

Chers lecteurs,

Deux petits “malentendus” sont au sommaire de ce SterineWS : le premier concerne la **valeur D intrinsèque** attribuée aux spores en général, malentendu particulièrement trompeur lorsque ces spores sont utilisées sous forme de suspensions pour inoculer directement un liquide pharmaceutique ou un dispositif.

Le deuxième concerne la **contamination** hypothétique des zones de travail ou de production par des spores introduites lors de l'utilisation et de la manipulation des indicateurs biologiques.

Nous espérons que ce SterineWS vous permettra de lever ces malentendus et nous vous souhaitons une bonne lecture.

A bon entendeur, salut !

*Jean-Christophe Géry*

## Les spores ne possèdent pas de valeur D intrinsèque

Le fait que les spores puissent posséder une valeur D intrinsèque est un malentendu assez fréquent dans l'industrie. Ceci n'est pas exact et la preuve en est simplement qu'il est impossible de tester la résistance des spores seules dans l'espace. Pour être testées les spores doivent obligatoirement être déposées sur une surface ou mises en suspension dans un liquide, et former un système qu'on appelle alors Indicateur Biologique.

Par définition, la valeur D d'un indicateur biologique est le temps (ou la dose) requis(e), dans des conditions d'exposition définies, pour réduire la population viable de spores d'un log ou de 90%. Il est important de noter que dans cette définition on parle de la valeur D de l'indicateur biologique et non des spores. Il ne faut jamais oublier que la valeur D mesure les performances de résistance du système que représente l'indicateur biologique avec son emballage et non celle des spores elles-mêmes.

Tous les éléments cités ci-dessous ont un impact sur le calcul de la performance de résistance de l'indicateur biologique assemblé, une modification d'un seul de ces paramètres provoquera un changement dans le résultat :

- Support (papier, inox, liquide etc...) sur lequel les spores sont inoculées.
- Emballage primaire (enveloppe de glassine, Tyvek®, tube de plastique pour l'EZ test, la taille et la forme de l'ampoule de verre pour les SterilAmp et les MagnaAmp).
- Le pH et le volume de milieu pour les MagnaAmp et SterilAmp.
- La marque et le numéro de lot du milieu utilisé (caséine soja pour les bandelettes par exemple)
- Les conditions d'incubation lors du dénombrement des spores.

En plus des composants utilisés pour la fabrication des indicateurs biologiques, de légères différences dans les performances du résistomètre utilisé ou les paramètres de tests programmés, peuvent conduire à une modification des performances de résistance mesurées. La méthode utilisée (Courbe de Survie ou Fractions Négatives, voir ISO 11138) peuvent également conduire à des résultats différents.

Il est crucial de comprendre cela lors de l'utilisation de **suspensions** et de supports inoculés sans emballage primaire par exemple.

Les suspensions de spores que nous fournissons sont généralement disponibles dans de l'éthanol 40% ou de l'eau. Les suspensions dans l'eau sont préférées dans l'industrie pharmaceutique pour l'inoculation de produits aqueux ou pour l'évaluation de la résistance de formulations. Les préparations dans l'éthanol sont plus adaptées à l'inoculation directe de charges solides dans la mesure où le diluant (alcool) va permettre une évaporation et donc un séchage plus rapide de l'inoculum par rapport à une suspension aqueuse.

Les suspensions que nous proposons sont fournies avec une valeur D.

Cependant il faut savoir que cette valeur est d'un intérêt relatif et qu'elle ne devrait seulement servir qu'à comparer un lot à un autre. Sur le certificat d'analyse fourni avec la suspension il est clairement indiqué, soit :

### Pour les suspensions dans l'eau

Valeur D calculée en utilisant la méthode de la courbe de survie. Valeur D déterminée dans des ampoules de verre contenant de l'eau PPI. La résistance peut être différente avec d'autre support que l'eau PPI.

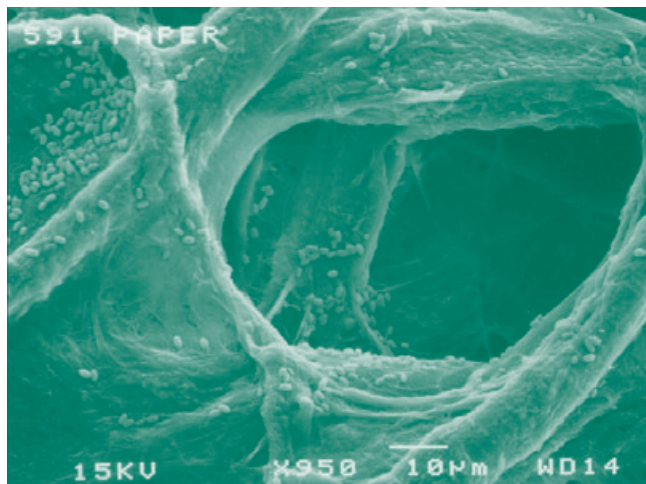
## Pour les suspensions dans l'éthanol

Valeur D calculée en utilisant la méthode de Holcomb-Spearman-Karber. Valeur D calculée sur bandelette papier enveloppée de glassine. La résistance peut-être différente avec d'autre support qu'une bandelette papier.

