

Chers Lecteurs,

Toute l'équipe d'Amilabo vous souhaite une très belle année 2007 au cours de laquelle nous aurons sans doute le plaisir de vous retrouver pour vous accompagner lors de vos qualifications et validations.

Nous profitons de l'occasion pour vous adresser un grand merci à tous pour votre confiance.

Une fois n'est pas coutume, ce SterineWS, un peu moins « technique » que les précédents, fait le point sur les nouveaux produits, et donc sur les nouvelles solutions, qui ont jalonné cette année 2006 ; Il fait aussi un tour d'horizon des nouvelles normes qui sont apparues et des plus anciennes qui se sont harmonisées (lentement mais sûrement) témoignant, s'il le fallait, de la place prépondérante tenue par les indicateurs biologiques dans le contrôle des procédés de stérilisation.

Bonne lecture.

Jean-Christophe Géry

STÉRILISATION EN PLACE RISQUES ET SOLUTIONS

Les services de validation font face à de nombreuses difficultés lors de la validation de stérilisation en place (**SEP** ou, plus fréquemment utilisé, **SIP** pour *sterilization in place*). Un des problèmes majeurs est la perte des indicateurs biologiques à l'intérieur des tuyauteries. C'est une des raisons pour laquelle beaucoup de protocoles de validation de SIP ne recommandent pas l'utilisation d'indicateurs biologiques et spécifient seulement un contrôle de la température. Cette approche bien que bonne théoriquement peut induire en erreur et avoir de dangereuses conséquences.

La SIP est communément utilisée pour la stérilisation ou la sanitisation des tuyauteries. La SIP est réalisée afin d'éliminer ou tuer les bactéries accrochées à l'intérieur des tuyauteries. Les bactéries sont extrêmement prolifiques et s'adaptent pratiquement à toutes les conditions environnementales de la planète. On estime qu'elles existent sur terre depuis des milliards d'années. La propension que les bactéries montrent à vivre dans une multitude d'environnements témoigne de leur nature opportuniste.

Une découverte assez récente met en évidence la capacité des bactéries à vivre naturellement attachées à une surface formant ainsi ce que l'on appelle un biofilm. Les biofilms ont été rapportés pour la première fois lors d'études réalisées dans les cours d'eau de montagne.

A la grande surprise des chercheurs, des communautés de bactéries ont été trouvées vivantes et s'accommodant très bien de cet environnement très pauvre en

nutriments. Les recherches développées dans ce secteur démontrèrent l'existence de biofilms dans pratiquement tous les environnements hydratés.

Les bactéries préfèrent la communauté du biofilm qui leur apporte la protection et les conditions de résistance qu'elles n'ont pas en flottant librement. **Les biofilms peuvent être définis comme un ensemble de microorganismes enfermés dans une matrice visqueuse fixée à une surface.**

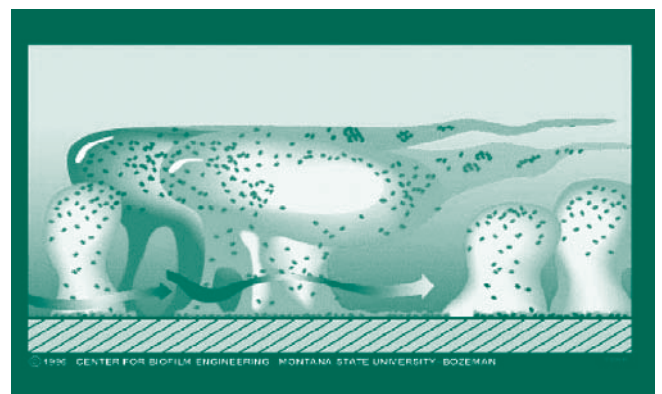


Figure 1

L'existence de ces communautés microscopiques a été découverte dans pratiquement tous les environnements aqueux où les bactéries s'accommodent aussi bien des fissures hydrothermiques des fonds océaniques que des dents de l'homme, en passant par les appareils à eau distillée et les valves cardiaques.

Il y a beaucoup d'avantages pour les bactéries à vivre à l'intérieur d'un biofilm. Ainsi fixées dans un environnement fluctuant, elles peuvent dédier toute leur énergie à la capture des nutriments ; en effet, devant ce tapis roulant nutritif, les bactéries n'ont pas besoin de se mouvoir mais seulement à se servir dans cette avalanche de mets. La protection des attaques par les macrophages et les amibes est, elle, assurée par le nombre.

Les caractéristiques de la matrice protégeant les bactéries des environnements caustiques et rudes, les biofilms bactériens peuvent vivre dans les canalisations d'eau et ne sont pas détruits efficacement par la chloration continue. Dans ce dernier cas en effet, quelques "pauvres âmes" vont se sacrifier pour le bien de la communauté, les carcasses des bactéries mortes forment alors une barrière au chlore mettant ainsi à l'abri les bactéries plus à l'intérieur.

