

INDICATEURS BIOLOGIQUES

Validation de la procédure de décontamination au peroxyde d'hydrogène sans Rogue BI's

Par SÉVERINE ITER, CHRISTIAN POINSOT, Icare

Cet article propose six éléments clés en vue de la fabrication d'indicateurs biologiques sans Rogue BI's pour la validation de systèmes de décontamination/stérilisation. De leur qualité dépend l'obtention de résultats répétables et reproductibles.

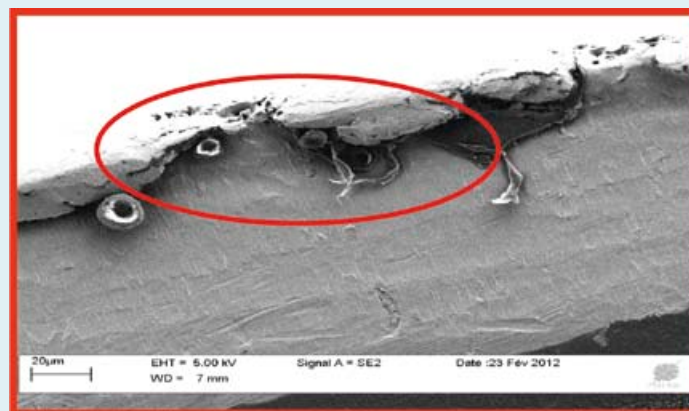
Pour éviter des problèmes de validation liés à la présence d'indicateurs biologiques plus résistants que la moyenne du lot (appelés communément Rogue BI's), leur fabrication doit être parfaitement maîtrisée. Ceci implique une parfaite maîtrise des différents paramètres du procédé de fabrication et de contrôle. De nombreuses variations des différents éléments clés du produit peuvent avoir un impact sur la qualification du process des utilisateurs. Les dispositions à mettre en œuvre pour fabriquer des indicateurs biologiques destinés à la validation de système de décontamination/stérilisation en s'affranchissant des Rogue BI's sont basées sur six

éléments clés : le support appelé aussi porte-germe, la suspension de microorganismes, l'inoculation, la numération, la valeur D, la concentration en microorganismes par BI, et la présentation (packaging) du BI.

Choix du type de support/porte germe

Le porte-germe doit être représentatif de ce que l'on souhaite valider. Il convient de privilégier l'utilisation de portes-germes inoculés et non d'indicateurs biologiques, car il s'agit d'une décontamination de surface (les bandelettes et supports à utiliser emballés ne sont pas appropriés). Il doit être représentatif et il faut définir un compromis pour le choix de la

1 Présence de multicouche de spores



matière. Très souvent, le choix est orienté vers un support en inox type 316L, avec un état de surface (Ra) maîtrisé.

Le traitement appliqué sur les supports inox doit permettre de s'affranchir du risque de rayure de la tôle de matière en créant une sorte de polissage de la surface (écrêtement des zones incisives). Si le support comporte des « cavités », comme le montre la **figure 1**, il y aura un risque important de présence de multicouche de spores lors de l'inoculation, donc un risque de présence de Rogue BI's.

La maîtrise est obtenue grâce au traitement de surface appliqué, contrôlé et répétable.

Chaque lot doit être contrôlé selon un plan de contrôle défini avec le fabricant. Un contrôle *via* la microscopie électronique à balayage (MEB) peut être effectué sur des supports de chaque lot de matière et doit montrer une homogénéité de traitement, comme représenté sur la **figure 2**. Le fabricant des supports doit être un fournisseur classé comme « critique », certifié ISO 9001. La fabrication des supports est ➡

→ réalisée selon un cahier des charges et des procédures opératoires spécifiques (SOP).

Choix de la suspension de la souche

Quel type de microorganisme ?

Le choix de la suspension est fonction du traitement appliqué. Si la décontamination est à l'acide peracétique, on utilise des spores de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ou des spores de *Bacillus subtilis* (*atrophaeus*) ATCC 9372. En revanche, si la décontamination est au peroxyde d'hydrogène,

on utilise des spores de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ou, parfois, ATCC 12980.

Un germe de l'environnement des zones à décontaminer peut être envisagé pour la fabrication du BI dans des cas où celui-ci présente une résistance plus importante.