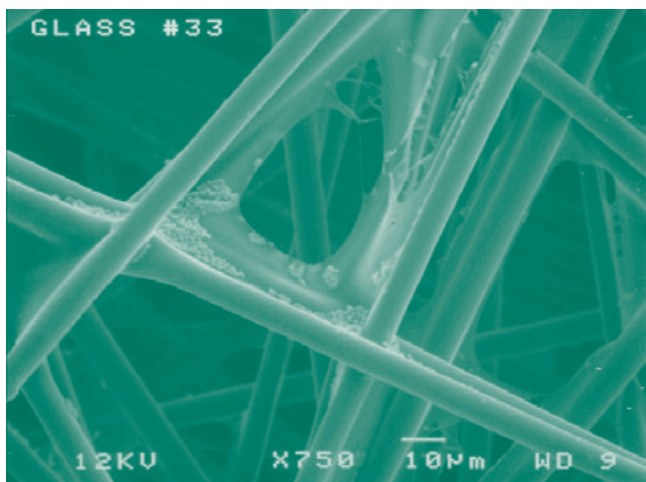
Il existe autant de types de supports liquides ou solides qu'il existe de produits pharmaceutiques ou de dispositifs médicaux. Les supports solides peuvent être fibreux (papier, polymères non tissés) ou présenter une surface telle que l'acier inoxydable, le verre, le plastique ou le caoutchouc. Les supports liquides sont généralement aqueux mais la formulation réelle et les principes actifs ont une influence significative sur la résistance des spores.

## Les supports solides

Toutes les surfaces ne sont pas égales. Les spores vont interagir différemment avec le support selon la topographie et l'hydrophobicité de la surface, le diluant utilisé pour la suspension ou la nature chimique même de la surface.



*Spores sur papier*

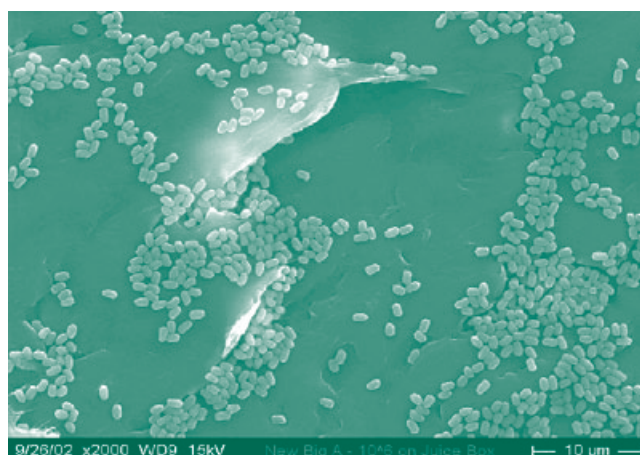
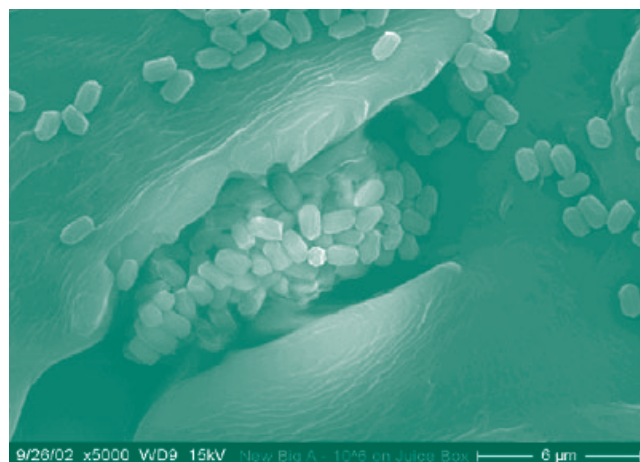


*Spores sur fibres de verre*

Les spores inoculées sur des bouchons caoutchouc (utilisés pour fermer les flacons dans l'industrie pharmaceutique et fabriqués à partir de différents élastomères) montrent des valeurs D très différentes en utilisant pourtant la même préparation de spores.