Ces biofilms peuvent devenir important en taille jusqu'à tomber en lambeaux, le détachement du biofilm peut être alors la source d'une décharge bactérienne et d'une dispersion de ces microorganismes. Souvent ces biofilms peuvent contenir des *E.coli* en concentration importante et sont problématiques dans tous les types de distribution de fluides.

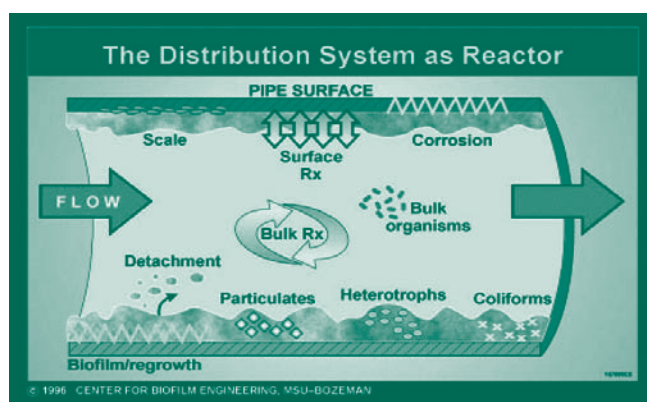


Figure 2

L'industrie laitière est très sensible à ce sujet, et elle s'attache particulièrement à enlever les biofilms formés pendant la circulation de ce produit très riche en nutriments qu'est le lait.

Depuis longtemps des tuyauteries en acier inoxydable sont utilisées dans l'industrie, et des efforts ont été réalisés pour rendre l'intérieur des surfaces aussi lisses que possible afin d'éviter toute prise aux bactéries. Comme on peut l'imaginer facilement plus la surface est rugueuse plus les bactéries pourront trouver facilement refuges dans le flux. Beaucoup de bactéries ont un diamètre inférieur à 1/100ème de millimètre, aussi la moindre rayure en surface est suffisante pour abriter des bactéries.

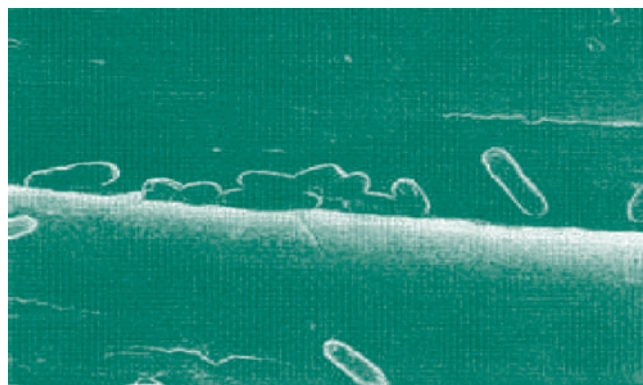


Figure 3

Il est facile d'imaginer comment les bactéries peuvent vivre sans trop de difficultés dans un milieu aussi riche que le lait ; ce qui rend plus perplexé est leur capacité d'exister également dans les systèmes d'eau ultra pure et d'eau pour injection (PPI) où les nutriments sont particulièrement rares.

Même si les bactéries qui colonisent les systèmes d'eau (par ex. *Pseudomonas*) sont généralement différentes de celles colonisant les systèmes de l'industrie laitière (par ex. *Listeria*) les problèmes sont également perturbants.

Bien que l'espèce *Pseudomonas* ne soit pas particulièrement pathogène, elle fait partie des bactéries possédant une membrane cellulaire contenant des lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines. Ces endotoxines ou pyrogènes sont la cause de chocs fébriles pouvant entraîner la mort.

De grands moyens sont mis en œuvre pour minimiser la possibilité de formation de biofilms dans les tuyauteries ; éliminer les biofilms dans ces systèmes s'avère très difficile.

La figure 4 décrit un scénario de formation de biofilm dans un bras mort de tuyauterie. Les bras morts sont définis comme des sections de tuyauteries dont la longueur est égale à au moins 6 fois le diamètre du tuyau. Même d'une longueur égale à 6 fois le diamètre du tuyau, ces réservoirs sont très difficiles à sanitiser ou stériliser en raison du flux réduit qui y passe.

