

UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD TLEMCEN

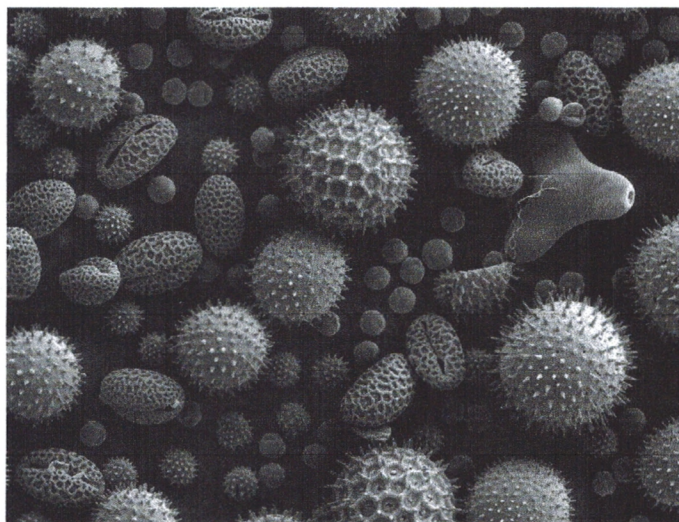
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE & FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

Mémoire de Master 2 pharmacie industrielle option production

Thème :

Les Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique



Sous la direction du Pr. Katia TAOULI

Mémoire présenté par : Mlle Siham BOUTERFAS

Suivi de stage assuré par : Dr. Mokhtar MENOUER

Membres de jury

Président : Pr K. KEZZAL

Examineurs : Dr M. DRISSI - Dr B. BENABADJI - DR HABIB BELMAHI

Encadreur universitaire : Pr. Katia TAOULI

Année de soutenance : 2011/2012

DEDICACE

JE DEDIE CE TRAVAIL

A mon Père,

Pieux, vertueux et modèle de persévérance, tu as toujours incarné à mes yeux, la bonté, la sagesse et l'honnêteté.

Aucun mot ne saurait exprimer ma reconnaissance, l'amour et le respect que j'ai pour toi.

Que ce modeste travail te procure la joie et la satisfaction du devoir accompli.

A ma Mère,

Mère si admirable de générosité et de dévouement pour ses enfants, ce travail n'aurait pu se faire sans ta bénédiction et tes prières.

Aucune expression ne paraît assez opportune pour t'exprimer la profondeur de mes sentiments d'amour et de reconnaissance.

A mon Frère et mes Sœurs,

Ce travail est le vôtre.

C'est grâce à votre soutien constant que j'ai pu mener à bien mes études.

Puisse le Tout-puissant renforcer davantage les liens solides de fraternité qui nous unissent.

A mes Oncles et Tantes,

Vous avez toujours manifesté un intérêt particulier à la réussite de mes études.

Pendant de longues années, vous m'avez encouragé, soutenu, conseillé, réconforté.

Recevez mes sincères remerciements et soyez assurés de mon affection.

A mes Cousins et Cousines ;

A mes Amis de toujours ;

Toute ma sympathie.

A mes Enseignants ;

A l'Algérie, mon Pays ;

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

A notre chef de projet,

Le Professeur TAOULI Katia,

Votre courtoisie, votre modestie et votre sens des responsabilités font de vous un maître respecté et estimé par toute une génération d'étudiants.

Veillez trouver ici, l'expression de nos remerciements les plus sincères et de notre parfaite reconnaissance.

A mon encadreur,

Le Docteur MENOUEUR MOKHTAR,

Nous apprécions à sa juste valeur l'honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail.

Vos qualités intellectuelles, votre abord facile, votre grande disponibilité et votre esprit critique nous laissent le souvenir d'un maître exemplaire.

Soyez assuré de notre parfaite reconnaissance et de notre attachement.

INTRODUCTION

Les microorganismes sont ubiquitaires ; la plus part d'entre eux ont une grande capacité de survie dans le milieu extérieur et certains, doués de pathogénicité peuvent être particulièrement dangereux.

Les risques potentiels liés aux espèces pathogènes ou non, ont conduit à définir la notion de sécurité dans les laboratoires et les industries, à concevoir des locaux, des équipements ainsi que des règles de bonnes pratiques de laboratoire et de fabrication.

En microbiologie industrielle, pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire, si certains microorganismes sont utilisés pour la fabrication de divers produits, d'autres sont indésirables car ils peuvent être à l'origine, en raison de leurs propriétés intrinsèques ou de leur nombre, d'une altération du produit, d'une contamination du consommateur ou du personnel.

L'importance de ces risques a justifié la mise en œuvre des contrôles réglementaires dont le nombre et la complexité sont étroitement liés à l'évolution des technologies, au concept de normalisation et à la dimension internationale des problèmes sanitaires.

A côté de l'exigence de stérilité reconnue depuis longtemps par les pharmacopées et l'industrie pharmaceutique pour les médicaments et matériel à usage parentéral, ophtalmique et chirurgical, s'est imposée plus tardivement la notion de qualité microbiologique pour les autres médicaments dits « non obligatoirement stériles ».

Cette notion s'étend à tous les produits de santé, y compris les cosmétiques.

Qu'il s'agisse de produits de santé ou autres, leur fabrication à l'échelle industrielle, leur distribution à de larges couches de population, la nécessité d'une conservation parfaite même pendant leur utilisation et jusqu'à leur date de péremption, place au premier rang le risque lié à la biocontamination.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

La maîtrise de la biocontamination occupe une place prépondérante dans l'industrie pharmaceutique, non seulement pour le médicament, mais également pour son environnement.

La fabrication de médicaments stériles ou non stériles impose des exigences particulières en vue de réduire les risques de contaminations microbienne et particulaire. Le contrôle et l'assurance de la qualité jouent dans ce domaine un rôle très important.

Les opérations de fabrication et de contrôle exigent également la mise en œuvre et le suivi des procédures et de méthodes soigneusement mises au point et validées.

Ce mémoire présente une vue d'ensemble de la biocontamination dans l'industrie pharmaceutique, tant au niveau de l'environnement et des locaux que sur celui des produits pharmaceutiques.

Partie I

La Qualité dans l'industrie pharmaceutique

1. NOTION DE LA QUALITE

Bien souvent, le terme « qualité » est interprété de manières très diverses. Dans le langage courant, on parle de produit de première qualité, ce qui signifie que le client est satisfait de la marchandise et des services offerts. Pour lui, la qualité est synonyme de satisfaction. Pour l'entreprise en revanche, la qualité implique par exemple la rapide disponibilité des produits à des coûts avantageux.

Le terme « qualité » pouvant être ambigu, vue sa multiplicité de sens, sa définition a été précisée au niveau de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO). Selon cette dernière, la qualité est « l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences ». Concrètement, la qualité existe lorsque la nature de la prestation offerte correspond aux exigences. La nature de la prestation d'un produit ou d'un service comprend, aussi, l'information et le contact avec le client. Les exigences ne se limitent toutefois, pas uniquement, aux besoins et aux attentes du consommateur individuel, mais englobent aussi les demandes et obligations de tous (respect de l'environnement et sécurité) et du producteur lui-même (coûts, délais).

Ces exigences ou attentes formulées peuvent concerner un produit, une activité ou un processus, un organisme ou une personne. Elles sont celles des utilisateurs ou clients à savoir des particuliers, des entreprises, des services publics ou privés, des services internes ; et sont soit exprimées par le client, soit implicites ou potentielles.

Par ailleurs, la qualité peut se définir selon le contexte socio-économique et culturel du milieu dans lequel l'on se trouve. Toute communauté possède des valeurs qui lui sont propres.

2. LE MANAGEMENT DE LA QUALITE PHARMACEUTIQUE

Les systèmes de management de qualité ont pour objectif la direction et le contrôle d'une entreprise du point de vue qualité.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Dans le cas de figure d'un laboratoire pharmaceutique, une approche globale s'avère nécessaire, qui tient compte tant les BPF, spécifiques au secteur pharmaceutique, que les procédures non spécifiques de management de la qualité.

Pour le développement d'un système général de management de la qualité dans un laboratoire pharmaceutique, beaucoup d'entreprises ont recours aux normes de la famille ISO 9000 à caractère très général, car elles sont très vues pour n'importe quel type d'entreprise. Elles peuvent donc être aussi utilisées par l'industrie pharmaceutique, en tenant compte toutefois de ses particularités.

Rappelons-nous, par exemple, que dans le secteur pharmaceutique, ce qui prime n'est pas l'amélioration, mais le contrôle.

Un système de qualité en pharmacie doit être conçu comme une base assurant le respect strict des BPF.

Une organisation du système de la qualité à trois niveaux (« Stratégique », « opérationnel » et de « travail ») s'avère très pratique.

- **Niveau « stratégique »**

L'entreprise, représentée par la direction, établit sa position en ce qui concerne l'assurance de la qualité. Ce niveau compte normalement deux documents :

Déclaration de la politique de la qualité de l'entreprise : il s'agit d'un document concis dans lequel la haute direction de l'entreprise expose solennellement les objectifs de qualité et en assure les moyens pour y parvenir.

Manuel de qualité : il décrit l'organisation et les responsabilités de système de qualité.

Pour un laboratoire pharmaceutique, il s'avère très pratique de rédiger le manuel en suivant de façon approximative les chapitres des BPF : (Organisation et responsabilités, Maîtrise des changements, Personnel, Locaux et équipement, Documents, Production et Contrôle de la qualité).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- **Niveau « opérationnel »**

Ce niveau est constitué des Procédures Opératoires de la Qualité (POQs) que développe le manuel de qualité.

Même si l'option choisie est d'avoir un manuel très détaillé, il est presque inévitable d'avoir recours à quelques procédures opératoires.

- **Niveau de « travail »**

Ce niveau, à caractère très pratique, rassemble tous les documents qui décrivent en détail la façon de faire les opérations (Procédures Opératoires Standard ou POS, instructions, spécifications...) et permettent d'enregistrer les données (enregistrements).

2.1. Facteurs influençant la qualité des médicaments

De cette exigence de « qualité » pour les médicaments, découle la nécessité de contrôler tous les facteurs qui sont en mesure de l'influencer : Matériel, Milieu, Main d'œuvre, Méthodes, Matières.

Bien que tous ces cinq facteurs (les 5 « Ms ») soient étroitement liés et qu'actuellement il ne soit pas possible d'envisager une industrie pharmaceutique qui ne les tient pas tous en compte, en pratique il y a une distinction très nette entre ce qui concerne « contenant » ou « installations » (milieu et matériel), « contenu » ou « production » (matières et méthodes) et main d'œuvre « personnel ».

Le « milieu » est représenté dans les BPF de l'UE par locaux [le chapitre 3, à propos des locaux indique que... l'éclairage, la température, l'humidité et la ventilation doivent être appropriés...], tandis que le « matériel » est désigné comme « équipement » ou aussi comme « matériel » [ce même chapitre 3 locaux et équipement commencent par ces mots : les locaux et le matériel ...].

Les « matières » ont un sens plus large que ce que les BPF de l'UE décrivent comme matière première [toute substance utilisée dans la fabrication d'un médicament à l'exclusion des articles de conditionnement (Glossaire)], puisqu'elle inclut aussi les articles de conditionnement.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le terme « méthodes » recouvre plusieurs dénominations des BPF de l'UE, bien sûr aussi « méthodes » mais bien d'autres comme « procédures » ou « procédés ».

Le « milieu » et « matériel » (locaux et équipement) constituent le support physique de la production, ils doivent faire l'objet d'une construction et on parle habituellement de « projets d'installations » ou, souvent de « projets » tout court.

Les « matières » et « méthodes » constituent la production proprement dite, qui fait l'objet de « développement ».

La « main d'œuvre », qui relève du chapitre 2 des BPF de l'UE, sous la dénomination de « personnel » est soumise à une « formation ».

2.2. Assurance de la qualité

Assurance de la qualité pharmaceutique

La qualité d'un médicament constitue l'un des critères permettant d'obtenir une autorisation de mise sur le marché.

L'objectif incontournable de l'industrie pharmaceutique ne peut être atteint que par la mise en place d'un système d'assurance de la qualité qui tient en compte tous les facteurs desquels dépend la qualité de ces médicaments.

L'assurance qualité concerne toutes les activités visant à assurer que le consommateur et le patient reçoivent un produit conforme aux spécifications et aux normes existantes de qualité, d'innocuité et d'efficacité. Elle s'applique à la fois à la qualité des produits proprement dits et à toutes les activités et services qui pourraient influencer sur la qualité.

C'est un ensemble de mesures prises depuis la recherche et développement, la production, le contrôle de la qualité, l'entreposage jusqu'à la distribution des médicaments ainsi que l'information destinée aux médecins et aux malades.

Il est de la responsabilité de tous les acteurs - de la production des médicaments à la distribution et la délivrance - de garantir la qualité des médicaments.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le secteur public et le secteur privé partagent ces responsabilités :

Les fabricants sont responsables de la mise au point et de la fabrication de produits de bonne qualité et doivent se conformer aux bonnes pratiques de fabrication. Ils doivent également recueillir des données relatives à leurs procédures et activités afin de garantir la qualité de leurs produits.

L'autorité de réglementation pharmaceutique doit veiller à ce que les médicaments dont la commercialisation a été approuvée ont été convenablement évalués et homologués, à ce que les fabricants respectent les bonnes pratiques de fabrication et, à cette fin, avoir recours à la délivrance de licences et à des inspections, à ce que la qualité des médicaments soit garantie, par exemple à l'aide du Système OMS de certification et, enfin, à ce que la qualité des médicaments soit préservée au cours du processus d'approvisionnement en s'assurant du respect des bonnes pratiques de stockage et de distribution et en surveillant la qualité des médicaments dans la chaîne de distribution.

Les responsables des achats pharmaceutiques doivent veiller à ce que les médicaments soient soigneusement sélectionnés, à ce qu'ils soient achetés à des fournisseurs fiables, inspectés à la réception et convenablement stockés et transportés.

Les analyses nécessaires de laboratoires doivent être demandées, et les mécanismes de notification de défaut de qualité et les procédures de rappel doivent être mises en place.

Les responsables de la distribution et de la délivrance des médicaments doivent veiller à ce que les produits soient convenablement stockés, et que la manutention, le conditionnement et la délivrance soient appropriés aux médicaments. Ils doivent aussi informer les patients sur la façon de manipuler et de conserver correctement les médicaments.

En outre, tous les locaux et installations utilisés pour la fabrication, le stockage et la distribution de ces produits doivent répondre aux critères imposés afin d'assurer la conformité permanente du produit avec les normes jusqu'à ce que celui-ci soit entre les mains de l'utilisateur final.

L'inspection et la qualité

L'inspection est une stratégie importante pour garantir la qualité des médicaments. Elle a pour but de veiller à ce que toutes les activités de fabrication, d'importation, d'exportation, de distribution des médicaments soient conformes aux normes réglementaires et de l'assurance qualité, et qu'elles se déroulent dans le respect de la réglementation. L'inspection exige un personnel motivé, bien formé, et convenablement rémunéré. Il existe des directives pour l'inspection élaborées par l'OMS.

L'assurance de la qualité globale appliquée à la fabrication des médicaments et déterminant notamment la bonne organisation des activités de production et de contrôle, est essentielle pour garantir la bonne qualité des produits. Ces pratiques sont définies dans les directives concernant les bonnes pratiques de fabrication des produits pharmaceutiques.

Le respect des bonnes pratiques de fabrication non seulement garantit la qualité de la production, mais peut également permettre des économies en réduisant le nombre des lots de mauvaise qualité qui doivent être fabriqués à nouveau ou détruits.

Dans les BPF (chapitre 1), l'AQ représente " **l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments fabriqués sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés.** "

2.3. Contrôle de la qualité

Le contrôle qualité est une partie des BPF qui concerne les procédures relatives à l'échantillonnage, aux spécifications, aux analyses, à la documentation et à la mise en circulation.

Pour un bon fonctionnement du contrôle qualité des exigences de base sont requises. Des installations appropriées, du personnel compétent et des méthodes approuvées doivent être disponibles pour effectuer l'échantillonnage, l'inspection et l'analyse des matières premières, du matériel d'emballage, des produits intermédiaires, en vrac ou finis et pour contrôler au besoin, les conditions environnementales pour se conformer aux BPF.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Les laboratoires nationaux de contrôle de la qualité

Le rôle des laboratoires de contrôle pharmaceutique est de vérifier par des analyses appropriées que les médicaments satisfont aux normes de qualité requises.

Les ressources et les moyens techniques disponibles pour mener ces activités dans les pays varient énormément, mais chaque autorité de réglementation pharmaceutique doit avoir accès à un laboratoire de contrôle de la qualité, qui joue également un rôle important dans le processus d'homologation et la surveillance de la qualité des produits commercialisés.

Un laboratoire de contrôle pharmaceutique est un établissement dont la création et le fonctionnement sont coûteux.

De manière générale, il est recommandé que tous les pays aient au moins accès à un petit laboratoire où les analyses de base peuvent être effectuées, et que ces installations ne comportant au départ que le minimum nécessaire soient graduellement développées.

Le niveau de contrôle doit être élevé, placé sous la stricte direction d'inspecteurs d'État et du laboratoire national de contrôle de la qualité des médicaments.

Les médicaments « faits en Algérie » ont démontré leur qualité par le contrôle du LNCPP (Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques), ce qui atteste le sérieux de la jeune industrie.

3. Référentiels de l'industrie pharmaceutique

Histoire

L'industrie pharmaceutique se présente comme un secteur soumis à une forte contrainte réglementaire. Celle-ci serait la garantie de la sécurité des médicaments, ces produits « pas comme les autres ».

L'histoire de l'enregistrement des produits pharmaceutiques, dans une grande partie du monde industrialisé, a suivi une configuration semblable qui pourrait

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

être décrite comme déclenchement, accélération, rationalisation et harmonisation.

Aux Etats-Unis une erreur tragique dans la formulation d'un sirop de sulfamide contenant du Diéthylène Glycol a fait 105 morts en 1937 ce qui a été le déclenchement pour installer le dossier d'enregistrement par le FDA.

Dans beaucoup de pays d'Europe, le déclenchement était la tragédie du thalidomide : En 1949, un nouveau sédatif, connu sous le nom de « thalidomide », était introduit sur le marché.

Malheureusement, ce médicament avait des effets indésirables imprévus qui ont donné lieu à une tragédie internationale : de nombreuses femmes qui avaient été soignées avec ce médicament durant leur grossesse donnèrent naissance à des enfants présentant des malformations très graves.

Tous ces incidents ont démontré que la nouvelle génération de drogues synthétiques qui jusque-là révolutionnait la médecine, pouvait avoir des effets néfastes sur la santé.

Devant la gravité de ces événements, les années 60 et 70 ont vu une augmentation rapide des lois, des règlements et des directives pour enregistrer et évaluer les données sur la sécurité, la qualité et l'efficacité de nouveaux produits pharmaceutiques afin de s'assurer que les produits défectueux ne soient pas à la portée du patient.

La rationalisation quant à elle, a été le fruit du progrès technique qu'a connu le monde et de l'apparition de la notion « **norme** ».

Les référentiels de l'industrie pharmaceutique regroupent un ensemble d'éléments formant un système de référence.

Différents types de référentiels s'appliquent au secteur de la santé et plus particulièrement à l'industrie pharmaceutique.

On distingue deux catégories de référentiels :

- Les référentiels d'application obligatoire : ils découlent de textes de loi (BPF, pharmacopées...).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- Les référentiels d'application volontaire : normes ISO9000, AFNOR...

3.1. Référentiels règlementaires

3.1.1. Bonnes pratiques de fabrication BPF

Les BPF constituent une sorte de « code de conduite pharmaceutique » introduit en 1963 aux Etats-Unis pour parer aux erreurs dans la production des médicaments.

Les B.P.F font partie de l'assurance qualité, ces pratiques garantissent que les médicaments sont continuellement fabriqués selon les standards de qualité adéquats à l'usage auquel ils sont destinés et tels que l'exige leur autorisation de mise sur le marché (demande d'enregistrement en Algérie).

