La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 66 | Juillet 2020
Trimestriel

Microbiologie

- Vaccines & endotoxin – A challenging world
- Microbiologie I Méthode alternative d'identification : exemple d'une implémentation d'un système Maldi Tof au laboratoire de contrôle
- Analyse de la charge microbienne en temps réel pour prévenir les risques de contamination et mieux contrôler les procédés
- Eau pour préparations injectables en vrac (productions, coûts). étude de cas axée sur la qualité microbiologique

www.a3p.org

ISSN 1298-047

Sommaire

N°66 // Juillet 2020

Édito I 3

Ils ont participé à ce numéro I Nos contributeurs 4

Billet d'humeur I Travailler différemment ! 5

La Chronique I Ce n'est pas un changement, c'est une rupture ! 6

Actualités I Agenda A3P 7

Réglementaire I 8

Microbiologie I Vaccines & endotoxin – A challenging world 10

Microbiologie I Méthode alternative d'identification : exemple d'une implémentation d'un système Maldi Tof au laboratoire de contrôle 16

Microbiologie I Implantation d'une méthode microbiologique alternative et polyvalente au laboratoire : exemple du BACTALERT 3D ® 21

Microbiologie I From Variable Operator Numeration To The Standardized 3P ® Station Automated Colony Counting On Environmental Monitoring Culture Media Plates 27

Microbiologie I Analyse de la charge microbienne en temps réel pour prévenir les risques de contamination et mieux contrôler les procédés 34

Eau I ISO 22519 PW/WFI production systems standard: Quality aspects 38

Eau I Eau pour préparations injectables en vrac (productions, coûts). étude de cas axée sur la qualité microbiologique 40

Rouging I Comic back to basics on rouging. 46

Particules I Winning combination: Reducing particles in RTU packaging by aligning lid material, adhesive and sealing parameters in a holistic approach 48

La Vague
Revue trimestrielle N° 66 - Juillet 2020

• Editeur
A3P Association
30, rue Pré Gaudry - 69007 Lyon
Tél. 04 37 28 30 40
Prix de vente au numéro : 10€

• Directeur de la Publication
Didier MEYER, Vice-Président A3P
E-mail : dgastonmeyer@gmail.com
• Rédactrice en Chef
Anne RIGOULOT
• Comité scientifique
Bénédicte GAS
• Coordinateur
Frédéric ESTASSY
E-mail : festassy@a3pservices.com
• Conception & graphisme
Sophie TORGUE
E-mail : storgue@a3pservices.com

• Impression
VL développement
42000 Saint-Just-Saint-Rambert

Dépot légal à parution
N° d'ISSN : 1298-047
N° CPPAP : en cours

Tous droits réservés. Les articles publiés dans la revue n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs.

OUI, je m'abonne à La Vague (4 n° + le site + newsletters) pour une durée de 1 an ☐ 40€TTC

Je souhaite acheter le N° ..... du mois de ..... et de l'année ..... ☐ 10€ TTC

Vos coordonnées

Prénom .....

Fonction ..... Email .....

Société ..... Adresse .....

Code postal ..... Ville .....

SIRET ..... CODE NAF .....

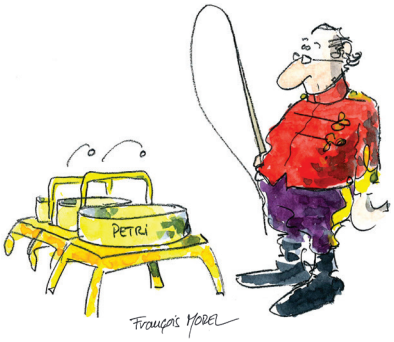
Date et signature

Compléter et renvoyer ce bulletin avec votre règlement sous enveloppe affranchie à A3P Association 30, rue Pré-Gaudry 69007 Lyon

☐ **Chèque à l'ordre d'A3P Association** ☐ **A réception de facture** ☐ **Par virement FR45 3000 2010 3900 0009 8857 E23 Swift CRLYFRPP**

Edito

Par Arnaud Carlotti - Membre du CA A3P



Ce numéro spécial "Microbiologie" de La Vague, devait faire suite aux "Rencontres de Microbiologie" initialement prévues en mars 2020 à Tours et nous permettre de faire le point sur le déroulé de notre congrès biannuel. Malheureusement, la pandémie de SARS-Cov-2 nous a contraint à reporter cet évènement (nouvelles dates les 3 et 4 novembre 2020) ainsi que bien d'autres.

Comme toutes les entreprises, et comme tous les êtres humains, cette situation extraordinaire a impacté et impacte encore profondément nos activités, nos vies. Pour les entreprises du médicament, les plans de continuité d'activité ont permis d'éviter les ruptures d'approvisionnement en médicaments, grâce aux organisations exceptionnelles et au dévouement des collaborateurs. Les laboratoires de contrôle qualité étaient aussi en première ligne, **merci à nos équipes !**
Pour notre Association, dont l'activité principale repose sur les évènements publiques (congrès, rencontres, journées, soirées, ...), les conséquences des multiples annulations sont encore incommensurables. Les équipes d'A3P ont innové, avec la réalisation de webinars, la publication d'articles sur internet, et assurent la continuité avec la publication de la Vague et le report des évènements. Nous avons une pensée amicale pour toutes les équipes d'A3P Service et d'A3P Association et nous les remercions pour leur professionnalisme et leur détermination infaillible à faire vivre notre Association.

En tant que microbiologiste, la période fût à la fois dramatique et exaltante.
Nous avons tous suivi la progression de la maladie (Covid-19) depuis janvier 2020, avec les chiffres journaliers des décès, des réanimations, des hospitalisés, des infectés… Certains ont perdu des proches et des personnes aimées.
Nous avons vécu les pénuries inacceptables et leurs justifications souvent absurdes.
Nous avons vécu le confinement, expérience unique et au combien traumatisante.
Nous vivons maintenant le déconfinement, avec chaque jour cette angoisse de constater une reprise épidémique de la maladie.
Dans ces circonstances exceptionnelles, nous avons ressenti le besoin impérieux d'être utile à la communauté.
Nous avons pu utiliser nos connaissances microbiologiques pour aborder cette maladie.
Fort de notre expérience passée de la grippe H1N1, nous avons pu anticiper à nos petits niveaux, les besoins en équipements de protection individuelle (pas de pénurie de masques dans nos laboratoires !), en réactifs pour les prélèvements, pour l'extraction des acides nucléiques, pour la RT-qPCR, etc…
Nous avons mis en place des organisations destinées à nous préserver en tant qu'équipe de travail (collaborateurs et manageurs) des risques de contaminations professionnelles et à continuer notre activité, pour ne pas être le maillon faible de la chaine de production des médicaments. Les résultats ont été à la hauteur.
Nous avons aussi dépanné pour les masques certains personnels de santé.
Nous avons développé des solutions techniques de diagnostic.
Nous avons fait de la recherche et du développement, car c'est notre métier en fait.

Cela faisait bien longtemps que je n'avais pas passé des nuits entières à faire de la bibliographie (les coronavirus, leurs caractéristiques de dissémination et de survie dans l'atmosphère et sur différents matériaux, les moyens de détection (RT-qPCR) à partir de différents échantillons et environnements, les moyens pour pallier aux pénuries inhérentes (solutions alternatives), à comparer les génomes des souches virales du monde entier, etc…), et à imaginer les expérimentations que j'allais faire le jour venu.
Pour les plus jeunes d'entre nous, cette expérience unique doit servir à mieux anticiper le prochain "évènement extraordinaire" où la compétence microbiologique pourra faire la différence. La connaissance doit aussi servir à cela. Alors, commençons par profiter du partage de connaissance, proposé par les auteurs des articles de ce numéro de La Vague, ensuite venez nombreux aux rencontres de microbiologie en novembre 2020 !
Bonne lecture
Arnaud Carlotti

Merci à nos Contributeurs

Ils ont participé à ce numéro

Thierry Bonnevay, rédacteur en chef, invité de ce numéro

Thierry Bonnevay a plus de 20 ans d'expérience dans le domaine du contrôle de la qualité microbiologique, acquis au sein de la société Sanofi Pasteur et a occupé différents poste dans ce domaine aussi bien en industrie qu'en R&D.
Il fait partie du groupe d'experts de l'USP sur les méthodes microbiologiques modernes (MMM) depuis 2015 et membre du Groupe d'Experts de la Pharmacopée Européenne EDQM au sein du Groupe 1 Microbiologie (depuis 2016), du Groupe de Travail Endotoxines Bactériennes (WP BET) depuis 2017 et du groupe de travail sur les Mycoplasmes (WP MYC) depuis 2018.

