system that permits penetration of microorganisms



is unsuitable for a sterile product. Any damaged or defective units should be detected, and removed, during inspection of the final sealed product.'^[5] The language of the draft EU Annex 1 revision makes clear that visual inspection is not considered to be an acceptable integrity test method. If statistical or 100% testing is desired, CCI test methods that enable the testing of larger sample sizes will need to be implemented.

To demonstrate statistical confidence in the process requires the generation of statistical CCI data. However, an argument could be made that a better place to do this in the product life cycle is in process development and scale-up rather than in manufacturing. The guidance provided in USP <1207> to collect package integrity data throughout the product life cycle to create a package integrity profile database implies an approach in which a significant amount of CCI data is generated outside of the manufacturing environment. The generation of robust CCI data providing knowledge of the container and closure system and the effects of the process on CCI, which then gives guidance to a CCI strategy in manufacturing, is exactly what is implied in the draft revised EU Annex 1 text as previously discussed. The schematic below outlines a possible approach to generating CCI data that enables the design of an appropriate CCI testing program in manufacturing.

After validation of the fundamental closure system, data needs to be generated to understand if the process introduces risk to CCI. To gain statistical confidence in the process, it would be necessary to perform testing on statistical sample sets. This in turn will require the use of non-destructive deterministic test methods because the probabilistic legacy test methods (blue dye and microbial ingress testing) have limited throughput capability. Testing could be done on either a pilot scale or with test and engineering batches from the manufacturing environment. Once a baseline failure rate has been established, process controls could be implemented to improve the process, if necessary. Product from the improved process would be tested to quantify the residual risk to CCI after which a decision could be made for an appropriate testing strategy in manufacturing. Packages and processes having a high inherent failure rate that is difficult to control would require a heavier inspection process and vice versa. In this way, the decision for an inspection process design is driven by science-based statistically relevant data.

Example: Data-driven CCI testing strategy in manufacturing

A manufacturer of cytotoxic freeze-dried products identified a batch with potential CCI issues. The batch of 11,000 product vials was put into quarantine. A CCI testing strategy of random sampling based on headspace analysis was implemented. Defective vials were identified by elevated headspace oxygen levels and loss of vacuum as measured by headspace analysis (the product specification was to seal the freeze-dried vials at 600 mbar of nitrogen). **Figure 3** shows the headspace oxygen and headspace pressure results of a few hundred samples. Because of the large number of CCI failures detected with random sampling, an AQL inspection was implemented for the problem batch (Batch B) as well as for the batches produced before and after (Batch A and Batch C, respectively). These results are shown in **Figure 4**.

The results of the statistical AQL inspection gave extra insight showing that the problem batch (Batch B) seemed to be an isolated problem batch – 15% of the product vials in Batch B suffered from CCI issues compared with 0% and 0.4% of Batch A and Batch C, respectively. A root cause investigation was started and it was decided to perform 100% CCI inspection of Batch B based on headspace pressure analysis to reject all defective vials from the batch. Results of the 100% CCI inspection are shown in **Figure 5** and confirm the conclusion of the AQL inspection that a significant portion of the batch suffered from CCI issues. The data also revealed some product vials suffering from full leaks (full gas exchange and full loss of vacuum) and some product vials suffering from partial leaks (partial gas exchange and partial loss of vacuum). This identified the root cause to be a problem with the stoppering process in the lyo chamber – some vials were leaking coming out of the lyo chamber and were sealed by the capping and crimping process before suffering a full loss of underpressure.

Summary

The current environment for CCI testing of sterile injectable products is evolving. New regulatory guidance recognizes CCI as a quality parameter that is critical for the maintenance of both the sterility and the stability of finished sterile products. New concepts introduced in the regulatory guidance are changing industry best practices and include the following:

- Generate science-based CCI data throughout the product life cycle to build up a package integrity profile database that can be used as input for risk management.
- When possible, use deterministic CCI test methods that have been validated to detect a critical leak.
- There is no one-size-fits-all CCI test; a toolbox of CCI testing technologies that can be optimized on a per product

→

package configuration is necessary for a robust CCIT program.

Because industry best practices will be evolving as the impact of the new guidance becomes clearer, a certain amount of uncertainty in CCIT best practices is to be expected in the near term. However, a general approach that includes a) the implementation of validated deterministic CCIT methods and b) the increased generation of science-based CCI data to enable informed risk assessments, will help prepare the industry for the future.

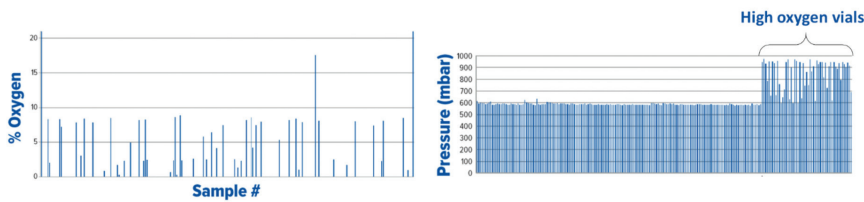


Figure 3: Headspace analysis data showing a significant number of random product samples having elevated oxygen levels and loss of vacuum (underpressure) resulting from loss of CCI.

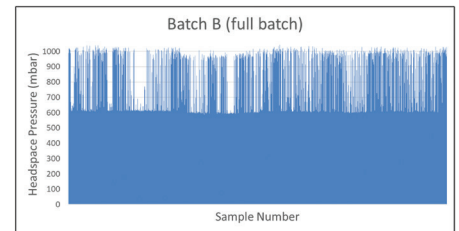


Figure 5: Results of 100% CCI inspection of Batch B - 16.2% of the batch was identified to have suffered from CCI issues. Defective product vials were identified as having elevated headspace pressure levels (loss of vacuum/underpressure).

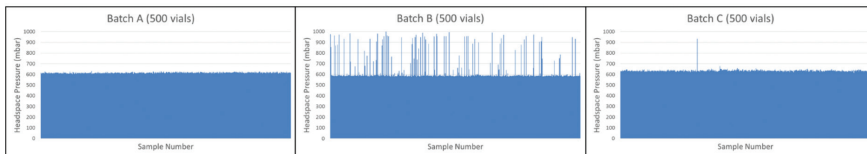
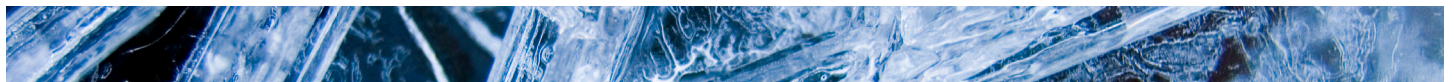


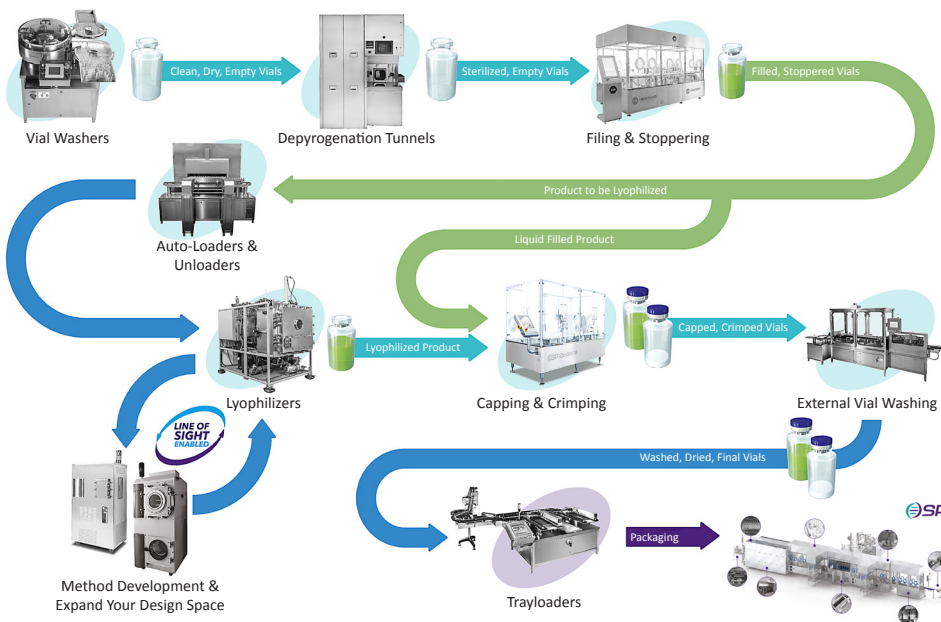
Figure 4: Results of the AQL CCI inspection showing that Batch B is an isolated problem batch.