Si les BPF ont été considérés comme une révolution dans la production pharmaceutique c'est surtout de par son caractère obligatoire et général, car ce qu'elles exigent n'était auparavant ni inconnu ni nouveau, mais plutôt logique : contrôler en double, enregistrer tout en temps réel, ne se fier pas à la mémoire ou aux instructions orales, établir des circuits logiques...

L'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé en 1969 l'adoption des BPF par tous les pays du monde, ce qui en ce moment est déjà fait ou le sera dans un court délai. Il faut savoir que si les BPF constituent le texte général et obligatoire pour la fabrication de médicaments, tant à usage humain que vétérinaire, elles peuvent être complétées par d'autres documents (guides, instructions, manuels...) publiés tant par des associations scientifiques que par des organisations gouvernementales ou internationales.

De tout cet ensemble découle une pratique généralement admise par les autorités sanitaires et par le secteur pharmaceutique.

Les bonnes pratiques de fabrication couvrent les aspects de production depuis le matériel de départ, les locaux et l'équipement jusqu'à la formation et l'hygiène du personnel.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Sans les BPF, on ne peut pas être sûr que chaque unité de médicament soit fabriquée à la même qualité que les autres.

3.1.1.1. BPF des Etats Unis

Les BPF des Etats Unis font partie du code législatif fédéral (« code of federal regulations-CFR ») dont le titre 21 concerne denrées alimentaires et médicaments.

Les BPF américaines s'étalent sur 17 parties de ce titre, de la 210 jusqu'à la 226.

Les BPF des Etats Unis sont publiées par la FDA « Food and Drug Administration», qui constitue le bureau de l'administration américaine chargée du contrôle des aliments et médicaments.

Elles sont couramment connues comme Current Good Manufacturing Practice (cGMP), c'est-à-dire « bonnes pratiques de fabrication en vigueur ».

Deux parties des BPF américaines concernent particulièrement la production des médicaments :

- Partie 210 [Current Good Manufacturing Practice in manufacturing, processing, packing, or holding of drugs; general].
- Partie 211[Current Good Manufacturing Practice for finished pharmaceuticals].

La commercialisation des médicaments sur le marché américain implique la conformité aux cGMP.

3.1.1.2. BPF européennes

La Commission européenne a adopté en 1991 deux directives établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication pour les, la première (Directive 91/356/CE)¹ concerne les médicaments à usage humain,

¹Cette Directive a été abrogée et remplacée par la Directive 2003/94/CE.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

tandis que la deuxième (Directive 91/412/CE) concerne les médicaments vétérinaires.

Ces BPF européennes communes possèdent neuf chapitres à caractère général (gestion de la qualité, personnel, locaux et équipement, documents, production, contrôle de la qualité, fabrication et analyse en sous-traitance, réclamations et rappels de médicaments et auto-inspection) et des annexes traitant les domaines d'activités spécifiques.

3.1.2. Bonnes Pratiques de Laboratoire BPL

Les directives des BPL font partie de l'environnement des industries pharmaceutiques depuis les années 70. Elles ont été mises en place pour promouvoir la qualité et la validité des données d'essai servant à établir la sûreté des produits chimiques.

Les principaux textes en vigueur sont :

-Les principes de BPL spécifiés à l'annexe 2 de la décision du conseil de l'OCDE du 12 mai 1981.

Le référentiel décrivant les BPL et la procédure d'inspection ont été élaborés par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique, organisation intergouvernementale réunissant 29 pays).

L'objectif premier des Principes de l'OCDE relatifs aux BPL est d'assurer l'obtention de données d'essai fiables et de grande qualité sur la sécurité des substances et préparations chimiques industrielles, dans le cadre de l'harmonisation des procédures d'essai aux fins de l'acceptation mutuelle des données (AMD).

-Les deux directives européennes concernant les BPL (directive 87/18/CEE et 87/18/CEE).

Les bonnes pratiques de laboratoire permettent d'assurer la qualité des études toxicologiques et cliniques destinées à être soumises aux autorités d'enregistrement (dans le cadre des études précliniques).

Elles pallient les faiblesses des BPF concernant le laboratoire de contrôle.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Les thèmes abordés dans les BPL sont les suivants : locaux, matériel, réactifs, échantillonnage, méthodes d'analyse, exploitation des résultats et sous-traitance.

Les BPL portent donc sur le mode d'organisation des études et sur les conditions dans lesquelles elles sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, rapportées, archivées et diffusées.

3.1.3. Pharmacopées

Une pharmacopée est définie comme une norme pharmaceutique destinée à assurer l'uniformité de la qualité.

Elle indique les caractéristiques des médicaments, les moyens qui permettent de les identifier, les méthodes d'essais et d'analyses à effectuer pour assurer leur contrôle, les procédés de préparation, de stérilisation, de conservation des médicaments ainsi que les règles de leur conditionnement, leurs principales incompatibilités et un ensemble de données qui peuvent être utiles au pharmacien pour leur préparation et leur délivrance.

Il existe plusieurs pharmacopées avec entre autre : La pharmacopée Européenne, la pharmacopée Américaine (USP), la pharmacopée Japonaise.

Les monographies

Pour assurer l'uniformité de tous les lots d'un médicament présenté sous une forme pharmaceutique donnée, il est nécessaire d'établir une norme appropriée pour l'identité, la pureté, la teneur, le comportement et d'autres caractéristiques.

C'est le strict respect de ces normes qui permet d'obtenir la qualité souhaitée.

Les monographies concernent les préparations pharmaceutiques, les excipients, les solvants, les agents de suspension...

Chacune se décompose sous plusieurs rubriques.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

3.1.4. International Conference on Harmonisation ICH

Bien que différents systèmes de normalisation aient été basés sur les mêmes obligations fondamentales d'évaluer la qualité, la sécurité et l'efficacité, l'enregistrement des médicaments est demeuré une responsabilité nationale.

Mais la divergence des impératifs techniques d'un pays à l'autre a obligé l'industrie à reproduire beaucoup de méthodes d'essai longues et chères afin de lancer de nouveaux produits sur le marché international.

La nécessité pressante d'harmoniser l'enregistrement a été poussée d'une part par l'escalade du coût du Recherche et Développement et d'autre part par les attentes de l'espérance publique d'avoir de nouveaux traitements sûrs, efficaces et disponibles dans les plus brefs délais.

Dans cette optique, plusieurs accords de coopération ont eu lieu entre les différentes autorités réglementaires et diverses tentatives d'harmonisation sont observées dans plusieurs régions.

En 1990, une initiative régionale liant les autorités d'enregistrement des Etats-Unis, du Japon et de l'Union Européenne et les associations représentant les industriels de ces trois régions se sont réunies sur l'initiative de la Fédération Internationale des Industries du Médicament et ont créé une conférence internationale appelée ICH : International Conference on Harmonisation ou encore la Conférence Internationale sur l'Harmonisation des exigences techniques relatives à l'homologation des médicaments à usage humain.

L'objectif d'ICH est de faire des recommandations tendant à mieux harmoniser l'interprétation et l'application des directives techniques afin de diminuer les cas de duplication des expériences auxquelles on procède durant la recherche et le développement des nouveaux médicaments.

Dans ce cadre, il y a eu cinq réunions : ICH1 à Bruxelles (Belgique) en 1991, ICH2 à Orlando (USA) en 1993, ICH3 à Yokohama (Japon) en 1995, ICH4 à Bruxelles en 1997 et ICH5 à San Diego (USA) en l'an 2000.

Durant ces conférences les autorités réglementaires et les représentants de l'industrie pharmaceutique travaillent ensemble pour mieux harmoniser les

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

impératifs scientifiques, techniques et administratifs qui permettent d'assurer l'efficacité, la qualité et la sécurité d'un médicament dans un but d'accélérer sa commercialisation et sa disponibilité au patient et pour permettre aux industriels de faire des économies pour pouvoir développer d'autres molécules.

Depuis sa mise en place en 1990, l'International Conference on Harmonisation a finalisé 45 guidelines en rapport avec la qualité, la sécurité, l'efficacité et même la communication.

L'ICH peut donc être considéré comme un succès de la coopération internationale en matière de médicament.

3.2. Référentiels normatifs

Les référentiels normatifs ou normes générales sont des textes de référence issus de différents organismes officiels de normalisation à différents niveaux:

- National: Association Française de Normalisation (AFNOR),
- Plurinational: Comité Européen de Normalisation (CEN),
- Mondial: International Organization of Standardization (ISO).

3.3. Référentiels professionnels et autres données bibliographiques

Ce sont des textes et des recommandations professionnels, organismes techniques, ou des publications diverses.

3.4. Dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché et le Document Technique Commun

3.4.1. Dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)

« on entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives et préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques. »

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le médicament est un produit actif nécessaire à la santé mais qui peut comporter des risques, c'est pourquoi la totalité du cycle du médicament est très encadrée à la responsabilité de pharmaciens.

C'est aussi un bien industriel, il est fabriqué par des entreprises dont la rentabilité doit assumer une recherche de haut niveau et coûteuse.

C'est pourquoi la production, la distribution et la mise des produits de santé sont soumises à une réglementation stricte.

L'utilisation des médicaments peut avoir des conséquences graves en terme de santé publique et en terme de sécurité. C'est la raison pour laquelle les conditions de commercialisation d'un médicament diffèrent considérablement de celles des autres biens de consommation.

L'une des principales caractéristiques qui distingue les médicaments des autres produits de consommation en matière de sécurité est l'exigence d'une autorisation de mise sur le marché et d'un enregistrement préalable.

Avant qu'un médicament ne puisse être introduit sur un marché, il doit être évalué et approuvé par les autorités compétentes, il s'agit d'ailleurs d'un principe établi dans le monde entier.

Le médicament prend naissance autour du dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Le principe de l'AMM vise à garantir les malades contre l'utilisation de médicaments qui ne répondraient pas à un niveau d'efficacité thérapeutique, de sécurité d'emploi et de qualité de fabrication.

Un dossier d'AMM est classiquement composé de quatre parties :

- Partie I : Résumé du dossier ; renseignements administratifs relatifs à la spécialité, caractéristiques du produit et rapport d'experts.
- Partie II "Qualité" : documentation chimique, pharmaceutique et biologique.

La partie II du dossier d'AMM présente les méthodes de contrôle:

- la partie II C concerne l'analyse des matières premières,

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- la partie II E concerne l'analyse des produits finis,
- la partie II F concerne les analyses de stabilité.

Les méthodes d'analyses décrites sont appliquées en routine par les laboratoires de contrôle.

- Partie III "Sécurité" : essais toxicologiques et pharmacologiques
- Partie IV "Efficacité" : documentation clinique

3.4.2. Document Technique Commun (CTD)

Ce Document Technique Commun (CTD) est organisé en 5 modules:

- Module 1 : Information administrative et données sur la prescription.

Ce module est spécifique à chacune des trois régions et son contenu sera défini par chacune d'elle.

- Module 2 : Résumés

Ce module comprend une introduction générale d'une page, un résumé global sur la qualité, un aperçu général de la préclinique et de la clinique ainsi que les résumés rédigés et tabulés des études précliniques et cliniques.

- Module 3 : Information sur la qualité.
- Module 4 : Rapports des études précliniques.
- Module 5 : Rapports des essais cliniques.

3.5. Règlementation concernant le laboratoire de microbiologie et les contrôles microbiologiques

La réglementation en vigueur concernant les contrôles environnementaux en zone stérile et non stérile : BPF, ISO 14644, ISO 14698, ainsi que la réglementation liée à la qualité et l'essai : ISO 17025, ISO 9000 et autres référentiels comme l'ISO TC 147/SC 4 - Méthodes microbiologiques (contrôle de qualité microbiologique de l'eau).

La réglementation pharmaceutique algérienne actuelle est assez récente (1992). Elle a été élaborée début des années « 90 » et comporte encore beaucoup d'éléments d'une inspiration française.

4. NOTION DE VALIDATION

➤ Terminologie et Aspects généraux

« Un des outils essentiels de l'AQ est la validation : Valider, c'est construire la qualité dans le produit. »

La validation permet de construire la qualité du produit au niveau du développement, des services techniques, de la production, autour d'un seul but: prouver que le procédé est sous contrôle. De même, les méthodes d'analyse utilisées doivent être validées.

Il est important de souligner que la validation est un exercice documenté.

➤ But et Objectif

La validation est une exigence réglementaire. Les industriels se doivent donc d'appliquer la réglementation en vigueur (dossier d'AMM, BPF...).

La validation est un concept en interaction avec toutes les actions d'amélioration de la qualité. Elle permet l'identification des éléments critiques ayant une influence sur la qualité finale du produit. Elle instaure la confiance en la qualité du produit en montrant qu'un procédé est sous contrôle. De plus, la maîtrise du processus est un moyen pour réagir vite aux nouvelles exigences des clients.

Enfin, la validation est un moyen économique important. En effet, elle permet d'une part une diminution des coûts:

- ▲ Au niveau de l'échantillonnage et du contrôle,
- ▲ Au niveau des rejets et des retraitements,
- ▲ En anticipant les problèmes, on peut intervenir au plus tôt sur un processus.

D'autre part, elle permet un gain de temps:

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- ▲ En améliorant le flux produit,
- ▲ En diminuant les accidents de production pour permettre une réduction des temps d'arrêt de production.

Comme l'indique la norme ISO 17025 : « ***Le laboratoire doit valider des méthodes [...] pour confirmer [qu'elles] conviennent à l'emploi prévu. La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins dans l'application ou le domaine d'application donné*** ».

Les BPF assurent d'une façon générale la qualité des médicaments, mais pour aller au-devant, elles ont dû incorporer la validation, qui possède un caractère spécifique pour chaque cas de figure.

La validation doit être considérée comme une percée formidable dans l'histoire de la réglementation pharmaceutique puisqu'elle propose l'auto responsabilisation. Il convient à chacun d'étudier son cas de figure et après, d'établir ce qu'il faut faire en vue d'assurer la qualité du produit.

➤ **Validation des méthodes d'analyses**

Dans le cadre du dossier d'AMM, il est nécessaire d'effectuer un certain nombre de contrôle sur la forme pharmaceutique qui va être libérée afin de s'assurer de sa conformité aux exigences définies. Par conséquent, toutes les méthodes d'analyses doivent être validées afin d'éviter la mise sur le marché de produits défectueux.

On valide une procédure analytique par l'intermédiaire de critères de validation. Selon l'analyse considérée (identification, essai, dosage), ces critères sont différents.

➤ **Qualification des équipements**

La qualification des équipements se décompose en quatre étapes qui sont:

1. La Qualification de Conception (ou design qualification) (QC) : il s'agit de vérifier que le système en cours de préparation chez le fournisseur correspond aux exigences préalablement définies dans le cahier des charges et que les éléments critiques sont bien maîtrisés. Il convient

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

également de s'assurer que les éléments critiques sont bien spécifiés et intégrés dans le cahier des charges.

2. La Qualification d'Installation (QI) : il s'agit de vérifier avant, pendant et après l'installation que celle-ci correspond aux exigences du cahier des charges. On vérifie également que toute la documentation nécessaire est présente et qu'elle est en adéquation avec l'installation. Tout ceci correspond à une vérification statistique hors fonctionnement.
3. La Qualification Opérationnelle (QO) : il s'agit d'une vérification dynamique hors production. On s'assure par le test des fonctions déterminées comme critiques, que l'installation est capable de réaliser ce pour quoi elle a été conçue. On vérifie que chaque fonction s'accomplit normalement de façon répétée.
4. La Qualification de Performance (OP) : elle permet de vérifier dans les conditions de production que le système est capable de fonctionner en garantissant la qualité du produit et ceci de façon reproductible.

La qualification est donc une opération destinée à démontrer qu'un matériel fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus, qui implique:

- La maîtrise du fonctionnement de l'équipement,
- L'identification de points critiques pouvant avoir une incidence sur le produit,
- La mise en place d'une maintenance préventive ciblée et efficace.

Ainsi, certains considèrent la «qualification» et la «validation» comme deux activités distinctes, mais connexes. D'autres emploient le terme «validation» pour englober l'ensemble des activités de pré validation et de qualification plus la validation du procédé.

Partie II

Validation d'un laboratoire de microbiologie

HISTORIQUE

Historiquement, la première tentative a été faite en 1986 par la Société Française de Biologie Clinique à l'intention des laboratoires d'analyse médicale. Ce travail n'a pas connu un très grand retentissement car il n'intégrait pas les notions d'assurance qualité et que le référentiel Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA) n'existait pas encore.

Ensuite, en 1992, la Société des Sciences et Techniques Pharmaceutiques a développé un guide de validation à l'intention des laboratoires de l'industrie pharmaceutique contraints de conduire les études des nouveaux médicaments sous BPL. Cette proposition a connu un succès beaucoup plus vaste et a été largement repris par l'International Conference on Harmonization (ICH).

Les laboratoires de contrôle microbiologique des produits pharmaceutiques peuvent être impliqués dans :

-Les tests de stérilité

- Détection, isolement, le dénombrement et l'identification des micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) et les tests des endotoxines bactériennes dans différents matériaux (matières premières, l'eau), les produits, surfaces, vêtements et environnement

- Essai en utilisant des micro-organismes dans le cadre du système de test.

Ces lignes directrices portent sur tous les laboratoires de microbiologie impliqués dans des activités de contrôle des produits pharmaceutiques, qu'ils soient indépendants ou font partie d'une entreprise pharmaceutique (une unité d'une installation de fabrication de produits pharmaceutiques).

Ces lignes directrices complètent les exigences décrites dans les bonnes pratiques pour les laboratoires pharmaceutiques de contrôle de qualité.

1. LOCAUX ET ENVIRONNEMENT

1.1. Aménagement

- ▲ Par ses dimensions, sa construction et sa localisation, le laboratoire doit répondre aux exigences du contrôle et permettre de réduire au mieux les perturbations qui pourraient altérer le déroulement normal du contrôle.
- ▲ L'aménagement du laboratoire de même que la disposition du matériel et des différents appareils doivent être adéquats pour faciliter le travail des analystes.
- ▲ Le plan du laboratoire doit prévoir une séparation suffisante des activités afin d'éviter qu'une fonction ou une activité ne nuise au déroulement normal du contrôle : **Les activités de microbiologie doivent être effectuées dans des locaux séparés.**
- ▲ Les laboratoires de contrôle doivent normalement être séparés des zones de production. Ceci est particulièrement important pour les laboratoires de contrôle des produits **biologiques, microbiologiques et des radio-isotopes**, qui devraient également être séparés les uns des autres.
- ▲ Le laboratoire doit disposer d'un nombre suffisant de pièces ou de zones pour que les systèmes d'analyse soient isolés et aussi pour éviter toute contamination et tout mélange.
- ▲ Les pièces ou zones de **stockage** des entités d'analyse doivent être séparées des pièces ou zones contenant les systèmes d'analyse. Elles doivent être construites de manière à préserver l'identité, le dosage, la pureté et la stabilité des produits et à permettre le stockage en toute sécurité des substances dangereuses.
- ▲ Des installations appropriées doivent être disponibles pour la collecte, le stockage et l'élimination des déchets, ainsi que les moyens de décontamination et de transport' le cas échéant. Aussi, La manipulation et l'élimination des déchets doivent être effectuées de manière à ne pas mettre en péril l'intégrité des études et l'environnement.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- ▲ Les laboratoires doivent être conçus de manière appropriée en utilisant des matériaux de construction adéquats pour permettre un nettoyage facile, et minimiser les risques de contamination.
- ▲ Les activités de **laboratoire de microbiologie**, tels que la préparation des échantillons, des milieux de culture et dénombrement des micro-organismes, doivent être séparés par un espace de manière à minimiser les risques de contamination croisée, des résultats faussement positifs et de faux résultats négatifs.
- ▲ Il faudrait envisager de concevoir des **zones classées** pour les opérations à effectuer dans le laboratoire de microbiologie, la classification doit être basée sur la criticité du produit et le fonctionnement en cours dans la région :
 - ▲ L'air fourni au laboratoire doit être de qualité appropriée et ne devrait pas être une source de contamination, il doit être établi via des filtres HEPA terminaux.
 - ▲ Toutes les surfaces apparentes doivent être lisses, imperméables et sans fissure afin de réduire la libération ou l'accumulation de particules ou de micro-organismes et de permettre l'usage répété de produits de nettoyage et de désinfectants. Aussi, il ne doit pas y avoir de recoins difficiles à nettoyer.
 - ▲ Les saillies, les étagères, les placards et le matériel doivent être réduits au minimum.
 - ▲ Les portes doivent être d'un modèle ne présentant pas d'anfractuosités difficiles à nettoyer. Les portes coulissantes ne sont donc pas souhaitables pour cette raison.
 - ▲ Les faux plafonds doivent être scellés pour éviter les contaminations provenant de l'espace supérieur.
 - ▲ Les canalisations et les gaines doivent être installées de façon à ne pas créer de recoins, d'orifices non scellés et de surfaces difficiles à nettoyer.
 - ▲ Les éviers et les canalisations d'évacuation doivent être **exclus** des zones de classe B.