Marine Marius
SANOFI PASTEUR

Rédactrice avec Thierry Bonnevay de " Vaccines & endotoxin A challenging world"

Marine is Scientist in the Analytical Sciences department of Sanofi Pasteur. She joined Sanofi Pasteur in 2012 in the Analytical R&D department, North America. She leads the development, validation and implementation of alternative and rapid microbiology methods (bacteriology and molecular biology) for commercial and investigational products. She is an internal SME in endotoxin, mycoplasma and mycobacteria testing.

Guillaume Pinon
ACM PHARMA

Eric Petat
ACM PHARMA

Rédacteurs de "Implantation d'une méthode microbiologique alternative et polyvalente au laboratoire : exemple du BACTALERT 3D ®"

De formation scientifique, spécialisé en microbiologie, Guillaume évolue depuis plus de 10 ans au cœur de la microbiologie industrielle. Après différents postes sur des sites de production (stériles et non stériles) et en labo. de contrôle qualité prestataire de service, il est actuellement Directeur Technique d'ACM Pharma.

Pharmacien biologiste, diplômé de la Fac. de Tours, après une expérience hospitalière au CHU de Tours et 5 ans de direction de labo. de biologie médicale Outre-Mer, Eric a dirigé le laboratoire de biologie médicale de Bellegarde durant 27 ans, et créé en association avec Martine PETAT, les laboratoires ACM Agro en 1990 (microbiologie alimentaire) et ACM Pharma (microbiologie pharmaceutique et cosmétique). Actuellement, Pharmacien responsable et Directeur scientifique d'ACM Pharma, il assure la codirection avec Martine PETAT de Teranga groupe, holding de gestion de ACM Pharma, CEBIPHAR et UPS Consultants.

Alexis Billard
STALLERGENES GREEG

Rédacteur de " Méthode alternative d'identification : exemple d'une implémentation d'un système Maldi Tof au laboratoire de contrôle"

D'une formation universitaire en Physiologie et Biologie Moléculaire appliquées à la Microbiologie, suivi d'un Doctorat et d'un Post Doctorat sur le développement de nouveaux modes d'action antifongiques dans de grands groupes agrochimiques en France et aux Etats Unis, depuis 2015, Responsable du laboratoire Développement Microbiologie puis de Développement et Contrôle Qualité Microbiologie au sein de Stallergenes Greer.

Paul-Arthur Sol
METTLER-TOLEDO SAS

Rédacteur de " Analyse de la charge microbienne en temps réel pour prévenir les risques de contamination et mieux contrôler les procédés"

Responsable Gamme Thornton chez Mettler Toledo SAS Spécialiste sur l'ensemble des analyses eau Pures et Ultra Pures pour Mettler Toledo SAS depuis 2ans.

Arnaud Paris
BIOMERIEUX

Lucile Plourde-Owobi
SANOFI PASTEUR

Rédacteurs de " From Variable Operator Numeration To The Standardized 3P® Station Automated Colony Counting On Environmental Monitoring Culture Media Plates"

Currently Director of the Healthcare Scientific Affairs for Microbiology at bioMerieux, and previously R&D Director for all the development of microbiological detection solutions for the healthcare industries. With over 13 years of pharmaceutical microbiology experience, Arnaud has an extensive knowledge of all the quality control of Biotechnology drugs and Cell & Gene Therapies (ATMPs). From traditional culture media solutions to fully automated and ultra-rapid microbiology detection technologies, Arnaud helped developed a wide portfolio of solutions for the healthcare industries.

More than 20 years of experience in industrial microbiology (analytical, manufacturing and R&D) for the development, the validation and the implementation of new microbial and molecular methods, bio-banking, characterization of strains, up-stream fermentation process, alternative, rapid and automated technologies to improve the productivity in the labs and trouble-shooting solving for industrial operations in the field of bacteriology. Through Research and Industry partnerships, Lucile is today missioned on "microbiota" Sanofi initiatives to develop the R&D synergies and to accelerate scientific innovation.

John Berggren
SCHOTT AG

Gregor Deutschle
SCHOTT AG

Rédacteurs de " Winning combination: Reducing particles in RTU packaging by aligning lid material, adhesive and sealing parameters in a holistic approach"

John Berggren joined SCHOTT 2 years ago after 25 years in pharmaceutical manufacturing (tablets and injectables) where he managed quality, analytical laboratories, drug/device development, supplier quality, engineering and technical operations. In his current role, he directs contamination control programs for the SCHOTT iQ® platform.

Gregor Deutschle started with SCHOTT in 2008 and has more than 7 years of experience in parenteral packaging, ready to use containers and fill & finish processes. He held various positions and is now the Director Business Development Sterile Solutions for the adaptiQ® ready to use vials. He focuses on accelerating the adoption of ready to use packaging and advancing aseptic manufacturing in the pharmaceutical industry. Gregor holds a degree in mechanical engineering.

Keren Zalkind Zigelboim
BIOPUREMAX

Shlomo Sackstein
BIOPUREMAX

Rédacteurs de "IISO 22519 PW/WFI production systems standard: Quality aspects"

Ms. Keren Z. Zigelboim is Head of Business development at Biopuremax, with BSc in Chemical Engineering from Technicon- Israel Institute of Technology.
A leading member of ISO 22519 standard committee for purified water (PW) and water for injection (WFI) Pretreatment and production systems.
Keren leads the quality processes in Biopuremax: CE mark, ISO13485 medical device and ISO 9001.
Keren Z. Zigelboim has extensive experience in validation.
This includes: pharmaceutical water systems, HVAC, aseptic processes and industrial utilities.

Mr. Shlomo Sackstein is Chief Executive Officer at Biopuremax and the Biopuremax patent holder, with a BSc in Mechanical Engineering from Technion – Israel Institute of Technology and an MBA in Business Administration from Tel Aviv University.
Shlomo has been designing, installing, validating and operating high purity water systems for 20 years in the Biopharma industry all over the world. The author of many publications in internationally : Pharmaceutical Engineering, Pharmind, Technopharm, PDA Letter, Cleanroom Technology Magazine and more and took a lead part in writing the latest update in the ISPE Baseline, Volume 4: Water and Steam.
Shlomo Sackstein is a member of ISPE. In addition Shlomo is an active member of the executive board of the Israel PDA chapter. Presently the chairman of the ISO standards committee TC282 / WG 3 Purified water (PW) and water for injection (WFI) pretreatment and production systems

Rédacteurs de " Eau pour préparations injectables en vrac (productions, coûts). Etude de cas axée sur la qualité microbiologique "

Olivier Chancel
BOEHRINGER-INGELHEIM.

Pharmacien, diplômé en production et contrôle qualité du médicament ainsi qu'en gestion des entreprises. Actuellement expert en stérilité et assurance de la stérilité et auditeur qualité senior. A travaillé dans ou avec l'industrie pharmaceutique pendant 20 ans : recherche et développement pharmaceutique, assurance qualité, contrôle qualité, gestion de projet et production de formes galéniques solides et injectables. A publié des articles concernant les activités en salle blanche ou les pratiques aseptiques.