References

- [1] Zuleger, B.; Werner, U.; Kort, A.; Glowienka, R.; Wehnes, E.; Duncan, D. Container/Closure Integrity Testing and the Identification of a Suitable Vial/Stopper Combination for Low-Temperature Storage at -80 °C. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 2012, 66 (1), 453-465.
- [2] U.S. Pharmacopoeia. USP 40 <1207>. Sterile Product Packaging - Integrity Evaluation. United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2017.
- [3] EU Annex 1 Revision, February 20th, 2020: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/2020_annex1ps_sterile_medical_products_en.pdf.
- [4] European Commission. 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. Brussels, Belgium: European Commission; 2009.
- [5] FDA Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced By Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice, September 2004 (FDA, Rockville, MD)



BIOPHARMA TECHNOLOGIES FRANCE



SP i-Dositecno

biopharma technologies france

Aujourd'hui, c'est toute l'automatisation amont/aval des lignes de productions formes liquides et/ou lyophilisées de la laveuse int./ext. à l'étiqueteuse et chargement de plateaux.

SP i-Dositecno

biopharma technologies france

Biopharma Technologies France
 ZA Grange Neuve, 26 route de Bourgoin 38790 Diémoz
 info@biopharmatech.fr

www.biopharmatech.fr



Efficient Control Strategy enabled by structured Knowledge.

By Michel HERTSCHUH & Johanne PIRIOU- AKTEHOM
 johanne.piriou@aktehom.com

Control Strategy, derived from current product and process understanding, is built-up throughout Pharmaceutical Development, becomes a central repository for Regulatory filing, and the reference to ensure Product Quality and Process Performance during Commercial Manufacturing and Product Lifecycle (OPV, Change Management).



Two enablers ensure the robustness of the Control Strategy: Quality Risk Management and Knowledge Management, supported by regulatory guidelines, particularly ICH Q10. With the increased complexity of the medicinal products and manufacturing processes, and the need to supply innovative therapies more and more rapidly for the patient needs, awareness has raised in the industry to implement jointly and efficiently these two enablers. The central question today is how QRM and KM can be improved to accelerate the products development, the products supply and innovation throughout the lifecycle? Which kind of knowledge should be managed? How to improve the knowledge leverage for an efficient use? What are the solutions to increase the relevant knowledge overtime (i.e. obsolete data removed), thanks to key contributors and Subject Matter Experts?

If the solutions are not totally developed and available, initiatives are emerging in the Health industry to improve knowledge flows, Knowledge Management tools and technologies (through Pharma 4.0 solutions). A mindset evolution in the Knowledge Management will be necessary to achieve the goals, but today, everyone aligns on the need: improve structuring, management, transfer and use of the Knowledge. The availability of the most up-to-date knowledge in real time, structured in databases, and the ability to share this knowledge efficiently through comprehensive and powerful digital tools will surely benefit product innovation, product quality and facilitate product lifecycle management.

1. Introduction

The Control Strategy, ensuring product quality, has always been a requirement, but was historically mainly ensured by end-product testing and narrow control of manufacturing processes and materials without a comprehensive understanding of the relationships between process parameters, material attributes and product quality attributes. The Control Strategy concept has evolved with the implementation of ICH guidelines Q8 to Q12¹, the 10 past years. A new pharmaceutical paradigm has emerged, with Quality by design approach highlighting science & risk-based approaches. In an enhanced approach to manufacturing process development using Quality by Design (QbD) concepts, an enhanced Control Strategy is based on a better understanding of the product and the process allowing to identify which material attributes and process parameters should be controlled. Scientifically sound and based on risk assessments, this approach allows Control Strategy to focus on fundamental elements influencing the product Critical Quality Attributes and ensuring to meet product quality.

Control Strategy including different types of control to assure product quality, is built during Pharmaceutical Process & Analytical Development and consolidated during Technology Transfer, proposed by the applicant in the Regulatory filing and approved by regulators. Building an efficient Control Strategy for the Commercial Phase of the product, relying on the basics of the Product and Process risks appear even more necessary and relevant as the ICH Q12¹ has been published to facilitate Change Management during the product lifecycle, encouraging innovation and continuous improvement.

The need for a robust Control Strategy, built in development and managed throughout the product lifecycle raised the need of effective Knowledge Management and Quality Risk Management use throughout this lifecycle.

Knowledge Management and Quality Risk Management have also been recognized by regulators as key enablers, strongly linked to ensure pharmaceutical products quality, providing the means for science- and risk- based decisions related to product quality (ICH Q10). If there is a consensus that knowledge is critical to successfully manage the product lifecycle, there are significant challenges to ensure that the right knowledge efficiently flows across the product lifecycle to build and manage the Control Strategy.

2. Current state and challenges

Initially developed and implemented during product development for production of clinical trial materials, Control Strategy must be updated for commercial scale production before regulatory dossier submission. Control Strategy can be challenged, reviewed when new product/process knowledge is gained during manufacturing of the commercial batches (communication with Health Authorities for Control Strategy update is determined by the element to be changed).

To develop and manage the Control Strategy, the use of QRM and KM have become compulsory throughout the product lifecycle:

- pharmaceutical development
- technology transfer and process validation
- preparation of the regulatory dossier submission
- commercial manufacturing: deviations and change management processes

2.1 Pharmaceutical Development (Construction of the Control strategy during Pharmaceutical Development)

Control Strategy is being constructed during late stages of the pharmaceutical development, is consolidated and finalized during Technology Transfer and implemented at the scale of the commercial manufacturing process. It is followed and verified during Process Validation stages and is an essential part of the CMC regulatory dossier and the basis for Commercial Manufacturing to ensure Product Quality. During the product lifecycle, the Control Strategy can evolve according to process monitoring feedback and Change Management process (Figure 1).

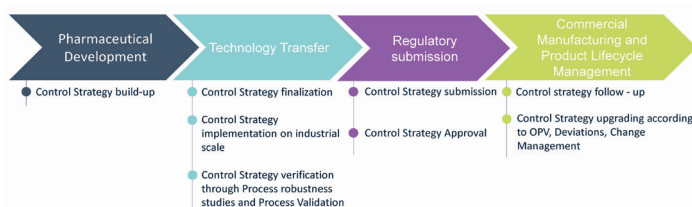


Figure 1 : Control Strategy evolution throughout the Product Lifecycle

At each stage of the product lifecycle and the Control Strategy build-up, product and process knowledge aided-risk assessments are performed. Using risk-management tools and iterative risk assessments are crucial for developing a control strategy that will be accepted by Health Authorities.

Figure 2 illustrates the different risk assessments performed during product characterization phase to obtain the final list of CQAs.

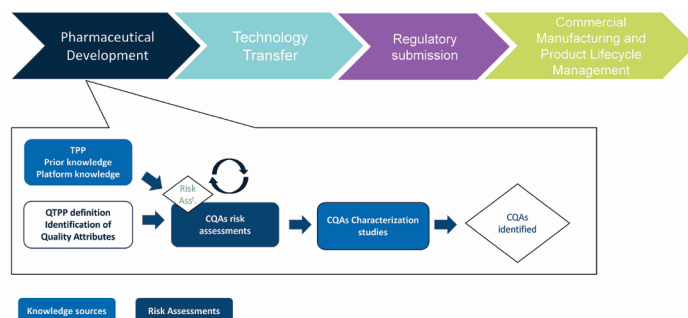


Figure 2 : Knowledge flow and Risk assessments needs during Pharmaceutical Development (Product scope)

Figure 3 illustrates the different risk assessments performed during the process characterization phase to identify the Critical Process Parameters and Critical Material Attributes.

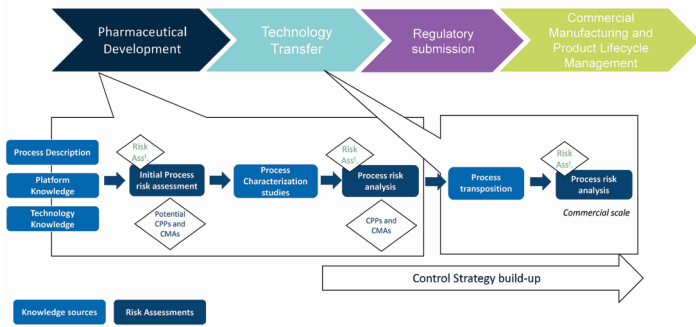


Figure 3 : Knowledge flow and Risk assessments needs during Pharmaceutical Development and Technology Transfer (Process scope)

Product and process knowledge is today largely tacit, particularly during early stage of development phase. Collecting a relevant and usable knowledge to perform these risk assessments is often a challenge. People who create knowledge are often separated by their location and the projects time from the knowledge users. Issues in the knowledge flow from early product development through the lifecycle are often encountered. Typical issues that are met are:

- the lack of data formalization,
- the unavailability of the SMEs who participated in the early stages of the project (SMEs do not necessarily stay at a company for the entire duration of a product lifecycle)
- the organizations in silos that slow the communication loops and knowledge transfer between product development teams, process development teams, Regulatory Affairs, industrialization teams

Knowledge loss and tacit knowledge are a central question, but unstructured knowledge is another one. Explicit knowledge is often stored in unstructured repositories files.