En ce qui concerne un laboratoire de microbiologie, les locaux doivent contenir les espaces suivants :

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- Espace de réception des échantillons
- Espace d'entreposage
- Salle de lavage et de stérilisation
- Espace de préparation des milieux de culture
- SAS
- Espace de travail pour l'analyse : Salle pour le test de stérilité et salle pour le test de propreté.

Les normes de sécurité doivent être prises en compte dans la conception du laboratoire d'où la nécessité de concevoir des postes de sécurité microbiologique de façon à protéger les opérateurs à la fois de l'environnement et des microorganismes au cours de manipulation des substances biologiquement actives, infectées ou dangereuses.

Les postes de sécurité microbiologique (PSM) conformes aux exigences de la norme AFNOR FX X44-201 répondent à cette nécessité. On en distingue trois sortes. (cf. annexes, tableau III).

- PSM de type I muni d'un dispositif d'aspiration d'air de bas en haut qui entraîne le flux d'air loin du manipulateur,
- PSM de type II muni d'un flux laminaire de haut en bas et en avant du plan de travail pour créer une barrière entre la manipulation et les manipulateurs, avec évacuation de l'air à travers un filtre,
- PSM de type III caractérisé par une enceinte totalement close munie de manchons terminés par des gants ; l'enceinte en dépression est alimentée en air filtré dont l'évacuation se fait à travers deux filtres à très haute efficacité (HEPA).

Soulignons que ces précautions ont été rendues obligatoires par les directives Européennes 97/59/CEE et 97/65/CEE.

1.2. Installations d'essai de stérilité

L'essai de stérilité est réalisé dans des conditions aseptiques. Pour que ces conditions soient réalisées, l'environnement d'essai doit être adapté aux modalités de réalisation de l'essai de stérilité, de ce fait, les conditions dans

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

lesquelles est réalisé l'essai doivent être régulièrement vérifiées par des prélèvements adéquats effectués dans la zone de travail et par des contrôles appropriés (tels que ceux spécifiés dans les directives communautaires européennes et les guides associés relatifs aux BPF). Cependant, Les précautions prises pour éviter une contamination microbienne ne doivent pas affecter les microorganismes recherchés.

Les installations d'essai de stérilité ont des exigences environnementales spécifiques pour pouvoir assurer l'intégrité des tests effectués.

Les tests de stérilité doivent être effectués dans des conditions aseptiques, qui devraient être équivalentes aux normes qualité de l'air requis pour la fabrication aseptique de produits pharmaceutiques : Le test de stérilité doit être effectué au sein d'une zone de classe A d'air unidirectionnel qui devrait être située dans une chambre propre avec un fond de classe B.

L'essai peut être effectué dans un isolateur, il faut prendre soin à la conception de l'installation et les modes d'écoulement d'air, afin de s'assurer que les modèles de flux d'air unidirectionnel ne soient pas perturbés (cf. Annexes).

La classification de la salle d'essai de stérilité doit être requalifiée au moins annuellement par une personne compétente.

La fréquence de la surveillance peut être justifiée sur la base de la gestion des risques de qualité (QRM). Une cartographie des lieux pour les points d'échantillonnage pour la surveillance de routine devrait être documentée, ainsi que la durée d'exposition, et la fréquence de tous les types de surveillance de l'environnement microbiologique devrait être précisée dans les procédures écrites.

Les tests de stérilité devraient toujours être effectués dans une zone dédiée, en vertu de la même classe que celle utilisée pour les opérations de fabrication stériles / aseptique : Une alimentation en air filtré doit maintenir en toutes circonstances une pression positive et une circulation d'air par rapport aux zones voisines de classe inférieure et doit ventiler efficacement la zone.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Les écarts de pression entre pièces adjacentes relevant de classes différentes doivent être de 10 à 15 pascals (valeurs guides).

Les vestiaires doivent être conçus et utilisés comme des SAS en vue de fractionner physiquement les différentes phases de l'habillage et de diminuer ainsi la contamination microbienne et particulaire des vêtements protecteurs.

Ces locaux doivent être efficacement ventilés avec de l'air filtré. La dernière partie du vestiaire doit relever, « au repos », de la même classe que la zone à laquelle il mène.

Les différentes portes d'un sas ne doivent pas être ouvertes en même temps : Un système de blocage alterné ou une alerte visuelle et/ou sonore doit être utilisé en vue d'empêcher l'ouverture de plus d'une porte à la fois.

De manière générale, les lave-mains ne doivent être installés que dans la première partie des vestiaires.

Les vêtements pour l'opérateur de **test de stérilité** doivent être conformes aux principes de l'article 10 de la GMP de l'OMS pour les produits pharmaceutiques stériles.

1.3. Surveillance de l'environnement dans le laboratoire

Lorsque cela est nécessaire (par exemple dans les zones pour les tests de stérilité) un programme de surveillance de l'environnement devrait être mis en place, qui couvre, le traitement de l'air, la température et la pression différentielle.

La surveillance microbienne de l'environnement de la zone de test de stérilité doit être effectuée au cours de chaque session de travail.

Les limites pour la surveillance microbiologique de l'environnement sont données dans le GMP de l'OMS pour les produits pharmaceutiques stériles. Les limites d'alerte et d'action doivent être définies (cf. annexes, tableaux I et II).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- **Qualité de l'environnement**

Le maintien d'une bonne qualité bactériologique de l'air et des surfaces de travail est nécessaire pour le déroulement normal des travaux de laboratoire.

- **Conditions ambiantes**

Des conditions de température particulières sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement de certains équipements, comme les incubateurs et les bains-marie.

La température ambiante doit se situer entre 16 °C et 27 °C.

- **Surfaces de travail**

La stérilité des surfaces de travail (incubateurs, tables de travail, espace de réception des échantillons, réfrigérateurs) doit être vérifiée mensuellement.

1.4. Nettoyage, Désinfection, Propreté et Hygiène

Il devrait y avoir un et un programme de désinfection et nettoyage documenté et une procédure pour traiter les déchets.

Des installations adéquates pour le lavage et la désinfection des mains devraient être disponibles.

Les vêtements et leur qualité doivent être adaptés aux classes des zones de travail. Ils doivent être portés de façon à protéger le produit des contaminations.

Les montres bracelets, le maquillage et les bijoux doivent être exclus des zones d'atmosphère contrôlée.

La propreté de l'équipement des tables de travail et du laboratoire constitue une condition essentielle à un travail de qualité en microbiologie.

L'entretien des planchers du laboratoire de microbiologie doit s'effectuer à l'aide d'un torchon humide et d'une solution désinfectante. De plus, le désinfectant utilisé pour nettoyer les surfaces de travail doit être d'une efficacité suffisante pour détruire un large spectre de micro-organismes et doivent être changés périodiquement.

Calendrier d'entretien

Le laboratoire doit disposer d'un calendrier d'entretien des locaux et des tables de travail. Le nom du désinfectant utilisé pour le nettoyage des surfaces de travail et du plancher doit être indiqué sur ce calendrier.

2. DIRECTION ET PERSONNEL

Pour que les résultats d'une étude de validation soient eux-mêmes valides, il est essentiel d'avoir la plus grande maîtrise possible sur le risque que représente une variable aussi aléatoire que ce facteur humain.

Le laboratoire doit disposer de personnel en nombre suffisant ayant le niveau d'études, la formation, les connaissances et l'expérience nécessaires pour les différents postes : un personnel d'encadrement et d'un personnel technique ayant l'autorité et les moyens nécessaires pour effectuer leurs tâches et repérer les cas où l'on s'écarte du système qualité et engager les mesures visant à prévenir ou à réduire au minimum de tels écarts.

La direction du laboratoire doit veiller à la compétence de toutes les personnes chargées de faire fonctionner des appareils, instruments ou autres dispositifs particuliers et d'effectuer les analyses. Ces personnes doivent également s'occuper de l'évaluation des résultats et signer les rapports d'analyse.

Le personnel en formation doit être correctement supervisé et il est recommandé de procéder à une évaluation officielle en fin de formation.

Le personnel effectuant des tâches particulières doit être qualifié pour cela et avoir le niveau d'études, la formation, l'expérience et/ou les compétences avérées nécessaires.

Le laboratoire doit employer du personnel permanent ou sous contrat. Il doit veiller à ce que le personnel intérimaire technique et d'exécution sous contrat soit supervisé et suffisamment compétent, motivé et qu'il travaille conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Le laboratoire doit tenir à jour les descriptions de poste du personnel d'encadrement, technique et d'exécution participant aux analyses.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le laboratoire doit tenir à jour des dossiers pour tout le personnel technique, y compris le personnel sous contrat, dans lesquels figureront les compétences utiles, le niveau d'études et les qualifications professionnelles, la formation, le savoir-faire et l'expérience.

Ces renseignements doivent être facilement disponibles et comporter la date à laquelle la qualification et/ou les compétences ont été confirmées. Les critères sur lesquels repose la qualification doivent également figurer dans le dossier.

Le nombre de personnes présentes dans les zones d'atmosphère contrôlée doit être réduit au minimum.

Toutes les personnes (y compris le personnel de nettoyage et d'entretien) qui travaillent dans ces zones doivent recevoir une formation continue qui doit comporter des modules relatifs à l'hygiène et aux éléments de base en microbiologie.

Le personnel est soumis au secret professionnel pour toutes les informations dont il a connaissance dans l'accomplissement de ses tâches.

Les tests microbiologiques doivent être effectués et supervisés par une personne expérimentée, qualifiée en microbiologie ou équivalent.

Le personnel devrait avoir une formation de base en microbiologie et en expérience pratique pertinente avant d'être autorisé à effectuer des travaux couverts par la portée des essais.

Le laboratoire doit également conserver les enregistrements de tout le personnel technique, décrivant leurs qualifications, la formation et l'expérience.

Si une méthode ou une technique n'est pas en utilisation régulière, la compétence du personnel pour effectuer le test doit être vérifiée.

3. ÉQUIPEMENT

Dans le cadre de son système de qualité, un laboratoire doit posséder un programme documenté pour la qualification, étalonnage, vérification de la performance, l'entretien et un système pour surveiller l'utilisation de ses équipements. Chaque équipement doit être identifié, qualifié et étiqueté.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

L'équipement de laboratoire ne doit pas être déplacé entre les zones de classe de propreté différente, afin d'éviter la contamination croisée accidentelle.

Le matériel utilisé dans le laboratoire de microbiologie ne doit pas être utilisé en dehors de la zone de la microbiologie, sauf dans le cas où des précautions spécifiques sont mises en place pour prévenir la contamination croisée.

Les équipements de laboratoire doivent correspondre aux méthodes d'analyse utilisées. Chaque équipement doit posséder un registre d'entretien et faire l'objet d'un programme de vérification périodique de la performance. Toutes les activités d'entretien et de réparation doivent être consignées par écrit.

Les instruments et équipements défectueux ou non performants sont retirés et clairement identifiés jusqu'à la résolution du problème.

De façon générale, tous les équipements devraient satisfaire aux spécifications du fabricant.

Des instructions concernant l'utilisation et l'entretien des équipements doivent être disponibles et le personnel doit être formé pour l'utilisation de ces équipements.

▲ **Entretien de l'équipement**

La maintenance des équipements essentiels doit être effectuée à des intervalles prédéterminés, conformément à une procédure documentée. Des dossiers détaillés doivent être conservés.

▲ **Qualification**

La qualification des équipements est traitée en détail dans la partie précédente (partie I : La qualité dans l'industrie pharmaceutique, Validation).

La date de l'étalonnage et l'entretien doit être clairement indiquée sur une étiquette fixée sur l'instrument.

La fréquence de l'étalonnage et la vérification des performances sera déterminée par une expérience documentée et sera basée sur les besoins, le type de l'équipement et le rendement antérieur de l'équipement.

4. MATÉRIEL ET RÉACTIFS

L'ensemble du matériel et des réactifs utilisés dans le laboratoire doit avoir été contrôlé avant la première utilisation et les critères spécifiés doivent être respectés. Les données brutes doivent être disponibles et facilement accessibles.

▲ *Membranes filtrantes*

Le laboratoire doit exercer des contrôles sur les nouveaux lots de membranes filtrantes utilisés. Il est recommandé de vérifier la présence des caractéristiques suivantes : bonne diffusion du milieu de culture, non diffusion de l'encre du quadrillé et absence de région hydrophobe.

Une copie de la fiche technique de chaque lot utilisé doit être conservée.

▲ *Verrerie et autres éléments*

La verrerie et les contenants de prélèvement utilisés en microbiologie doivent être exempts de tout produit bactériostatique ou bactéricide et être en parfait état après le lavage.

L'instruction de travail concernant le lavage de la verrerie et des contenants de prélèvement doit être disponible et affichée dans le laboratoire.

▲ *Milieux de culture et réactifs*

Les milieux de culture déshydratés et les réactifs doivent être entreposés selon les recommandations du fabricant. De plus, ils doivent être utilisés dans les délais acceptables prescrits par celui-ci.

Chaque nouveau lot de milieu de culture doit être contrôlé pour s'assurer de sa conformité aux critères des méthodes d'analyse.

L'efficacité des nouveaux lots reçus doit être vérifiée par une mesure du pourcentage de récupération (voir titre n°=7 : validation des analyses en microbiologie).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Également, à chaque préparation de milieu de culture, la stérilité et le pH doivent être vérifiés et enregistrés. Les milieux réhydratés doivent être utilisés selon les délais acceptables prescrits dans les méthodes d'analyse.

Le laboratoire doit maintenir un inventaire à jour des milieux déshydratés et des réactifs.

- ▲ Eau de rinçage ou de dilution (tampon phosphate, eau peptonée ou eau déminéralisée stérile)

La stérilité de chaque lot de bouteilles d'eau de rinçage, de dilution ou d'eau déminéralisée stérile doit être vérifiée et enregistrée. Le pH de l'eau de rinçage ou de dilution doit satisfaire aux critères des méthodes d'analyse.

- ▲ Eau déminéralisée ou distillée

Les milieux de culture, les réactifs de même que l'eau de dilution ou de rinçage servant aux analyses microbiologiques sont nécessairement préparés à l'aide d'eau déminéralisée ou distillée ce qui rend la vérification de l'efficacité du système de purification de l'eau indispensable à intervalles réguliers, et les mesures correctives nécessaires doivent être appliquées, car la qualité des résultats d'analyse en dépend.

Les résultats des contrôles doivent être disponibles dans le laboratoire de microbiologie.

- ▲ ***Contenants de prélèvement***

Les contenants de prélèvement doivent être capables de contenir un volume suffisant d'échantillon pour les tests requis. Ils doivent protéger les échantillons des contaminations extérieures jusqu'à ce que les analyses soient effectuées. Ils doivent également permettre un nettoyage et une stérilisation adéquate lorsqu'ils ne sont pas à usage unique.

Le numéro de lot doit être inscrit sur chaque contenant.

▲ *Souches de contrôle*

Les souches de contrôle sont utilisées pour vérifier la qualité des matériaux d'analyse.

Le laboratoire doit s'assurer de conserver et de manipuler correctement les souches et de vérifier périodiquement les caractères phénotypiques et l'activité biochimique.

Le laboratoire doit posséder une liste à jour des souches de contrôle disponibles.

Le laboratoire doit avoir une instruction de conservation et de manipulation des souches de contrôle permettant de maintenir leur intégrité et d'éviter toute mauvaise utilisation.

Les souches de référence peuvent être repiquées pour fournir des stocks de référence ; des contrôles biochimiques doivent être réalisés en parallèle, le cas échéant.

▲ *Réactifs d'identification*

Tous les réactifs utilisés pour la confirmation et l'identification des colonies doivent être contrôlés à la réception et périodiquement, selon l'utilisation du réactif. Les résultats de ces contrôles doivent être enregistrés.

5. TRAÇABILITE DE L'INFORMATION

Le mode d'enregistrement des données constitue un facteur important dans l'obtention de résultats fiables. Tous les renseignements concernant les analyses doivent être enregistrés et disponibles de façon que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses opérations sont contrôlées.

Le laboratoire doit avoir un système défini par écrit permettant d'identifier de façon unique les échantillons à analyser, afin qu'il n'y ait à aucun moment de confusion sur l'identité de tels échantillons. Si un système électronique est utilisé, le laboratoire doit enregistrer la même information que celle exigée. Tous les enregistrements manuscrits doivent être à l'encre.

▲ *Les procédures d'essai*

Les tests doivent normalement être effectués conformément aux procédures décrites dans les pharmacopées nationales, régionales et internationales.

6. ÉCHANTILLONNAGE ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Lorsque les laboratoires d'essais sont responsables de l'échantillonnage pour obtenir des éléments d'essai, il est fortement recommandé que cet échantillonnage soit couvert par un système d'assurance qualité et devrait être soumis à des audits réguliers.

L'échantillonnage doit être effectué uniquement par du personnel qualifié, de façon aseptique en utilisant du matériel stérile.

Tout processus de désinfection utilisé pour obtenir l'échantillon (par exemple la désinfection des points d'échantillonnage) ne devrait pas compromettre le niveau microbien dans l'échantillon.

Les tests sur les échantillons devraient être effectués dès que possible après le prélèvement.

Le transport et le stockage des échantillons doivent être dans des conditions qui préservent l'intégrité de l'échantillon.

Les conditions de stockage doivent être surveillées.

Pour les échantillons où une croissance de la population microbienne pendant le transport et le stockage est possible, il doit être démontré que les conditions de stockage, le temps et la température, n'affectera pas la précision du résultat des tests.

Les précautions appropriées doivent être prises pour s'assurer que l'intégrité des échantillons est maintenue grâce à l'utilisation des contenants hermétiques et stériles pour la collecte d'échantillons.

Il peut être nécessaire de surveiller les conditions environnementales, par exemple, contamination de l'air et la température, sur le site d'échantillonnage.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le temps d'échantillonnage doit être enregistré.

Le laboratoire doit avoir des procédures qui couvrent la livraison et la réception et l'identification des échantillons.

L'échantillonnage doit être effectué selon les normes nationales ou internationales, là où ils existent, ou par des méthodes validées en interne.

Procédures d'échantillonnage doivent être conçues pour recueillir un échantillon représentatif.

Il devrait y avoir une procédure écrite pour la conservation et l'élimination des échantillons.

Si l'intégrité des échantillons peut être maintenue, les échantillons doivent être conservés jusqu'à ce que les résultats des tests soient obtenus.

L'emballage et les étiquettes des échantillons peuvent être fortement contaminés et doivent être manipulés et entreposés avec soin afin d'éviter toute propagation de la contamination.

▲ ***Enregistrement des échantillons au laboratoire***

Le laboratoire doit mettre en place un système d'enregistrement des échantillons permettant de conserver tous les renseignements nécessaires pour assurer une traçabilité adéquate de l'information.

7. VALIDATION DES ANALYSES EN MICROBIOLOGIE

Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important.

On va s'intéresser ici uniquement à la validation des méthodes microbiologiques nécessaire pour mettre en place un laboratoire de microbiologie.

La validité des contrôles microbiologiques, réalisés dans l'objectif d'assurer la sécurité sanitaire des médicaments, nécessite notamment l'obtention de résultats d'analyse fiables.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

La fiabilité des résultats implique l'utilisation de méthodes validées, mises en œuvre par un laboratoire compétent.