Sylvie Genoux
BIOMERIEUX

Endotoxin Business Manager chez bioMerieux depuis 2017, Sylvie participe au développement de la nouvelle gamme ENDONEXT utilisant le facteur C recombinant pour la détection des Endotoxines. Précédemment, elle a travaillé quelques années sur l'implémentation d'un automate de microbiologie et plus de 20 ans dans le domaine des endotoxines en tant que Sales Manager en charge des ventes, du support et de la formation des clients pharma.

Robert Neri
Consultant

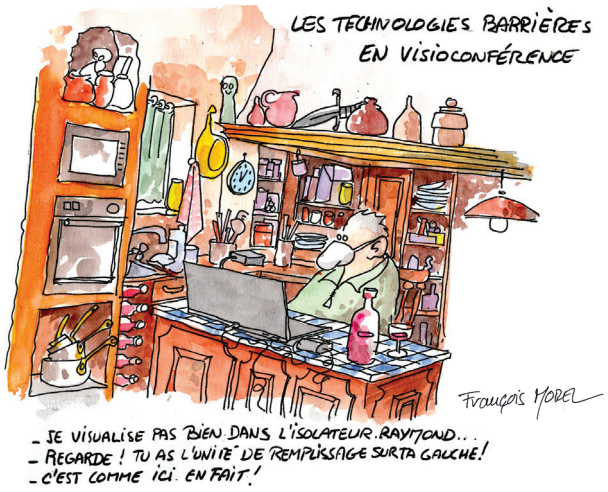
Expert eaux à usage pharmaceutique et eau de process.

Vous aussi, vous souhaitez participer aux prochains numéros ? Faites-nous parvenir vos propositions d'articles qui seront étudiées par le comité de lecture pour approbation. *=> Coordonnées des contacts page 2*

Billet d'Humeur

Par Anne Hays - Membre du CA A3P

Travailler différemment.



Début avril 2020, j'ai été sollicitée pour intervenir lors d'une table ronde virtuelle, organisée autour du thème "Le confinement est bientôt fini, et maintenant… ? Enjeux et opportunités au sein des entreprises".
Le fait d'être invitée à participer à cette table ronde et d'avoir à réfléchir à ce thème, a fait surgir en moi un certain nombre de réflexions dont une que j'aimerais particulièrement partager ici, relative au télétravail.

J'étais en effet "entrée en confinement", un peu comme tout un chacun, sans trop d'état d'âme un mois auparavant.
Nous avons continué de travailler et de vivre mais dans un contexte beaucoup plus lourd au quotidien.
Un trop plein d'informations qui accentue le degré de gravité parfois et crée une charge mentale qui pèse sur la capacité à se concentrer.

Le business devait cependant être assuré, nous devions rapidement nous adapter et donc organiser nos structures en intégrant à la fois les nouvelles règles sanitaires, et l'aménagement du mode de travail de nos équipes,
en fonction de leurs missions et de leurs contraintes personnelles.

Dans la mesure de sa compatibilité avec la fonction, le travail à distance est apparu naturellement comme la solution.
Cette généralisation du home-office a été une opportunité extraordinaire de briser des préjugés et de lui confirmer une certaine légitimité.
Même les plus récalcitrants en conviennent aujourd'hui. Zoom, WhatsApp, Teams pour ne citer que ceux-là, tous ces outils,
qui se devront bien évidemment d'être améliorés, nous ont permis de mettre en évidence deux choses :
il est possible de travailler chez soi avec concentration et autonomie et il est possible de collaborer en présentiel virtuel, de presque n'importe où, aussi efficacement, avec une productivité insoupçonnée et des coûts maîtrisés !
Et pourtant, les conditions de ce télétravail relevaient parfois d'un fonctionnement en mode dégradé,
du fait des doubles vies que de nombreuses personnes ont dû mener entre l'école à la maison et la vie professionnelle.
Nous avons aujourd'hui la preuve que le télétravail doit être considéré différemment dorénavant et
qu'il est même parfois souhaitable à certains moments, car avec une même capacité à s'investir,
il permet à chacun de prendre un certain recul et ainsi se focaliser avec plus d'efficience sur ses missions.
Le télétravail et le travail au bureau pourraient devenir ainsi complémentaires dans l'après-crise.

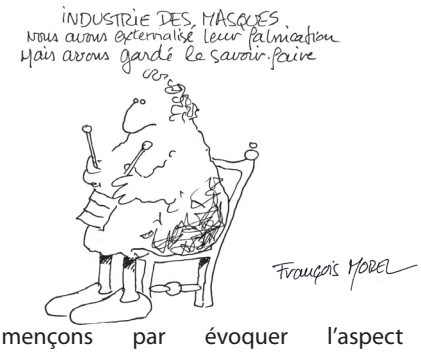
**Cette expérience va nous amener tout naturellement à réfléchir à cette dernière,
à l'intérêt de certaines réunions, brainstorming, déplacements pas toujours justifiés et qui sait,
à reconsidérer peut-être nos espaces de travail et en premier lieu l'open space, par exemple !
Nous serons certainement amenés alors à repenser certaines organisations afin d'en améliorer le management.
Une chose est sûre en revanche, c'est que c'est dès à présent que nous devons entreprendre cette réflexion sur le changement et qu'elle doit être menée comme un véritable projet d'entreprise,
impliquant toute la hiérarchie avec un flux d'information fluide à double sens.
Nous devons nous appuyer sur ce que chacun a vécu durant cette crise pour repenser nos façons de travailler,
nous recentrer sur l'essentiel.**

La Chronique

Par Patrick HIBON DE FROHEN - Membre du CA A3P

Ce n'est pas un changement, c'est une rupture !

Au moment où ces lignes sont écrites nous sommes à la mi-mai et le déconfinement a été autorisé depuis une bonne semaine et nous pouvons dire que nous venons de vivre une époque épique. En effet, depuis l'annonce du confinement, le 16 mars, nos vies ont été bouleversées : cours à distance, fermeture des commerces non essentiels, généralisation du télétravail, recours massif au chômage partiel et mobilité restreinte, pour ne citer que cela ! Néanmoins quelques enseignements, tant sur le plan industriel, en matière de santé, que sur le plan humain dans nos laboratoires, peuvent d'ores et déjà être tirés.



Commençons par évoquer l'aspect industriel. Cela fait déjà quelques années que nous étions nombreux à évoquer le risque de la dépendance sanitaire de la France, particulièrement en matière de médicaments. En août 2019, une vingtaine de médecins et professeurs hospitaliers s'étaient déjà inquiétés, dans une tribune du JDD, de récentes pénuries de médicaments. Ils demandaient la création d'un "*établissement pharmaceutique à but non lucratif, si possible européen, pour prévenir les pénuries et garantir de la qualité des médicaments*". Tous, nous avions conscience que l'économie planétaire s'était développée au profit de la Chine parce que bien des entreprises en sont venues à s'appuyer sur des exportations chinoises bon marché, sans trop se soucier du risque qu'il y avait à faire d'un régime autoritaire le moteur de la production mondiale ! L'Europe, et plus particulièrement la France, ont ainsi perdu leur indépendance sanitaire et cela s'est bien vu au cours de cette crise due au Covid-19, sur le risque de pénurie de certains médicaments lié à l'approvisionnement de certains principes actifs de première urgence fabriqués en Chine. Et il a fallu cette pandémie pour que nombre d'entreprises prennent conscience d'être trop dépendantes de processus de production qui échappent à leur contrôle, particulièrement en regard de la désinvolture de la Chine dans le domaine de la propriété intellectuelle.

Les priorités et les attitudes sont néanmoins en train de changer rapidement. Citons deux exemples, l'un à court terme : l'ANSM vient, mi-avril, de solliciter des organisations, telle l'A3P, pour recenser activement des petits laboratoires qui pourraient produire les médicaments critiques (antibiotiques et curares) pour les patients atteints par ce Coronavirus et qui sont actuellement en fort risque de pénurie. L'autre à plus ou moins moyen terme : Sanofi a annoncé, fin février dernier, avoir pour ambition de créer un leader européen des principes actifs pharmaceutiques (API).