Another typical situation encountered is a collection of data assembled at the end of each development gate, leading to large development reports retracing several years of development. Freestyle narrative reports are available, but they are not directly linked to the goal: Product and process relationships (CQAs, CPPs and CMAs identification). Then, a high workload is needed to transform these narrative elements into a comprehensive and structured risk assessment tool.

Knowledge leverage lacks efficiency and at each step of QbD approach, these risk assessments require some efforts. They consume time and resources to collect historical knowledge, compile the data and provide the scientific rationales. These statements are also applicable during Technology Transfer and the preparation of Process Validation.

2.2 Technology Transfer and Process Validation

During Technology Transfer, the process is transposed to the commercial scale and Control Strategy is usually finalized at this stage, requiring another round of process risk analysis focused on industrial scale impacts. This time, the CPPs and CMAs identification has already been performed, the goal is to identify how they are controlled at industrial scale and with the technologies in place in the plant. This part of the Control Strategy is often called Process Control Strategy.

To formalize the Process Control Strategy on the commercial scale process, an update of the process risk analysis is needed. A typical situation when performing the process risk analysis at industrial scale is to redevelop a new risk analysis tool because the one used in Development phase does not comply with specific requirements, SOPs, or templates of the manufacturing site. There is a lack of standard tools and templates for managing knowledge and this situation adversely affects the efficiency of Transfer Technology. There is a need for flexible tools and rules (complexity varying according to the stage of the lifecycle) but also harmonized definitions to avoid misalignment when preparing the regulatory dossier.

In the scope of Knowledge Management, we can observe that successes and failures are not systematically captured across the lifecycle and induce to reperform some experiments by engineering teams that were maybe already experienced by development teams. Process changes history and the rationale for each change can be difficult to collect unfortunately, yet it is key for the process understanding and the future product lifecycle.

Concerning the tools, Excel spreadsheets are developed to formalize Product & Process risk assessments.. No one can deny that there are some risks of discrepancies between files when redundant information is present and when updates are performed. The cost to maintain these tools is not negligible and has to be taken into consideration when defining the maintenance and update frequency of these Excel Spreadsheets and associated reports.

In the scope of knowledge management, transfer and sharing, the usual Microsoft Office tools (word files, excel sheets,) provide limited visualization solutions. To create instructive visuals, Experts must generate them manually, which is time-consuming and expensive, and can be sources of error as they are manually created.

2.3 Regulatory dossier submission

When comes the time for the regulatory dossier preparation and submission, the worst situation that could happen is that the Regulatory Affairs drafting the CMC sections were not involved during previous stages of the project. Some elements of the Control Strategy described in the dossier will become regulatory binding and the dossier drafting should be performed as a team. The team should consist of the Regulatory Affairs (CMC Managers), product and process SMEs, Projects teams involved in risk assessments, and anticipated in the previous stages of the project.

This teamwork will enable the provision of a relevant overview of Control Strategy and detailed scientific justification and rationales of each individual element which are presented in the Regulatory dossier.

2.4 Commercial manufacturing: deviations and change management processes

During commercial manufacturing, Control Strategy is the key element to ensure product quality and process performance. The relationships between materials and process parameters with the product CQAs (i.e. the critical elements assuring the product quality) must be perfectly understood to efficiently manage the process deviations and the Change Management process. If this is not the case, Deviations management and Change Management are very challenging, time consuming if the scientific rationales and knowledge are not easily accessible.

Many challenges affect the Control Strategy robustness and the efficiency of the Product Lifecycle Management. Nevertheless, awareness emerged in the Pharmaceutical industry to improve the data and knowledge availability to support the Control Strategy.

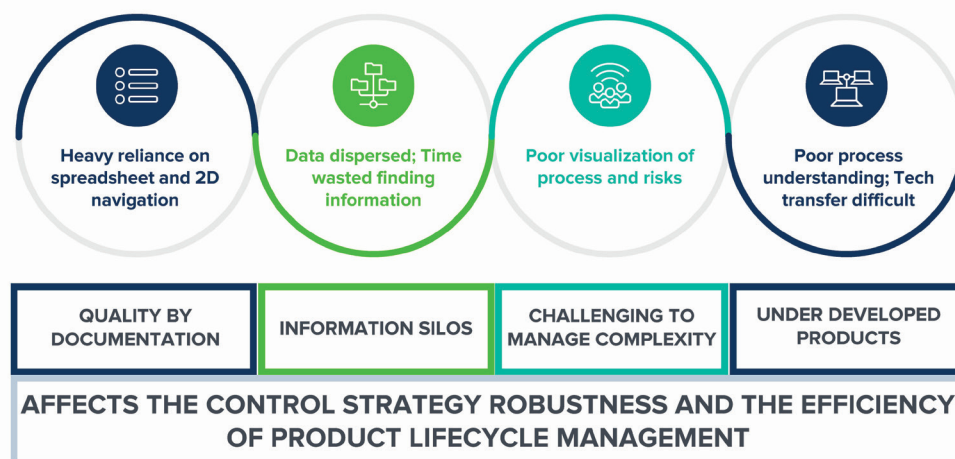


Figure 4 : Current state of the data and knowledge availability to support Control Strategy

3. Needs and solution elements

To answer to the current state and challenges described before, pharmaceutical industry needs to work on the effectiveness of the knowledge structure, management, flows and use. Some key elements are summarized (do not represent an exhaustive list):

- Improve the availability of an up-to-date knowledge, at any time of the lifecycle
- Be able to easily update data and the knowledge progression
- Better support the documentation and traceability of process development
- Improve the Knowledge structuring and accessibility
- Improve the capture of platform knowledge and prior knowledge
- Improve the availability of subject matter expertise
- Improve the communication loops

In addition, to gain efficiency in all stages of the lifecycle, from development to commercial production, the following solution elements are intended to decrease the cost, workload and level of effort needed at each stage:

- Develop iterative risk assessment tools using common definitions and wording
- Develop common key methodologies and concepts that will be used in QbD/QRM implementation throughout the product lifecycle
- Facilitate communication loops (to express needs and feedbacks) in the product and process development lifecycle
- Use visualization tools and technologies allowing a more efficient sharing of the knowledge, being more powerful in the risk communication, recommended by guideline ICH Q9.
- Improve the sharing of information about risk and process design between the decision makers and other stakeholders

International working groups like the BPOG² (BioPhorum Operations Group) already started the work to identify solution elements and has developed a Knowledge mapping for the biopharmaceutical industry in CMC business (Process Development, Control strategy development and Technology Transfer). This group proposed solutions to answer to current state and challenges, around the guiding principles of Knowledge Management considering People, Process, Content and Technology.

The feedback loops in the product and process development lifecycle are a good example of a solution element considering **Process** (who, when, how), and **Content** (what). A typical feedback loop that can be used as an example is the relationship between manufacturing and product/process development. To develop a manufacturing process that will answer to the manufacturing needs and constraints, a good

practice is to share between Development and Manufacturing teams to gather manufacturing sites experience for process control capability (according to the current technology available). Considering the manufacturing needs and constraints is key to design the appropriate studies reflecting enough process variability and flexibility. On the other side, manufacturing teams should be aware of development choices on essential process design elements to avoid reproducing failures during process transfer, that could already occur in previous stages of the lifecycle. The involvement of Regulatory stakeholders (CMC) during the Development phase is also a best practice, that is not always followed. Later, during commercial manufacturing phase, sharing between Development and Manufacturing teams will support the continuous improvement both for future development and current manufacturing challenges (i.e. deviations handling, change management).

To summarize, the involvement and engagement of cross-functional teams for all QbD steps is crucial for the project success as well as the implementation and use of iterative tools and common methodologies throughout the lifecycle. These principles will enable to collect the scientific rationales and populate the risks assessments on a regular basis and avoid knowledge loss and jerky effects on workload before each project gate.