La reconnaissance des résultats de contrôles suppose que deux étapes intervenant lors de leur production soient validées :

1. l'étape d'échantillonnage, qui correspond à la constitution et au prélèvement de l'échantillon à partir d'un lot de production, et dont les paramètres (taille, nombre, conservation, ...) doivent être parfaitement définis, si possible sur des bases statistiques ;

2. l'étape d'analyse, qui suppose non seulement qu'il existe une méthode d'analyse validée, mais aussi que le laboratoire prestataire soit compétente pour la mettre en œuvre.

La Pharmacopée Européenne demande à valider les méthodes d'analyse microbiologique dans le laboratoire d'exécution.

La validation implique quatre sortes de tests :

- Témoin négatif : incubation et ensemencement en l'absence de produit.
- Témoins positifs : incubation et ensemencement avec une petite quantité contrôlée de germes.
- Contrôles positifs : incubation et ensemencement avec une petite quantité contrôlée de germes et du produit à tester.
- Essais : incubation et ensemencement avec le produit à tester.

Les témoins négatifs sont assimilés à des contrôles d'environnement puisque le résultat conforme est une absence de colonie.

Les témoins positifs correspondant à des tests de fertilité lors desquels sont vérifiées les qualités nutritives et spécifiques des bouillons et des géloses.

Les contrôles positifs ont pour but de vérifier que la croissance bactérienne n'est pas perturbée, et plus particulièrement inhibée, par la présence du produit à tester.

Les paramètres nécessaires pour la validation d'une méthode d'analyse microbiologique

1. LIMITE DE DÉTECTION D'UNE MÉTHODE

La limite de détection d'une méthode (LDM) permet de déceler la concentration minimale, à l'aide d'une méthode d'analyse, avec une fiabilité définie.

Théoriquement, pour une méthode en microbiologie, il s'agit d'un organisme cible dans le volume d'échantillon analysé. La limite de détection est normalement définie dans la méthode de référence normalisée.

2. LIMITES DE QUANTIFICATION D'UNE MÉTHODE

Les limites de quantification d'une méthode (LQM) sont les concentrations la plus basse et la plus élevée, correspondant au nombre de colonies isolées d'un volume donné d'échantillon, qui peuvent être dénombrées sur une seule membrane ou gélose, à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie et qui constitue la zone quantifiable d'une méthode.

Les limites de quantification sont définies dans les méthodes de référence normalisées.

La limite supérieure de quantification est la valeur au-delà de laquelle la fiabilité d'un dénombrement sur une seule membrane ou gélose à l'aide d'un volume déterminé d'échantillon est affectée par des facteurs incontrôlables.

La limite inférieure de quantification est la valeur en deçà de laquelle l'erreur anticipée devient trop grande par rapport au nombre de colonies dénombrées.

3. FIDÉLITÉ

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répliquabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

3.1. Répliquabilité

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

La réplicabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions : même analyste, mêmes entonnoirs (filtration), même lot de milieu de culture et membrane filtrante, même incubateur, même jour d'analyse. La réplicabilité peut varier d'un analyste à un autre.

Dans la littérature, l'expression « précision intra-technicien » est souvent employée. D'ailleurs, cette donnée peut servir ultérieurement à l'évaluation et au suivi de la performance technique d'un analyste.

3.2. Répétabilité

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont les conditions analytiques varient, comme par exemple: l'analyste, le lot de préparation de milieu de culture, le lot d'eau de rinçage, le lot de membrane filtrante, l'incubateur, le moment de la journée (avant-midi et après-midi), le poste de travail, etc.

3.3. Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, même jour.

Cette donnée n'est disponible que si le laboratoire participe à un essai inter-laboratoire pour une méthode identique et un même échantillon et n'est requise que pour la validation d'une méthode développée par le laboratoire.

4. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Le pourcentage de récupération permet de déterminer, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié, divisée par la concentration de l'organisme ajouté. Un minimum de cinq essais est exigé pour la détermination du pourcentage de récupération d'une méthode d'analyse.

5. PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

La performance de la méthode peut se mesurer à l'aide de la sensibilité, de la spécificité, du taux de faux positifs, du taux de faux négatifs et de l'efficacité. Les données de confirmation amassées au cours des dernières années peuvent être utilisées par le laboratoire. Le résultat sera bien plus représentatif de la réalité de la méthode si un grand nombre de données est utilisé.

La sensibilité est la fraction de tous les résultats positifs correctement identifiée dans le comptage présumé; la spécificité est la fraction de tous les résultats négatifs correctement identifiée dans le comptage présumé; le taux de faux positifs est la fraction de positifs observés non correctement identifiée; le taux de faux négatifs est la fraction de négatifs observés non correctement identifiée; l'efficacité est la fraction de colonies identifiée correctement.

6. SÉLECTIVITÉ DE LA MÉTHODE

La sélectivité est la caractéristique d'une méthode qui favorise la croissance de l'organisme désiré tout en retardant la croissance d'autres organismes n'offrant pas d'intérêt. Les données de confirmation amassées au cours des dernières années peuvent être utilisées par le laboratoire. Le résultat sera bien plus représentatif de la réalité de la méthode si un grand nombre de données est utilisé.

L'index de sélectivité est calculé à l'aide du rapport du nombre de colonies typiques recherchées et observées, sur le nombre total de colonies isolées sur les milieux de culture pendant l'analyse. La sélectivité est meilleure lorsque l'index se rapproche de l'unité.

Partie III

Méthodes de contrôle microbiologique

1. CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DE L'ENVIRONNEMENT (AIR ET SURFACE)

L'air contient naturellement des particules (contamination particulaire) et des micro-organismes (aérobiocontamination) dont la nature et la quantité varient en fonction des lieux géographiques.

Les micro-organismes dans l'air sont des bactéries, des levures, des spores (champignons), des virus, d'où l'importance de filtrer rigoureusement l'air dans les zones à atmosphère contrôlée (ZAC) et d'en contrôler les volumes-cibles de contaminants acceptables.

Cette filtration ne se suffit pas à elle-même. Il faut également contrôler la circulation de cet air dans les ZAC selon les exigences de l'aérodynamique : le flux d'air unidirectionnel, dont le cheminement est notamment vérifié par des tests aérauliques, doit provoquer un effet de balayage des biocontaminants éventuels vers l'extérieur pour protéger la zone la plus critique.

Pour maintenir les degrés de pression d'air dans les salles selon leur classe, des sas fonctionnent comme des écluses, une porte ne s'ouvrant que si l'autre est refermée.

1.1. Le développement de la technologie « salle propre » et l'effort normatif

De 1960 à 1990, l'expérience industrielle mène à la sélection d'une solution performante au problème de la maîtrise du « risque poussière » : c'est la technologie dite « salles propres ».

En 1990, cette technologie est suffisamment stabilisée pour que le CEN s'empare du dossier qui sera transféré à l'ISO en 1993.

Deux séries de normes vont paraître sous les deux références suivantes :

*Série NF en ISO 14644, salles propres et environnements maîtrisés apparentés :

Partie 1 : classification de la propreté de l'air (NF en ISO 14644-1 : 1999).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Partie 2 : Spécifications pour les essais et la surveillance en vue de démontrer le maintien de la conformité avec l'ISO 14644-1 (NF en ISO 14644-2 : 2000).

Partie 3 : méthodes d'essai (NF en ISO 1466-3 : 2006).

Partie 4 : conception, construction et mise en fonctionnement (NF en ISO 14644-4 : 2001).

Partie 5 : exploitation (NF en ISO 14644-5 : 2004).

Partie 6 : vocabulaire (NF en ISO 14644-6 : 2007).

Partie 7 : dispositifs séparatifs (postes à air propre, boîtes à gants, isolateurs et mini-environnements) (NF en ISO 14644-7 : 2004).

Partie 8 : classification de la contamination moléculaire aéroportée (NF en ISO 14644-8 : 2006).

Partie 9 : classification de la propreté des surfaces par la concentration de particules (PR NF en ISO 14644-9 : 2008).

*Série NF en ISO 14698, salles propres et environnements maîtrisés apparentés- Maîtrise de la biocontamination :

Partie 1 : principes généraux et méthodes (NF en ISO 14698-1 : 2004).

Partie 2 : évaluation et interprétation des données de biocontamination (NF en ISO 14698-2 : 2004).

La série NF en ISO 14644 est consacrée aux poussières (particules), la série NF en ISO 14698 à la biocontamination (microorganismes).

L'AFNOR a réuni ces textes en un recueil de plus de 500 pages, un chiffre qui montre l'importance du travail accompli, et la mine d'informations que cela représente pour nombreuses industries concernées.

Notons que l'effort normatif n'est pas fini et que l'on travaille sur la classification de la biocontamination et la gestion du risque de biocontamination.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Il est évident qu'une salle propre est une salle qui est propre. Le terme « salle propre » revêt de nos jours une signification particulière qui est définie dans la norme internationale ISO 14644-1 de la manière suivante :

Une salle dans laquelle la concentration des particules en suspension dans l'air est maîtrisée, et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la génération et la rétention des particules à l'intérieur de la pièce, et dans laquelle d'autres paramètres pertinents, comme la température, l'humidité et la pression sont parfaitement maîtrisés.

Il s'agit d'un local qui minimise l'introduction la génération et la rétention de particules.

Pour obtenir ce résultat, on introduit un débit d'air particulièrement élevé et filtré avec des filtres à très haute efficacité (HEPA).

Ce débit d'air sert à diluer et à éliminer les particules et les microorganismes émis par les personnes et les équipements à l'intérieur de la salle, à mettre en surpression la salle pour éviter les entrées d'air sale de l'extérieur.

Les salles propres définies par la norme NF EN ISO 14644-1 sont essentielles pour un grand nombre de productions ainsi qu'à l'hôpital, en santé humaine.

Plus qu'à un espace, elles correspondent à un ensemble de technologies combinées entre elles pour répondre aux besoins de ne pas transmettre de microorganismes, véhiculés par divers vecteurs, à un produit de fabrication ou à l'homme malade.

En deuxième lieu, une salle propre est construite avec des matériaux qui n'émettent pas de particules et qui, de plus, sont prévus pour être facilement nettoyables.

Enfin, les personnes à l'intérieur de la salle sont revêtues de tenues qui enveloppent largement le corps afin de réduire au minimum la dissémination à l'intérieur de la salle propre.

Dans les salles propres, on peut également assurer le contrôle de la température, l'humidité, le niveau sonore, l'éclairage et les vibrations.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Selon les techniques de distribution, de traitement de l'air, de mise en surpression, on distingue quatre grands types de salles propres :

- les salles conventionnelles à flux turbulent ou à flux non unidirectionnel,
- les salles à flux directionnel, vertical ou horizontal, ancien flux laminaire, dans lesquelles l'air est soufflé suivant un plan de filtres absolus et traverse la pièce de manière unidirectionnelle,
- le flux composite à ventilation turbulente, associé à un plafond soufflant à flux unidirectionnel,
- les isolateurs (boîtes à gants), en complément.

1.2. La classification des salles propres en pharmacie

Les salles propres pour la production pharmaceutiques sont soumises à des normes spécifiques. Les deux normes de référence ont été publiées par l'union Européenne et les États-Unis.

Le Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication de L'Union Européenne

Pour la fabrication des médicaments stériles, quatre niveaux de propreté de l'air sont donnés. La classification des particules en suspension dans l'air correspondant à ces niveaux est indiquée dans le tableau (voir annexes).

Les conditions particulières définies pour l'état au repos doivent être retrouvées en un court laps de temps, entre 15 et 20 minutes (valeur guide) après l'arrêt des activités.

En routine, on se réfère maintenant aux zones à atmosphère contrôlée divisées en quatre classes A, B, C, D.

Selon les lignes directrices concernant la fabrication des médicaments stériles (Bonnes Pratiques de fabrication, 6ème édition...). Celles-ci correspondent à des limites de teneur de l'atmosphère en particules et en contaminations microbiologiques considérées séparément, conformément aux tableaux I et II ci-dessous.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Ainsi, par exemple, la production de médicaments injectables exigeant une ambiance aseptique, nécessite une zone de classe A (correspondant à la classe 100 de la Federal Standard N°209 américaine). (Voir tableau I)

1.3. Maîtrise de la contamination et élaboration du schéma de risques

Avant de parler d'une maîtrise de contamination et avant de mettre en place un schéma de risque, il faut d'abord identifier les sources et le cheminement de la contamination pour pouvoir agir d'une façon efficace et pertinente.

1.3.1. Les sources de contamination

Parmi toutes les sources possibles de contamination d'une salle propre, on peut citer:

▲ *Les zones sales adjacentes à la salle propre*

Les zones adjacentes à la salle propre sont généralement moins propres que la salle où l'on produit : les sas matériel et personnel peuvent être contaminés par l'activité qui s'y déroule, et dans les couloirs de circulation et de service, il est possible qu'il n'y ait pas maîtrise de la contamination.

▲ *L'air de la salle propre*

L'air qui est introduit dans la salle peut être une source de contamination, s'il n'est pas convenablement filtré.

L'air ambiant de la salle, peut, lui aussi, être une source de contamination qui véhicule des éléments indésirables en suspension, émis par d'autres sources comme les personnes ou les équipements.

▲ *Les surfaces*

Parmi les surfaces qui peuvent être source de contamination, on peut citer le sol, le plafond et les parois de la salle propre. Leur contamination est avant tout à des apports par contact (quand les gens les touchent) ou par sédimentation des contaminants aéroportés. Ces surfaces peuvent également générer des

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

contaminants, si elles sont constituées de matériaux de mauvaise qualité, susceptibles de se désagréger, de relarguer des fibres, des fragments de bois, de plâtre, etc.

Les tenues de salle propre, les gants et les masques présentent aussi des surfaces qui sont contaminées par les personnes qui les portent, ou par contact avec d'autres surfaces de la salle.

▲ **Les personnes**

Les personnes qui se trouvent dans la salle peuvent diffuser des contaminants issus de leur peau, de leur bouche et de leur tenue.

▲ **Les équipements en fonctionnement**

Les équipements constituent également une source de contamination, car ils peuvent émettre des contaminants générés par les pièces en mouvement, ou par l'apport thermique, les phénomènes électriques, etc.

▲ **Les matières premières, conditionnements et emballages**

Les matières premières et les emballages, que l'on introduit dans la salle propre, ou ce qui rentre par des tuyauteries, peuvent être contaminés et devront être considérées comme des sources potentielles.

1.3.2. Les voies de transfert par l'air ou par le contact

Il faut non seulement identifier les sources de contamination mais aussi les voies de transfert de cette contamination.

Les deux voies principales de cheminement des contaminants sont l'air et le contact.

Les contaminants peuvent être mis en suspension dans l'air à partir de toutes les sources potentielles, et transmises ainsi au produit.

Si les particules sont fines, elles sont facilement transportées, sous forme d'aérosol, vers d'autres points de la salle propre. A l'inverse, les particules grossières, comme les fibres, les éclats et la grenaille restent assez proches de

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

leur source, et peuvent retomber directement sur la surface du produit, ou être absorbées dans sa masse.

On peut rencontrer des contaminations par contact chaque fois que des équipements, des conditionnements, des emballages, des matières premières, des gants des tenues, etc. se trouvent à proximité directe du produit.

La contamination par contact peut se produire de différentes manières, comme, par exemple, lorsque le produit est manipulé par des personnes, qui transmettent une contamination avec leurs gants, ou quand le produit rentre en contact avec un conditionnement ou des emballages sales.

En utilisant les informations présentées dans ce paragraphe, et le précédent, on peut identifier les sources et les voies de contamination, puis élaborer un schéma de risques dans n'importe quelle salle propre.

1.3.3. Elaboration d'un schéma des risques

L'élaboration d'un schéma des risques est une méthode pour comprendre quelles sont les sources de contamination, et comment cette contamination parvient ensuite jusqu'au produit.

On explique souvent mal quel est le processus de contamination d'un produit, mais le fait d'élaborer un schéma permet généralement d'enrichir la réflexion.

Le schéma des risques mettra en évidence les sources potentielles de contamination, les voies principales de transmission et les méthodes pour maîtriser cette transmission. Il pourra s'avérer nécessaire plusieurs schémas pour un procédé complexe, ou dans des cas où il faut maîtriser plusieurs contaminants, par exemple : des particules inertes, des particules porteuses de microbes et une contamination moléculaire.

1.4. Objectifs des contrôles d'environnement

La réalisation des contrôles d'environnement (air, eaux, surfaces) fait partie de la politique de lutte contre la contamination des produits pharmaceutiques. Ce sont des indicateurs qui s'intègrent dans un plan d'action qualité visant à la gestion du risque de contamination.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Chaque laboratoire pharmaceutique doit adapter la stratégie de contrôle de son environnement, en fonction de zones à risque qui auront été au préalable définies.

Les objectifs des contrôles d'environnement peuvent être de plusieurs ordres :

- Contrôles dans le cadre d'une procédure de qualification d'une installation

Avant le démarrage des activités dans un nouvel environnement (ex : salles opératoires, flux laminaires) ;

- Contrôles à visée de surveillance

Par exemple :

Dans le cadre du plan de maintenance d'une installation (ex. : flux laminaires) ;

Dans le cadre d'un plan d'action qualité (surveillance de points critiques) établissement du niveau de contamination de base et suivi

Dans le cadre de travaux générant un risque: évaluation du niveau de ce risque.

- Contrôles à visée d'investigation

Recherche de la source de contamination afin de la supprimer.

1.5. Organisation générale des prélèvements et transport des échantillons

Les conditions de prélèvement doivent répondre à une standardisation.

Ces prélèvements sont réalisés par un opérateur formé en matière de prélèvements à visée microbiologique de l'environnement.

La tenue de l'opérateur doit être adaptée au site où est effectué le prélèvement.

L'identification de l'échantillon comprend les informations classiques (site, date, heure, identité de l'opérateur...), mais aussi toute information susceptible d'être

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

prise en compte dans la technique d'analyse et pour l'interprétation des résultats. Par exemple :

- le moment de réalisation du prélèvement (hors présence humaine ; pendant l'activité avec le nombre de personnes présentes ; après le nettoyage...) ;
- les caractéristiques de l'installation contrôlée (caractéristiques du système de traitement de l'air...) ;
- les problèmes éventuels rencontrés lors du prélèvement.

Certains prélèvements pourront être accompagnés de mesures complémentaires.

Par exemple : mesure de la température, du taux de désinfectant résiduel lors des prélèvements d'eau, mesure de la surpression ou de la vitesse de l'air lors des prélèvements d'air...

Le volume de chaque échantillon est fonction du contrôle réalisé.

Le délai et les conditions d'acheminement de l'échantillon doivent assurer la survie des micro-organismes collectés sans en favoriser le développement, ni celui de la flore associée. Le transport doit être le plus rapide possible et en cohérence avec la réglementation.

1.6. Contrôle de l'air

• Indications

Les investigations ne se justifient qu'en zones à environnement maîtrisé, c'est-à-dire lorsqu'il existe un système de traitement d'air dont la conception, la performance et l'entretien permettent d'obtenir et de maintenir une classe particulaire donnée.

Dans ce contexte, les indications peuvent se décliner ainsi :

Dans le cadre du processus de maîtrise du système de traitement de l'air, comme indicateurs de résultats et validation de tous travaux de maintenance (plan d'assurance qualité). La fréquence des prélèvements doit être définie en concertation avec le service d'hygiène.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

En cas de travaux dans un secteur à environnement maîtrisé ou un secteur adjacent.

Les prélèvements doivent être réalisés par du personnel spécifiquement formé.

La référence à des procédures opératoires validées est indispensable.

- ***Comptage des particules en suspension dans l'air***

Le test le plus important pour tester les performances d'une salle propre est le comptage particulaire.

Avant de l'effectuer, il faut avoir réalisé tous les contrôles sur les points suivants : débit d'air soufflé, pressions différentielles, schéma aéraulique, écoulement d'air entre les salles et intégrité des filtres.

Des résultats satisfaisants doivent être obtenus pour chacun de ces contrôles.

Ensuite, et en dernier lieu, le comptage particulaire sera effectué pour apporter la preuve que la concentration particulaire ne dépasse pas la limite supérieure de classe dans l'état d'occupation convenu.