La nouvelle entité "*contribuerait à sécuriser la fabrication des API ainsi qu'à développer les capacités d'approvisionnement pour l'Europe et au-delà*" indique Philippe Luscan, Vice-Président Exécutif, Affaires Industrielles Globales.

Saluons enfin, pour clore ce chapitre, l'annonce de l'émergence d'une "Europe de la Santé" que le couple Franco-Allemand vient d'appeler de ses vœux.

Penchons-nous maintenant sur le plan humain. Aujourd'hui, de nombreux outils de communication existent pour collaborer à distance. Si on s'intéresse aux applications les plus téléchargées durant la première semaine de confinement, 8 sur 10 sont destinées à garder le contact, jouer à distance et même collaborer de façon virtuelle. On peut citer Skype, Teams, Zoom ou encore WhatsApp. Les entreprises ont appris à réinventer les modalités de travail collaboratif (réunions, brainstorming, échanges, etc.).

Récemment, fin avril, deux consultantes en ressources humaines, Dominique Ben Dhaou fondatrice de Point North et Nathalie Baron Unique Pathways ont organisé des tables rondes avec des intervenants de différents secteurs, sur le thème : "Le confinement est bientôt fini, et maintenant ? Enjeux et opportunités au sein des entreprises". Permettez-moi d'en faire une brève synthèse, certes non exhaustive, tant ces échanges ont été riches d'enseignements. Si certains avaient des a priori négatifs sur le télétravail, ils ont volontiers reconnu, à leur grande surprise, que ce mode de travail à distance avait été "très productif pour des postes auxquels ils n'avaient pas pensé et que cela fonctionnait !". Le confinement a ainsi créé des nouveaux modes de communication horizontale et verticale, en particulier pour les team-leader, avec des échanges très importants d'informations, de données, d'idées, de questions, même pour les timides et introvertis. De plus, il ne parait pas concevable aujourd'hui de revenir en arrière, les collaborateurs risqueraient d'être frustrés, car selon les mêmes, l'écoute active et les compétences interpersonnelles sont encore plus importantes en virtuel. Il a été noté que la notion de flexibilité, qui en a découlé, va être conservée, car on peut parfaitement fonctionner en mode projet, même à distance. Les soft skills, identifiés comme prioritaires dans les organisations de demain, se révèlent être d'autant plus prioritaires en pareille situation.

Autre point important, si la technologie a permis cela, tous sont convaincus que cette crise va être un "accélérateur de transformation digitale". Le rôle de l'animateur des réunions en visioconférence étant essentiel (écoute, respect, donner la parole à tous, synthèse, reformulation, etc.), une formation apparait comme nécessaire. Les "Learning lab digitalisés[1]", au sein des centres de formation, que j'avais pour ma part, il y a près de quatre ans déjà appelé de mes vœux, sont devenus des incontournables. Tous les participants à ces tables-rondes ont, in fine, affirmé "qu'après ne sera pas ou plus comme avant" et que tous les modèles RH acquis ont pris une autre réalité et donc qu'il allait falloir les reconstruire autrement. A titre d'exemple, la difficulté va être de concilier le télétravail et la vie sociale en entreprise. Il faudra également préserver un équilibre entre télétravail et présentiel. Pour toutes ces bonnes raisons, il a été suggéré de créer un poste d'observation et de concrétisation, voire d'exploitation "d'un référentiel de dialogue, de prise en compte de l'émotionnel dans le virtuel, de gestion des risques en intégrant l'improbable et l'imprévu", etc. Je termine mon propos en vous soumettant, pour réflexion, ce slogan d'une célèbre ONG internationale : "***Lets not go back to normal. Normal was the problem.***"

Référence: : Learning lab. : sont des lieux d'expérimentation en innovation pédagogique. Souvent soutenus par des entreprises ou regroupement d'universités et centres de formation, leur développement s'inscrit dans le mouvement des moocs, de l'intelligence collective et du web 2.0. Les fondateurs ont défini **six prérequis :** favoriser l'innovation pédagogique, disposer d'un espace innovant ainsi que d'un ensemble d'équipements numériques, s'appuyer sur un dispositif de recherche, soutenir l'acquisition de compétences, être un lieu ouvert et accueillant.

Les rendez-vous A3P

Découvrez l'ensemble des programmes & inscription sur **www.a3p.org**

Respect des gestes barrières
Pour bien vous protéger

Rejoignez la communauté A3P
LinkedIn

Réglementaire

À ne pas manquer !

Ce point réglementaire trimestriel proposé par la société AKTEHOM, présente les récentes évolutions réglementaires au regard du cycle de vie du produit. Cette sélection des parutions intervenues depuis la précédente édition se focalise sur les grandes thématiques impactant les métiers pharmaceutiques.

This quarterly regulatory point presents recent regulatory developments in terms of product lifecycle. Since the previous edition, this selection of publications focuses on the major themes impacting the pharmaceutical professions.

Analytique - Analytical

Origine	Titre	Type	Date
ICH	**Q3C (R8): Impurities: guideline for residual solvents** *Proposition d'intégration de valeurs de PDE pour les composés suivants :* *2-METHYLTETRAHYDROFURAN, CYCLOPENTYL METHYL ETHER, et TERTIARY-BUTYL ALCOHOL*	Draft	04/05/2020
EP	**Chapitre général 5.28 Maîtrise statistique des procédés multivariée** *Ce nouveau chapitre constitue une introduction à l'utilisation de la MSPM ainsi qu'un guide de bonne pratique ; il est publié à titre d'information et ne sera pas juridiquement contraignant. Les principes de la MSPM et de l'établissement de cartes de contrôle multivariées y sont décrits de façon générale, et les fondements théoriques des procédures statistiques d'analyse multivariée brièvement abordés. La Ph. Eur. est la première pharmacopée à élaborer un chapitre général sur ce sujet. Le nouveau chapitre 5.28, et la révision du chapitre 5.25 sur le contrôle analytique des procédés (PAT) qui fait désormais référence au chapitre 5.28, seront publiés dans le Supplément 10.4 de la Ph. Eur., qui sera disponible en octobre 2020*	Final	11/05/2020
EP	**Update to work programme of the European Pharmacopoeia** *Overview du programme de révision des Pharmacopées Européennes*	Info	06/05/2020
USP	**General Chapter** *Les chapitres suivants ont été révisés et seront applicable au 1er Déc 2020* *(121) Insulin Assays (Nouvelle méthode pour les insulines)* *(381) Elastomeric Components in Injectable Pharmaceutical Product Packaging/Delivery Systems (chapter update)* *382) Elastomeric Component Functional Suitability in Parenteral Product Packaging/Delivery Systems (New Chapter)* *(671) Containers—Performance Testing (Chapter update)* *(1381) Assessment of Elastomeric Component Used in Injectable Pharmaceutical Product Packaging/ Delivery Systems (New Chapter)* *(1382) Assessment of Elastomeric Component Functional Suitability in Parenteral Product Packaging/ Delivery Systems (New Chapter)* *(1430.3), (1430.6) & (1430.7) : Analytical Methodologies Based on Scattering Phenomena—Dynamic Light Scattering, Particle Counting via Light Scattering & Nephelometry and Turbidimetry (3 New Chapters)* *(1079.2) Mean Kinetic Temperature in the Evaluation of Temperature Excursions During Storage and Transportation of Drug Products (New Chapter)*	Final	01/06/2020

Fabrication – Manufacturing

Origine	Titre	Type	Date
WHO	**QAS/20.849 - Points to consider on the different approaches –including HBEL –to establish carryover limits in cleaning validation for identification of contamination risks when manufacturing in shared facilities** *Ce document discute des différentes approches possibles - y compris les méthodes qui tiennent compte des données pharmacologiques et toxicologiques (limites d'exposition basées sur la santé {HBEL}) - qui pourraient être utilisées lors de l'établissement de limites de transfert sûres lors de la fabrication dans des installations partagées. Il fournit des éclaircissements sur la validation du nettoyage et présente les points à considérer lors de l'analyse de l'existant et des approches de validation du nettoyage dans les installations multiproduits.*	Draft	14/05/2020

