

RETOUR D'EXPERIENCE SUR LA VALIDATION DE L'EFFICACITE DES DESINFECTANTS SUR L'ENVIRONNEMENT SELON L'ANNEXE 1 DES BPF/EU GMP EN REVISION

F.Polyn¹, J-Y Biname²

¹ HeX Lab, Portes des Bâtisseurs, 145 – 7730 ESTAIMPUIS

² IRE Elit, Avenue de l'Esperance, 1 – 6220 FLEURUS

L'Institut des Radio Eléments de Fleurus produit, au niveau de sa filiale IRE ELiT, des générateurs de radio isotopes destinés à l'imagerie médicale et au traitement des cancers. Les opérations de production y sont réalisées dans des isolateurs blindés en milieu aseptique. Le contrôle de la contamination microbiologique est au cœur des activités d'IRE.

Récemment, il a été nécessaire de caractériser la flore locale en vue de démontrer l'efficacité des produits utilisés pour la désinfection des isolateurs en grade A. IRE Elit s'est rapproché d'HeX Lab pour réaliser cette étude.

1. EVALUATION DE L'ECOLOGIE MICROBIENNE DE L'ENVIRONNEMENT DE PRODUCTION

IRE Elit, comme l'ensemble des industriels pharmaceutiques, réalise une surveillance microbiologique environnementale régulière de ses zones de production. La conformité aux critères cibles définis dans les Eu GMP ne comprend que le dénombrement des UFC (Unité Formant Colonie), sans identification.

Figure 1 – Extrait des BPF (N°2015/12 bis).

19. Recommandations pour la surveillance microbiologique des zones à atmosphère contrôlée durant la production.

| Limites recommandées de contamination microbiologique (a) | | | | |
|---|---|--|---|--|
| Classe | Echantillon d'air ufc/m ³ | boîtes de Pétri (diam.:90 mm), ufc/4heures (b) | géloses de contact (diam. :55 mm), ufc/plaque | empreintes de gant (5 doigts) ufc/gant |
| A | <1 | <1 | <1 | <1 |
| B | 10 | 5 | 5 | 5 |
| C | 100 | 50 | 25 | - |
| D | 200 | 100 | 50 | - |

Notes :

(a) Il s'agit de valeurs moyennes.

(b) Certaines boîtes de Pétri peuvent être exposées pendant moins de quatre heures.

Hors, l'annexe 1 des GMP (opposable au niveau européen) en cours de révision met en avant dans le chapitre 9.33 l'identification au genre et à l'espèce les microorganismes détectés en grade A et B, ainsi que dans les grades C et D selon une stratégie de contrôle de contamination définie par l'industriel. Cette notion qualitative de la contamination

retrouvée dans les zones classées, au-delà de l'aspect quantitatif, nécessite une étude documentée de l'écologie microbienne des environnements de production.

Cette évaluation peut se réaliser :

- En contrôle de routine par l'identification des OOS (Out Of Specification), des boîtes non dénombrables, en présence de microorganismes indicateurs dont des moisissures. Bien qu'imposée dans la révision de l'annexe 1, cette approche n'est pas représentative de l'écologie globale de l'environnement de production puisque les identifications sont réalisées sur un échantillonnage des points de contrôle de routine lui-même réduit par rapport au nombre de points de la qualification de performance.
- En phase de qualification de performance de nouveaux locaux sur l'ensemble des points de prélèvement (surface, air actif et air passif). Généralement, seuls des dénombrements ont été réalisés. Lorsque des identifications ont été menées, seuls les OOS ont été traités.
- Hors qualification de performance ou contrôle de routine pour des locaux qualifiés. C'est la stratégie choisie par IRE Elit.

1.1. Plan d'échantillonnage

La remarque de l'inspecteur FDA portait sur l'isolateur en grade A. Les résultats du monitoring étant conformes à la cible en routine (<1 UFC sur les différents piliers du monitoring) et il n'était pas possible d'identifier des micro-organismes issus de cet environnement. L'évaluation de l'écologie microbienne a donc été réalisée dans le local de l'isolateur, le SAS d'accès et pas-box en grade C, partant du principe que les microorganismes qui pourrait être retrouvés dans l'isolateur proviendraient forcément de l'environnement de l'isolateur.