Quelle qualité ?

La qualité de la suspension est primordiale. L'absence de formes végétatives est à vérifier sur la suspension mère, à réception. Elle doit être homogène en intra-lot et inter-lot. Le moyen le plus fiable est une observation en MEB. Ce

critère doit être pris en compte pour établir le choix du fournisseur. La qualité doit être stable dans le temps. La **figure 3** représente une suspension de qualité insatisfaisante, tandis que la **figure 4** représente une suspension satisfaisante.

Par ailleurs, une maîtrise de la pureté est indispensable afin de ne pas avoir de risque de numération incorrecte et de valeur D non reproductible ou non répétable. La **figure 5** représente une suspension non pure ayant pour risque d'entraîner la présence de Rogue BI's lors de la validation du process

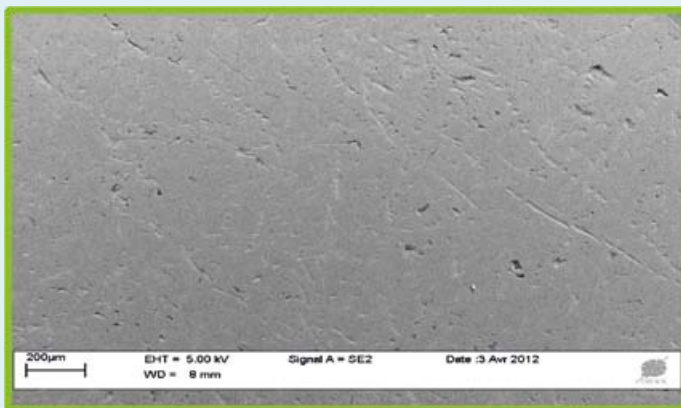
de décontamination. Cette qualité insatisfaisante de suspension a un impact direct sur la valeur D, qui est, dans ce cas précis, supérieure à celle déterminée avec une suspension pure.

Inoculation et fabrication du BI

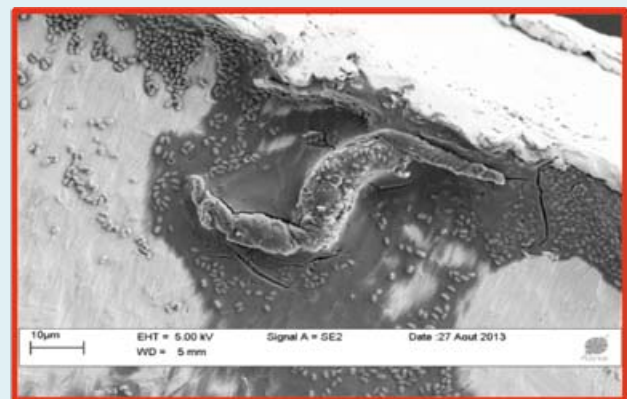
Il est important d'obtenir une monocouche. Les suspensions doivent être déposées en monocouche (**figure 7**) et non en multicouche (**figure 6**).

Cette monocouche n'est obtenue que s'il y a une parfaite maîtrise de la pureté de la suspension et

