

MINI-ENVIRONNEMENTS

Contamination microbienne et gants pour isolateurs : quelle gestion de risque ?

Par E. FILAIRE¹, M. BESSON², P. COPPENS³, E. GOHIER⁴, C. POINSOT¹, V. ROCHETTE¹, A. TOUSSAINT⁵ et J. TRIQUIET⁶
 1 Icare, 2 Axys Network, 3 Isotec'xel, 4 JCE Biotechnology, 5 GSK Vaccines, 6 CSL Behring et l'ensemble du GIP Technologie barrière de l'A3P

Le contrôle régulier de l'intégrité des gants utilisés dans les systèmes barrières est une obligation, or les données scientifiques sur les attributs critiques de ces accessoires sont rares. Cette étude entend se rapprocher le plus possible des conditions de production pharmaceutique afin d'évaluer le risque microbiologique.

Les systèmes de barrière tels que les isolateurs ou les systèmes de barrière à accès restreint (RABS) jouent un rôle fondamental dans la protection des personnes et des produits tant dans la production pharmaceutique que pour la réalisation de tests analytiques et de stérilité [1]. Les gants constituent une interface cruciale entre l'environnement intérieur de l'isolateur et l'opérateur. Leur intégrité est donc essentielle afin d'éviter tout risque de contamination. Le contrôle régulier de cette intégrité est du reste obligatoire en

vertu de nombreuses réglementations. La Food and Drug Administration américaine [2], par exemple, stipule « qu'un gant ou un manchon défectueux représente une voie de contamination et une brèche critique dans l'intégrité de l'isolateur ». En outre, les employés doivent inspecter visuellement les gants pour vérifier qu'ils ne sont pas endommagés avant chaque utilisation et des tests physiques doivent être effectués régulièrement. Des exigences similaires sont établies dans l'annexe 1 des Bonnes

Pratiques de fabrication (BPF) de l'UE [3]. En effet, les technologies barrières sont largement recommandées dans cette nouvelle version afin d'éviter toute interaction directe entre les opérateurs – connus comme la principale source de contamination potentielle – et les étapes critiques du processus de fabrication de produits stériles. À cette fin, les gants doivent être contrôlés régulièrement en fonction de leur utilisation, ce contrôle incluant une inspection visuelle à chaque utilisation et après toute manipulation susceptible d'affecter l'intégrité du système. Par ailleurs, les tests d'intégrité et d'étanchéité des systèmes de confinement doivent être effectués à des intervalles définis. L'un des principaux défis est que les fabricants de produits pharmaceutiques doivent définir leurs propres procédures opérationnelles standard pour le test des gants conformément à ces directives et mettre en place une procédure appropriée pour leurs installations sur la base d'une analyse des risques. Les tests microbiologiques de surface des gants des isolateurs peuvent être effectués en temps réel pendant la

Positionnement du gant



Évaluation de la pression du gant lors de l'introduction de la main dans le gant.

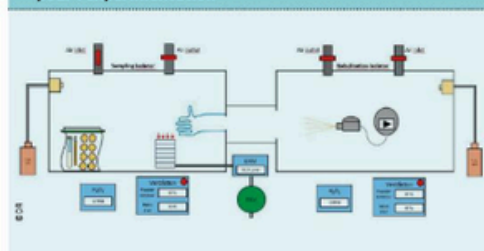
production, mais leurs résultats ne sont connus qu'après celle-ci. Le processus de prise de décision en temps réel doit donc reposer sur des données scientifiques robustes concernant les attributs critiques des gants. À notre connaissance, les données scientifiques sur cette problématique sont rares. En effet, si on utilise le site National Library of Medicine (PubMed) avec comme mots-clés « gants, trous », seules 83 publications sont parues depuis 1960. Pour comparaison, durant la même période,

120 232 articles ont été publiés pour le mot-clé « microbiologie ».

L'étude de référence est celle de Gessler *et al.* [1], dans laquelle l'évaluation des risques potentiels de contamination microbienne et de migration à travers des trous (0,4 à 0,8 mm) sur des gants en polyéthylène chlorosulfoné (CSM) a été quantifiée, la souche étudiée étant *Brevundimonas diminuta*. Même si une charge biologique élevée sur la face interne des gants défectueux représentait un risque de contamination pour le produit ainsi que pour l'intérieur de l'isolateur (grade A), les auteurs suggéraient que la charge biologique trouvée sur ces gants présente généralement de faibles concentrations, inférieures à 20 UFC/cm². Maier *et al.* [4] ont discuté de l'intérêt de l'utilisation d'un test de pression en indiquant que des tests spécifiques et précis devraient être utilisés pour surveiller l'intégrité des gants pendant leur utilisation dans des applications critiques telles que la fabrication pharmaceutique, afin de s'assurer que l'environnement reste stérile et exempt de toute contamination. Ainsi, il a semblé important de compléter ces études précédentes, d'abord en étendant la taille des trous des gants à une gamme susceptible d'être visible et donc détectée lors d'un contrôle visuel par les opérateurs, et ensuite en se rapprochant le plus possible des conditions de la production pharmaceutique afin d'évaluer le risque d'entrée de micro-organismes sur la surface interne des gants.