Réglementaire

Inspection – Inspection

Origine	Titre	Type	Date
PICS	**Annual Report 2019** *Rapport annuel détaillant les activités du PIC/S en 2019*	Rapport	15/05/2020
PICS	**Inspection of Health Based Exposure Limit (HBEL) Assessments and Use in Quality Risk Management PI 052-1** *Cet aide-mémoire décrit l'approche à suivre par des inspecteurs sans expertise toxicologique lors d'une inspection vis-à-vis de l'HBEL (Health Based Exposure)*	Final	01/06/2020
PICS	**Q&A on Implementation of Risk-Based Prevention of Cross-Contamination in Production and 'Guideline on Setting Health-Based Exposure Limits for Use in Risk Identification in the Manufacture of Different Medicinal Products in Shared Facilities' PI 053-1** *Ce Q&A vient compléter l'aide-mémoire PI052-1*	Final	01/06/2020
EMA	**2019 annual report of the European Medicines Agency** *Synthèse des principaux accomplissements de l'année 2019. A noter : Synthèse des documents publiés au cours de l'année, Transfert du siège aux Pays Bas (conséquence Brexit), Résumé des nouvelles législations européenne applicables au territoire européen, Plan d'intégration du big data dans les prises de décision règlementaires, Impureté Nitrosamine, résistances antimicrobienne*	Rapport	15/05/2020
ICH	**ICH electronic Common Technical Document - eCTD v4.0 Q&A** *Questions-Réponses résumant les principales questions posées sur le package d'implémentation eCTD4.0*	Q/A	08/06/2020

Développement - Development

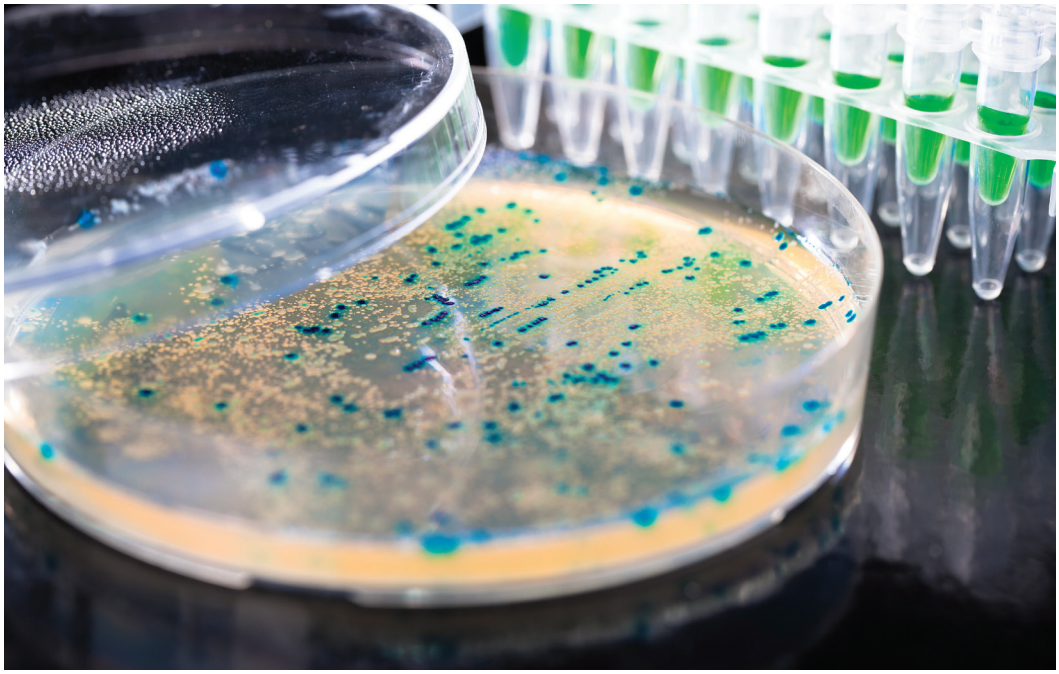
Origine	Titre	Type	Date
FDA	**Orange Book Questions and Answers Guidance for Industry** *Guide compilant les questions fréquemment demandées en regard de l'utilisation du Orange Book (Approved Drug Product With Therapeutic Evaluations publication)*	Q/A	27/05/2020
EMA	**How to prepare and review a summary of product characteristics** *Ce guide, préparé par le SmPC Advisory Group de l'Agence, liste et classifie les effets secondaires et indésirable des produits.*	Final	25/06/2020

Dispositifs Médicaux - Produits Combinés

Origine	Titre	Type	Date
EC	**Règlement (UE) 2020/561 du parlement européen et du conseil** *Règlement modifiant le règlement (UE) 2017/745 (MDR) relatif aux dispositifs médicaux en ce qui concerne les dates d'application de certaines de ses dispositions.*	Final	23/04/2020

Vaccines & Endotoxin, a Challenging World.

Par Marine MARIUS & Thierry BONNEVAY - Sanofi Pasteur
Marine.Marius@sanofi.com / Thierry.Bonnevay@sanofi.com



Endotoxins are heat-stable lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria and are potential contaminants that can be introduced during the manufacturing of pharmaceutical products, including vaccines. Parenteral pharmaceutical products must undergo endotoxin testing since endotoxins are pyrogenic in humans and can induce severe physiological reactions. Currently, animal-derived Limulus amoebocyte lysate (LAL) assays are widely used. Assays using recombinant Factor C (rFC), a non-animal-derived reagent, have been proposed as an alternative. Recently in Europe, in June 2020, rFC was introduced in a general Chapter as compendial assay that will be effective on 01 January 2021.

1. Pharmacopeial environment around endotoxins

Within the last 10 years, there have been developments in the regulatory significance of endotoxin testing. The change is mainly due to the context around the Low Endotoxin Recovery (LER) phenomenon, which is still debated since 2013, as well as the focus on alternative methods to measure endotoxins with rFC (and full recombinant). Even though commercial reagent solutions exist now for more than 15 years, the rFC-based method is gradually becoming a compendial method.

The first to approach the rFC from a regulatory point of view was the United States Pharmacopoeia (USP) with the publication in the Pharmacopeial Forum (PF) of a stimuli article from Lonza in 2010. Generally, a stimuli article is written as a pre-draft for a future text, but in that case, it was never published in the USP as rFC was still single vendor technology at the time. Then, in 2012, the Food and Drug Administration (FDA) published the guideline Endotoxins and Pyrogens Questions & Answers to clarify and replace the former Guideline LAL for the final product (published in 1987), in which the FDA specifies that an alternative method to LAL based on rFC can be implemented if it is

⇢

duly validated and proven. Such alternative procedures and methods should be validated as described in the USP General Chapter <1225>, Validation of Compendial Procedures, and should be shown to achieve equivalent or better results.
Finally, since 2013, new conferences in the USA and Europe have started to flourish based only on the specific context of pyrogens and bacterial endotoxins as well as the introduction and implementation of rFC.

We are going to take a detailed look at the advancement and the evolution of regulatory texts concerning endotoxins and specifically the recombinant factor C in four essential and influential pharmacopoeias: the European Pharmacopoeia, the United States Pharmacopoeia, the Japanese Pharmacopoeia, and the Chinese Pharmacopoeia.