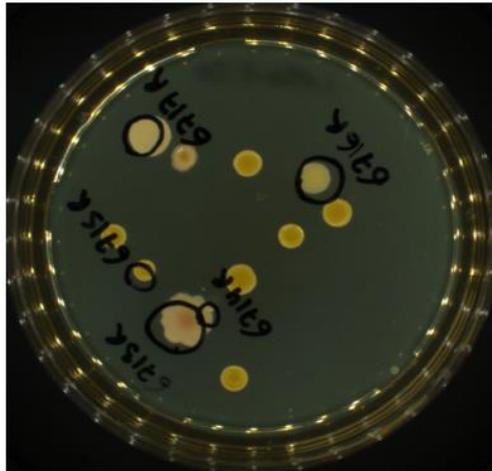
Le plan d'échantillonnage du local et de ces accès est issu de l'analyse de risque réalisée en cours de production. Cette analyse prend en compte le croisement des circuits et des manipulations des opérateurs de production, des matières premières et du produit. Au total, 22 points en surface, air actif et air passif ont été prélevés sur 3 runs en activité. Les résultats n'ont pas été comparés aux critères cibles s'agissant de runs pour identification microbienne hors contrôle de routine.

1.2. Sélection des souches à identifier

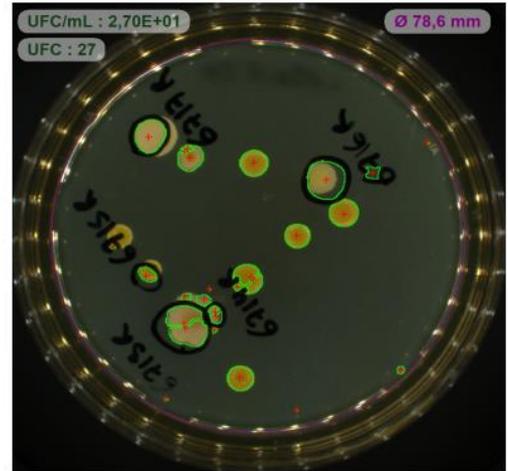
Sur les 22 points prélevés au 3 -ème run, 327 UFC ont été dénombrées au total dont 325 bactéries et 2 moisissures. Une pré-sélection des souches à identifier à été réalisée sur la base du mode opératoire d'identification des microorganismes d'HeX Lab sous portée d'accréditation également. Le principe consiste à réaliser des observations macroscopique et microscopiques le cas échéant afin de différencier les colonies microbiennes différentes retrouvées sur la boîte de Pétri, par point de prélèvement. Une photo de la sélection des souches retenue par point est réalisée par Scan 1200 dont le dénombrement automatique n'est pas pris en compte par manque de reproductibilité. Seul le dénombrement manuel est pris en compte et validé.

Figure 2 – Traçabilité sélection des souches

interscience



Echantillon



Echantillon analysé avec SCAN 1200®, version 8.0.7.0

| | | | | | |
|-----------------|---------------------|------------------|-------|------------|----------|
| Nom opérateur : | pool6 | N° échantillon : | 55 | UFC/mL : | 2,70E+01 |
| Réglages : | Flore totale | Nbre d'UFC : | 27 | Dilution : | 1 |
| Date Heure : | 20/12/2018 14:31:03 | Surface (%) : | 100 % | | |

Sur les 327 UFC dénombrées dans le run retenu de 22 prélèvements, 80 colonies bactériennes et 2 colonies fongiques ont été sélectionnées soit entre 3 et 4 colonies par boîte pour ce local en grade C. C'est, par expérience, cette proportion qui est retrouvée sur des grades C avec un bon niveau de maîtrise de la contamination microbiologique. Pour des grades D, nous retrouvons empiriquement entre 4 et 8 colonies morphologiquement différentes.

1.3. Choix de la méthode d'identification

Les critères morphologiques et biochimiques ont permis durant de nombreuses années d'identifier des souches isolées à partir de prélèvements biologiques. La technologie permet aujourd'hui en 24h à 48h et par une approche génétique, une identification précise à l'espèce de souches isolées d'origine biologique et environnementale. Parmi les méthodes disponibles sur le marché aujourd'hui, on retrouve le séquençage du gène codant l'ARNr16S. Basée sur une amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR) couplée au séquençage par la méthode SANGER des fragments obtenus, cette technique consiste à :

- Décrypter en premier lieu le gène codant l'Acide Ribonucléique Ribosomique (ARN) 16S
- Réaliser la comparaison des séquences obtenues sur des bases de données internationales (EMBL, NCBI, BiBi, Genebank, ...), afin d'identifier le genre et l'espèce bactérienne ayant la plus grande homologie de séquence avec la souche inconnue.