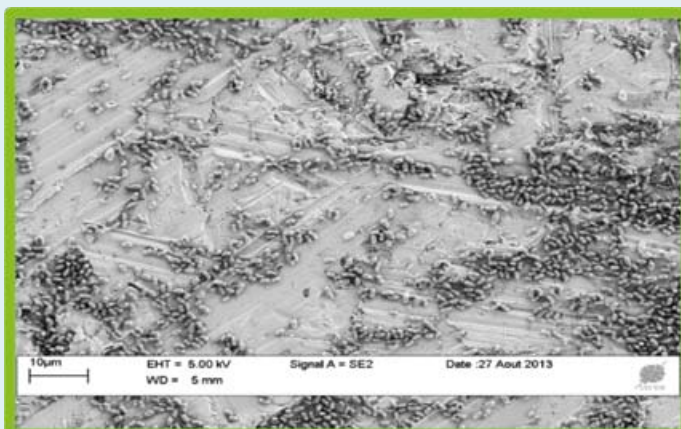
2 Homogénéité de traitement



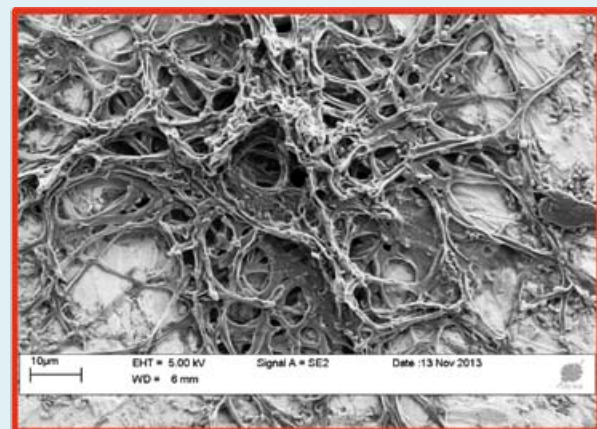
3 Suspension de qualité insatisfaisante



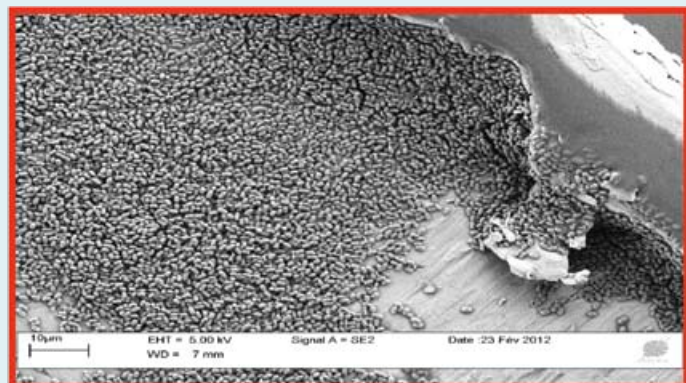
4 Suspension satisfaisante



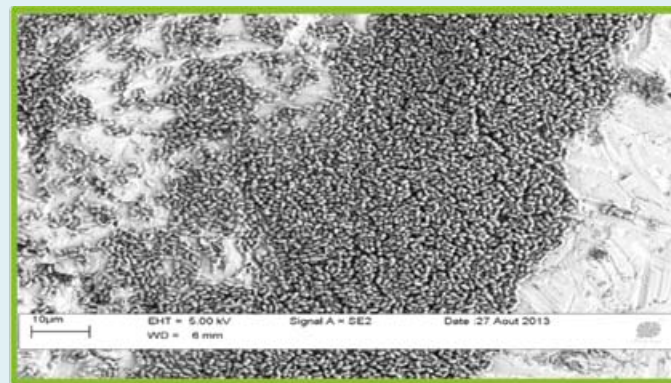
5 Suspension non pure



6 Suspensions déposées en multicouche



7 Suspensions déposées en monocouche



de la qualité du support (régularité de l'état de surface). Ce qu'il est important d'obtenir est une absence d'effet de bord lors du dessèchement du dépôt. La monocouche est très importante afin de ne pas impacter la pénétration du gaz, la valeur D et la numération.

S'il y a présence d'un effet de bord, il n'y a aucune maîtrise de la numération et de la valeur D (absence de reproductibilité et de répétabilité inter- et intra-lot).

La concentration de l'inocula et la numération

Il est important de définir le niveau requis d'inactivation. Ce niveau peut être minimisé si le procédé présente une faible biocharge en routine (à déterminer en fonction des analyses de tendance des contrôles environnementaux de routine). Il est possible d'utiliser des BI de 10^3 spores par BI à 10^6 spores par BI. Plus la concentration est élevée, plus le risque de Rogue BI's est élevé.

Une analyse de risque du procédé permet de déterminer le niveau acceptable pour la concentration

à utiliser sur les supports.

Les textes réglementaires tels que :

- USP36 - USP 36 - <1028> Sterility testing - Validation of isolator systems - § Performance Qualification (PQ) : Decontamination validation...

"Total kill analysis studies are suitable for Bis with a population of 10^3 spores per unit, while fraction negative studies are suitable for Bis with a Population of 10^5 or greater".