Voir exemples tableau ci-dessous :

Bouchons	Spores	Valeur D
Type 1	<i>G. stearothermophilus</i>	1,4 mn
Type 2	<i>G. stearothermophilus</i>	2,3 mn
Type 3	<i>G. stearothermophilus</i>	6,1 mn



*Spores sur surface hydrophobe et différentes topographies*

## Les supports liquides

Les spores issues d'une même préparation et inoculées dans différents produits pharmaceutiques montrent un large éventail de résistance. Voir exemples ci-dessous :

Produit		Val D
Eau PPI		3,6 mn
Produit A	1mg/l principe actif	2,1 mn
Produit A	10mg/l principe actif	4,2 mn
Produit B	Avec principe actif	1,2 mn
Produit B	placebo	4,9 mn

Quand les suspensions sont utilisées pour préparer des indicateurs biologiques à façon, il faut faire très attention à l'impact que le produit peut avoir sur la résistance des spores. A cet égard les spores ne sont pas les seules concernées; la contamination naturelle du produit (bioburden), qui est celle que l'on cherche à stériliser en premier lieu, sera également affectée dans sa résistance.

Nous pouvons vous aider dans cette évaluation de la résistance des spores. SGM met à disposition ses résistomètres (BIER vessels) conformes aux exigences de performance imposées par la norme **ISO 18472 :2006** concernant l'appareillage d'essai. N'hésitez pas à nous contacter.

## Les spores contenues dans les Indicateurs Biologiques, peuvent-elles contaminer ma zone de production ?

Doit-on être perturbé par l'introduction de spores vivantes à l'intérieur de notre environnement de travail ?

Nous avons eu ces derniers temps des questions concernant l'usage des indicateurs biologiques et la contamination possible des aires de travail par ces indicateurs. Il y a également un malentendu à ce sujet, car cela n'arrive tout simplement pas. Il y a des dizaines de millions d'indicateurs biologiques utilisés chaque année et ceci depuis 30 ou 40 ans. Et nous n'avons jamais entendu parler de cela.

L'emballage des Indicateurs Biologiques est destiné à protéger leur intégrité après l'exposition dans le stérilisateur. Ce même emballage prévient aussi le relargage de spores à travers l'emballage, avant une stérilisation.

### Y a-t-il des spores sur l'extérieur de l'emballage ?

Il peut y en avoir (très rarement en fait).

### Cela peut-il créer un problème ?

C'est peu probable. Les spores sont des contaminants naturels de tous les environnements où se trouvent des personnes. Les particules du sol qui contiennent des spores envahissent constamment l'environnement de travail. Ces particules sont transportées par nos chaussures, nos vêtements, nos mains. Elles peuvent même être transportées en faible quantité par les systèmes d'aération. Elles passent par les ouvertures de porte sur l'extérieur et migrent ensuite à l'intérieur des locaux.

Nous avons tous des procédures de nettoyage et de décontamination pour éliminer la biocharge et les contaminants de l'environnement. Nous utilisons des programmes de suivi environnemental pour démontrer que nos contrôles sont adéquats et que nos procédures de nettoyage sont efficaces.

Nous réalisons des essais de biocharge sur nos produits pour déterminer la contamination naturelle existante. Il n'est pas rare de trouver un faible niveau de spores dans ces matériaux. Ainsi nous reconnaissons que nous avons des spores issues d'autres sources et nous établissons notre procédé de stérilisation en conséquence.

Regardons certains aspects biologiques des spores qui vont nous les rendre moins intimidantes. Une spore est une forme de vie dormante. Tant que nous ne lui donnons pas un environnement favorable pour sa croissance, elle reste une simple spore dormante.

Les spores utilisées pour le contrôle de la stérilisation vapeur sont du *Geobacillus stearothermophilus*, et sont donc thermophiles. Cela signifie que même si tous les nutriments leur sont fournis pour leur croissance, que les conditions d'humidité sont adéquates, elle ne germeront pas et ne pousseront pas si la température de 45°C n'est pas atteinte. Généralement les conditions de travail sont aux alentours de 20°C.

D'autre part, *Bacillus atrophaeus*, qui est utilisé pour le contrôle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène ou à la chaleur sèche, est un organisme mésophile qui pourra pousser à température ambiante. S'il y a germination et pousse, cela n'est pas nécessairement une mauvaise nouvelle. Quand les spores germent, elles perdent leur résistance à la chaleur et aux produits chimiques. Les désinfectants utilisés pour les procédures normales de nettoyage sont très efficaces sur ces formes végétatives, beaucoup d'entre eux ont par ailleurs des propriétés sporicides.

### Les cellules végétatives peuvent-elles alors donner de nouvelles spores ?

C'est possible, mais dans un laboratoire ou en production, les endroits où trouver des nutriments sont généralement très limités, exceptionnels ou interdits. Le sol où poussent naturellement ces microorganismes représente une source très riche en nutriments et minéraux. Quand la terre devient chaude et humide les spores germent et poussent. Quand l'environnement commence à sécher, les formes végétatives sporulent.