Le gène codant l'ARNr16S est un gène constitué d'une alternance de régions dites conservées et de régions hypervariables (V1 à V9). La composition nucléotidique de ces dernières est suffisamment discriminante pour une identification à l'espèce. Pour certains genres bactériens ayant une homologie de séquence forte inter-espèce, cette approche est alors complétée par le séquençage d'un ou plusieurs gènes plus variables au sein d'un même genre (sodA, rpoB, gyrB, hsp65, ADNr23S, ...).

L'identification au niveau génétique, par sa précision, apporte indéniablement un avantage dans l'analyse de cartographies d'écologie microbienne.

La fiabilité de l'identification est également importante pour la mise en collection des souches issues des prélèvements nécessaire pour des comparaisons éventuelles avec des contaminants du produit ou des essais d'efficacité des produits désinfectants utilisés. C'est pourquoi cette méthode d'identification est retenue par HeX Lab.

1.4. Cartographie de l'écologie microbienne

Le résultat de l'identification génétique précise le genre, l'espèce et le pourcentage d'homologie de la séquence à la base de données prise en référence (par exemple : *Kocuria rhizophila* identifiée à 99.706 % ou à 99.701 %).

Sur les 80 souches bactériennes identifiées par séquençage génétique, 36 souches différentes ont été retrouvées au genre et à l'espèce et 47 souches différentes au genre, à l'espèce et en pourcentage. Les 2 souches fongiques sont identiques à l'identification.

Cette cartographie permet de mieux appréhender l'écologie microbienne des zones classées. En tenant compte du nombre d'UFC de chacune des souches identifiées, 26 souches sur 36 présentent une occurrence <2% et 6 souches représentant 50% des UFC dénombrés.

1.5. Conservation des souches physique et digitale

La conservation des souches microbiologiques à plusieurs objectifs. Le premier est d'assurer le maintien de la pureté de la souche. Cette pureté doit être vérifiée à la mise en collection et lors de la préparation d'un nouveau lot de souches. Le deuxième est d'assurer la reviviscence de la souche en cas de besoin (essais de biocide, comparaison de souches lors d'une contamination...). Le troisième objectif est de maintenir la sensibilité naturelle de la souche aux produits et procédés de désinfection. Il est en effet important

que la méthode de conservation n'altère pas la résistance d'une souche aux molécules actives composant les produits de désinfection.

Seules les conditions définies dans la norme EN 12353 :2013 relatives à la conservation des microorganismes d'essai utilisés pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide permet de garantir ces 3 objectifs. C'est pourquoi cette méthode est retenue par HeX Lab.

Associée à cette conservation « physique » de souches, la conservation digitale des données d'identification est possible par le séquençage génétique. Chaque identification est établie par la comparaison des données de séquençage aux bases de données internationales.

Figure 3 – exemple de données de séquençage d'un *Staphylococcus epidermidis* (100% d'homologie à la base de données)

```
GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACT
GGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCATTATAGATGGATCCGCGCCGCAT
TAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTGTATTAGGGAAGAACA
AATGTGTAAGTAACTATGCACGCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGG
AAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGT
GGGGATCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGGAAGAACCTTA
CCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTGTCTGCTAG
```

Le code génétique de la souche est quant à lui conservé sans durée. Cette base de données propre à chaque environnement de production peut être enrichie des nouvelles souches identifiées. Enrichie d'une codification des données de prélèvement dont son issues les souches stockées, elle forme un outil fiable d'analyse de tendance et à terme prédictif de maîtrise de la contamination.

2. SELECTION DES SOUCHES ET DES MATERIAUX A TESTER

Cette étape est importante pour la représentativité des essais réalisés. Compte tenu du nombre de souches différentes retrouvées pour un plan d'échantillonnage de 22 points de prélèvements et des différents matériaux composant la zone de production, il est nécessaire de sélectionner les microorganismes par un système de cotation multifactoriel d'évaluation du risque.