- European Pharmacopeia (Ph. Eur.): In 2015, the Ph. Eur. added a statement in chapter 5.1.10 "Guideline for using the test for bacterial endotoxin" to allow the use of rFC as an alternative to the LAL and at the same time initiated a discussion with the PDG (Pharmacopeial Discussion Group) on the possibility of including a seventh method "G" using the rFC reagent in the harmonized chapter 2.6.14. But it was still too early in 2015 to consider the rFC as a compendial test. However, in 2017 a request from a stakeholder regarding the possible development of a chapter on Bacterial Endotoxin Test (BET) using rFC prompted the Ph. Eur., to resume the work started in 2015; it was then considered that the scientific data and knowledge accumulated in the meantime, the number of kits available in Europe, would allow the development of such a chapter. The Ph. Eur. commission decided at its 160th session to develop a separate chapter entitled "Testing for Bacterial Endotoxins using Recombinant Factor C" new Chapter 2.6.32. The draft of this new Chapter 2.6.32. has been published in Pharmeuropa 31.1 for public inquiry (from end of December 2018 until end of March 2019). This new Chapter 2.6.32 describes a BET performed using a rFC-based method on the horseshoe crab gene sequence to quantify endotoxins, as well as an endpoint fluorometric detection method. Ph. Eur. would like to point out that no special sample preparation (e.g. phage ligand) is described. Only the fluorometric method is included in this Chapter because this is the read out used in all rFC kits currently available on the European market and in most scientific data. This Chapter could be revised to include the full recombinant approaches i.e. rFC chromogenic method developed by a third Japanese supplier (i.e., PyroSmart kit). In addition to this new Chapter, to promote acceptance of the method, Ph. Eur. will soon launch a collaborative study to verify rFC methods on different products and compare them with classical LAL methods. This new Chapter was officially published in the edition 10.2 and will be effective in edition 10.3 January 2021. In parallel, Ph. Eur. revised the guideline 5.1.10. to be also published in edition 10.3 to precise the use and implementation of this new Chapter 2.6.32.

- United States Pharmacopeia (USP): End of January 2018, the USP published in the PF 44[(4)] a new Chapter in draft proposal <1085> "Guidelines on endotoxins test" with the justification of the retirement of the 1987 FDA (1) guideline, where a lot of useful information was removed. This new 18-page guide focused primarily on the LAL test and its environment. First, a very small section mentioned alternative tests to the LAL with the rFC but was revised 2 years later with the sub-Chapter <1085.1> "Use of Recombinant Reagents in the Bacterial Endotoxins Test - Photometric and Fluorometric Methods Using Recombinantly Derived Reagents" (details on this sub-Chapter are given later in this section). The same year, rFC was approved by FDA as endotoxin release method for Elli Lilly's Emgality™ drug (Galcanezumab)). Then, USP organized a specific Workshop on 10 and 11 June 2019 at Rockville, "Future of Endotoxins and Pyrogen Testing: Reference Standards and Procedures". A specific session was dedicated to examining the implementation of alternative test methods for endotoxin testing (Session 2: Alternative Methods: Is an Alternative Source of Factor C Desirable?). Following this workshop, the USP, to the great surprise, released a revision of the harmonized Chapter <85> for public comment in PF 45 (5) August 2019 that allowed the use of recombinant reagents as an alternative to LAL. However, based on stakeholder feedback, this revision proposal was canceled in April 2020. Stakeholders recommended the development of an independent Chapter rather than inclusion in a harmonized Chapter. This was the sub-Chapter <1085.1>. This sub-Chapter includes recommendations for the use and qualification of recombinant reagents as alternatives to LAL reagents. It also provides guidance on Quality Assurance oversight of recombinant reagents for BET, which are currently not regulated by the FDA. rFC remains allowed as an alternative method, and its target publication in PF 47 (1) is January-February 2021. In parallel, in May 2020, USP accepted for publication in the PF, a new stimuli article entitled "Application of Recombinant Factor C Reagent for the Detection of Bacterial Endotoxins in Pharmaceutical Products and Comparability to Limulus Amebocyte Lysate" written by Jay Bolden. This article can be commented until the end of July 2020.

- Japanese Pharmacopeia (JP): The JP Expert Committee on Biological Methods has launched a kick-off discussion to develop a BET using the reactive rFC for inclusion in the JP General Information. When this draft is available in English, the JP will send it for public consultation to Ph. Eur. and USP. JP experts intend to harmonize the use of rFC reagent in the future through the CPG. JP believes that sharing information in detail is important for future harmonization. JP has launched two collaborative studies in Japan on the comparison of LAL and rFC (one in 2017, one in 2018, but still in the Japanese language). JP is thinking of an rFC Chapter in 2021 (JP 18th Edition) but wants to work with USP and Ph. Eur. for future harmonization. Finally, in September 2019, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) has released a new text to be commented entitled "Bacterial Endotoxins Test and alternative methods using recombinant protein- reagents for endotoxin assay". In this new text, it is mentioned "… recombinant protein-reagents for endotoxin assay have been developed as alternatives to lysate reagents for the purpose of protecting horseshoe crabs, ensuring a stable supply of reagents, reducing differences between reagent lots, and improving the continuity of the tests…"

- Chinese Pharmacopeia (ChP): The endotoxin testing is described in the ChP version 2015 in Chapter 1143, "Tests for Bacterial Endotoxin". This Chapter describes Tachypleus Amebocyte Lysate (TAL) method with a gel clot (limit test and semi-quantification test) as well as photometry methods. There is no description or recombinant reagent in this Chapter. However, ChP has proposed in 2019 for the future ChP 2020 expected by June 2020 in the Chinese language a new Chapter entitled « Guideline for the Application of the Test for Bacterial Endotoxin ». In this new guideline, there is a description of new bacterial endotoxin test methods that have been successively developed to meet the needs of bacterial endotoxin test for particular products or to reduce the use of TAL reagent. Examples include the rFC method with a specific annex.

2. Endotoxin testing in the vaccine industry

Bacterial endotoxin testing assays are used for four different purposes: manufacturing process monitoring testing (MPMT), in-process control testing (IPCT), final bulk, or product release (including raw material) and environmental water testing.

For the first two purposes, endotoxin testing ensures the reduction or elimination of endotoxins originating from raw materials and/or host cells during the manufacturing of biological products.
In turn, the final product release testing ensures product safety by ensuring that the defined monography endotoxin limits of the *said* product have been reached. Endotoxin water testing is also critical to ensure consistently high-quality water used for equipment cleaning, and ingredient water or raw material to all pharmaceutical processing. A related area is with depyrogenation studies.

⇢

There is no particularity linked to final product/raw material or environmental water endotoxin testing in the vaccine industry compared to others. However, when it comes to the testing of intermediate stages during the production of biological products involving Gram-negative bacteria, endotoxin testing can be challenging. This is particularly true when producing:

- A bacterial vaccine based on a Gram-negative bacterial antigen such as our Vi capsular polysaccharidic Typhim Vi® vaccine based on purified Vi polysaccharide from *Salmonella enterica serovar typhi* (http://products.sanofi.ca/fr/typhim.pdf)
- A conjugate vaccine based on Gram-negative toxoid protein, outer membrane vesicle or protein complex as protein carrier such as our Menactra® vaccine containing each of meningococcal A, C, W, and Y polysaccharides conjugated to diphtheria toxoid protein carrier (https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/menactra)
- The recombinant proteins using Gram-negative bacteria as host cells such as *Escherichia coli*

When vaccine antigen or protein carrier is derived from Gram-negative bacteria, endotoxins are inherent in the product per se. They are an inevitable part of the vaccine production and are considered as process derived substances. In that case, BET can be used to monitor process consistency, characterize the endotoxin content in the product, and depending on the product type, can be associated with a pyrogen test to release the final product.

Historically, endotoxin methods were developed to detect low amounts of endotoxin in parenteral solutions administrated in large volumes, such as saline infusions. Sensitive detection of endotoxin was critical.

Today, the challenge that we face is not a sensitivity issue but rather being able to satisfactory recover the positive product control (PPC) spike. The difficulty is exacerbated by the Gram-negative bacterial nature of our antigens or host cells and the use of different treatments in purification steps during new process development or optimization where sample formulation has not been set yet.

The BET has become an essential tool for developing our processes with an increased focus on quality by design and process control.
Depending on vaccine families as detailed above, levels of endotoxin can be much higher than classical parenteral solutions (e.g., insulin or viral vaccines).

Indeed, for culture intermediate stages (upstream stages), levels of endotoxin can reach up to 1E9IU/mL. For more purified stages (downstream stages before drug substance), reduction or elimination steps are implemented to reduce endotoxin content to an acceptable level, and samples are often more inhibitory than the final product.