Considering the “**Technology**” as a KM guiding principle, Industry needs the availability of appropriate tools to answer to their knowledge flows improvement. Structured databases are needed to support the amount of data that will be generated throughout the lifecycle. An illustration of structuring is shown **Figure 5**.

To answer to the drawbacks of Excel Spreadsheets or Word documents to aggregate data from the earliest stages of process design and development through technology transfer and commercialization, IT softwares are currently developed and commercialized, enabling availability of electronic data (easily accessible and searchable) providing an enhanced quality-by-design vision. These softwares rely on structured databases and represent the future of the QbD approach implementation. Why ? They facilitate and accelerate the Knowledge Management, transfer and sharing, thanks to the creation of instructive and powerful visuals, enabled by automated visualization tools.

4. Opportunities and Benefits

As developed throughout this article, the benefits of improving the knowledge flows and structure to support iterative risk assessments and new knowledge inputs during Development, Submission and Commercial Phases are obvious and abundant to increase the efficiency of pharmaceutical companies, such as: →

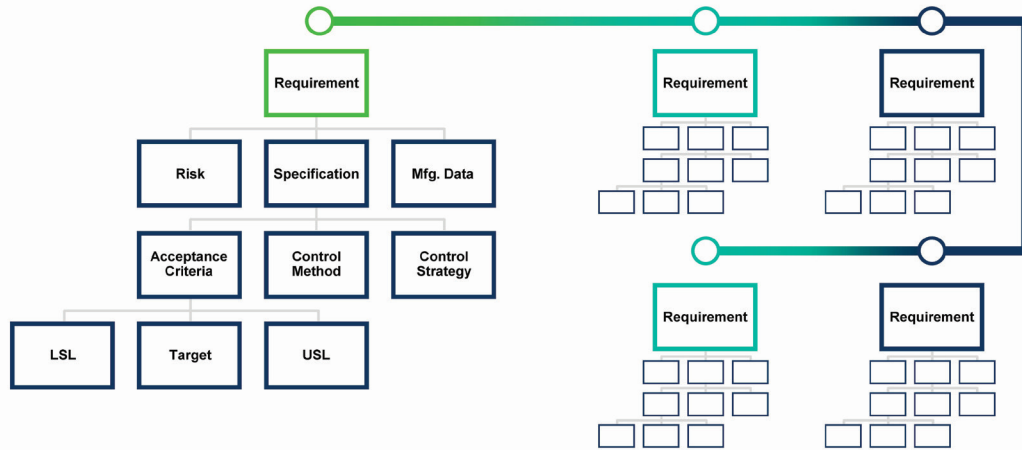


Figure 5 : QbD approach requirements – illustration of the need for structuring

- Accelerate time to market and decrease the cost of drug development
- Accelerate decisions, based on better information
- Accelerate the Technology transfer phase
- Reduce the workload and risks for Regulatory dossier submission and approval
- Accelerate the deviations handling and troubleshooting during commercial phase
- Enable a more efficient Change Management process as proposed in ICH Q12 guideline

As regards to ICH Q12, the aim of this guideline, published in final version (Step 4) in November 2019, and currently in Step 5 (implementation phase) is to provide a framework to facilitate the management of post-approval CMC changes in a more predictable and efficient manner. The implementation of this approach is:

- on one side, a huge opportunity to provide more flexible regulatory approaches, reduce the number of regulatory variations and simplify the communication process (i.e. reporting categories for changes) between HA and MAH, reducing the regulatory burden for the pharmaceutical companies
- on the other side, subject to increased product and process knowledge, to the use of science- and risk-based approaches in drug development and regulatory decisions (supported by effective Pharmaceutical Quality System).

The approach proposed by Q12 will “benefit patients, industry, and regulatory authorities by promoting innovation and continual improvement in the pharmaceutical sector, strengthening quality control and improving supply of medicinal products” as highlighted in the guideline itself, providing that product and process knowledge are efficiently managed and combined to science- and risk- based approaches.

Leverage product and process knowledge are not only promoted by ICH Q12. Knowledge structuring is likely to become a regulatory need, as highlighted today by the FDA, with the launch of their KASA initiative³ (Knowledge-aided Assessment and Structured Applications). FDA is creating a new pharmaceutical quality assessment system, called KASA system, designed to:

1. “Capture and manage knowledge during the lifecycle of a drug product;
2. Establish rules and algorithms for risk assessment, control, and communication;
3. Perform computer-aided analyses of applications to compare regulatory standards and quality risks across applications and facilities;
4. Provide a structured assessment that minimizes text-based

narratives and summarization of provided information.”

The current state and the need for the KASA system development is close to the industry state and challenges developed previously:

- Availability of previous knowledge on similar product/process: “it is not possible to easily locate historical data about similar products, processes, or the facilities. Such a practice has significantly reduced the efficiency of the regulatory assessment and increased the likelihood of inconsistencies”.
- Subjectivity in risk assessment and control, based on written “unstructured text that are not easily identifiable in lengthy assessment documents”
- “Absence of databases to capture current knowledge”... “insufficient knowledge management tools”

To face these challenges, FDA is developing KASA, a system that “captures and manages information about inherent risk and control approaches for product design, manufacturing, and facilities, in a structured format. This is intended to facilitate a concise and consistent quality assessment and largely replace freestyle text”.

Knowledge structuring and consistent quality assessment are a need for the regulatory agencies that also want to improve their assessment efficiency and consistency. Again, the need for structured databases and softwares to manage knowledge in real time (on product, process, controls and pharmaceutical activities to control quality) is raised.

Digitalization is one of the solution elements to improve the current state and answer to the identified needs. Knowledge must be available at several levels (product, process, facilities, platform knowledge, historical knowledge, current knowledge, ...) and with a multivariate and multidimensional vision to facilitate converting knowledge into understanding and intelligence. This vision will be facilitated with digitalization solutions.



Figure 6 : Representation of the Product & Process relationships as a Network Graph for Structured knowledge

Conclusion

Both industry and regulators agree on the need of improved knowledge flows and risk assessments across the industry and throughout the product lifecycle. Solutions are diverse but consensus is unquestionable regarding the need for pharmaceutical industry efficiency to:

- **reduce cost** of development and supply,
- **reduce time** for product release and implementation of innovative changes,
- **improve the product quality and process performance** thanks to a robust control strategy and the capability to understand the relationships between process variability (CPPs) and product consistency (CQAs)

If digitalization enables a better availability and use of the knowledge, it will not improve Knowledge Management on its own. Culture, mindset evolution, people, will all be essential to use the modern KM and QRM tools efficiently.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the following participating individuals for their contributions in the technical editing of this article:

- Yash Sabharwal, QbD Vision by CherryCircle Software
- Luke Gerrero, QbD Vision by CherryCircle Software

References

1. ICH Q12 – Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management - Final version (Step 4) adopted on 20 November 2019
2. BioPhorum Operations Group. (March 2020):
Biomufacturing technology roadmap - Knowledge Management
Knowledge mapping for the

- biopharmaceutical industry. A test case in CMC business processes from late-stage development to commercial manufacturing.
3. FDA's new pharmaceutical quality initiative: Knowledge-aided assessment & structured applications – International Journal of Pharmaceutics (2019) - Lawrence X. Yu, Andre Raw, Larisa Wu, Christina Capacci-Daniel, Ying Zhang, Susan Rosencrance

Glossary

- CMC** Chemistry, Manufacturing & Controls
CMA Critical Material Attribute
CPP Critical Process Parameter
CQA Critical Quality Attribute
HA Health Authority

- KASA** Knowledge-aided Assessment and Structured Applications
KM Knowledge Management
MAH Marketing Authorization Holder
QRM Quality Risk Management
SME Subject Matter Expert



Produire de l'eau purifiée et de l'eau PPI membranaire



L'Orion MkIII associe de nombreuses expertises technologiques de Veolia Water Technologies et les met au service de l'industrie pharmaceutique. Le skid Orion MkIII produit de l'Eau Purifiée et de l'Eau Pour Préparations Injectables à partir d'eau potable, en respectant les normes en vigueur : USP, EuPh. Conçu et fabriqué suivant les recommandations ISPE, le système est totalement en accord avec les normes FDA, cGMP et GAMP. Suivant le modèle, l'Orion produira entre 500L par heure et 20 m³ par heure.