Si les éléments nutritifs de votre zone de production sont surtout constitués de particules de terre (!) la sporulation sera possible; sinon elle ne pourra pas se produire. Dans un pareil cas l'environnement favoriserait naturellement la croissance de toutes les spores présentes et non seulement celles « échappées » des indicateurs biologiques. Comme les spores sont transportées par le sol, celles-ci devaient vraisemblablement se trouver là bien avant l'arrivée des indicateurs biologiques...

Les personnes transportent plus de spores que ne le feront jamais des indicateurs biologiques. Les procédures de nettoyage efficaces gardent sous contrôle ces formes de vie. L'indicateur biologique est l'outil qui vous assure de l'efficacité de votre stérilisation contre ces spores qui justement nuisent à la qualité de vos produits.

L'indicateur biologique est votre ami pas votre ennemi.

## Actualités

### ⇒ Nouvelle avancée dans le temps réduit d'incubation des indicateurs biologiques autonomes EZ tests

Les systèmes autonomes, conformes à l'ISO 11138, tels que l'EZ test (*B. atrophaeus*) pour l'oxyde d'éthylène permettent une lecture à 48 heures et l'EZ test (*G. stearothermophilus*) une lecture à 24 heures, selon le protocole FDA (voir Sterine news numéro 4 juin 2004).

Aujourd'hui le **Smart-Read EZ test** permet de confirmer une stérilisation après seulement **10 heures** d'incubation dans un incubateur-lecteur sophistiqué spécialement dédié à cet usage, l'incubateur-lecteur **Smart-Well**.



Le Smart-Read EZ test est un véritable indicateur biologique (sans enzyme ou indicateur chimique ajouté) incubé, évalué, documenté, en une seule opération automatisée. Ce système peut facilement être mis en place et nécessite un minimum de formation et validation.

Il sera disponible prochainement et seulement, pour l'instant, pour la stérilisation vapeur (*G. stearothermophilus*).

### ⇒ Biodécontamination

L'USP considère aujourd'hui qu'il est possible, dans certaines conditions, d'utiliser des indicateurs biologiques d'une population inférieure à  $10^6$  spores par support lors de la validation des isolateurs.

A l'instar des coupons inox de population  $10^6$  spores que nous fournissons déjà, des coupons inox avec une population de  $10^3$  spores sont aujourd'hui disponibles.

La même technique de polissage de l'inox est utilisée permettant d'assurer notamment l'absence de rayures où peuvent s'abriter les spores.

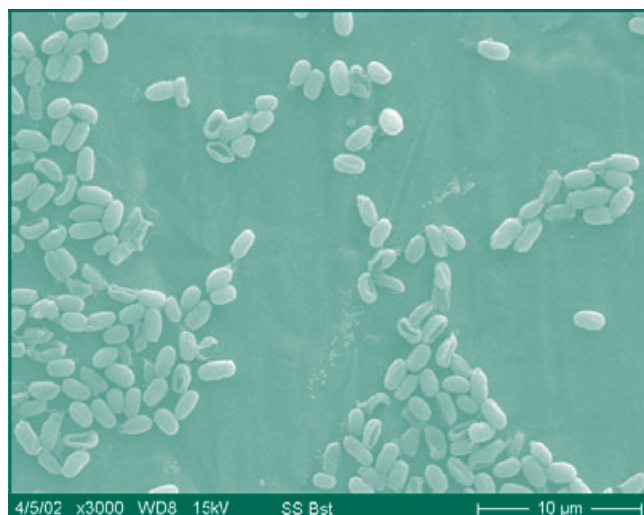
Mais cette technique permet également d'assurer, lors du lavage des coupons, l'élimination complète des composés toxiques et antimicrobiens utilisés pour leur préparation. Ces composés peuvent en effet réagir avec le gaz stérilisant utilisé et augmenter ainsi artificiellement la mortalité des spores (diminution du kill time).

Cette qualité de l'inox est très importante si l'on veut obtenir des coupons possédant **une résistance significative**. La destruction de spores par des réactions secondaires (parfois post process) est à prendre en compte sérieusement. Il est bien sûr important de détruire les spores déposées sur ces coupons mais il l'est tout autant (voire plus) de savoir comment ces spores ont été détruites.

Ces coupons inox sont également utilisés pour la décontamination des salles, ils sont emballés dans une enveloppe de Tyvek® perméable, dans certaines conditions, au peroxyde d'hydrogène.

**Les conditions de température ambiante et de température de surface (point de rosée) sont, on le sait aujourd'hui, déterminantes dans l'efficacité d'une stérilisation ou biodécontamination à l'aide de gaz.**

Selon le gaz et/ou l'appareil de vaporisation utilisés il est parfois nécessaire d'enlever cette enveloppe de Tyvek®.



Spores sur coupons inox