Il est assuré par des appareils appropriés appelés les compteurs de particules

Les zones et les dispositifs d'atmosphère contrôlée sont surveillés « en activité » de façon systématique et les emplacements de prélèvements sont définis sur la base d'une analyse de risque documentée et des résultats obtenus pendant les essais de classification des locaux ou des dispositifs d'atmosphère contrôlée.

Dans les salles propres de forte exigence, où le produit présente une forte sensibilité à la contamination ambiante, on pratique un monitoring (une surveillance) continu de l'air. Cependant, dans les salles propres de moindre exigence, il n'est pas nécessaire d'effectuer un contrôle continu : on peut se contenter de l'intervention ponctuelle d'un technicien avec un compteur de particule pour effectuer le contrôle.

Les contrôles particuliers sont effectués à l'aide de compteurs de particules. Le choix du compteur de particules doit tenir compte de ses qualités ergonomiques (poids, encombrement, maniabilité...).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Cette technique s'intéresse aux particules d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5 μm . L'air étant un milieu fluctuant et hétérogène, un prélèvement unique est insuffisant et il est préférable de réaliser 3 prélèvements en chaque point.

Les comptages et surtout les cinétiques particulières sont des investigations délicates à ne confier qu'à du personnel formé.

- **Comptage des microorganismes**

Il existe une grande variété de dispositifs d'échantillonnage des bioaérosols. Ils entrent cependant dans trois catégories :

- Impaction sur une boîte de Pétri contenant une substance nutritive. L'impaction permet de séparer une particule d'un courant gazeux à partir de l'inertie des particules. L'impacteur est constitué d'un embout en forme de trou ou de fente de taille variable et d'un substrat dans une boîte de Pétri (milieu de culture) : L'air aspiré est directement projeté sur les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture spécifique pour la recherche des micro-organismes. L'effet d'inertie crée l'impaction des M.O. sur les boîtes. La boîte de Pétri est ensuite enlevée et mise en incubation. On procède ensuite à un comptage.

Parmi les limites données dans la norme AFNOR, on note la faible précision et la nécessité d'un temps d'échantillonnage court. Par contre, le niveau de détection est élevé ce qui permet une utilisation en atmosphère avec des concentrations faibles.

- Impingers : les impingers réalisent un échantillonnage des aérosols cultivables dans un fluide. Un sous échantillon de cet échantillon liquide est mis en culture sur différents milieux. Une quantité plus grande en microorganismes peut être mise en culture.
- Filtration : les particules sont ici collectées à partir d'un échantillon d'aérosol sur un filtre de nature membraneuse ou fibreuse. La taille des pores des filtres peut varier de 0.01 à 10 μm , ce qui permet d'échantillonner la fraction inhalable des particules.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Les filtres sont ensuite lavés et les microorganismes sont examinés dans la solution de lavage par mise en culture. Les solutions de lavage subissent des dilutions avant toute mise en culture. C'est pourquoi cette méthode reste flexible pour les microorganismes qui sont présents en grande quantité dans l'air.

Cette technique n'est guère adaptée aux microorganismes dont les niveaux de concentration sont très faibles.

La norme ne précise pas le type d'échantillonneur qu'on doit utiliser. Il est simplement recommandé que l'échantillonneur utilisé ait une efficacité d'échantillonnage connue et documentée.

D'une façon générale, les contrôles de l'aérobiocontamination sont effectués à l'aide de biocollecteurs dont les caractéristiques techniques vont conditionner la qualité des résultats d'analyse. Par souci de reproductibilité et de comparaison des résultats le même appareil sera toujours utilisé.

Les critères de choix d'un biocollecteur doivent tenir compte :

- Des qualités ergonomiques (poids, encombrement, maniabilité...) ;
- Des exigences de la norme ISO/DIS 14698-1.
- De la possibilité de désinfecter la surface externe de l'appareil, de stériliser les parties amovibles de l'appareil (« buses ou cribles ») ;
- De la possibilité de prélever hors présence humaine (appareils à télécommande ou à déclenchement différé) ;
- l'appareil doit être livré avec un certificat d'étalonnage « d'origine » et un contrôle d'étalonnage doit pouvoir être proposé par le fournisseur.

L'air étant un milieu fluctuant et hétérogène, un prélèvement unique est insuffisant. Il est donc conseillé de faire comme dans les comptages particuliers, 3 prélèvements en chaque point (norme NF S 90-351).

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- **Contrôle particulière ou contrôle de l'aérobiocontamination ?**

Quelques éléments peuvent orienter le recours à l'une ou l'autre de ces deux techniques d'investigations :

- Il n'existe pas obligatoirement de corrélation entre le nombre de particules et le nombre de micro-organismes dans l'air.
- Le comptage particulaire est plus aisé à mettre en œuvre et plus réactif (résultats absolus et immédiats) que la mesure de l'aérobiocontamination qui impose des délais de mise en culture au laboratoire.
- Le comptage particulaire permet de se référer à des normes définissant clairement des classes d'empoussièrement particulaire.
- Les mesurages de l'aérobiocontamination font également référence à des classes bactériologiques ou à des recommandations, mais leur interprétation est bien plus délicate en raison de la grande disparité de performances des appareils et de l'absence de techniques de référence.

Du fait des avantages pratiques et de la meilleure standardisation présentés par le contrôle particulaire.

Les contrôles d'aérobiocontamination peuvent être utiles dans un deuxième temps pour évaluer le niveau de concentration en micro-organismes dans l'air, lorsque les contrôles particuliers ne sont pas conformes au niveau cible.

Il est important que chaque établissement détermine en fonction de la nature de ses installations les points critiques à prélever afin de définir un plan d'échantillonnage dans le cadre d'une démarche qualité spécifique. Cette démarche doit associer les services techniques de l'établissement et l'équipe opérationnelle d'hygiène.

Une surveillance microbiologique supplémentaire est également nécessaire en dehors des phases de production, par exemple après des opérations de validation, de nettoyage ou de désinfection.

Des seuils d'alerte et d'action appropriés sont définis pour les résultats de la surveillance particulaire et microbiologique.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

En cas de dépassement de ces limites, des procédures opérationnelles imposent des mesures correctives.

1.7. Le contrôle microbiologique de surface

Il existe plusieurs méthodes de prélèvement microbiologique sur une surface, mais deux entre elles sont couramment utilisées dans les salles propres. Il s'agit des prélèvements par contact et d'écouvillonnage.

➤ Le prélèvement par contact

On utilise des boîtes de contact ou des lames souples chaque fois que la surface, sur laquelle on souhaite prélever un échantillon, est plate.

Pour les boîtes de contact, elles ont généralement un diamètre de 50 mm et se composent d'une base creuse recouverte par un couvercle qui s'emboîte sur une lèvre creuse inscrite sur toute la périphérie de la base. La boîte est remplie de 15.5 à 16 ml de gélose, pour obtenir un ménisque proéminent.

On applique la partie recouverte de gélose sur la surface à prélever. Les microorganismes vont adhérer à la gélose en contact.

La boîte est ensuite mise en culture pendant une durée et une température appropriées ; les microorganismes vont former des colonies que l'on pourra dénombrer.

Sur des surfaces qui sont souvent mises à une désinfection, il y a un risque de rencontrer des résidus lors du prélèvement. Ces résidus sont susceptibles d'inhiber la multiplication des microorganismes. Il en résulte qu'il est parfois nécessaire d'incorporer dans le milieu de culture des composés chimiques capables de neutraliser l'action du désinfectant. Il est aussi possible d'utiliser des lames de contact pour effectuer des prélèvements de surface. Ces lames sont détachées de leur boîte puis appliquées sur la surface à prélever.

Les microorganismes piégés sur la gélose sont comptés par énumération des colonies après mise en culture.

➤ **Écouvillonnage**

Pour effectuer un prélèvement sur des surfaces irrégulières, on a très souvent recours à l'application d'un écouvillon, à tête absorbante (en coton par exemple).

De la façon la plus simple, on frotte au jugé la surface à tester avec un écouvillon stérile et ensuite, on ensemence l'écouvillon sur une gélose. Ensuite, on met en culture la gélose, puis on dénombre les microbes.

Pour améliorer l'efficacité de la reproductibilité de ce procédé, on peut tremper l'écouvillon dans un liquide stérile, tel que le sérum physiologique, avant de le passer sur la surface à prélever.

On peut aussi employer d'autres pratiques qui consistent à agiter l'écouvillon dans un liquide, pour récupérer le plus possible de microorganismes piégés dans l'écouvillon lors du prélèvement.

1.8. Prélèvement d'échantillons sur les personnes

Les personnes sont le principal émetteur de microorganismes dans une salle propre.

Il peut s'avérer nécessaire de les surveiller pour s'assurer qu'elles n'émettent pas de quantités anormalement importantes de microorganismes à l'intérieur de la salle propre.

Lorsqu'on décèle des concentrations particulièrement élevées de microorganismes en suspension dans l'air, dans d'autres fluides, sur des surfaces ou dans le produit, il peut être opportun de rechercher la personne qui est à l'origine de cette contamination.

En règle générale, on a recours aux méthodes suivantes :

- L'empreinte des doigts. On appuie, ou on passe, les doigts ou le gant de la personne examinée sur une gélose, pour ensuite dénombre les microorganismes.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- Des boîtes ou des lames de contact. On prélève un échantillon sur la tenue d'une personne en appuyant la boîte ou la lame contre le tissu. Il est préférable d'effectuer ce prélèvement à la sortie de la salle propre.
- La body box. Quand une personne, dans ses vêtements habituels, effectue des gestes à l'intérieur de la cabine de test, il est possible de déterminer son taux de dispersion de microorganismes.

2. CONTROLE DE L'EAU PHARMACEUTIQUE

Le secteur industriel est un grand consommateur d'eau mais malheureusement dans encore bien des cas un grand pollueur.

Parallèlement, la qualité de l'eau utilisée dans les processus de fabrication et de production est également une préoccupation majeure de nombreux industriels qui interviennent sur des secteurs pointus tels que l'industrie pharmaceutique ou informatique...

Pour répondre à leurs besoins, les industriels utilisent des eaux purifiées et des fois même de l'eau ultra pure. Bien entendu, le niveau de purification est fonction de la production.

▲ Les eaux pharmaceutiques

Dans l'industrie pharmaceutique, l'eau est une des matières premières les plus importantes.

L'eau est un des éléments les plus utilisés par l'industrie pharmaceutique : elle peut être présente en tant qu'excipient, servir à la reconstitution d'un produit fini, participer à des étapes de synthèse ou de contrôle analytique ou bien encore servir en tant qu'agent de nettoyage.

La pharmacopée Européenne demande de produire et de maintenir une eau pharmaceutique correspondant à l'usage pour lequel elle est destinée. Elle doit être fabriquée à partir d'une eau « bonne à la consommation humaine ».

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Les pharmacopées définissent l'aspect normatif des qualités précises d'eaux destinées à la production des produits pharmaceutiques et leur mode d'obtention.

Les technologies utilisées doivent permettre de produire et de maintenir la qualité normative de ces eaux pharmaceutiques aux points d'utilisation.

Différentes qualités d'eau sont nécessaires, selon l'utilisation qui en serait faite.

Les différentes qualités d'eau se remarquent par leur pureté chimique et microbiologique.

- Eau purifiée

Eau destinée à la préparation de médicaments autres que ceux qui doivent être stériles et exempts de pyrogènes, sauf exception justifiée et autorisée.

- Eau hautement purifiée

Eau destinée à être utilisée dans la préparation de médicaments lorsqu'une eau d'une qualité biologique élevée est nécessaire, sauf dans les cas où l'emploi d'Eau pour préparations injectables est requis.

- Eau pour préparations injectables : Eau PPI

Eau destinée soit à la préparation de médicaments pour administration parentérale à véhicule aqueux (eau pour préparations injectables en vrac), soit à la dissolution ou la dilution de substances ou préparations pour administration parentérale (eau stérilisée pour préparations injectables).

L'eau est un élément important dans la production des injectables. Le niveau de qualité attendu nécessite la mise en œuvre d'installations de traitements capables d'éliminer les sels minéraux (deminéralisation), les micro-organismes, et de supprimer toute activité pyrogène (provoquant de la fièvre) par l'absence d'endotoxines.

Les principales étapes de purification sont :

- L'adoucissement

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- L'osmose inverse
- Les lits mélangés de résines
- La distillation (pour les besoins critiques)

L'osmose inverse est un système de filtration qui, sous l'effet de la pression, permet de retenir les minéraux, les particules, les micro-organismes, en fonction de leur taille. Les lits mélangés sont des cuves remplies de résine polymère ayant la capacité de retenir les sels minéraux par échanges d'ions.

- Eau pour irrigation (eau versable)

Cette appellation, codifiée par la Pharmacopée Européenne dans la monographie « Préparations pour irrigation », désigne des préparations aqueuses stériles de grands volumes destinées à l'irrigation des cavités, des lésions et des surfaces corporelles, par exemple au cours d'interventions chirurgicales.

L'étiquetage doit indiquer que l'eau ne doit pas être injectée, qu'elle doit être utilisée en une seule fois et que les quantités non utilisées doivent être jetées. L'eau pour irrigation doit être stérile et contenir moins de 0,5 UI/ml d'endotoxines bactériennes.

- ▲ En ce qui concerne le contrôle, l'analyste procède à une filtration de l'échantillon au travers d'une membrane. Cette membrane agit comme un tamis, elle possède des mailles suffisamment petites (0.45 µm) pour empêcher aux germes de la traverser. La membrane contenant les germes en surface est placée sur un milieu nutritif dans une boîte de pétri et l'ensemble est incubé en étuve thermostatique à la température idéale de développement. Ensuite, les colonies sont identifiées ou dénombrées.

3. VALIDATION DE NETTOYAGE

La désinfection des zones d'atmosphère contrôlée est particulièrement importante. Elles sont minutieusement nettoyées, conformément à un programme écrit.

Lorsque des désinfectants sont utilisés, il convient d'en employer plusieurs et de différents types. Une surveillance microbiologique régulière est nécessaire en vue de détecter tout développement de souches résistantes.

Les désinfectants et les détergents sont contrôlés sur le plan de la contamination microbienne ; leurs dilutions sont conservées dans des récipients nettoyés au préalable et ne peuvent être stockées pour une durée déterminée à moins qu'elles n'aient été stérilisées.

Les désinfectants et détergents utilisés dans des zones de classe A et B sont stériles.

La fumigation des zones d'atmosphère contrôlée peut s'avérer utile pour diminuer la contamination microbienne dans les endroits inaccessibles.

4. CONTROLE DES MEDICAMENTS

Le contrôle microbiologique des médicaments produits finis, s'effectue conformément aux exigences de la pharmacopée européenne. Cependant, le microbiologiste intervient dès la mise au point de la formulation et participe à la réalisation du dossier d'AMM en vue d'assurer la qualité microbiologique du produit fini.

Au cours de l'étape « Recherche et Développement » les études peuvent porter sur la qualité des matières premières, le choix du meilleur agent de conservation et l'évaluation de sa stabilité au fil du temps, le comportement de la formule en conditions normales d'utilisation (CNU) dans un conditionnement donné, la mise au point de méthodes de contrôle d'activité du produit fini, etc.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Les résultats acquis permettent la mise en place des contrôles de routine tout au long de la fabrication, matières premières, produits en cours, produits finis, et simultanément contrôle de l'eau, de l'air, des surfaces, des personnels, des matériels et articles de conditionnement. Enfin les contrôles de stabilité jusqu'à la date de péremption constituent la dernière étape.

En ce qui concerne les aspects réglementaires, la Pharmacopée Européenne classe les préparations pharmaceutiques en quatre catégories : la catégorie 1 comprend les produits obligatoirement stériles, les catégories 2, 3 et 4 les produits non obligatoirement stériles. La catégorie 2 comprend les préparations pour application locale ou pour administration dans les voies respiratoires. La catégorie 3 les préparations pour administration par voie orale ou rectale ; la catégorie 4 ne contient que des médicaments à base de plantes.

Les médicaments de la catégorie 1 sont soumis aux essais de stérilité ; ceux des catégories 2, 3 et 4 font l'objet de dénombrements de microorganismes totaux et de la recherche des bactéries spécifiées. A cela, il faut ajouter selon la nature de la formulation ou celle du principe actif, la mise en œuvre des techniques d'évaluation de l'efficacité des agents de conservation antimicrobienne, de l'activité microbicide des antiseptiques, les techniques de titrage des antibiotiques.

Ces techniques officielles, normalisées dont seul le principe sera rappelé, présentent certains inconvénients.

Elles sont souvent lourdes à mettre en œuvre, nécessitent des délais de réponse longs et sont peu automatisables.

La tendance actuelle est la recherche de techniques alternatives qui seront sommairement exposées mais au sujet desquelles se posent les problèmes de validation.

Les techniques utilisées pour l'analyse microbiologique des médicaments sont très formalisées, on se réfère à des méthodes normalisées, validées, nationales ou internationales.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

L'analyse est :

- Soit qualitative et quantitative : dans ce cas, elle est intitulée recherche et dénombrement de... on détecte un groupe microbien choisi comme indicateur.
- Soit qualitative. Dans ce cas on recherche la présence ou l'absence d'un agent microbien donné.

Les résultats doivent être interprétés en tenant compte des critères légaux d'acceptabilité définis par les textes réglementaires et selon la nature du médicament étudié.

4.1. Essai de stérilité : contrôle des produits pharmaceutiques stériles

Il a pour but de déceler tout microorganisme revivifiable (bactérie ou funji) susceptible d'être présent dans l'échantillon analysé.

Il doit être réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuse (hotte à flux d'air laminaire de classe A dans une salle propre de classe B).

Il s'effectue soit par ensemencement direct des milieux nutritifs spécifiques avec le produit à examiner, soit par filtration sur membrane.

La durée d'incubation à 30-35°C pour les bactéries et à 20-25°C pour les funji, est de 14 jours.

L'absence de tout développement microbien satisfait à l'essai de stérilité.

Cet essai doit être effectué sur un nombre d'échantillons représentatif des divers lots de stérilisation pour donner une assurance suffisante en ce qui concerne les résultats de l'essai.

La longue durée d'incubation et l'extrapolation des résultats obtenus sur quelques échantillons à la totalité d'un lot, oriente actuellement vers la recherche de méthodes alternatives applicables tout au long de la fabrication.

Pour les produits stérilisés dans leur conditionnement final, la vérification et la conformité des paramètres de stérilisation (température, pression de vapeur,

durée de chauffage...) fournit une garantie supérieure à celle par l'essai de stérilité.

4.2. Essai de propreté : Contrôle des médicaments non obligatoirement stériles

Il consiste en l'évaluation de la charge microbienne d'une préparation au plan quantitatif par dénombrement des microorganismes aérobies viables totaux et au plan qualitatif par la recherche des microorganismes spécifiés :

Entérobactéries, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium sp.* (Notamment *C. perfringens*).

Les critères d'interprétation sont définis selon les préparations regroupées en fonction de leur voie d'administration.

Les essais décrits pour le contrôle microbiologique des produits non stériles permettent le dénombrement des bactéries mésophiles, des moisissures et levures capables de se développer en aérobiose.

Ces essais servent avant tout à déterminer si un produit est conforme aux exigences microbiologiques spécifiés de sa monographie, à la Pharmacopée.

Cependant, pour la pharmacopée européenne, ces techniques peuvent également être mises en œuvre pour vérifier l'efficacité de la conservation antimicrobienne ainsi que dans le cadre de la surveillance du niveau de qualité des matières premières ou de préparations pharmaceutiques.

Des précautions sont nécessaires pour la bonne exécution de ces contrôles :

La manipulation doit éviter toute contamination accidentelle du produit à examiner

Les techniques de contrôle microbiologique mis en œuvre dans l'industrie pharmaceutique sont standardisées par les pharmacopées.

Elles sont difficilement automatisables et ont souvent un temps de réponse relativement long.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Sous réserve d'une validation, certaines de ces techniques semblent pouvoir être adaptées au domaine pharmaceutique.