Les technologies de base de l'Orion sont l'adoucissement, l'osmose inverse et l'électro- déionisation continue. Ces technologies offrent l'avantage de ne nécessiter quasiment aucun ajout d'additifs chimiques. Le choix des technologies, des matériaux de construction, de membranes d'osmose basse consommation énergétique et de systèmes (optionnels) de traitement des concentrats d'osmose permettent de réduire significativement l'impact environnemental de l'exploitation du système.

Suivant les besoins, l'Orion se décline en trois modèles :

- SÉRIE S : rendement optimisé jusqu'à 90 %, minimisation de la consommation électrique, désinfections thermiques du prétraitement et de la production, affichage des économies sur le pupitre opérateur.
- SÉRIE E : désinfections thermiques du pré- traitement et de la production, affichage des économies sur le pupitre opérateur.
- SÉRIE C : Désinfection chimique du prétraite- ment, désinfection thermique de la production L'intégralité des éléments de purification de l'Orion MkIII est désinfectée thermiquement (>80 °C) automatiquement pour garantir le meilleur contrôle microbien possible. L'ajout optionnel d'étapes de traitement UV et d'ultrafiltration permet de répondre à toutes les exigences en qualité bactérienne et en niveaux d'endotoxines.

Les solutions ORION™ sont idéalement adaptées aux applications suivantes :

- la fabrication pharmaceutique primaire et secondaire,
- la fabrication biopharmaceutique,
- les solutions ophtalmiques,
- les produits de grande consommation,
- l'industrie cosmétique,
- les produits vétérinaires,
- les équipements médicaux.

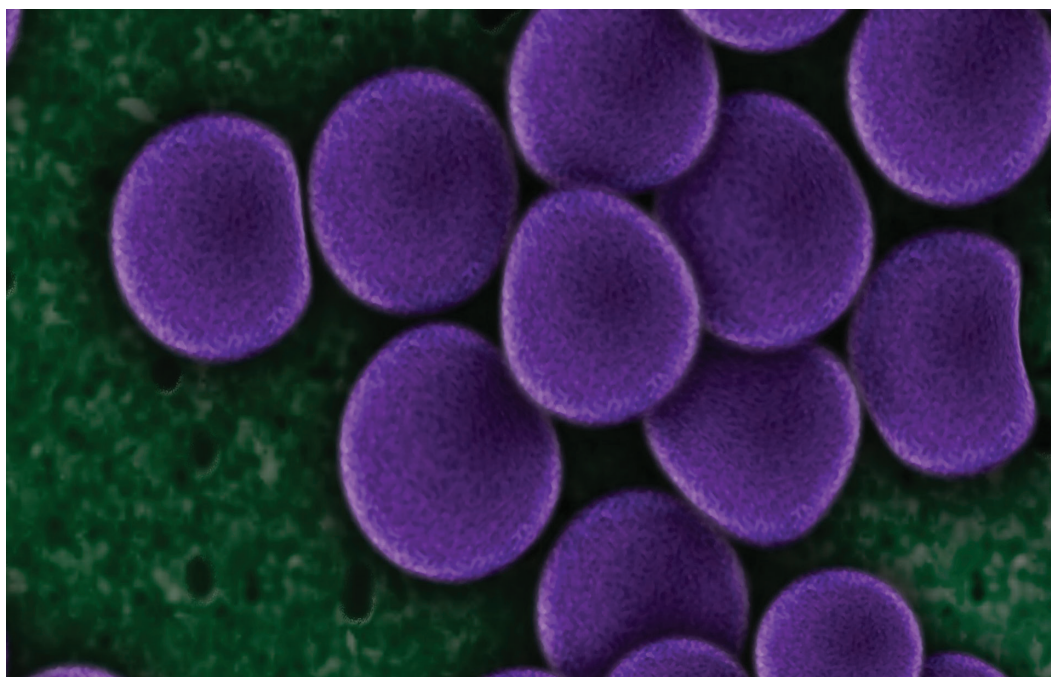
Veolia Water STI

L'Aquarène 1, place Montgolfier - 94117 Saint-Maurice Cedex - France
www.veoliawatersti.com / contact : infosti@veolia.com

Une solution performante pour les dénombrements en temps réel des colonies sur membranes dans l'analyse microbiologique.

Par Sébastien BONOT & Gautier VARIN - APTARPHARMA & Manon LABORIE - Interscience.
sebastien.bonot@aptar.com - mlaborie@interscience.com

Le dénombrement des microorganismes viables sur milieux de cultures gélosés reste la méthode de référence recommandée ou imposée par les différentes normes pour les tests microbiologiques en contrôle libératoire. Il s'agit soit d'un ensemencement direct avec un volume de l'échantillon liquide à analyser (étalement en surface du milieu ou inclusion dans un milieu fondu avant sa prise en masse) soit d'une libération de la biomasse de l'échantillon solide dans un volume liquide qui est filtré sur une membrane (diamètre de pores 0,22 à 0,45 µm) qui sera ensuite déposée sur le milieu de culture approprié.



Les milieux sont ensuite incubés à la température permissive pour les microorganismes à isoler et les colonies qui se sont développées (UFC) sont dénombrées en fin d'incubation traditionnellement par comptage manuel par un technicien.

Bien qu'éprouvées, les techniques basées sur la culture peuvent présenter différents biais de la préparation de l'échantillon à la lecture finale des boîtes (Corry et al., 2007). Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux inconvénients liés plus spécifiquement au dénombrement final, les principaux sont :

- Le temps important consacré au dénombrement : le dénombrement est une étape longue où un ou plusieurs techniciens doivent compter chaque UFC développé et ceci pour un nombre de boîtes de Pétri très importants. Cette activité représente plusieurs heures hebdomadaires dans l'activité d'un laboratoire d'analyses microbiologiques,
- La capacité du technicien à détecter les colonies : et celle-ci peut être impactée par différentes causes uniques ou combinées. Le phénotype des colonies peut rendre compliqué la détection sur un milieu ou une membrane (colonies translucides ou de couleur proche de la membrane ou du milieu). La taille des colonies est également contraignante lorsque celles-ci sont des micro colonies ou au stade précoce de développement. Leur localisation sur les bords des boîtes de Petri peut également entraîner des omissions de certaines colonies. Enfin, une densité importante des colonies sur le milieu va également compliquer la détection de chaque UFC en tant que telle,
- Le phénomène de confluence pendant l'incubation : la lecture des boîtes étant réalisée en fin d'incubation (de 24h à plusieurs jours), certaines colonies peuvent être masquées par d'autres ou se chevaucher, rendant leur détection impossible et/ou ne donnant l'impression de la présence d'une seule colonie alors qu'en réalité ce sont plusieurs colonies,
- Le risque d'erreur au comptage : pour partie intrinsèquement lié à deux points cités

précédemment, le phénomène d'erreur au comptage notamment lorsque les séries de boîtes à compter sont importantes est également récurrent est mis en évidence dans de nombreuses études depuis plusieurs décennies (Fowler et al., 1978 ; Peeler et al., 1982).

A ces risques d'erreurs du dénombrement à la paillasse, s'ajoutent ceux liés au traitement du résultat, involontaires ou dans le but de masquer une non-conformité :

- L'erreur de report du résultat,
- L'oubli du report du résultat,
- La falsification de données,
- L'effacement de données,
- La destruction des données.

Depuis quelques années, la réglementation s'est évertuée à imposer la notion d'intégrité des données.

L'intégrité des données fait référence au maintien et à l'assurance de l'exactitude et de la cohérence des données tout au long de leur cycle de vie, de la conception, de la mise en œuvre et de l'utilisation de tout système qui stocke, traite ou récupère des données. L'intégrité des données est une préoccupation réglementaire clé et pour aider les personnes travaillant dans les produits pharmaceutiques et les soins de santé, des documents ont été publiés par la Food and Drug Administration (FDA, 2018). Elle est devenue désormais une exigence fondamentale du système qualité pharmaceutique décrit au Chapitre 1 des GMP. Les données se réfèrent au système ALCOA et doivent donc être :

- Attribuables : auteur et source identifiés,
- Lisibles : interprétables et à long terme,
- Contemporaines : enregistrées au moment où elles sont collectées,
- Originales ou de copie certifiée,
- Fiables.

Dans ce contexte et pour pallier l'ensemble de ces problématiques, dans une évolution logique des systèmes de détection semi-automatiques ou automatiques qui sont apparus depuis un peu plus de 20 ans, l'émergence de technologies de comptage automatisées avec une gestion informatisée des données à vue le jour. Parmi ces technologies, nous étudierons l'exemple du ScanStation développé par Interscience.