For these complex samples, especially for purification intermediates, LAL-based methods can present some drawbacks due to the LAL enzymatic cascade being potentially subject to interferences. Interferences can come from the complex culture medium and activate the alternative non-specific endotoxin LAL (Factor G) pathway but also from chemicals used during the manufacturing purification process, product exposition to cellulose filters, etc.

By exploring the different interferences from our processes, we found that the use of rFC based methods was an appropriate solution to overcome some of the Kinetic Chromogenic LAL assay 's difficulties.
Below are two different examples where endotoxin testing was used to quantify high endotoxin concentrations and where rFC performances were identical or better than the Kinetic Chromogenic LAL test for MPM and IPC samples.

For finished products or environmental water samples, the demonstration that both Kinetic Chromogenic LAL and rFC assays are adequate for testing will not be shown in detail in this article.
Rapidly, we compared two Kinetic Chromogenic LAL- and two rFC-based assays for endotoxin detection in four complex human vaccine matrices (3 viral vaccines and 1 bacterial vaccine potentially presenting natural endotoxin content from the Gram-negative antigens it contained). We showed that the results for the rFC-based assays were at least equivalent to those for LAL. The rFC-based assays were found to be adequate but slightly less suitable for one of our products which contained proteases and the methods used to inactivate the proteases reduced the assay performance. However, samples containing proteases that can liberate the coloured substrate or fluorophore in the absence of endotoxin are problematic for both the LAL-based and rFC-based endotoxin assays. Likewise, LAL was adequate but less suitable for another product which contained glucans (please refer to the paper Marius et al., 2020 in the PDA Journal for more details). In a second study, we demonstrated that the performance of the rFC-based method was at least similar to that for the Kinetic Chromogenic LAL-based methods for the detection of endotoxin in water samples in our setting (water for injection, purified water and cleaning validation samples; publication on-going).

3. Example of high endotoxin concentration from drug substance derived from Gram-negative bacteria manufacturing process

As stated above, endotoxin test methods were first developed to detect minute quantities of endotoxin.
In this example, samples were diluted in endotoxin-free water to target theoretical concentrations of 107 IU/mL, 106 IU/mL and 105

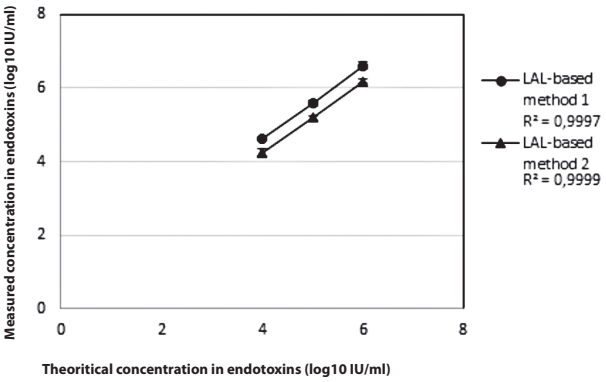


Fig1: Endotoxin concentration in IU/mL and standard deviation obtained with two Kinetic Chromogenic LAL-based methods by two analysts on three different days

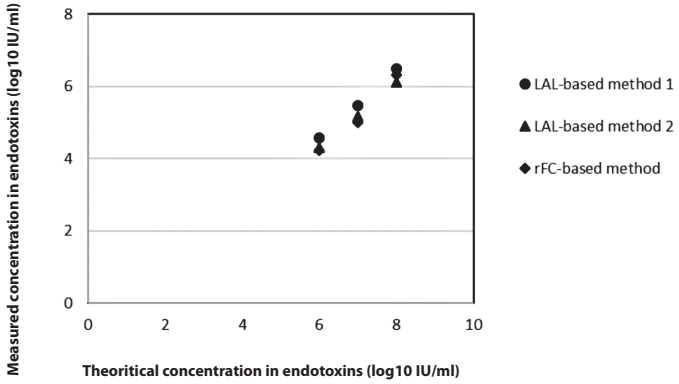


Fig2: Endotoxin concentration in IU/mL obtained with two Kinetic Chromogenic LAL-based methods and one rFC-based method

⇢

IU/mL, and the exact same dilution tube was tested by two different endotoxin methods (two Kinetic Chromogenic LAL-based methods). Each concentration was tested on three different days by two different analysts. Results (concentration and standard deviation) are shown in Figure 1.
High dilutions were applied to samples to fit the standard curve (50 – 0.05 IU/mL) and to obtain appropriate PPC recovery (~100%). Error on endotoxin quantification should be high since essential dilutions were prepared (dilutions up to 106 in endotoxin reagent water), but excellent correlation coefficients were obtained for both methods (>0.999). Results from both Kinetic Chromogenic LAL-based were within the method variability.

In Figure 2, results from the two LAL-based methods were compared to one rFC-based method.

The same results were obtained independently of the test method (within method variability) for high endotoxin concentrations. In this example, endotoxin testing was used to support process consistency. The recommendation was to use only one method to avoid any bias.

To conclude, here, we demonstrated that Kinetic Chromogenic LAL and rFC-based methods can be used to quantify accurately and reproducibly high endotoxin concentrations from a Gram-negative bacterium.

4. b. Example of analytical support to help the bioprocess teams in defining the most appropriate endotoxin removal steps

Below is an example of analytical support given by our lab to help the bioprocess teams in defining the most appropriate extraction and purification technologies for recombinant proteins produced on Gram-negative bacteria.

Endotoxin removal steps are critical to implementing but in general, there is no universal protocol that can be broadly applicable. The different characteristics of the production process and target protein or antigen require specific method combinations to achieve successful endotoxin removal, and the endotoxin testing method procedure must be adapted each time.
In our example, the evaluated endotoxin removal methods included a combination of purification technologies and treatment with extreme pH, precipitation using salts, and detergent used to dissociate the protein-endotoxin complex. Different ion strengths were also used to elute endotoxin.
In the first intention, the compendial Kinetic Chromogenic LAL method was selected to monitor endotoxin removal.
Our Kinetic Chromogenic LAL testing was limited in providing accurate detection in complex matrices, the downside of the purification treatments being strong interferences on the LAL enzymatic cascade. This was observed by low PPC spike recovery that was fixed by dilutions in endotoxin-free water, a common treatment used in the endotoxin community, to overcome product interferences.

By applying high dilutions, results obtained by the Kinetic Chromogenic LAL method were not satisfying since they were "signed" (e.g., <5000 IU/mL). Usually, the obtention of signed results is minimized by having a maximum valid dilution (MVD), which is derived from the ratio of the endotoxin limit to the test sensitivity. However, for intermediate stages, no product specification nor MVD are defined; high dilutions can be applied to recover PPC proper values.
Signed results did not indicate the efficiency of the tailored combination of purification technologies. Indeed, the use of extreme pH or detergent, for instance, helps endotoxin removal, but the drawback of those methods includes the need for subsequent detergent removal in samples, buffering, etc. especially in LAL based methods.
One solution would have been to increase PPC concentration. Indeed, the statistics for the recovery of our current PPC (0.5 IU/mL) may not be optimum. Another solution would have been to address the multiple sample interferences sequentially. For instance, an acidic pH (<6) and the presence of organic solvent could have been addressed with dilution in endotoxin-free NaOH to adjust the pH followed by multiple dilutions in endotoxin-free water.

The phage ligand-based assay looked very promising to overcome our sample interferences despite its longer testing time compared to classical LAL and rFC assays. This assay is based on a selective capture of lipopolysaccharide (LPS) achieved using a phage-derived receptor protein. After binding the sample's LPS to the microplate, the original sample matrix is washed off, thereby eliminating potentially interfering components. In the second stage of the assay, LPS is detected by factor C that reacts with a fluorescence substrate (Grallert et al., 2011).
In **Table 1**, we first demonstrated that for non-interfering matrices, the same results were achieved between Kinetic Chromogenic LAL and phage ligand-based assay.