4.3. Evaluation de l'efficacité de la conservation antimicrobienne

Cet essai a pour but soit d'évaluer l'éventuelle activité antimicrobienne intrinsèque d'une préparation soit de prouver que la présence d'un conservateur, à une dose donnée comme optimale, au sein d'une formulation lui assure une protection satisfaisante et empêche toute prolifération microbienne au cours de sa conservation et de son utilisation, le conservateur devant figurer sur la liste des conservateurs autorisés des médicaments.

L'essai consiste en une contamination de la préparation à l'aide d'inoculum calibrés de microorganismes de référence, au maintien de la préparation inoculée à 20-25°C, au prélèvement d'échantillon à intervalles de temps donnés et au dénombrement des microorganismes.

L'efficacité est obtenue si une diminution significative des inoculum est observée ainsi qu'une absence d'augmentation du nombre de microorganismes au terme de l'essai.

Les critères d'acceptation varient en fonction des catégories de préparations et des divers microorganismes.

4.4. Titrage microbiologique des antibiotiques

L'activité biologique d'un antibiotique est évalué en comparant l'inhibition de la croissance d'un microorganisme-test choisi pour sa sensibilité, inhibition provoquée respectivement par des concentrations connues de l'antibiotique à titrer et d'une substance de référence dont le titre est a été déterminé par rapport à l'étalon international.

Ces dosages peuvent être effectués soit en cultivant le microorganisme sur un milieu solide par la technique de diffusion, soit en cultivant le microorganisme sur un milieu liquide par la technique turbidimétrique.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le choix de la méthode de titrage dépend de la concentration d'antibiotique à mesurer, du milieu dans lequel se trouve l'antibiotique, du nombre d'analyses à effectuer et de la capacité d'automatisation du laboratoire.

Le titre de l'antibiotique est obtenu par un calcul statistique approprié, complété par des épreuves de validité pour un niveau donné de probabilité.

4.5. Recherche des endotoxines bactériennes

Les endotoxines issues de bactéries gram-négatives sont les principales responsables des effets toxiques attribués à la contamination de produits pharmaceutiques par des pyrogènes. Leur activité pyrogène est beaucoup plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes.

Ces endotoxines sont des lipopolysaccharides. Malgré l'existence de quelques pyrogènes ayant une structure chimique différente, il est souvent justifié d'interpréter l'absence d'endotoxines bactériennes dans un produit comme équivalant à l'absence de pyrogènes, à condition que l'éventualité de la présence de pyrogènes autres que des endotoxines puisse être exclue.

La présence d'endotoxines dans un produit peut être masquée par l'existence de facteurs interférant dans la réaction entre les endotoxines et le lysat d'amœbocytes.

L'analyste qui souhaite remplacer l'essai des pyrogènes sur lapin prescrit dans une monographie de la Pharmacopée par un essai des endotoxines bactériennes doit donc démontrer que celui-ci peut être réalisé de façon satisfaisante sur le produit considéré.

Ceci peut nécessiter l'élimination des facteurs d'interférence, par une méthode appropriée.

4.6. Méthodes alternatives

Des méthodes alternatives aux techniques microbiologiques classiques ont été développées ces dernières années et des automates mis au point dans le but d'optimiser les contrôles microbiologiques dans l'industrie en vue de réduire les délais de réponse pour la libération de lots à commercialiser, ou de mettre en

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

place, en cours de production, des mesures correctives si cela s'avère nécessaire.

Ces « nouvelles méthodes rapides » plus adaptées aux contraintes industrielles sont fondées pour les uns sur le dénombrement direct des microorganismes éventuellement présents et pour d'autres sur la multiplication microbienne témoin d'une contamination initiale.

Certaines sont déjà utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et de l'environnement et peuvent être classées en deux grands groupes.

Un premier groupe comprend les méthodes de détection microscopique permettant le comptage direct des microorganismes après marquage afin de rendre fluorescent l'élément recherché.

En général, ce marquage se fait à l'aide de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques, couplés à des antigènes de surface ou à des marqueurs de viabilité liés à certaines fonctions cellulaires.

- La méthode DEFT (Direct Epi Fluorescence Filter Technique) utilise un microscope à épifluorescence et permet de différencier cellule vivante et cellule morte.
- La cytométrie de flux, méthode d'analyse et de tri cellulaire permet un comptage automatisé, rapide et précis et possède une bonne sensibilité.
- La cytométrie à balayage laser améliore encore la sensibilité par augmentation du volume analysé et s'avère intéressante pour les produits filtrables faiblement contaminés.

Ces techniques présentent l'avantage de permettre des analyses en série, mais le coût du matériel est très élevé, la préparation des échantillons et le choix de marqueurs délicats.

Elles permettent en outre, à côté de la différenciation cellules mortes/ cellules vivantes de détecter les microorganismes viables non cultivables.

L'épifluorescence sur membrane est particulièrement adaptée à l'analyse des eaux, au dénombrement de la microflore aérobie viable totale.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

L'emploi de marqueurs de viabilité permet aussi son utilisation pour mesurer l'efficacité des conservateurs ou des désinfectants.

Enfin, la cytométrie de flux peut être utilisée grâce à l'emploi de marqueurs de viabilité spécifiques de certaines fonctions cellulaires pour l'évaluation de l'activité des antibiotiques sur la physiologie cellulaire.

Le deuxième groupe comprend des méthodes fondées sur la détection d'un métabolite particulier.

- La bioluminescence : la réaction de bioluminescence permet la détection de l'ATP (adénosine triphosphate) présent dans toutes les cellules vivantes pour l'utilisation du système luciférine/luciférase avec production d'une émission lumineuse directement proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans le système.

De nombreux appareillages existent, actuellement utilisés essentiellement en industrie agroalimentaire pour les contrôles des surfaces et des matériels.

Des applications sont développées pour le contrôle microbiologique des médicaments.

- L'impédancemétrie : repose sur le fait que la croissance de microorganismes dans un milieu donné entraîne une modification des propriétés électriques du milieu. La mesure de ces variations électriques permet de détecter leur présence.

Différents appareils sont disponibles et utilisés dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques car ils sont simples d'utilisation et permettent, après une incubation de courte durée, de traiter un grand nombre d'échantillons au plan quantitatif et qualitatif. Utilisés surtout pour les dénombrements des microorganismes aérobies viables totaux, ils servent pour le contrôle de produits non obligatoirement stériles et des eaux ; ils peuvent être adaptés au titrage microbiologique des antibiotiques ainsi qu'au test d'efficacité de conservateurs.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Ces nouvelles méthodes de contrôle plus modernes, plus rapides doivent encore faire la preuve de leurs performances vis-à-vis des méthodes dites traditionnelles avant de pouvoir figurer parmi les méthodes de référence.

Partie IV : Partie pratique

Le contrôle microbiologique de la gentamicine injectable

INTRODUCTION

Le contrôle de la qualité est une obligation légale : les fabricants doivent pouvoir justifier à tout moment que tous les produits qu'ils utilisent (matières premières), préparent et délivrent (produits finis) sont conformes aux caractéristiques auxquels ils doivent répondre ce qui implique le recours au contrôle.

La partie pratique va porter sur le contrôle microbiologique d'un antibiotique injectable qui est la Gentamicine 80 mg/2ml.

Durant la période du stage pratique, j'ai eu la chance d'assister et de pratiquer des contrôles microbiologiques du produit médicamenteux mais aussi de son environnement.

J'ai choisi la gentamicine comme exemple de contrôle microbiologique parce que son contrôle englobe deux essais : l'essai de stérilité (de par sa forme pharmaceutique : un médicament injectable) et le titrage ou le dosage microbiologique des antibiotique (de par ses propriétés pharmacologiques). Et que, en contrôlant la stérilité d'un produit, il faut toujours effectuer un contrôle de l'environnement en parallèle.

ESSAI DE STERILITE

I. Rappel Théorique

1. Généralités

Ce chapitre s'attache à décrire les différentes méthodes microbiologiques utilisées pour contrôler les **produits stériles** tels que les médicaments injectables.

La stérilité définie comme « l'absence de microorganismes viables », constitue un critère de qualité microbiologique et de sécurité pour l'administration des médicaments chez l'homme. Le contrôle de ce paramètre est fixé par les réglementations européennes et américaines.

Les paragraphes suivants reprennent les grands principes des textes réglementaires en incluant des explications et des commentaires pratiques pour aider à leur mise en œuvre.

1.1. Objectif de l'essai

L'objectif du contrôle de stérilité est de vérifier l'absence de micro-organismes dans un échantillon représentatif d'un lot de médicaments.

Les préparations pharmaceutiques qui doivent satisfaire à l'essai de stérilité sont décrites dans la pharmacopée européenne: ce sont d'une part les préparations obligatoirement stériles de par leur forme pharmaceutique et d'autre part les préparations étiquetées stériles.

Dans le premier cas (Préparations obligatoirement stériles), l'essai de stérilité est à mettre en place systématiquement quelle que soit la nature du produit : l'essai est imposé par la voie d'administration du produit.

Dans le deuxième cas, l'essai de stérilité n'est pas systématique pour une forme pharmaceutique donnée : c'est le cadre d'utilisation qui conditionne cet essai.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

1.2. Limites de l'essai de stérilité

Le résultat favorable d'un essai de stérilité signifie seulement qu'**aucun** micro-organisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné dans les conditions de l'essai.

L'essai de stérilité ne peut à lui seul apporter la preuve formelle de la stérilité d'un lot de produit, il reste en revanche le seul moyen analytique à la disposition des instances pour effectuer des contrôles.

La réalisation d'un essai de stérilité a une deuxième faiblesse d'ordre pratique : Il existe en effet des risques de faux positifs liés à une contamination extérieure de l'échantillon ou du milieu de culture lors de la manipulation. Il suffit d'introduire un seul germe dans le milieu de culture pour observer un trouble après une certaine durée d'incubation et donc avoir un doute sur la stérilité du produit. C'est pourquoi la pharmacopée européenne est très stricte à la fois en terme de qualité de l'environnement pour les manipulations et en terme d'interprétation des résultats.

En ce qui concerne l'environnement, il faut se situer pour le contrôle lui-même, dans des conditions quasiment identiques à la fabrication de médicaments stériles : pour répondre à l'exigence de conditions aseptiques, il est possible de travailler sous hotte à flux laminaire (classe A) en salle propre (classe B) ou au sein d'un isolateur stérile.

La pharmacopée demande de réaliser des contrôles de cet environnement (contrôle de l'air, de surfaces et du personnel) car ils servent à l'interprétation des résultats au moment de l'analyse.

1.3. Echantillonnage

La pharmacopée européenne donne des règles d'échantillonnage en fonction de la taille du lot et du volume ou de la quantité par récipient de la préparation testée.

La taille de l'échantillon représentatif est variable selon le type de préparation.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

2. Méthodologie

La recherche de micro-organismes proposée par la pharmacopée est basée sur la mise en culture en milieu liquide soit de l'échantillon lui-même (ensemencement direct), soit d'une membrane sur laquelle les microorganismes ont été recueillis par filtration préalable du produit (filtration sur membrane).

La présence d'un éventuel microorganisme se matérialise par l'apparition, après incubation à une température et pendant une durée déterminées, d'un trouble du milieu de culture lié à sa manipulation, confirmé par comparaison avec un témoin négatif.

2.1. Filtration sur membrane

La priorité est donnée à cette technique toutes les fois que le produit à analyser le permet. C'est le cas de nombreuses formes pharmaceutiques liquides puisque peuvent être filtrées à la fois des solutions aqueuses, des alcooliques mais également des solutions huileuses.

Certaines préparations plus visqueuses peuvent être diluées de façon appropriée avant filtration.

Cette méthode est plus sensible que l'ensemencement direct car les volumes filtrés peuvent être importants alors que dans la première technique, on ne peut introduire qu'un volume limité de produit.

C'est l'un des avantages de la filtration pour les préparations pharmaceutiques de gros volumes. En plus de sa sensibilité, la filtration permet, par la possibilité du rinçage, l'élimination d'un effet inhibiteur de multiplication microbienne, lié à la présence de traces du produit analysé sur la membrane, responsable de faux négatifs. En effet, de nombreux médicaments ont une activité bactériostatique ou bien forment un substrat défavorable à la multiplication des microorganismes empêchant la formation d'un trouble et masquant une présence microbienne.

La technique de filtration sur membrane emploie des membranes de porosité 0.45 μm et de 50 mm de diamètre composées de cellulose sous forme de

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

nitrate pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques et sous forme d'acétate pour les solutions fortement alcooliques.

La filtration du produit à analyser est suivie de trois rinçages de la membrane par un diluant stérile approprié qui élimine toute trace de produit sur celle-ci.

Le volume de rinçage doit être validé : il est conditionné par le volume du produit à filtrer, sachant que, selon la pharmacopée, une membrane supporte au total le passage d'un litre de liquide maximum, réparti en 5 filtrations de 200 ml.

2.2. Ensemencement direct

Cette technique a l'avantage d'être simple à réaliser puisqu'elle ne nécessite pas un traitement préalable de l'échantillon ni de matériel particulier.

L'exigence principale concerne le volume maximal de produit pouvant être ensemencé correspondant à 10% maximum du volume total du milieu.

Ce procédé est à réserver en pratique à des produits non filtrables.

3. Environnement de l'essai

Avant la manipulation, des prélèvements d'air de la hotte et de la salle de stérilité sont effectués à l'aide d'un biocollecteur d'air.

Ils servent à détecter la présence éventuelle de microorganismes dans l'atmosphère du lieu de travail.

Ils remettent en cause le caractère valable de l'essai lorsqu'une croissance bactérienne est observée sur la gélose dans les boîtes de pétri.

Ces boîtes de gélose sont incubées au même titre que les essais sur les produits pendant une période de 14 jours.

4. Tests de validation

Les résultats de l'essai de stérilité sur un produit ne sont interprétables qu'à condition que des **validations préalables** aient été effectuées.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Ces validations concernent les milieux de culture en eux même et les milieux de culture en présence des produits : des tests de fertilité et de stérilité permettent de prévenir respectivement les faux négatifs et les faux positifs lors des contrôles effectués en routine.

4.1. Validation des milieux de culture

La vérification de la stérilité des milieux de culture consiste en une mise à l'étuve d'un certain nombre d'échantillons à la température prévue de l'essai pendant une période de 14 jours.

L'essai de fertilité ou test de croissance, quant à lui, sert à vérifier qu'une contamination artificielle des milieux de culture avec des souches de référence recommandées par la pharmacopée provoque bien un trouble visible et précoce sur ces milieux incubés à la température prévue.

La pousse doit avoir lieu en moins de 3 jours pour les bactéries et en moins de 5 jours pour les levures et moisissures.

4.2. Validation des milieux de culture en présence du produit à analyser (Validation de l'élimination de l'activité antibiotique du produit à tester)

Pour un produit donné, la validation consiste à réaliser le protocole classique de contrôle de stérilité avec les étapes de filtration et de rinçage mais en introduisant en cours de manipulation une contamination microbienne de niveau et de nature déterminés à l'avance.

Chaque essai est réalisé en parallèle d'un témoin positif constitué par un milieu de culture contaminé.

Si le trouble observé au bout de 5 jours maximum, est comparable au témoin positif, l'activité antimicrobienne du produit est considérée comme inexistante ou éliminée : le milieu en présence de produit restant fertile, le protocole de contrôle de la stérilité est validé.

Dans le cas contraire, il faut adapter le protocole d'essai de façon à éliminer toute trace résiduelle de produit.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- Cas de filtration sur membrane :

En cas de mise en évidence d'un effet bactériostatique du produit sur la multiplication microbienne, la démarche de première intention consiste à augmenter soit le volume de liquide de rinçage soit le nombre de rinçages.

Il existe par ailleurs des substances ou des solvants neutralisants spécifiques dans lesquels les produits peuvent être dilués avant filtration. Des membranes spéciales sont également utilisables.

- Cas de l'ensemencement direct :

Le produit peut être transformé en émulsion avant introduction dans le milieu, des substances neutralisantes pouvant également être ajoutées.

4.3. Microorganismes d'essai pour les tests de validation recommandés par la Pharmacopée européenne

Pour tous les essais de validation, la Pharmacopée propose un certain nombre de souches de référence.

- Pour le milieu au Thioglycolate, sont à tester deux bactéries aérobies représentatives de deux grandes catégories de bactéries (cocci à Gram positif et bacilles à Gram négatif respectivement) : ***Staphylococcus aureus*** et ***Pseudomonas aeruginosa***.

Pour tester la fertilité vis-à-vis des anaérobies, une souche de ***Clostridium sporogenes***, de manipulation délicate, est recommandée.

- En ce qui concerne le milieu trypticase-soja, la levure et le champignon de référence sont respectivement ***Candida albicans*** et ***Aspergillus niger***.

Une bactérie aérobie, ***Bacillus subtilis*** (bacille à Gram positif) doit également être testée sur ce milieu.

5. Milieux de culture de référence

Etant donné l'objectif du test consistant à détecter tout microorganisme présent dans l'échantillon, les milieux utilisés sont à large spectre et complémentaires.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Le milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja est destiné à la recherche des levures, des moisissures et les bactéries aérobies. Il est incubé pour l'essai de stérilité à $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

Le milieu thioglycolate à la rézasurine est un milieu particulier qui permet de rechercher simultanément des bactéries anaérobies et des bactéries aérobies. Il a l'avantage de pouvoir être utilisé sans conditions d'anaérobiose extérieures.

La rézasurine oxydée en présence d'air forme un halo rose à la partie supérieure du flacon sur une hauteur de 30% maximum au niveau duquel les bactéries aérobies peuvent se développer.

La partie inférieure est propice au développement d'éventuelles bactéries anaérobies. Ce milieu est incubé à $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

II. Essai de stérilité appliqué à la gentamicine injectable

La méthode utilisée est la méthode dite « la méthode par filtration » dont le principe est décrit précédemment.

1. Validation des milieux de culture

Les milieux de culture doivent être validés, pour cela des tests appropriés doivent être effectués :

A- Stérilité : témoin négatif

Milieu de culture seul incubé pendant 14 jours

B- Test de croissance : fertilité

C'est le témoin positif constitué de milieu de culture+ inoculum (germes spécifiques pour chaque milieu).

C- Test de validation :

Le milieu de culture + le produit+ inoculum : les méthodes utilisées sont celles utilisées pour le test proprement dit (filtration et ensemencement direct).

Ce test permet d'évaluer l'action du neutralisant (l'élimination de l'activité antimicrobienne du produit).

2. Conditions du prélèvement

Le prélèvement doit être fait dans les meilleures conditions d'asepsie afin d'éviter toute contamination du produit prélevé.

Le conditionnement recevant le prélèvement doit être obligatoirement stérile.

Les conditions d'asepsie sont adaptables à la qualité microbiologique du produit à prélever.

3. Mode opératoire

La méthode utilisée : la méthode de filtration sur membrane.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- Matériel nécessaire

Appareillage et verrerie

- ✓ Une hotte à flux laminaire ou un isolateur stérilisable par un gaz (acide peracétique ou peroxyde d'hydrogène) associé à un appareil pour la vaporisation de l'agent stérilisant.
- ✓ Une rampe de filtration stérilisée auparavant.
- ✓ une pompe à vide.
- ✓ Tubes stérilisés à l'autoclave.
- ✓ Ciseaux et pince stériles
- ✓ Seringue stérile

Réactifs et milieux de culture

- ✓ Membranes stériles en cellulose de 50 mm de diamètre et de 0.45 μm de diamètre de pores.
- ✓ Un diluant stérile adapté pour les rinçages des membranes.
- ✓ Des flacons de bouillon au thioglycolate et de bouillon trypticase-soja.
- ✓ Echantillon : 3 ampoules de chaque lot.
- ✓ Témoin négatif : milieu de culture seul
- ✓ Témoin positif : le milieu avec la souche de référence.

Un agent stérilisant : acide peracétique ou peroxyde d'hydrogène pour le fonctionnement en isolateur.

- Conditions de l'essai

- Avant de procéder au test de stérilité, il faut allumer la lampe UV pour assurer sa stérilisation.

- La salle de stérilité doit être convenablement nettoyée afin d'assurer le bon déroulement du test et afin de prévenir toute éventuelle contamination.