- FDA Guidance for industry - Sterile Drug Products - Produced by aseptic Processing - Current Good Manufacturing practice - § D.2 Decontamination - Efficacy - "An appropriate, quantified Biological Indicator (BI) (...) Normally, a four- to six log reduction can be justified depending on the application. The specify BI spore titer used and the selection of BI placement sites should be justified. For example, demonstration of a four log reduction should be sufficient for controlled, very low bioburden materials introduced into a transfer isolator, including wrapped sterile supplies that are briefly exposed to the surrounding clean-room environment."

- PDA - Technical Report N° 51 - § 7.3.1 - Cycle Development Approaches - "Cycle development

starts with the definition of the required level of inactivation in terms of Bis. Sporocidal gassing cycles for critical areas used in aseptic processing are commonly validated to a minimum of 6-log reduction using biological indicators. Lower levels of log reduction may be acceptable in areas or on surfaces where risk of biocontamination transfer has been assessed as low. Cycle that are not characterized may have unacceptable process variability. The methodology for cycle development should be defined and documented, and should include the determination of critical and key operational parameters based on challenge studies using Bis (...)"

apportent des informations sur la possibilité de diminuer le nombre de spores par indicateur biologique si la biocharge du process est faible. Il est autorisé d'utiliser un BI avec une concentration comprise entre 10^3 et 10^6 spores. Chaque lot d'indicateur biologique doit être numéré après sa fabrication. Pour cela, une procédure opératoire doit être définie, adaptée et validée. La numération doit être réalisée par un opérateur habilité à la méthode de numération.

Une validation complète doit être menée au préalable afin de vérifier la stabilité dans le temps, en fonction des conditions de stockage et de transport. Cette validation permet de définir le délai de péremption applicable.

Une numération est incorrecte si les points suivants ne sont pas respectés :

- Qualité de la suspension maîtrisée. Afin de vérifier la stabilité de la qualité de la suspension, une maîtrise du fournisseur est nécessaire via des audits. À cela, on peut ajouter le contrôle à réception des suspensions via la numération des formes végétatives et sporulées et via la réalisation de figure MEB ;
- Support du BI maîtrisé. Afin de vérifier la reproductibilité de la qualité du support, une maîtrise du fournisseur est nécessaire via des audits, les contrôles de chaque lot selon un cahier des charges et la réalisation de photo MEB ;
- Inoculation maîtrisée. Une maîtrise du fabricant de BI doit être suivie via des audits, les contrôles à réception de chaque lot via la numération et une réalisation de photo MEB pour chaque lot de suspension. Si tous ces critères sont ➡

→ respectés et suivis dans le temps, la numération sera correcte, stable et reproductible.

Résistance du BI (valeur D)

Les BI utilisés doivent être accompagnés d'une valeur D. Cette valeur est « le temps nécessaire pour inactiver 90 % d'une population d'essai dans des conditions établies. Plus la valeur D est élevée, plus la souche est résistante au procédé de décontamination ».

La présence ou absence d'une enveloppe entraîne une variation de la valeur D. En cas de présence d'enveloppe, cette valeur D est supérieure. La présence de l'enveloppe constitue une barrière supplémentaire dans le process. La question qu'il est important de se poser est : « est-ce représentatif du process à valider ? ».

Lors de la détermination de la valeur D, la variation des paramètres température, humidité, et la concentration en agent désinfectant a une influence directe sur cette valeur D. Ces paramètres doivent apparaître sur le certificat accompagnant le lot de BI. Une augmentation de la température et de l'humidité relative entraîne une diminution de la valeur D. Il est donc important de déterminer une valeur D selon une procédure opératoire définie, validée. La valeur D doit être définie à la fois selon la courbe de survie et par la méthode par fraction négative (NPP).

La détermination de la valeur D est directement liée au système utilisé avec une maîtrise de la concentration en vapeur de peroxyde d'hydrogène au centre de l'enceinte pendant toute la durée d'exposition des indicateurs. Il est nécessaire de contrôler la concentration au plus proche

des BI's ainsi que la température et l'humidité relative.

Il ne faut pas oublier de valider la stabilité de la valeur D dans le temps, selon des conditions de transport et de stockage définies.