1. Présentation du ScanStation

ScanStation, station d'incubation et de comptage de colonies en temps réel, détecte et compte les colonies dès leur apparition pour 100, 200 ou 300 boîtes de Petri. ScanStation permet la lecture microbienne en temps réel pendant l'incubation. Il fournit des résultats microbiens complets et anticipés pour les laboratoires de contrôle qualité et R&D des industries pharmaceutiques intégrant, une traçabilité complète des données en conformité avec le 21 CFR part 11.

ScanStation a été conçu et développé par Interscience, une société française. L'innovation majeure de ScanStation est de réaliser le comptage automatique des colonies à un stade précoce de leur développement, dès le début du cycle d'incubation. Les boîtes de Petri sont prises en photo à intervalle régulier, toutes les 30 minutes,

(toutes les heures pour le modèle ScanStation 300) délivrant une vidéo de la croissance microbienne. Le résultat final est ainsi connu jusqu'à trois fois plus rapidement par un comptage automatique des colonies, supprimant le travail répétitif, et en dissociant les artéfacts d'origine donc offrant un résultat plus précis et beaucoup plus tôt. La vidéo de croissance accélérée permet de « remonter le temps » et aide à valider les résultats, car l'opérateur peut revoir les premières images afin de déterminer le nombre initial de colonies, identifié par une croix verte.

2. Objectif de l'étude : Vérification de la performance de détection/dénombrement des colonies sur membranes de filtration par ScanStation

Si la validation de la détection des colonies sur des milieux gélosés est validée, la question de la performance de détection sur des membranes de filtration restait à vérifier. De premiers essais avaient été réalisés par Interscience mais uniquement sur des membranes en cellulose. Des travaux préalables dans le cadre de la collaboration Aptar pharma / Interscience, ont permis des améliorations logicielles permettant une détection des colonies sur des membranes en nitrate, acétate et esters de cellulose couramment utilisées en analyses microbiologiques. L'objectif de l'étude suivante est de vérifier les performances de l'appareil pour une détection des UFC sur membranes notamment en définissant :

- Le type de membrane et le programme de l'appareil permettant le meilleur dénombrement,
- Son aptitude à dénombrer des souches bactériennes de phénotypes différents,
- Son seuil de détection maximal et s'assurer que celui-ci est suffisant pour réussir à dénombrer quantitativement un nombre de colonies important proche des 150 UFC (valeur admise comme seuil maximal dénombrable sur membranes).

3. Matériels & Méthodes

3.1 Membranes testées

Quatre références de membranes couramment utilisées dans les contrôles de microbiologiques sont testées :

- Membrane blanche quadrillée en nitrate de cellulose, 0,45µm (Microsart® Sartorius référence : 16D01--25-06--BK)
- Membrane blanche non quadrillée en acétate de cellulose, 0,45µm (Sartorius référence : 11106--47-----N)
- Membrane noire quadrillée en nitrate de cellulose, 0,45µm (Sartorius référence : 16D03--25-H6--BK)
- Membrane noire non quadrillée en esters de cellulose, 0,45µm (Millipore référence : HABP04700)

3.2 Souches microbiennes utilisées

Sept souches sont utilisées dont cinq référencées par la Pharmacopée :

- *Aspergillus brasiliensis* (moisissure) en BioBall 550 (bioMérieux référence : 56011)
- *Bacillus subtilis* (bactérie) en Bioball 550 (bioMérieux référence : 56012)
- *Candida albicans* (levure) en BioBall 550 (bioMérieux référence : 56013)
- *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie) en BioBall 550 (bioMérieux référence : 56017)
- *Staphylococcus aureus* (bactérie) en BioBall 550 (bioMérieux référence : 56019)

→

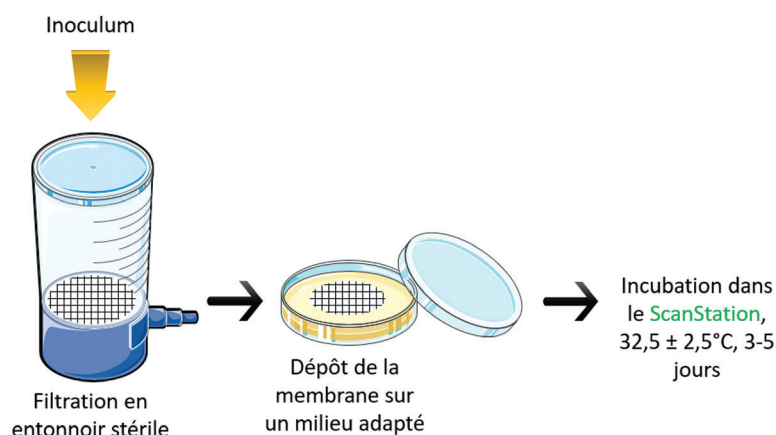


Figure 1 : Protocole général d'ensemencement des membranes

Deux souches isolées des environnements de production (zones non stériles) appelées U1 (colonies beiges translucides) et U2 (colonies blanches).

Les différents essais consistent :

- En des inoculums purs pour chaque souche.
- En inoculums contenant *S.aureus* (33%), *B.subtilis* (33%) et *Paeruginosa* (33%) (Consortium 1).
- En inoculums contenant *S.aureus* (25%), *B.subtilis* (25%) et *Paeruginosa* (25%) *A.brasiliensis* (25%) (Consortium 2).

3.3 Génération des inoculums et ensemencements des membranes

Le protocole d'ensemencement des membranes est résumé dans la Figure 1.

L'inoculum de départ est préparé et amené à la concentration souhaitée. Il est dilué dans un volume de 100 mL de solution saline (0,9%) versé dans l'entonnoir de filtration. Ce volume est filtré au travers de la membrane. La membrane est ensuite prélevée et déposée sur le milieu de culture adapté : TSA-agar pour les bactéries et les consortiums microbiens, et SAB-agar pour les souches de moisissures et levures en cultures pures. Les milieux sont mis en incubation dans ScanStation à 32,5±2,5 °C pendant 3 à 5 jours.

3.4 Détermination des couples "membrane / programme de détection du Scanstation"

ScanStation dispose de différents réglages d'incubation. Ceux-ci font varier l'éclairage des boîtes lors de l'acquisition photographique ainsi que l'algorithme de détection des colonies par le logiciel de traitement d'image. Il existe trois réglages prédéfinis pour les membranes :

- Membrane de filtration blanche papier
- Membrane de filtration blanche polycarbonate
- Membrane de filtration noire

Un premier test réalisé avec *S. aureus* permet d'affilier le programme de ScanStation qui permet la détection la plus optimale pour chaque type de membrane.

Un inoculum commun est utilisé et des fractions de celui-ci sont dilués dans un volume de solution salin 0,9% stérile (100 mL). Ils sont filtrés sur chaque type de membranes. Celles-ci sont ensuite déposées sur des milieux TSA-agar puis incubés dans ScanStation à 32,5±2,5 °C pendant 3 jours. Chaque essai est composé d'une série de 5 membranes pour chaque référence de membrane. Un comptage manuel est réalisé en double afin de déterminer le nombre total de colonies développées sur chaque membrane à l'aide des images prises par l'appareil.

3.5 Détermination du meilleur couple "membrane / programme de détection du ScanStation"

Pour chaque couple programme ScanStation / membrane, des essais de détection sont réalisés avec *S. aureus*, *B. subtilis* et les deux souches usines U1 et U2. Les inoculums et les incubations sont réalisés

comme décrits dans le paragraphe précédent. Les séries sont composées également de 5 membranes.

Un comptage manuel est réalisé en double afin de déterminer le nombre total de colonies développées sur chaque membrane à l'aide des images prises par l'appareil.

3.6 Limite de détection maximale

Des séries d'inoculums purs, de *S.aureus*, *B.subtilis* ou *P.aeruginosa*, obtenues par dilution en cascade au 1/10ème, ont servi pour ensemencer des membranes noires quadrillées (Sartorius). Celles-ci sont déposées sur milieu de culture gélosé type TSA puis mises en incubation dans ScanStation comme décrit précédemment.

4. Résultats et discussions

Les résultats obtenus sont convertis en pourcentages moyens de détection. Idéalement pour considérer une détection efficace le constructeur se fixe un pourcentage de détection de 95 ± 5%.

4.1 Détermination des couples "membrane / programme de détection du ScanStation"

Une première série d'essais a pour but de déterminer quel programme permet une détection en fonction de la membrane utilisée. On note que le programme "membrane de filtration blanche polycarbonate" permet la détection des colonies la plus efficace lorsqu'on utilise des membranes blanches quadrillées ou non (Tableau 1) avec des pourcentages de détection respectifs de 95 ± 3 % et 98 ± 2 %. Pour les membranes noires, le programme "membrane de filtration noire" permet une détection totale. A l'inverse le programme "membrane de filtration blanche papier" ne permet pas de détection des colonies malgré le contraste marqué entre la couleur de la membrane (noire) et celle des colonies (jaune) (Figure 2).