L'AMDEC « **Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité** » est une méthode d'analyse des risques. L'AMDEC est à l'origine une méthode utilisée dans la gestion de la qualité. Elle est aujourd'hui souvent utilisée lorsqu'il s'agit d'identifier les risques d'un projet et les mesures à prendre pour les réduire. Adaptée au monde industriel, son principe de cotation s'applique parfaitement à l'évaluation d'un risque de contamination et donc au choix de souche les plus critiques vis-à-vis des procédures de nettoyage et désinfection.

2.1. Choix de souches :

2.1.1. Détermination des risques liés aux microorganismes identifiés dans l'écologie microbienne de la zone

Les facteurs de risque pour chaque micro-organisme ont été définis conjointement entre HeX LaB et IRE :

- L'occurrence : fréquence d'apparition de chaque micro-organisme en pourcentage de la population totale,
- La pathogénicité : établie entre autres sur la base des publications PubMed développée et maintenue par le Centre national d'information sur la biotechnologie (National Center for Biotechnology Information - NCBI) de la National Library of Medicine®,
- La sensibilité à l'isopropanol, base du produit IPA à tester, selon l'étude « Antiseptique et Désinfection » 1996. B Joly, J. Freney.

Ces facteurs sont propres à chaque situation. Ils résultent d'une analyse des procédures de nettoyage et désinfection, de l'étude des dossiers scientifiques d'efficacité des produits désinfectants, de l'écologie propre à chacun des environnements (présence de germes sporulants, de flore fongiques...).

2.1.2. La cotation des facteurs risques

Une fois définis, les facteurs doivent être cotés selon une note de 1 à 4 ou 5 dans le cas présent. Cette gradation de la cotation est à définir également en fonction des facteurs retenus. Par exemple, si la capacité de sporuler ou pas des microorganismes est retenue, seul 2 niveaux de cotation sera à prendre en compte. La figure 3 présente le tableau de cotation proposée, discutée et validée conjointement entre HeX Lab et IRE.

Figure 3 – tableau de critère pour la cotation du risque

| Occurrence | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Note | Critère |
| 1 | < 2% |
| 2 | < 6% |
| 3 | < 8% |
| 4 | < 10% |
| 5 | ≥ 10 % |
| Sensibilité à l'Isopropanol | |
| Note | Critère |
| 1 | +++ |
| 2 | ++ |
| 3 | + |
| 4 | 0 |
| Commensale | |
| Note | Critère |
| 1 | Commensale non pathogène |
| 2 | Commensale pathogène |
| 3 | Pathogène opportuniste |
| 4 | Pathogène spécifique |

2.1.3. L'analyse AMDEC proprement dite

La dernière phase consiste à coter chaque microorganisme selon les critères définis et de réaliser le produit des 3 critères. La cotation globale de chaque microorganisme peut osciller de 1 à 80. A l'issue de l'analyse, 5 souches bactériennes et la seule souche fongique ont été retenues pour la réalisation des essais d'efficacité de la méthode de nettoyage IRE :

- Janibacter sp coté 20,
- Micrococcus luteus coté 16,
- Staphylococcus epidermidis coté 16,
- Staphylococcus haemolyticus coté 12,
- Zimmermannella faecalis coté 10,
- Cladosporium ramotenellum / Cladosporium bruhnei sélectionnée comme seule souche fongique retrouvé.

2.2. Sélection des matériaux

A cette étape, il est nécessaire d'inventorier les matières différentes retrouvées dans l'environnement de production. On retrouve généralement de l'inox ou de l'époxy pour les équipements, des résines, du Trespa, du Corian, du compact, des vitres... Dans le cas présent, le choix du composant principal de l'isolateur à savoir l'inox a été retenu comme matière d'essais. Le choix de cette matière permet également de se conformer aux supports des normes européennes d'essais des antiseptiques et désinfectant (cf chapitre 3.1).

3. ESSAIS DE BIOCIDIE

L'objectif de ces essais est de vérifier l'efficacité des produits de nettoyage et désinfection sur l'écologie microbienne de l'environnement des zones de production. Même si les produits mis sur le marché ont leur efficacité testée par des laboratoires indépendant, ces essais sont réalisés dans des conditions standardisées (souches de référence internationales, temps de contact du produit...) qui ne sont pas forcément significatives des conditions d'utilisation.