- Un prélèvement d'air de la salle de stérilité et de la hotte à l'aide d'un Biocollecteur d'air est nécessaire avant le début de l'essai pour s'assurer que le travail a été fait dans de bonnes conditions et qu'aucune contamination détectée n'est due à un environnement qui n'est pas contrôlé.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- L'analyste doit porter les vêtements convenables pour effectuer une analyse dans un environnement contrôlé (salle de classe B).

Maintenant que toutes les conditions de l'essai sont réalisées, on passe à la manipulation :

- La rompe de filtration est placée sous la hotte.
- La communication de la rompe avec la pompe à vide placée en dehors de la hotte doit être assurée d'une façon à ne pas avoir des reflux lors de la filtration.
- Placer les joints dans la rampe (les joints empêchent toute fuite du contenu de la rampe).
- Placer ensuite la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile.
- Remettre l'entonnoir de la rampe
- Fermer le robinet
- Faire passer 100 ml du diluant trois fois de suite (l'entonnoir de la rampe étant gradué)
- Placer le couvercle de l'entonnoir
- Aspirer à chaque fois en utilisant la pompe à vide.

A l'aide d'une seringue stérile prélever 3 ml d'échantillon, il doit provenir de trois ampoules différentes.

- Enlever le couvercle de l'entonnoir
- Placer la seringue au centre de la membrane sans la toucher, injecter l'échantillon
- Remettre le couvercle et aspirer
- Enlever l'entonnoir et à l'aide de ciseaux stériles, couper la membrane en deux
- Placer chaque moitié dans un milieu à l'aide d'une pince stérile

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- Laisser incuber : Le milieu TSB à 22°C et le thioglycolate à 37°C

Note :

La quantité de milieu représente 90% et la quantité de l'échantillon représente 10% du volume final : 9 ml du milieu et 1 ml de l'échantillon.

4. Résultats et interprétation

L'interprétation des résultats est très précisément décrite par la Pharmacopée européenne qui, suite à l'amélioration de la qualité de l'environnement et des techniques de contrôles de stérilité, propose une stratégie très stricte.

La Pharmacopée distingue deux notions distinctes : la notion d'essai valable ou non, et la notion de produit satisfaisant ou pas à l'essai.

Deux cas peuvent se présenter :

a- Absence de croissance microbienne : le produit satisfait à l'essai.

- En cas de croissance microbienne avérée (trouble de nature microbiologique), un certain nombre de points sont à prendre en compte : résultats des contrôles microbiologiques d'environnement, défaut d'asepsie lors de la manipulation, pousse des témoins négatifs.

Si en réponse à ces questions, toute hypothèse de contamination extérieure est éliminée, alors le trouble observé est attribué à la non-stérilité de l'échantillon : aucun autre essai n'est autorisé, le produit est déclaré « ne satisfaisant pas à l'essai ».

- Dans le cas contraire, l'essai est déclaré « non valable ». dans la mesure où les conditions de sa réalisation n'ont pas été jugées conformes, un deuxième essai est autorisé. Par la suite, le produit satisfait ou non à l'essai, selon les mêmes règles.

Le résultat obtenu

- ✓ Contrôle de l'environnement : les boîtes de pétri utilisées pour le contrôle d'air ne présente aucune croissance microbienne ce qui signifie que l'environnement de l'essai est

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- ✓ Contrôle du produit : Absence de microorganisme sur les deux milieux de culture le produit est satisfaisant à l'essai.

Conclusion

L'essai de stérilité est à mettre en place en routine pour le contrôle des produits finis médicamenteux obligatoirement stériles ou étiquetés stériles. Cet essai est primordial dans le cas des médicaments stériles préparés sans stérilisation terminale.

Le caractère valable du résultat est cependant conditionné par la qualité de l'échantillonnage et par le respect strict des techniques de la Pharmacopée, préalablement validées pour chaque produit et réalisées dans un environnement maîtrisé.

TITRAGE MICROBIOLOGIQUE DES ANTIBIOTIQUES

I. Rappel théorique

La méthode la plus ancienne pour déterminer le titre d'un antibiotique est le titrage microbiologique. Le principe en est simple : il suffit de mesurer l'inhibition par l'antibiotique à doser de la croissance d'un micro-organisme sensible.

Le titrage peut se faire avec un micro-organisme cultivé en milieu solide (il s'agit des titrages par diffusion) ou avec un micro-organisme cultivé en milieu liquide (il s'agit des titrages par turbidimétrie).

1. Principe des méthodes

1.1. Dosage par diffusion

La croissance microbienne a lieu en milieu solide. Le milieu gélosé en surfusion est ensemencé avec le micro-organisme test puis versé en couche uniforme dans une boîte de diffusion.

Les solutions antibiotiques de référence et à tester sont déposées dans des cupules découpées dans la gélose ou sur des disques pour antibiogramme.

Avant incubation, une prédiffusion est réalisée puis les boîtes sont mises à incuber pendant 18 h à 32°C environ. Après incubation, les zones d'inhibition de la croissance microbienne sont mesurées. Elles sont proportionnelles aux concentrations mises en œuvre.

Le titre de l'antibiotique à tester est calculé à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

1.2. Dosage par turbidimétrie

La croissance microbienne a lieu en milieu liquide. Les solutions antibiotiques de référence et à tester sont déposées dans des tubes puis le bouillon ensemencé est réparti. Les tubes sont mis à incuber pendant 4 h à 37°C environ. Après incubation, la croissance microbienne est bloquée dans les tubes puis l'opacité de chaque tube est mesurée. L'opacité des tubes est

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

inversement proportionnelle aux concentrations mises en œuvre. Le titre de l'antibiotique à tester est calculé à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

2. Micro-organismes tests

Les pharmacopées indiquent des micro-organismes tests en fonction des antibiotiques à doser. Ceux-ci sont dédiés aux dosages de produits disposant de monographies. Mais, la lecture de la Pharmacopée européenne et de l'USP nous montre que les micro-organismes tests recommandés ne sont pas toujours les mêmes. Les différences se situent au niveau de l'espèce mais aussi du genre.

Le manque d'harmonisation au niveau des Pharmacopées ne facilite pas le travail des laboratoires.

2.1. Préparation des suspensions

Les pharmacopées indiquent des conditions de préparations :

Les suspensions devront être contrôlées quant à leurs puretés, l'identité du micro-organisme devra être vérifiée.

Aucun descriptif de méthodologie ne permettra à un laboratoire de réaliser, au premier essai, une suspension de micro-organismes « qui marche ». À ce niveau-là, c'est vraiment l'expérience du laboratoire qui entre en jeu. Il est plus difficile de fabriquer une suspension de micro-organisme pour les dosages par turbidimétrie où le micro-organisme doit être cultivé en 4 h en présence d'antibiotique que pour les dosages par diffusion où il dispose de 18 h d'incubation.

3. Milieux de culture

3.1. Choix, pH et pourcentage d'ensemencement

Les pharmacopées décrivent un large éventail de milieux de culture suivant l'antibiotique à titrer. Le milieu de culture doit favoriser la croissance du micro-organisme test.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

3.2. Réalisation pratique

Les milieux de culture sont généralement préparés à l'avance, stérilisés à l'autoclave et conservés dans les conditions appropriées à chaque type de milieu.

Lors des dosages par turbidimétrie, où l'incubation ne dépasse pas 4 h, le milieu peut être préparé juste avant utilisation à partir d'une base déshydratée.

Pour les dosages par diffusion, le milieu de culture doit être liquéfié par chauffage au bain-marie.

L'ensemencement avec le micro-organisme test est fait lorsque la température du milieu est à environ 45°C juste avant le coulage en couche uniforme de la gélose dans les boîtes de diffusion.

Après solidification, la gélose est préparée pour le dépôt des échantillons : des cupules sont découpées.

Le diamètre habituellement employé pour les cupules est de 6 mm.

Ce diamètre permet ultérieurement le dépôt de 50 µl d'échantillon à doser.

4. Préparation des solutions à doser

Les solvants ou les solutions tampons appropriées sont utilisés. Si la solubilisation du produit à doser nécessite l'emploi de solvants organiques ou de toutes autres substances pouvant avoir une action antimicrobienne, il est nécessaire de vérifier que les concentrations résiduelles ne perturbent pas la croissance du micro-organisme test.

Les solutions échantillons doivent être diluées pour obtenir des concentrations présumées égales aux solutions étalons.

Le choix des concentrations des solutions doit assurer qu'une relation linéaire existe entre le logarithme de la dose et la réponse (diamètres pour le dosage par diffusion, absorbance pour le dosage par turbidimétrie) dans les conditions de l'essai.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

5. Schémas de répartition

Comme il est indiqué dans la Pharmacopée européenne, 3 doses d'étalon, en progression géométrique et 3 doses d'échantillon, suivant la même progression que l'étalon, doivent au minimum être utilisées. Le nombre de répliques par dose doit être suffisant pour permettre d'atteindre la précision requise.

Cela se traduit habituellement par 6 à 9 répliques lors des dosages par diffusion ou seulement 4 répliques lors des dosages par turbidimétrie pour obtenir des limites de confiance ($P = 0,95$) comprises entre 95 % et 105 %.

Les différentes dilutions sont réparties dans les boîtes de diffusion ou dans les portoirs de turbidimétrie au hasard.

Si toutes les dilutions ne peuvent pas être déposées sur la même boîte de diffusion, chaque boîte de diffusion devra comporter une réplique de chaque dilution. Les dilutions devront être déposées de façon à éviter toute interaction entre les dilutions les plus concentrées (recouvrement de zones d'inhibition).

6. Incubation

En turbidimétrie, l'incubation est faite dans un bain-marie avec circulation d'eau afin d'obtenir une température homogène entre les tubes. L'incubation a généralement lieu à 37°C pendant 3 à 4 h.

En diffusion, l'incubation est faite en étuve à une température voisine de 32°C. Une pré-incubation à température ambiante est parfois nécessaire afin de réduire l'effet boîte, c'est-à-dire réduire les différences de taille de zones d'inhibitions entre les boîtes dues aux décalages des temps de répartition. Il faudra s'assurer de la parfaite horizontalité des étagères des étuves.

7. Lecture

En turbidimétrie, si la lecture de l'ensemble des tubes ne peut pas être faite en moins de 1 à 2 min, il est nécessaire de bloquer la croissance des micro-organismes avec du formaldéhyde. L'opacité est mesurée avec une précision allant jusqu'à 3 chiffres significatifs.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

En diffusion, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec une précision de 0,1 mm au moins.

Les lectures sont généralement manuelles en diffusion et automatiques en turbidimétrie.

8. Calcul statistique

Les titrages biologiques sont conçus comme des titrages de dilution, ce qui signifie que la préparation à titrer est supposée contenir le même principe actif que la préparation étalon, des composants inactifs et inertes étant cependant présents dans des proportions différentes.

La relation dose-réponse est transformée en fonction linéaire par passage au logarithme de la dose. Le modèle statistique employé est le modèle en lignes parallèles : la relation entre le logarithme de la dose et la réponse peut être représentée par une droite dans l'intervalle des doses utilisées ; pour chaque préparation inconnue, la droite est parallèle à la droite de l'étalon.

Les résultats des titrages sont considérés comme statistiquement valables si la régression est hautement significative, ce qui indique que la pente de la droite logarithme dose-réponse diffère nettement de 0, si le terme de non-linéarité n'est pas significatif et si le terme correspondant au manque de parallélisme n'est pas significatif, l'activité et les limites de confiance peuvent alors être calculées.

9. Choix de la méthode à employer

Les méthodes par diffusion ou par turbidimétrie sont équivalentes. Le choix de l'une ou l'autre méthode dépendra de l'automatisation présente au laboratoire et des échantillons à analyser.

La turbidimétrie est une méthode très fastidieuse lorsqu'elle n'est pas automatisée. En revanche, lorsqu'elle est automatisée, elle permet d'obtenir dans la journée des titres avec des limites de confiance bien meilleures qu'en diffusion.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

La méthode par diffusion est la méthode de choix lors des titrages de milieux biologiques (plasma, salive, urine, tissus, etc.) à cause des faibles volumes déposés (généralement 50 µl) et de la gamme qui couvre un grand intervalle de concentrations.

II. Dosage microbiologique de la gentamicine injectable : « Gentamicine sulfate 80 mg/2 ml »

Les contrôles pharmaceutiques sont réalisés selon les méthodes de la pharmacopée ou des normes européennes.

L'identification chimique et le dosage de l'activité biologique sont deux tests complémentaires

On se propose de réaliser le contrôle de la concentration en gentamicine d'une forme injectable, par méthode de diffusion en milieu solide.

Cette méthode pour être validée, nécessite entre autres l'utilisation de souche bactérienne pure la plus sensible possible à l'antibiotique contrôlé, ainsi que l'utilisation d'une concentration bactérienne précise.

La détermination de ses paramètres est effectuée en préalable au dosage microbiologique de l'antibiotique.

1. Principe

Le dosage microbiologique de la Gentamicine s'effectue par la mesure comparative de l'activité bactéricide d'un antibiotique de référence (étalon) et d'un échantillon sur la souche *staphylococcus aureus* ATCC 6538.

On mesure le diamètre des zones d'inhibition produites par trois concentrations différentes d'un étalon et d'un échantillon.

Le standard utilisé : la gentamicine étalon dont le titre a été déjà déterminé

2. Matériel nécessaire

2.1. verrerie

- ✓ Fioles jaugées de 100 ml
- ✓ Pipettes volumétriques de 5 ml
- ✓ Boîtes de pétri
- ✓ Emporte-pièce
- ✓ Propipette
- ✓ Micropipette

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- ✓ Flacons stériles

2.2. Réactifs

- ✓ Solution tampon B3 pH= 8.1 stérilisée à l'autoclave, constituée de quantités connues de K_2HPO_4 (le phosphate dipotassique) et de KH_2PO_4 (le phosphate monopotassique) pour 1 litre d'eau distillée.
- ✓ Milieux de culture
- ✓ Souche de référence
- ✓ Eau physiologique

3. Mode opératoire

- Préparation de la solution Tampon stérile pH= 8 ± 0.1

$KH_2PO_4 \longrightarrow 0.523g$

$K_2HPO_4 \longrightarrow 16.73g$

- ▲ Dissoudre KH_2PO_4 et K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée.
- ▲ Ajuster le pH à 8 ± 0.1 et stériliser à l'autoclave.

- Préparation de la solution mère du standard S

Le titre de la solution étalon international, le titre est de 651 $\mu g/mg$

On doit convertir cette valeur en mg/ml :

$1mg \longrightarrow 651 \mu g$

$X \longrightarrow 1000 \mu g$

$X = 1.563 mg/ml$

Pour 100 ml de B₃ $X = 153.60 mg/ 100 ml$

$X = 0.1536 g/ 100 ml$

- ▲ Peser exactement 0.1536 g du standard Gentamicine.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- ▲ Transférer dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster au niveau avec le tampon.
- Préparation des solutions de l'échantillon U

La gentamicine est dosée: 80 mg/ 2 ml

1 ml → 40 mg

X → 1mg

$$X = 0.025 \text{ ml/mg} \quad \boxed{X = 2.5 \text{ ml/ } 100 \text{ ml B}_3}$$

- ▲ Prélever 2.5 ml d'échantillon, transférer dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster au niveau avec le tampon.

Préparation des dilutions

- ▲ Concentration minimale (U_3 et S_3) : introduire 2.5 ml de la Solution mère (échantillon, standard) dans une fiole de 100 ml de B_3
- ▲ Concentration intermédiaire (U_2 et S_2) : introduire 5 ml de la Solution mère (échantillon, standard) dans une fiole de 100 ml de B_3
- ▲ Concentration maximale (U_1 et S_1) : introduire 10 ml de la Solution mère (échantillon, standard) dans une fiole de 100 ml de B_3
- ▲
- Préparation des boîtes de pétri
- ▲ Couler 9 boîtes de pétri avec 20 ml du milieu adéquat.
- ▲ Garder le reste du flacon à une température de 45°C
- Préparation de l'inoculum

Le dosage microbiologique d'un antibiotique ne peut se faire qu'avec des souches sensibles à l'antibiotique.

Afin de déterminer la souche la plus adaptée au dosage de la gentamicine, plusieurs souches bactériennes sont testées.

Principe : Une quantité définie du micro-organisme à tester est déposée sous forme de spots à la surface de différentes géloses Mueller Hinton contenant des

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

concentrations décroissantes en antibiotique et toutes inférieures à la concentration critique inférieure de la gentamicine.

Le dosage de la gentamicine est réalisé avec une des souches, c'est la « souche test »

L'identité de la souche test doit être vérifiée en réalisant une coloration de Gram et un test enzymatique.

- Préparation de la suspension
 - Allumer le colorimètre et le mettre en mode transmittance
 - Préparer la souche (culture jeune de 24H) dans de l'eau physiologique ou dans le milieu de culture utilisé (TSB) en grattant quelques colonies de la culture préparée 24 heures à l'avance.
 - Agiter le tube contenant la suspension du microorganisme (souche de référence) préparée au vortex pour permettre une répartition homogène de la souche, puis mesurer au colorimètre.

La transmittance doit être de 25 à 30%, si une valeur inférieure ou supérieure à celle-ci figure sur l'écran du résultat, on doit ajuster la concentration de la suspension en ajoutant de l'eau physiologique et/ou le microorganisme jusqu'à obtention de la valeur citée ci-dessus.

- Ensemencement des boites
 - Dans un tube contenant 100 ml de milieu gélosé (TSB) en surfusion à 45°C, introduire 1 ml de la suspension test préparée (eau physiologique/ TSB + la souche de référence).
 - Homogénéiser soigneusement
 - Couler 4 ml de cette préparation à la surface de chacune des 9 géloses précoulées.
 - Laisser solidifier puis mettre au réfrigérateur à 4°C pour une période de pré-diffusion de 10 min.
 - Dans chacune des boites, pratiquer 4 puits à l'aide d'un emporte-pièce et enlever les disques de gélose. Pour chaque boite et à l'aide d'une

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

micropipette, remplir les puits avec 50 µl de la dilution appropriée dans chaque cupule.

- Avant de déposer les solutions, rincer chaque fois les embouts de la micropipette avec la dilution correspondante.
- Laisser prédiffuser environ 30 minutes au réfrigérateur avant incubation.
- Incuber les boîtes à l'étuve à 32°C- 35°C pendant 18 à 24 heures, puis mesurer les zones d'inhibition à 0.1 mm près à l'aide d'un pied à coulisse.
- Lecture des résultats

La lecture des zones d'inhibition se fait à l'aide d'un pied à coulisse ou d'un lecteur de zones approprié.

4. Résultats

Les diamètres sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Echantillon	Standard
U ₁ : Dilution maximale	S ₁ : Dilution maximale
U ₂ : Dilution moyenne	S ₂ : Dilution moyenne
U ₃ : Dilution minimale	S ₃ : Dilution minimale

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Tableau des résultats

	Dilutions de l'échantillon				Dilutions du standard			
	U ₁	U ₂	U' ₂	U ₃	S ₁	S ₂	S' ₂	S ₃
Boite 01	20.77 mm	/	/	17.35 mm	19.33 mm	/	/	14.33 mm
Boite 02	20.89 mm	/	/	17.61 mm	21.60 mm	/	/	15.95 mm
Boite 03	20.05 mm	/	/	17.72 mm	20.04 mm	/	/	17.01 mm
Boite 04	20.00 mm	/	/	17.10 mm	20.66 mm	/	/	15.02 mm
Boite 05	20.08 mm	/	/	17.69 mm	20.74 mm	/	/	17.20 mm
Boite 06	20.00 mm	/	/	16.57 mm	19.22 mm	/	/	15.28 mm
Boite 07	/	18.29 mm	19.69 mm	/	/	17.42 mm	17.09 mm	/
Boite 08	/	19.03 mm	19.16 mm	/	/	18.38 mm	17.35 mm	/
Boite 09	/	18.50 mm	17.25 mm	/	/	17.26 mm	17.93 mm	/

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

5. Calcul et interprétation des résultats

Le calcul se fait à l'aide d'un logiciel proposé par la pharmacopée Européenne appelé CombiStats qui permet de calculer le titre de l'antibiotique à partir des diamètres des zones d'inhibition.