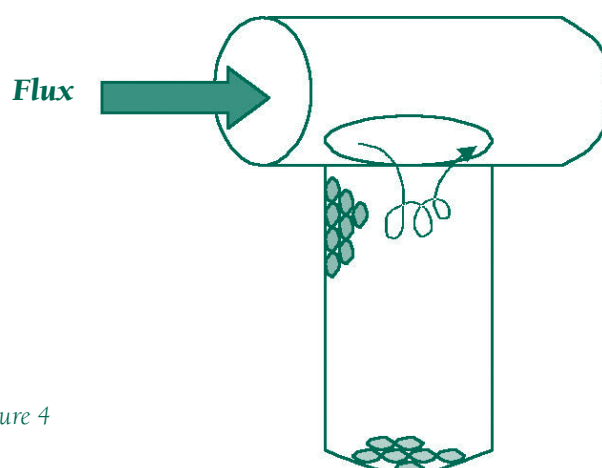


Figure 4

L'éloignement du flux principal et la faiblesse des turbulences assurent un environnement propice à la formation de biofilms.

La stérilisation en place (SIP) est une méthode courante utilisée pour stériliser les tuyauteries. Cette méthode implique de transformer le système de distribution de tuyauterie entier en un vaste autoclave. Des événements sont installés dans les bras morts pour minimiser la quantité d'air qui pourrait être piégée pendant le cycle SIP, accroissant ainsi l'efficacité de la stérilisation. De plus un suivi de la température est effectué pendant la SIP pour s'assurer que le système entier a bien reçu la température de stérilisation adéquate pendant le temps approprié.

Le but d'une stérilisation est de débarrasser un système ou un produit de tout microorganisme vivant. Un challenge microbiologique est donc à démontrer ; c'est pour cela que les indicateurs biologiques de stérilisation sont généralement utilisés.

Le placement adéquat des indicateurs biologiques pendant la SIP, et particulièrement pendant la phase de validation, a toujours constitué une difficulté. Des dispositifs personnalisés sont souvent développés pour loger ces indicateurs et le risque rencontré est, comme nous l'avons déjà dit, la perte des indicateurs. Pour cette raison les responsables de validation ne sont pas très enclins à utiliser des indicateurs biologiques pour les SIP.

Pourtant il s'avère être le seul instrument sensible capable d'intégrer l'ensemble des paramètres critiques d'une stérilisation et de mesurer l'efficacité de pénétration de vapeur dans tout le système, sachant que la vapeur tue les microorganismes de manière beaucoup plus efficace que de l'air chaud.

En utilisant seulement le contrôle de température, on présuppose qu'une région dans laquelle la température appropriée a bien été atteinte la stérilisation a été réalisée ; mais si aucun indicateur biologique de stérilisation n'a été utilisé, il est impossible d'assurer qu'une vapeur létale a atteint un point déterminé.

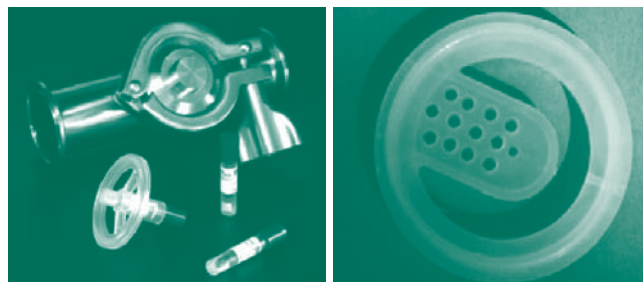
Une vapeur saturée est 10 fois plus létale que de l'air chaud.

Le cœur du problème est que les bactéries préfèrent être collées aux surfaces et ce fait ne changera jamais ; une SIP efficace doit pouvoir fournir l'assurance que les bactéries ont été tuées et que le potentiel d'avoir un biofilm est réduit au minimum.

De nouveaux joints ou SmartGasket® sont maintenant disponibles pour faciliter l'utilisation des indicateurs biologiques de stérilisation dans le cadre des SIP. Ces joints permettent de placer et de maintenir en position dans les tuyauteries nos indicateurs biologiques pour lesquels ils ont été spécifiquement usinés, qu'il s'agisse des indicateurs biologiques autonomes (avec milieu de culture) EZ test ou des indicateurs biologiques plus classiques sous forme de bandelettes.

Deux types de joint, ou Gasket, sont disponibles pour un positionnement en ligne dans la tuyauterie ou pour un chargement par le dessus. Ces joints sont bien sûr disponibles en différents diamètres de façon à s'adapter à tous les diamètres courants de tuyaux (de 3/4" à 4"). Certains modèles possèdent un orifice permettant le passage d'un thermocouple.

Nous vous invitons à retrouver l'ensemble de cette gamme sur notre site www.amilabo.com dans la rubrique stérilisation : matériels associés SIP.



Actualités

Normes ISO-11138 (2006) Modifications

Comme nous vous l'avons annoncé, l'harmonisation des normes européennes EN 866 et des normes Internationales ISO 11138 relatives aux indicateurs biologiques de stérilisation a généré quelques modifications.