3.1. Principe des essais de biocide selon les méthodologies EN

La normalisation européenne des essais d'efficacité des antiseptiques et désinfectants est organisée autour de :

- 3 groupes de produits : Le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité, en médecine humaine et dans le domaine vétérinaire
- Différentes phases d'essais : Phase 1 (contact direct du produit et des microorganismes), Phase 2/1 (présence de substances interférentes), Phase 2/2 (essais surfaciques)
- Différents spectres d'activité (bactéricide, fongicide, sporicide, virucide)

Dans le cadre de cette étude, la norme EN 13697 de juin 2015 : Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité - Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2) a été retenue pour les essais. Les essais ont été menés en parallèle avec action mécanique simulant le mode opératoire de nettoyage et désinfection d'IRE du local concerné.

Le produit testé étant uniquement désinfectant, la substance interférente retenue est l'albumine bovine 0,3 g/l (conditions de propreté). Le support sélectionné est celui de la

norme à savoir des disques en acier inoxydable (304, nuance 2B, finition bilatérale, 2 cm de diamètre).

Le taux de réduction attendu est défini dans les normes européennes. Pour la norme EN 13697, il est fixé à 4 log de réduction pour la bactéricidie et 3 log pour la fongicidie. D'autres objectifs cibles de réduction peuvent être pris en compte, notamment ceux de l'USP.

3.2. Résultats des essais

Les essais ont été menés sur une période d'un mois selon les paramètres suivants :

- 6 souches sélectionnées par l'étude AMDEC
- Sans action mécanique (IPA 70/30 à 3 concentrations)
- Avec action mécanique (essuyage au wipe imbibé d'IPA 70/30 à 3 concentrations)

Figure 4 – tableau de synthèse des résultats obtenus

| Souches testées | Réduction logarithmique attendue | Essais sans action mécanique | | | Essais avec action mécanique | | |
|---|----------------------------------|---|--------|--------|------------------------------|--------|--------|
| | | Réductions logarithmiques obtenues aux concentrations en % (v/v) du produit à tester: | | | | | |
| | | 100 % | 50 % | 25 % | 100 % | 50 % | 25% |
| <i>Janibaceter sp.</i> | ≥ 4 | > 6,83 | > 6,83 | < 1,41 | > 6,83 | > 6,83 | > 6,83 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | | > 7,07 | > 7,07 | < 1,65 | > 7,07 | > 7,07 | 3,63 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | | > 6,78 | > 6,78 | < 1,36 | < 6,78 | > 6,78 | 2,36 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | > 6,70 | > 6,70 | < 1,28 | > 6,70 | > 6,70 | 2,97 |
| <i>Zimmermannella faecalis</i> | | > 7,09 | > 7,09 | < 1,67 | > 6,70 | > 6,70 | 1,73 |
| <i>Cladosporium ramotenellum / Cladosporium bruhnei</i> | ≥ 3 | > 5,36 | > 5,36 | > 5,36 | > 5,36 | > 5,36 | > 5,36 |

Pour chacune des souches testées, le protocole de désinfection entraîne une réduction logarithmique de la population initiale conforme aux exigences de la norme EN 13697.

4. CONCLUSION

Les essais réalisés, selon la méthodologie de la norme EN13967 du 20 juin 2015, montrent que le désinfectant utilisé par IRE ELiT, conformément au mode opératoire de nettoyage, atteint le niveau d'efficacité attendu pour la flore locale présente dans les isolateurs de production.

Les essais complémentaires, montrent que le désinfectant dilué à 50% reste efficace vis-à-vis de cette flore locale.

Cette connaissance de l'écosystème local permettra une résolution plus aisée des potentiels hors spécification relevé lors des divers prélèvements de routine, par l'identification et la concordance avec les souches de référence.

Les microorganismes testés sont conservés dans une banque de donnée.

5. REFERENCES

- BPF (N°2015/12 bis)
- EN 13697 de juin 2015 : Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité - Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2)
- 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
- « Antiseptique et Désinfection » : 1996. B Joly, J. Freney
- La diversité insoupçonnée du monde microbien : Catherine Dauga, Joël Doré, Abdelghani Sghir