CombiStats est un logiciel dédié à l'analyse statistique des résultats de titrages biologiques, conformément au chapitre 5.3 de la 6e Edition de la Pharmacopée Européenne (analyses statistiques).

Le résultat obtenu après utilisation de CombiStats : $T = 122,74329\%$

Le titre figurant dans le dossier du produit : [90-125%] donc le produit est déclaré conforme.

CONCLUSION

L'environnement, air-poussières-eaux-surfaces et sols, les équipements industriels, le personnel est à l'origine d'un risque de contamination dont l'importance dépend de la conception des locaux, des types d'activité et des bonnes pratiques concourant à l'hygiène et à la sécurité, l'utilisation de locaux à environnement contrôlé s'avère nécessaire, elle réduit significativement le risque potentiel. Les niveaux sont variables selon les cas, les salles propres autrefois appelées salles blanches étant le degré supérieur. De ça, on ne doit pas se contenter ; l'application des mesures d'hygiène et d'une maintenance préventive rigoureuse par un personnel formé et motivé doit permettre d'obtenir et maintenir ces niveaux de qualité.

La pratique des contrôles microbiologiques des médicaments nécessite l'utilisation de techniques microbiologiques spécifiques et des connaissances suffisantes sur les indications des prélèvements, les paramètres, les limites et les critères d'interprétation des résultats obtenus. En effet, l'utilisation de techniques inadaptées ou une interprétation erronée des résultats microbiologiques peuvent conduire à la prise de mesures inutiles ou inadéquates par les décideurs et les autres utilisateurs des données produites, De ce fait, le laboratoire devra satisfaire à des exigences strictes pour assurer la qualité des analyses. Le personnel doit posséder la formation, les aptitudes, les connaissances, ainsi que l'expérience nécessaires à l'exécution des fonctions dont il est chargé.

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Signification
CE	Comité Européen
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
UE	Union Européenne
FDA	Food and Drug Administration
CFR	Code of federal Regulation
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
AFNOR	Agence Française de la Normalisation
CEN	Comité Européen de Normalisation
ISO	International Organisation for standardization
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
BPL	Bonnes Pratiques de laboratoire
ICH	International Conference on Harmonisation
USP	United States Pharmacopea
cGMP	Current Good Manufacturing Practices
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
CTD	Document Technique Commun
AQ	Assurance de la Qualité
POQs	Procédures Opératoires de la Qualité
POS	Procédures Opératoires Standrd
AMD	Acceptation mutuelle des données
QC	Qualification de Conception
QI	Qualification d'Installation
QO	Qualification Opérationnelle
QP	Qualification de Performance

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
ZAC	Zone à atmosphère contrôlée
CNU	Conditions normales d'utilisation
HEPA	Filtre à très haute efficacité
LQM	Limites de quantification d'une méthode
M.O	Microorganismes
QRM	Management de risque de qualité
NF	Norme Fédérale

ANNEXES

TABLEAU I

LIMITES EN PARTICULES SELON LA CLASSE DE LA ZONE A
ATMOSPHERE CONTROLEE

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particules par m ³ , de taille égale ou supérieure à			
	0.5 mm	5mm	0.5mm	5mm
A	3500	0	3500	0
B	3500	0	350000	2000
C	350000	2000	3500000	20000
D	3500000	20000	Non défini	Non défini

TABLEAU II

LIMITES DE CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE SELON LA
CLASSE DE LA ZONE

Classe	Limites recommandées de contamination microbologique			
	Echantillon d'air de ufc/m ³ doigts)	Boîtes de Pétri Diamètre 90mm ufc/4h	Gélose de contact Diamètre 55 mm ufc/plaque	Empreintes gant (5 ufc/gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Tableau III

TYPES DE POSTES DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE

PSM I	PSM II	PSM III
Protection du manipulateur par la création d'un flux d'air entrant dans l'enceinte	Protection du manipulateur par une aspiration créée au bord avant le plan du travail (barrière immatérielle entre lui et le produit manipulé)	Protection du manipulateur totalement en dehors de l'enceinte dans laquelle est manipulé le produit par l'intermédiaire de gants (manchons souples terminés par des gants)
Protection de l'environnement par filtration de l'air de l'enceinte à travers un filtre à très haute efficacité	Protection de l'environnement par filtration de l'air de l'enceinte à travers un filtre à très haute efficacité	Protection de l'environnement par filtration de l'air de l'enceinte à travers deux filtres à très haute efficacité en série
Le produit manipulé n'est pas protégé puisqu'en contact avec l'air du laboratoire	Protection du produit manipulé par un flux d'air descendant préalablement filtré à travers un filtre à très haute efficacité. Cette protection diminue également les contaminations croisées entre deux produits manipulés simultanément.	Protection du prélèvement puisque il n'entre pas en contact avec l'air du laboratoire. Absence de protection contre les contaminations croisées car absence de flux laminaire dans l'enceinte

Monographie de la Gentamicine

GENTAMICINE (SULFATE DE) « PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6.0 »

DÉFINITION

Mélange de sulfates des substances antimicrobiennes produites par *Micromonospora purpurea*, les composants principaux étant les gentamicines C1, C1a, C2, C2a et C2b.

Teneur : au minimum 590 UI/mg (substance anhydre).

CARACTÈRES

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

Solubilité : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'alcool.

IDENTIFICATION

Première identification : C, D.

Seconde identification : A, B, D.

A. Dissolvez environ 10 mg de sulfate de gentamicine dans

1 ml d'eau R et ajoutez 5 ml d'une solution d'acide sulfurique R à 400 g/l. Chauffez au bain-marie pendant 100 min, refroidissez et complétez à 25 ml avec de l'eau R.

Examinée de 240 nm à 330 nm (2.2.25), la solution ne présente aucun maximum d'absorption.

B. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Solution à examiner. Dissolvez 25mg de sulfate de gentamicine dans de l'eau R et complétez à 5 ml avec le même solvant.

Solution témoin. Dissolvez le contenu d'un flacon de sulfate de gentamicine SCR dans de l'eau R et complétez à 5 ml avec le même solvant.

Plaque : plaque au gel de silice pour CCM R.

Phase mobile : la couche inférieure d'un mélange à volumes égaux d'ammoniaque concentrée R, de méthanol R et de chlorure de méthylène R.

Dépôt : 10 µl.

Développement : sur les 2/3 de la plaque.

Séchage : à l'air.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Détection : pulvérisez de la solution de ninhydrine R1.

Chauffez à 110 °C pendant 5 min.

Résultats : les 3 taches principales du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner sont semblables quant à leur position, leur coloration et leurs dimensions aux

3 taches principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de la composition.

Résultats : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 5 pics principaux ayant des temps de rétention respectivement identiques aux 5 pics principaux du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

D. Le sulfate de gentamicine donne la réaction (a) des sulfates (2.3.1).

ESSAI

Solution S. Dissolvez 0,8 g de sulfate de gentamicine dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et complétez à 20 ml avec le même solvant.

Aspect de la solution. La solution S est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution de degré 6 de la gamme des solutions témoins présentant la coloration la plus appropriée (2.2.2, Procédé II).

pH (2.2.3) : 3,5 à 5,5 pour la solution S.

Pouvoir rotatoire spécifique (2.2.7) : + 107 à + 121 (substance anhydre).

Dissolvez 2,5 g de sulfate de gentamicine dans de l'eau R et complétez à 25,0 ml avec le même solvant.

Composition. Chromatographie liquide (2.2.29) : utilisez le procédé de normalisation en prenant en compte uniquement les pics dûs aux gentamicines C1, C1a, C2, C2a et C2b ; utilisez le chromatogramme fourni avec le sulfate de gentamicine SCR pour identifier les pics correspondants.

Solution à examiner. Dissolvez 50 mg de sulfate de gentamicine dans la phase mobile et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (a). Dissolvez le contenu d'un flacon de sulfate de gentamicine SCR dans la phase mobile et complétez avec la phase mobile pour obtenir une solution à 0,5 mg/ml.

Solution témoin (b). Prélevez 5,0 ml de la solution témoin (a) et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

— *dimensions* : $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,

— *phase stationnaire* : copolymère de styrène-divinylbenzène

R (8 μm) présentant un diamètre de pores de 100 nm,

— *température* : 55 °C.

Phase mobile : mélange préparé avec de l'eau exempte de dioxyde de carbone R contenant 60 g/l de sulfate de sodium anhydre R, 1,75 g/l d'octanesulfonate de sodium R, 8 ml/l de tétrahydrofurane R, 50 ml/l de solution de phosphate monopotassique 0,2 M R préalablement ajustée à pH 3,0 avec de l'acide phosphorique dilué R et dégazée.

Débit : 1,0 ml/min.

Solution post-colonne : solution d'hydroxyde de sodium exempte de carbonate R diluée au 1/25, préalablement dégazée, ajoutée sans pulsations à l'effluent de la colonne à l'aide d'un serpentin mélangeur polymérique de 375 μl .

Débit : 0,3 ml/min.

Détection : détecteur ampérométrique à pulsations ou appareil équivalent, doté d'une cellule composée d'une électrode indicatrice en or, d'une électrode de référence en

argent-chlorure d'argent et d'une électrode auxiliaire en acier inoxydable, maintenues respectivement à des potentiels de détection à + 0,05 V, d'oxydation à + 0,75 V et de réduction à - 0,15 V, avec des pulsations de durée conforme au type d'appareil utilisé.

Injection : 20 μl .

Enregistrement : 1,2 fois le temps de rétention de la gentamicine C1.

Conformité du système : solution témoin (a) :

— *rapport pic/vallée* : au minimum 2,0 avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû à la gentamicine C2a et H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû à la gentamicine C2.

Limites :

— *gentamicine C1* : 20,0 pour cent à 40,0 pour cent,

— *gentamicine C1a* : 10,0 pour cent à 30,0 pour cent,

— *somme des gentamicines C2, C2a et C2b* : 40,0 pour

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

cent à 60,0 pour cent,

— *limite d'exclusion* : la surface du pic dû à la gentamicine C1a du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b).

Substances apparentées. Chromatographie liquide (2.2.29) selon les indications de l'essai de la composition.

Limites (pour les substances apparentées éluant avant la gentamicine C1a) :

— *toute impureté* : au maximum 3,0 pour cent,

— *total* : au maximum 10,0 pour cent.

Méthanol (2.4.24, *Système B*) : au maximum 1,0 pour cent.

Sulfate : 32,0 pour cent à 35,0 pour cent (substance anhydre).

Dissolvez 0,250 g de sulfate de gentamicine dans 100 ml d'eau distillée R. Ajustez à pH 11 avec de l'ammoniaque concentrée R. Ajoutez 10,0 ml de chlorure de baryum 0,1 M et environ 0,5 mg de pourpre de phtaléine R. Titrez par l'édétate de sodium 0,1 M en ajoutant 50 ml d'alcool R dès le début du virage de l'indicateur. Continuez le titrage jusqu'à disparition de la coloration bleu-violet.

1 ml de chlorure de baryum 0,1 M correspond à 9,606 mg de SO₄.

Eau (2.5.12) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé sur

0,300 g de sulfate de gentamicine.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 1,0 pour cent, déterminé sur 0,50 g de sulfate de gentamicine.

Endotoxines bactériennes (2.6.14) : moins de 0,71 UI/mg, si le sulfate de gentamicine est destiné à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

TITRAGE

Effectuez le titrage microbiologique des antibiotiques (2.7.2).

CONSERVATION

En récipient étanche. Si la substance est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

IMPURETÉS

Impuretés spécifiées : A, B, C.

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Autres impuretés décelables (si elles sont présentes à une teneur suffisante, les substances suivantes seront détectées par l'un des essais de la monographie.

Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale

Substances pour usage pharmaceutique (2034). Il n'est donc pas nécessaire de les identifier pour démontrer la conformité de la substance. Voir également chapitre 5.10. *Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique*) : D, E.

Milieux de culture « PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6.0 »

- **Essai de stérilité**

1. Milieu liquide au thioglycolate

L-Cystine 0,5 g

Gélose en granulés (teneur en eau maximum 15 pour cent) 0,75 g

Chlorure de sodium 2,5 g

Glucose monohydraté/anhydre 5,5 g/5,0 g

Extrait de levure (hydrosoluble) 5,0 g

Hydrolysât pancréatique de caséine 15,0 g

Thioglycolate de sodium ou 0,5 g

Acide thioglycolique 0,3 ml

Solution de résazurine sodique à 1 g/l, récemment préparée

1,0 ml

Eau R 1000 ml

pH du milieu après stérilisation : $7,1 \pm 0,2$

2. Milieu à l'hydrolysât de caséine et de soja ou (milieu B)

Hydrolysât pancréatique de caséine 17,0 g

Hydrolysât papaïque de farine de soja 3,0 g

Chlorure de sodium 5,0 g

Phosphate dipotassique 2,5 g

Glucose monohydraté/anhydre 2,5 g/2,3 g

Eau R 1000 ml

pH du milieu après stérilisation : $7,3 \pm 0,2$

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

- **Titration microbiologique des antibiotiques**

Milieu A

Peptone 6 g

Peptone pancréatique de caséine 4 g

Extrait de viande de boeuf 1,5 g

Extrait de levure 3 g

Glucose monohydraté 1 g

Gélose 15 g

Eau *q.s.p.* 1000 ml

RESUME

Le contrôle microbiologique dans l'industrie pharmaceutique constitue un outil de qualité et surtout d'innocuité qu'on ne peut pas s'en passer. Il ne concerne pas le produit médicamenteux seulement mais également son environnement.

Ce mémoire présenté en deux parties – l'une théorique et l'autre pratique- décrit les différentes méthodes microbiologiques utilisées dans l'industrie pharmaceutique en allant de la validation du laboratoire et l'instauration du système d'assurance de la qualité jusqu'à la validation des méthodes d'analyse avec une illustration pratique « le contrôle microbiologique de la gentamicine injectable ».

Mots clés : contrôle microbiologique, validation, biocontamination, environnement, souche de contrôle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Sites Web

www.techniques-ingenieur.fr

www.irsst.qc.ca

www.Cerist.SndI.DZ

www.Gimopharm.fr

www.Aspec.fr

www.lfis.fr

www.iso.org

www.confarma.fr

www.cofrac.fr

Références

- ▲ Pharmacopée Européenne 6^{ème} édition 2009
- ▲ Guide BPF 2011
- ▲ PROTOCOLE POUR LA VALIDATION ET LA VÉRIFICATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE EN MICROBIOLOGIE : DR-12-VMM Édition, 6 février 2012
- ▲ Normes ICH d'enregistrement des médicaments.
- ▲ OMS, Série de rapports techniques, N° 902, 2002 Annexe 3, traduction
- ▲ Guide BPL, Introduction aux bonnes Pratiques de Laboratoire Pour les formations De Recherche de L'INSERM (Institut national de la santé de la recherche médicale)
- ▲ Guide Gestion laboratoire de microbiologie.pdf
- ▲ Guide BPF CANADA 2009.pdf

Livres

- ▲ BOSGGIRAUD, Claudine. *Microbiologie Générale Et Santé*. Paris : Editions ESKA, 2003. Chapitre 10, Contrôles et sécurité microbiologiques, p.468-478.
- ▲ BOTET, Jordi. *Guide pratique pour les projets d'installations pharmaceutiques*. Barcelona-Spain : Editions STE, 2005.
- ▲ WHYTE, William. *LES TECHNOLOGIES DE SALLE PROPRE : CONCEPTION, QUALIFICATION ET EXPLOITATION*. Paris : Edition Dunod, 2007.

Articles

- ▲ Peut-on assurer la stérilité de nos préparations stériles ? Jihane Eid, *Pharmactuel* vol. 38 N° 4 Août-septembre 2005.
- ▲ Optimisation de la gestion du contrôle de la qualité. Partie II, les résultats Anton Szymanowicz, Marie-Odile bourgne, Isabelle Denis, Marie-Jo Neyron *SPECTRA BIOLOGIE* n° 148, Novembre 2005.

SOMMAIRE

Introduction.....	3
-------------------	---

Partie I :

La qualité dans l'industrie pharmaceutique

1. Notion de la qualité.....	6
2. Management de la qualité pharmaceutique.....	6
2.1. Facteurs influençant la qualité des médicaments.....	8
2.2. Assurance de la qualité.....	9
2.3. Contrôle de la qualité.....	11
3. Référentiels de l'industrie pharmaceutique.....	12
3.1. Référentiels règlementaires.....	14
3.2. Référentiels normatifs.....	19
3.3. Référentiels professionnels.....	19
3.4. Dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché et le Document Technique Commun.....	19
3.5. Règlementation concernant le laboratoire de microbiologie et les contrôles microbiologiques.....	21
4. Notion de validation.....	22

Partie II :

Validation d'un laboratoire de microbiologie

1. Locaux et environnement.....	27
1.1. Aménagement.....	27
1.2. Installations d'essai de stérilité.....	29
1.3. Surveillance de l'environnement dans le laboratoire.....	31
1.4. Nettoyage, Désinfection, Propreté et Hygiène.....	32
2. Direction et personnel.....	33
3. Equipement.....	34

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

4. Matériel et Réactifs.....	36
5. Traçabilité de l'information.....	38
6. Echantillonnage.....	39
7. Validation des méthodes d'analyse en microbiologie.....	40

Partie III :

Méthodes de contrôle microbiologique

1. Contrôle microbiologique de l'environnement (air et surface).....	46
1.1. Le développement de la technologie « salle propre » et l'effort normatif.....	46
1.2. La classification des salles propres en pharmacie.....	49
1.3. Maîtrise de la contamination et élaboration du schéma de risques.....	50
1.4. Objectifs des contrôles d'environnement.....	52
1.5. Organisation générale des prélèvements et transport des échantillons.....	53
1.6. Contrôle de l'air.....	54
1.7. Le contrôle microbiologique de surface.....	59
1.8. Prélèvement d'échantillons sur les personnes.....	60
2. Contrôle de l'eau pharmaceutique.....	61
3. Validation du nettoyage.....	64
4. Le contrôle des médicaments.....	64
4.1. Contrôle des produits pharmaceutiques stériles.....	66
4.2. Contrôle des médicaments non obligatoirement stériles.....	67
4.3. Evaluation de l'efficacité de la conservation antimicrobienne.....	68
4.4. Titrage microbiologique des antibiotiques.....	68
4.5. Recherche des endotoxines bactériennes.....	69
4.6. Méthodes alternatives.....	69

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

Parti IV : Partie pratique

Contrôle microbiologique de la Gentamicine injectable

Introduction.....	74
Essai de stérilité.....	75
I. Rappel théorique.....	75
1. Généralités	75
1.1. Objectif de l'essai.....	75
1.2. Limite de l'essai.....	76
1.3. Echantillonnage.....	76
2. Méthodologie.....	77
2.1. Filtration sur membrane.....	77
2.2. Ensemencement direct.....	78
3. Environnement de l'essai.....	78
4. Tests de validation.....	78
5. Milieux de culture de référence.....	80
II. Essai de stérilité appliqué à la gentamicine injectable.....	82
1. Validation des milieux de culture.....	82
2. Conditions du prélèvement.....	82
3. Mode opératoire.....	82
4. Résultats et interprétation.....	85
Le titrage microbiologique des antibiotiques.....	87
I. Rappel théorique	87
1. Principe des méthodes.....	87
2. Microorganismes test.....	88
3. Milieux de culture.....	88
4. Préparation des solutions à doser.....	89
5. Schémas de répartition.....	90
6. Incubation.....	90
7. Lecture.....	90
8. Calcul statistique.....	91
9. Choix de la méthode à employer.....	91
II. Dosage microbiologique de la gentamicine injectable.....	93
1. Principe.....	93

Contrôles Microbiologiques Dans l'Industrie Pharmaceutique

2. Matériel nécessaire.....	93
3. Mode opératoire.....	94
4. Résultats.....	97
5. Calcul et Interprétation des résultats.....	99
Conclusion.....	100
Liste des abréviations.....	101
Annexes.....	103
Références	
Bibliographiques.....	113