Les normes concernées sont les suivantes :

- **ISO 11138-1** : Stérilisation des produits de santé : Indicateurs biologiques : Généralités
- **ISO 11138-2** : Stérilisation des produits de santé : Indicateurs biologiques pour la stérilisation à l'oxyde d'éthylène
- **ISO 11138-3** : Stérilisation des produits de santé : Indicateurs biologiques pour la stérilisation à la vapeur d'eau
- **ISO 11138-4** : Stérilisation des produits de santé : Indicateurs biologiques pour la stérilisation à la chaleur sèche

Ces normes remplacent désormais les normes européennes EN 866.

Modifications les plus importantes :

Concernant les **indicateurs biologiques autonomes** avec milieu de culture (pour Amilabo : EZtest : lecture à 48 heures pour l'oxyde d'éthylène et à 24 heures pour la vapeur) ils sont maintenant intégrés à la partie -1 de l'ISO : " exigences générales"

Pour la chaleur sèche

la valeur D minimale d'un indicateur biologique doit maintenant être supérieure ou égale à **2.5 minutes**.

Pour la vapeur

Bacillus subtilis ATCC 35021 (5230) est cité comme organisme d'essai pour les procédés réalisés à une température inférieure à 121°C (voir aussi le Sterine news N°4 de juin 2004)

Valeur de Fbio (log population X D) : cette valeur dans les normes précédentes ne devait pas être inférieure à 10. Il n'y a plus maintenant de valeur indiquée.

Important

Ces **normes ISO 11138** spécifient les exigences relatives à la production et les exigences de performance, **applicables à la fabrication d'indicateurs biologiques**.

Nous vous rappelons qu'il existe d'autres normes s'adressant plus particulièrement à l'utilisateur ; c'est le cas de l'**ISO 14161**, qui donne des indications pour le choix, l'utilisation et l'interprétation des indicateurs biologiques de stérilisation.

Autre nouvelle norme :

L'essai de performance des indicateurs biologiques de stérilisation nécessite l'utilisation d'un équipement spécifique ; ces résistomètres ou **BIER Vessels** ne sont pas des stérilisateur traditionnels ; les exigences en terme d'exactitude, de précision, de reproductibilité etc... pour les BIER Vessels sont maintenant clairement définies dans la norme **ISO 18472 : 2006** : stérilisation des produits de santé : indicateurs biologiques et chimiques, **appareillage d'essai**.

Ces appareils permettent principalement d'établir les caractéristiques de résistance d'un indicateur biologique (valeur D, valeur Z, temps de survie et de destruction...) pour les procédés de stérilisation à la vapeur, à l'oxyde d'éthylène, à la chaleur sèche et au peroxyde d'hydrogène gazeux.

Il est particulièrement important de s'assurer lors de contrôle ou d'études sur la valeur D d'un indicateur, par exemple lors d'étude destinée à démontrer l'influence ou non d'un produit pharmaceutique sur la résistance des spores utilisées comme indicateur biologique, que ces essais sont bien réalisés à l'aide d'un appareil d'essai performant et conforme à cette nouvelle norme.

Voir aussi les Sterine news N° 5 (Octobre 04) et N° 7 (juin 05) sur :

www.amilabo.com

Nouveautés

DriAmp (chaleur sèche, dépyrogénéation)

Les bioindicateurs pour **chaleur sèche** sont disponibles le plus souvent sous forme de bandelettes enveloppées sous glassine (inoculées avec *B. atrophaeus*). Cette présentation est limitée à l'utilisation d'une température maximum de 160°C, car des températures plus importantes peuvent endommager l'enveloppe de glassine et créer des faux positifs.

Aujourd'hui un indicateur biologique pour la chaleur sèche, le **DriAmp**, est disponible **pour des températures** pouvant être **très élevées**.

En effet les spores de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, souche recommandée pour la stérilisation à la chaleur sèche, sont inoculées sur des **grains de silice** contenus dans une **ampoule en verre**.

De plus un milieu prêt à l'emploi livré dans un tube séparé et contenant un indicateur coloré permet une lecture en **72 heures** au lieu de 7 jours.



Les DriAmp sont **conformes** aux normes internationales **ISO 11138**. Ils présentent une valeur $D \geq 2,5$ minutes.

Le DriAmp peut également être utilisé pour des huiles et des solutions non aqueuses (non productrices de vapeur).

Releasat Vapeur

Lecture en 24 heures

Le Releasat **vapeur** est un kit constitué de bandelettes papier classiques enveloppées dans de la glassine et inoculées avec *G. stearothermophilus* ATCC 7953 et de tubes de milieu prêt à l'emploi spécialement élaboré pour assurer une pousse des spores en 24H.

Ce milieu contient un indicateur de pH permettant une lecture aisée du résultat (virage du violet au jaune vif) en **24 heures**.

Le Releasat Vapeur est conforme aux normes internationales **ISO 11138-1 et -3**.

La lecture à 24 heures a été validée par le protocole RIT (Reduced Incubation Time) de la FDA (Sterine news N°4 juin 04).