L'objectif de cette étude préliminaire initiée par le groupement d'intérêt commun A3P « Technologie barrière » était de soumettre des gants en CSM à un aérosol contenant un micro-organisme, *Geobacillus stearothermophilus*, afin

Mise en place du gant et dispositif utilisé pour l'expérimentation



de vérifier leur étanchéité. Sur la base des travaux évoqués précédemment [1 ; 4], nous avons émis l'hypothèse qu'en dessous d'une certaine taille des trous, les gants pouvaient assurer une étanchéité, même si leur surface était altérée. *G. stearothermophilus* est une bactérie thermophile à Gram positif et produisant des spores [5]. Ce micro-organisme a été choisi car il a la capacité de croître et de se reproduire à une température sélective non propice à la croissance d'un autre organisme, éliminant ainsi la possibilité de faux positifs causés par la contamination par d'autres micro-organismes.

Matériels et méthodes

Choix des gants et de la taille des trous

Quinze gants en polyéthylène chlorosulfoné (taille : 8 ; épaisseur : 6 mm) ont été testés. Des trous calibrés de différents diamètres (1, 2 et 3 mm) ont été réalisés à l'aide

d'un emporte-pièce, de sorte que les trous soient toujours positionnés au même endroit, à 1 cm du bout du doigt. Ces diamètres ont été choisis car ce sont des tailles qu'un opérateur peut voir à l'œil nu.

Évaluation de la pression induite par l'introduction de la main dans le gant

Après avoir placé le gant sur un bracelet relié à une manchette et l'avoir nettoyé avec de l'alcool isopropylique, la main a été introduite dans le gant et la pression a été prise en continu au bout du doigt (majeur) et dans la paume de la main grâce à un dispositif Delta Ohm (figure 1).

Préparation de la suspension de spores

Une suspension de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 ajustée à environ 10⁷ UFC/mL a été utilisée pour l'expérimentation.

Déroulement des essais

Deux isolateurs répondant aux normes de qualification de l'industrie pharmaceutique reliés par un sas de transfert et préalablement décontaminés par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ont été utilisés. Le gant à tester a été placé sur un anneau de poignet au niveau de la porte gauche du sas de transfert entre les deux isolateurs, le trou du gant étant dirigé vers la paroi arrière (figure 2). Après une prédecontamination du gant à l'alcool isopropylique, une décontamination au H₂O₂ vaporisé a été réalisée dans les deux isolateurs durant 15 minutes. Une ventilation a ensuite été appliquée afin de diminuer la concentration en H₂O₂ à 0 ppm.

La nébulisation du *G. stearothermophilus* ATCC 7953 a alors débuté et a été réalisée dans l'isolateur de droite. Une fois cette nébulisation effectuée, la pression a été augmentée à 500 pascals dans l'isolateur de droite afin de mimer la surpression induite par l'introduction de la main dans le gant.

Tests microbiologiques

Un prélèvement de surface par boîte Count-Tact autour du trou de l'index du gant testé et des prélèvements de surface sur les parois de l'isolateur de gauche ont été effectués. Après deux jours d'incubation à 58 ± 2 °C, la présence ou l'absence de colonies a été évaluée.

Taille des trous vérifiée à la loupe binoculaire et comptage des UFC

	Gant n° 1	Gant n° 2	Gant n° 3	Gant n° 4	Gant n° 5
Nombre d'UFC	3	3	3	10	37
Taille des trous (mm)	0,53	0,59	0,65	0,86	1

→ Résultats

Trois résultats peuvent être notés :

- la charge biologique trouvée sur l'échantillonnage de surface sur l'isolateur était proportionnelle à la taille du trou (résultats non montrés) ;
- la charge biologique retrouvée sur l'extérieur du gant autour du trou de 1 mm était faible. La valeur moyenne était en effet de 11 UFC, la quantité totale initiale aérosolisée étant de 10^8 (tableau A) ;
- en nous concentrant sur le trou de 1 mm de diamètre et après avoir vérifié leur taille à l'aide d'une loupe binoculaire, nous avons pu constater que les trous variaient de 0,53 à 1 mm (tableau A). Jusqu'à 0,65 mm, la charge microbienne restait très faible.