Le packaging

Doit-on utiliser un BI emballé ou un BI « nu » ? Il est important que l'utilisation soit représentative du procédé à valider. Il est tout à fait possible d'exposer les BI's nus. Ceci permet de s'affranchir du risque de faux négatif et de faux positif.



Les textes réglementaires reproduits ci-après décrivent les points à risque avec l'emballage d'un BI :

- PDA – Technical Report N° 51 - § 7.4.1 – Sterilant Retained on the BI - “An important factor in determining spore recovery after exposure to decontamination agents is the neutralization of residual agents at the time of sampling. This prevents continued action against spores that may have survived the cycle. Residual agents may have been adsorbed by the spore coat, the surface of the carrier, and the primary pack material (...)”

- USP 36 - <1035> Biological indicators for sterilization - § Selection for specific Sterilization Processes : “The biological indicator may also be individually packaged in a suitable primary overwrap package that does not adversely affect the performance of the indicator, and is penetrable by VPHP. Use of an overwrap material to package VPHP biological indicators must be carefully assessed to ensure that, following VPHP exposure, residual hydrogen peroxide is not retained by the packaging material, possibly inducing bacteriostasis during the recovery steps. Microbial D values will be influenced by the presence of a biological indicator overwrap material relative to the

rate of inactivation and the potential presence of residual VPHP.”

Si l'enveloppe n'est pas parfaitement perméable, de manière homogène, il est probable d'obtenir un faux positif du fait de la présence d'une barrière physique à l'agent stérilisant. Il y a ce qui est appelé un effet d'adsorption. Si l'enveloppe adsorbe l'agent gazeux pendant le procédé de désinfection, il y a un risque de relargage de cet agent résiduel, et donc de destruction des spores potentiellement restantes sur le support en fin de process, avant mise en culture. Dans ce cas, il y a un risque de faux négatif.

La présence d'une enveloppe a un effet sur la détermination de la valeur D. Dans ce cas, il est encore plus important de respecter les points abordés précédemment pour connaître les critères du cycle qui ont été appliqués pour la détermination de la valeur D.

Une validation de l'influence de l'emballage est donc nécessaire afin de valider l'absence d'effet de relargage et de la perméabilité à l'H₂O₂.

Conclusion

La maîtrise de ces six éléments clés permet de ne pas impacter les résultats de la qualification des process. La qualité des indicateurs biologiques qui sont utilisés permet d'avoir des résultats répétables et reproductibles si le procédé à valider est stable et maîtrisé. Le fabricant d'indicateur biologique doit maîtriser parfaitement son support et sa suspension. Pour la qualification, d'autres éléments sont nécessaires à prendre en compte, tels que l'emplacement des indicateurs biologiques, la récupération des indicateurs biologiques et leur mise en culture.

Une étude de fertilité au préalable est nécessaire afin de s'assurer que l'indicateur biologique soumis au gaz ne relargue pas de peroxyde d'hydrogène pendant la période d'incubation qui entraînerait un faux négatif.

Les résultats faux négatifs sont tout aussi importants à prendre en compte dans l'analyse de risque que les faux positifs.

Le temps de mise en culture entre la fin d'un process à valider et la mise en culture doit être le plus court possible car il peut y avoir un relargage de peroxyde d'hydrogène, pouvant entraîner un faux négatif. Ce phénomène est d'autant plus présent si les indicateurs biologiques sont utilisés emballés. En résumé :

- faire une analyse de risque afin d'évaluer l'impact des six éléments clés de performance ;
- établir un cahier des charges avec les fournisseurs de BI (support, suspension, inoculation) et réaliser des audits de certification et de surveillance ;
- mettre en place des contrôles à réception des lots de BI en intégrant contrôle numération, valeur D (certificat) et si possible des photos MEB ;
- vérifier l'homogénéité intra-lot et inter-lot.

Un lot d'indicateur biologique est la somme de : lot suspension + lot du support + inoculation + valeur D + numération. Si les six clés de performances sont intégrées et maîtrisées, la probabilité d'apparition de Rogue BI's et de faux négatif sera proche de zéro. ■

ICARE

Biopôle Clermont-Limagne
63360 SAINT-BEAUZIRE
Tél. : 04 73 33 99 99