Programme / Membrane	Membrane de Filtration Blanche Polycarbonate	Membrane de Filtration Blanche Papier	Membrane de Filtration Noire
Membrane Blanche Quadrillée			
Membrane Blanche non Quadrillée			
Membrane Noire non Quadrillée			

Figure 2 : Exemple de détections obtenues des colonies de *S. Aureus* par analyse d'images du ScanStation

Programme / Membranes	Membrane de filtration blanche polycarbonate	Membrane de filtration blanche papier	Membrane de filtration noire
Membrane Blanche Quadrillée	95 ± 3 %	88 ± 5 %	
Membrane Blanche non Quadrillée	98 ± 2 %	93 ± 2 %	
Membrane Noire		0 %	100 ± 3 %

Tableau 1 : Pourcentage de détection des colonies de *S. Aureus* sur les différentes références de membranes en fonction du programme du ScanStation utilisé

Pour les essais suivants le programme "membrane de filtration blanche polycarbonate" est utilisé pour une détection sur les membranes blanches et le programme "membrane de filtration noire" est utilisé pour une détection sur des membranes noires.

4.2 Choix du couple "programme ScanStation/membrane" le plus optimal pour la détection des colonies

Trois souches bactériennes ont été testées afin de savoir quel couple programme/ membrane était le plus performant pour détecter des colonies de phénotypes très différents (Tableau 2). Pour *S.aureus*, on note des détections de l'ordre 99 ± 2 % et 98 ± 2 % respectivement pour les membranes noires et les membranes blanches non quadrillées. Pour les membranes blanches quadrillées, le pourcentage de détection est inférieur aux deux autres avec 78 ± 7 %. Notons que des essais menés avec *B.subtilis* sur des membranes blanches quadrillées ou non, montraient cette même tendance. En effet le taux de détection passe de 70 ± 2 % sur des membranes non quadrillées à 19 ± 8 % sur membranes quadrillées. L'analyse des images a permis de montrer que les colonies non détectées étaient systématiquement localisées sur les quadrillages. Il y a donc un effet délétère des quadrillages sur les performances de détection dont il convient de tenir compte pour le choix des membranes blanches.

Pour les deux souches isolées des usines, seules les membranes noires permettent une détection et un dénombrement des colonies de l'ordre de 99 ± 1 % pour la souche type coli et 100 ± 4 %. Aucune détection de ces souches de couleurs claires, n'est observée sur des membranes blanches.

Considérant ces résultats, le choix des membranes noires couplées au programme du ScanStation "membrane de filtration noire" est la combinaison qui semble être le plus adaptée pour détecter différents phénotypes de façon performante.

Membranes / Souches	<i>Staphylococcus aureus</i>	Souche U1	Souche U2
Membrane Blanche Quadrillée	78 ± 7 %	0 %	0 %
Membrane Blanche non Quadrillée	98 ± 2 %	0 %	0 %
Membrane Noire non Quadrillée	99 ± 2 %	99 ± 1 %	100 ± 4 %

Tableau 2 : Pourcentage de détection des colonies de *S. Aureus* et des deux souches usines sur les différentes références de membranes par le programme de détection du ScanStation adapté

Ces résultats ont été confirmés par d'autres séries d'essais sur deux

références de membranes de filtration noires (membranes non quadrillées, Millipore et membranes quadrillées, Sartorius) avec des souches pures et des consortiums mimant une population mixte comme on peut en trouver sur les cultures issues des contrôles (Tableau 3). Les pourcentages de détection sur les membranes noires Sartorius et Millipore sont comparables et respectivement de :

- 100 ± 2 % et 101 ± 2 % pour *S.aureus*
- 100 ± 1 % et 100 % pour *B.subtilis*
- 96 ± 4 % et 88 ± 8 % pour *P.aeruginosa*
- 100 % pour *C.albicans*

Souches / Membranes	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A.brasiliensis</i>	<i>C.albicans</i>	Consortium 1	Consortium 2
Noire quadrillée (Sartorius)	100 ± 2%	100 ± 1%	96 ± 4%	110 ± 17%	100%	96 ± 2%	101 ± 6%
Noire non quadrillée (Millipore)	101 ± 2%	100%	88 ± 8%	161 ± 31%	100%	100 ± 9%	112 ± 21%

Tableau 3 : Pourcentage de détection de différentes souches pures ou en consortium sur deux références de membranes de filtration noires

Les pourcentages de détection de *P.aeruginosa* sont plus faibles car les colonies sont parfois translucides. Ce phénotype peut faire qu'il y a peu de contraste avec la membrane ce qui peut limiter le discernement de certaines colonies par le logiciel. De plus, l'analyse des images a montré qu'une partie des colonies non dénombrées étaient proches d'une autre. Cela crée de la confluence et empêche le dénombrement des deux colonies séparément.

Les pourcentages de détection d'*A.brasiliensis* montrent une grande variabilité de détection sur les deux types de membranes, égales à 110 ± 17 % (membrane Sartorius) et 161 ± 31 % (membrane millipore).

Cette moisissure est blanche et invasive. Sa capacité à se répandre sur la membrane crée une confluence entre les colonies. Cela augmente la densité de mycélium au niveau des zones de confluence et donc une intensification de la couleur blanche. Cette variation de couleur est détectée par le logiciel et une colonie est alors dénombrée par erreur (Figure 3). La première photographie de la Figure 3 montre une membrane noire recouverte par des colonies d'*A.brasiliensis*. Des halos de confluence y sont visibles.

S'agissant des dénombrements des consortiums 1 et 2, les pourcentages de détection sont de :

- 96 ± 2% sur les membranes Sartorius et de 100 ± 9% sur les membranes Millipore pour le Consortium 1,
- 101 ± 6% sur les membrane Sartorius et 112 ± 21% sur les membranes Millipore pour le Consortium 2.

Les dénombrements des consortiums microbiens présentent des



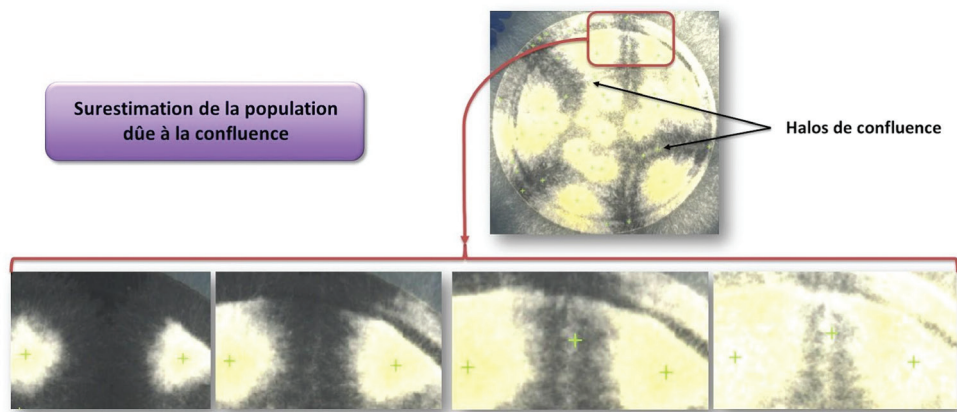


Figure 3 : Illustration d'une surestimation par détection d'un halo de confluence comme colonie à part entière. Exemple de *A. brasiliensis*.

pourcentages de détection proches. L'écart entre le nombre réel de colonies et le nombre de colonies dénombrées est inférieur à 5%. Cependant si l'on analyse les détections par le logiciel sur les images, toutes les colonies ne sont pas dénombrées. Il s'agit d'une compensation numérique. Une erreur de double dénombrement d'une colonie vient compenser une erreur de comptage unique de deux colonies proches. Cette compensation est fréquente notamment lors des dénombrements de *B.subtilis* dans le consortium. L'erreur est mineure mais répétée au cours des analyses. Notons que ce genre d'erreur est rapidement corrigée par la vérification finale du technicien sur l'écran en fin d'incubation.

De la même façon, le même phénomène est observé pour la détection d'*A.brasiliensis*. Le nombre de colonies semble plus surestimé sur les membranes Millipore que sur les membranes Sartorius. Il est difficile d'expliquer cette observation. Une hypothèse serait que la membrane peut avoir une incidence sur le phénotype des colonies d'*A.brasiliensis*. Cette différence d'aspect pourrait influencer la détection des colonies par le logiciel du ScanStation.