Discussion

La fabrication de médicaments et de produits thérapeutiques stériles nécessite un traitement aseptique utilisant une technologie comprenant des isolateurs et des systèmes de barrière à accès restreint (RABS), comprenant des gants et des manchettes, sachant qu'ils sont les maillons les plus faibles pour le maintien de l'intégrité de la barrière. En effet, la nature des gants, du fait de leur épaisseur et de leur souplesse, induit un risque de déchirure ou de percement. L'inspection visuelle effectuée régulièrement au cours de la production (c'est-à-dire avant et après chaque intervention sur les gants) se situe dans la fourchette de 0,8 mm à 3 mm pour le niveau de détection du trou d'épingle. La méthode d'étrétement

« Il existe toujours une absence de consensus quant à la taille du trou pouvant induire une brèche dans l'intégrité de l'isolateur et le passage de micro-organismes. »

des gants complète les tests d'intégrité physique avec un résultat positif proche de 85 % d'efficacité de détection. En effet, l'étrétement améliore la détection des trous d'épingle dans les endroits difficiles sans déchirer le matériau, l'espace comblé étant presque indétectable. Néanmoins, il existe toujours une absence de consensus quant à la taille du trou pouvant induire une brèche dans l'intégrité de l'isolateur et le passage de micro-organismes. L'objet de notre étude préliminaire était d'utiliser des conditions de charge biologique au-delà de la réalité industrielle (*worst case*) pour évaluer le transfert de ces micro-organismes à travers des tailles de trous visibles par un opérateur. Dans les conditions expérimentales choisies, nos résultats ont montré qu'en dessous d'une taille de trou d'environ 0,6 mm, les gants défectueux ont une faible probabilité de générer un passage de micro-organismes et donc de générer un risque microbiologique en raison du passage des micro-organismes et donc de générer un risque microbiologique. Au-delà de cette taille, le phénomène de passage et donc le risque de contamination microbienne semblent augmenter. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gessler *et al.* [1]. Cependant, ils apportent un point de vue supplémentaire dans la mesure où le protocole a tenté de reproduire les conditions réelles de l'industrie. Néanmoins, des recherches complémentaires sont nécessaires, incluant non seulement l'évaluation de l'impact de ces brèches sur d'autres matériaux de gants, mais aussi l'évaluation d'autres souches bactériennes, combinées à une inspection visuelle. Ainsi nous nous proposons dans un premier temps de poursuivre cette étude préliminaire en travaillant sur deux types de micro-organismes, à

savoir *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, et quatre types de porosités différentes allant de 0,3 à 1,5 mm, afin de mimer au maximum les conditions réelles de production pharmaceutique et d'évaluer le risque d'entrée de micro-organismes au niveau de la surface interne des gants isolants. *S. aureus*, bactérie résidente de la peau, peut être une cause majeure de contamination des produits pharmaceutiques en raison d'une mauvaise manipulation ou de processus et de protocoles aseptiques déficients. Il peut être transmis de différentes manières, par exemple par des gouttelettes d'air ou des aérosols et par contact direct avec des objets contaminés

(aliments, eau...). *B. subtilis* est une source courante de contamination de l'environnement en laboratoire, retrouvée régulièrement sur les plaques de décontamination de l'environnement et dans le cadre de la surveillance de l'air. L'objectif ultime de ces expérimentations est de donner des arguments aux fabricants pour qu'ils développent leurs propres procédures opérationnelles standard et leurs décisions fondées sur les principes de la gestion du risque qualité. ■

Nous remercions les sociétés CSL Behring, Getinge, OSK, JCE Biotechnology, Octapharma, Piercan et l'association A3P pour leur soutien à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A. Gessler, A. Stärk, V. Sigwarth et C. Moirand, *How risky are pinholes in gloves? A rational appeal for the integrity of gloves for isolators*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 65 (3): 227-41, 2011.
- Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice*, 2004.
- European Commission, *Annex 1, Guidelines: Good Manufacturing Practices The Rules Governing Medicinal Products in the European Union*. Vol. 4, 2022.
- C. Maier et J. L. Drinkwater, *Managing contamination risks in glove holes in barrier separation technology*. European Pharmaceutical Review, 2016.
- S. A. Burgess, S. H. Flint, D. Lindsay, M. P. Cox et P. J. Biggs, *Insight into the Geobacillus stearothermophilus species based on phylogenomic principles*. BMC Microbiology 17, art. 140, 2017.



Pour la mise en conformité de vos outils de production avec l'annexe 1

Conception de RABS et Retrofit sur mesure.

Solutions de transfert et de convoyage.



Flacons



Seringues



Ampoules



Autres



Convoyage, RABS et Traitement de l'Air pour milieu ultrapropre

www.avn-france.com