4.3 Limite de détection/comptage maximal sur membrane

La limite de détection correspond au nombre de colonies maximal dénombrable sur une membrane de manière quantitative et fiable par le ScanStation.

Le dénombrement manuel est effectué en complétant le dénombrement du ScanStation. Les colonies non dénombrées sont additionnées à la valeur obtenue automatiquement et les dénombrements multiples d'une même colonie sont soustraits. La compilation graphique des 5 séries indépendantes permet de définir une zone où l'on observe une linéarité entre la détection des colonies par le ScanStation et le nombre réellement présent de colonies sur la membrane (Figure 4). Une extrapolation de la zone de perte de linéarité permet de définir de façon approximative une limite de détection maximale de 619 colonies. Considérant qu'au-delà de 150 colonies sur une membrane, celle-ci est considérée comme non comptable, ce résultat met en évidence une performance importante de l'appareil bien au-delà des valeurs maximales exploitables sur membrane de filtration.

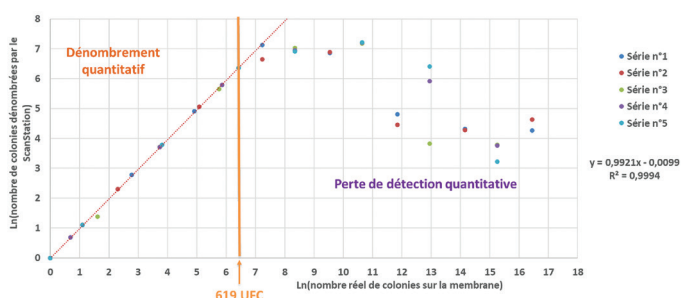


Figure 4 : Estimation de la limite de détection maximale des UFC de *S. aureus* sur membrane noire quadrillée par le ScanStation

Pour confirmer les performances de dénombrement du ScanStation lorsque le nombre de colonies approche de la valeur seuil de 150 UFC, des essais complémentaires ont été réalisés avec des inoculums de *S.aureus*, *B.subtilis* et *P.aeruginosa*. La concentration de ces inoculums est ajustée à 150 UFC. Les pourcentages moyens de dénombrement obtenus sont les suivants :

- *S. aureus* : 100%
- *B. subtilis* : 98 ± 1%
- *P. aeruginosa* : 99 ± 2%

Cela confirme bien la capacité de l'appareil pour une détection d'un nombre important de colonies de phénotypes différents aux valeurs maximales exploitables.

4.4 Erreurs logicielles observées

Différents types d'erreurs de comptage ont pu être faites au fil de nos essais et ainsi recensées pour aider Interscience à améliorer son interface logicielle. Ces observations sont présentées dans le **Tableau 4** Le double dénombrement de colonies (161 occurrences) et le comptage unique de deux colonies très proches/confluentes (49 occurrences) sont les plus présentes. Cela représente des survenues d'erreurs sur un total de 3928 colonies dénombrées réparties sur 122 boîtes. C'est donc une probabilité d'erreur peu importante et ces occurrences sont finalement corrigeables aisément grâce au double contrôle que le technicien effectue en fin d'incubation sur l'écran de l'appareil pour valider le résultat.

Description	Occurrence
Imprécision de comptage dû à une gouttelette d'eau sur le couvercle de la boîte de Petri	1
Comptage unique de deux colonies très proches ou confluentes	49
Double comptage d'une colonie	161
Absence de comptage d'une colonie isolée et/ou bien visible et/ou translucide	5
Dénombrement d'artéfact(s)	1
Micro-colonie non-dénombrée	10
Absence de comptage d'une colonie recouverte par une autre	12

Tableau 4 : Erreurs de détection logicielle recensées pendant les essais

Conclusion

Cette étude permet de confirmer les capacités des incubateurs de la gamme ScanStation pour une détection des colonies microbiennes sur membranes. Il convient de noter qu'en l'état actuel de la solution logicielle embarquée dans l'appareil, la détection n'est efficace que si l'on utilise des membranes de filtration de couleur noire avec le programme de l'appareil "membrane de filtration noire". Il sera cependant important de tester plusieurs références de membranes noires afin de choisir celle permettant le développement de la plus grande part de la microflore à détecter. Cette étape incontournable reste cependant une validation assez supportable pour un laboratoire puisqu'elle ne demande que de vérifier un élément précis et non l'ensemble d'une technique.

Les performances de détection/ comptage sont d'ailleurs

largement suffisantes puisque la détection est quantitative pour des nombres de colonies supérieurs ou égaux à 150, qui reste la valeur maximale que l'on définit sur une membrane en analyse microbiologique.

Au cours de ces essais, différentes erreurs de détection et comptage ont pu être recensées. Elles restent finalement mineures comparées au volume de boîtes analysées. L'amélioration logicielle continue proposée par le fournisseur pourra probablement permettre d'en résoudre une majeure partie. Ces erreurs sont d'autant plus à relativiser, qu'en plus de leur faible occurrence, en fin d'incubation, une vérification des analyses photographiques et des détections de colonies sont contrôlées par un technicien qui pourra repérer et corriger ces anomalies de comptage au travers d'une interface informatique où la moindre modification d'analyse est tracée et sécurisée.

C'est donc une véritable solution technique en phase avec

- (1) les exigences de la "data integrity",
- (2) les exigences de précisions du résultat d'analyse et
- (3) qui permettra de libérer un temps d'activité technicien considérable qui pourra être dédié à des activités toujours plus grandissantes dans les laboratoires d'analyses microbiologiques en libérateur.

References

1. Corry J. E. L., Jarvis B., Passmore S., Hedges A., 2007, A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms, *Food Microbiology*, 24, 230-253.
2. FDA, 2018, Data Integrity and Compliance With Drug CGMP Questions and Answers Guidance for Industry, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/data-integrity-and-compliance-drug-cgmp-questions-and-answers-guidance-industry>
3. Fowler, J.L., Clark, W.S., Foster, J.F., Hopkins, A., 1978. Analyst variation in doing the standard plate count as described in Standard Methods for the Examination of Dairy Products. *J. Food Prot.* 41, 4-7.
4. Peeler, J.T., Leslie, J.E., Danielson, J.W., Messer, J.W., 1982. Replicate counting errors by analysts and bacterial colony counters. *J. Food Prot.* 45, 238-240.

Glossaire

FDA : Food Drug Administration

SAB : sabouraud dextrose

TNCT : Too number to count

TSA : gélose trypticase soja

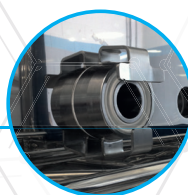
UCF : Unité formant colonie



CONFORME AUX STANDARDS PHARMA (cGMP, GAMP5, ASME-BPE, FDA INCL. 21CFR PART 11, ISPE)
POUR UN PROCÉDÉ TOTALEMENT VALIDÉ



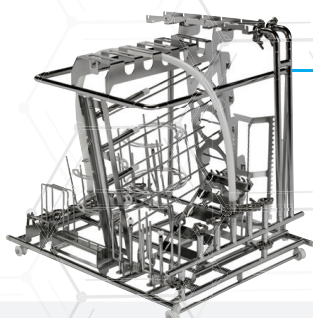
LAVAGE PERFORMANT VIA DES BRAS DE LAVAGE ROTATIFS
ET UNE CONNEXION À VERROUILLAGE RAPIDE POUR UN PANIER



PANIER SUR-MESURE POUR LAVER TOUT TYPE DE PIÈCES
(VERRERIE, FLEXIBLES, PIÈCES DE MACHINES, VANNES, POMPES, ...)



EMPREINTE AU SOL RÉDUITE
POUR 3 TAILLES DE CHAMBRE (400L, 800L ET 1200L)



DOING OUR PART...



TO ENSURE A HEALTHY WORLD

Pursuing Sustainability Excellence

Specializing in chromogenic and turbidimetric reagent technologies, Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) has been a global leader in endotoxin and (1→3)-β-D-glucans detection products and services. Since 2011, ACC has had a growing commitment to taking a responsible role in making sure we do our part to ensure that we reduce the environmental footprint on our operations. We endeavor to work with partners and suppliers who share common goals and contributions to collectively operate in a sustainable manner to benefit the environment.



Associates of Cape Cod Int'l., Inc.

Your Endotoxin & Glucan Experts

www.acciuk.co.uk • (+44) 151.547.7444