In **Table 2**, we implemented phage ligand-based assay to achieve better assay sensitivity. The additional washing steps allowed reduction of sample dilution to 1:1 or 1:10.

In **Figure 3**, purification intermediates were screened with both methods. In blue, results obtained from the LAL method, only signed results were obtained (i.e., < 1666616 and <10000 IU/mL) while in fuchsia quantified results were obtained (except for PI 5 detergent 2, signed result <0.5 obtained (Figure 3B)).
The performance of purification tools was assessed to the phage ligand-based assay since it was the only method able to show the decrease of endotoxin content over purification steps.
For this study, endotoxin levels needed to be closely monitored to define the efficiency of reduction or elimination steps through the different purification and manufacturing stages. The rFC-based method was the adapted solution.
The phase-ligand based assay allowed us to meet our bioprocess needs and was an excellent "orthogonal" tool.
To conclude, in our lab, the rFC method meets our needs in our settings for final product release, environmental water testing, and MPM/IPC testing.

Conclusion

The rFC based method is not widely approved as a compendial test, and most pharmacopeias are still considered it as an alternative method.
However, pharmacopoeias are in the process of evolution and propose draft and new texts on the recombinant approach of the LAL reagent. The Europeans are the first to have an official text that will be effective from January 2021, and the other pharmacopoeias should come with similar texts in 2022-2023 before finally being able to harmonize on this approach in about 5-6 years.

Glossaire

BET: Bacterial Endotoxin Test
LAL: Limulus Amebocyte Lysate
rFC: recombinant Factor C
MPMT: manufacturing process monitoring testing
IPCT: in-process control testing
Ph. Eur.: European pharmacopeia
USP: United States pharmacopeia
JP: Japanese Pharmacopeia
ChP: Chinese Pharmacopeia
PDG: Pharmacopeial Discussion Group
PF: Pharmacopeial Forum

⇢

Sample description	Endotoxin concentration in IU/mL	
	Kinetic Chromogenic LAL method	Phage ligand-based rFC method
Thwaed soluble fraction	3.49E+06	2.48E+06
Clarified filtration from Technology 1	2.18E+06	1.63E+06
Supernatant after precipitation & centrifugation	1.67E+06	1.33E+06
Clarified filtration Technology 2	<1.67E+06	1.09E+06

Table 1: Endotoxin concentration in IU/mL obtained using Kinetic Chromogenic LAL and phage ligand-based methods for complex samples - 1

Sample description	Sample characteristic			Endotoxin concentration in IU/mL	
	Salt concentration	Ionic strength	pH	Kinetic Chromogenic LAL method	Phage ligand-based rFC method
Filtrate from Tech 1	{HIGH}*	Neutral	Neutral**	≈ 2 200	44.182
Filtrate from Tech 2	{HIGH}	Neutral	Neutral	< 2 500	257
Filtrate from Tech 3	{HIGH}	High	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 4	{HIGH}	High	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 5	{HIGH}	High	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 6	{HIGH}	High	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 7	{HIGH}	Neutral	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 8	{HIGH}	Neutral	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 9	{HIGH}	High	Acid***	< 2 500	0.141
Filtrate from Tech 10	{HIGH}	High	Neutral	< 2 500	< 0.05
Filtrate from Tech 0	{LOW}****	Regular	Neutral	< 5	0.063
Filtrate from Tech 1	{LOW}	Low	Neutral	< 5	< 0.05
Filtrate from Tech 2	{LOW}	Low	Neutral	< 5	< 0.450
Filtrate from Tech 3	{LOW}	Low	Neutral	< 5	< 0.05
Filtrate from Tech 4	{LOW}	Low	Neutral	< 5	< 0.05
Filtrate from Tech 5	{LOW}	Regular	Neutral	< 5	< 0.05
Filtrate from Tech 6	{LOW}	Regular	Acid	< 5	< 0.05
Filtrate from Tech 7	{LOW}	Low	Acid	< 5	< 0.05

*> 500 mM **pH 6 - 8 ***< pH 6 ****< 500 mM

Table 2: Endotoxin concentration in IU/mL obtained using Kinetic Chromogenic LAL and phage ligand-based methods for complex samples - 2

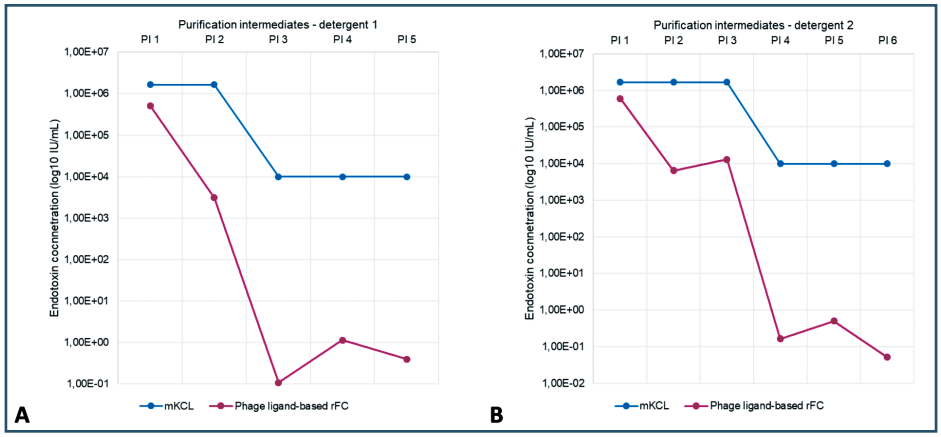


Figure 3: Endotoxin concentrations in IU/mL obtained using Kinetic Chromogenic LAL and phage ligand-based methods for complex samples – 3 [3A from detergent 1; 3B from detergent 2]

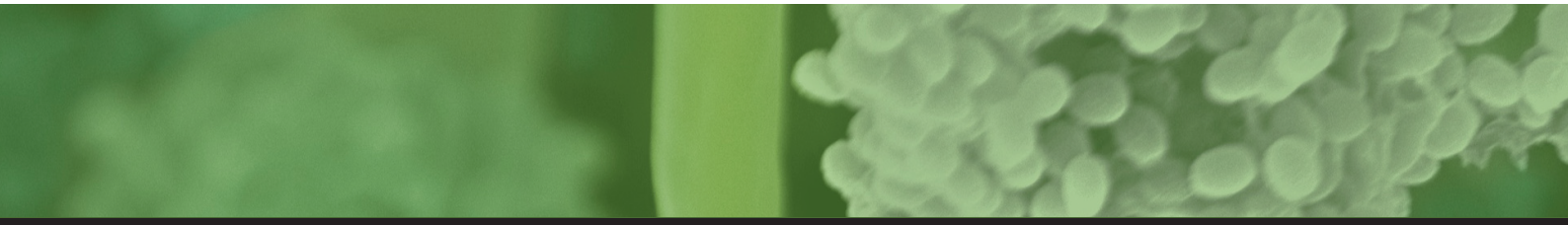
Références

1. Grallert, H., Leopoldseder, S., Schuett, M. et al. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. Nat Methods 8, iii–v (2011).
2. Marius, M., Vacher, F. and Bonnevay, T. Comparison of LAL and recombinant Factor C endotoxin testing assays in human vaccines with complex matrices. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 10.5731/pdajpst.2019.010389 (2020)
3. Pharmacopeial Forum USP. Stimuli articles. Vol. 36(1). A Recombinant Factor C Procedure for the Detection of Gram-negative Bacterial Endotoxin. Bruce Loverock & al. (Jan.–Feb. 2010)
4. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition Chapter 2.6.14. Bacterial Endotoxins. Strasbourg, France: EDQM Publications (2016).
5. Chapter <85>, Bacterial Endotoxins Test. United States Pharmacopeia 39. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention (2015)
6. Chapter <1225>, Validation of Compendial Procedures. United States Pharmacopeia 39. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention (2017)
7. General Test 4.01 Bacterial Endotoxins Test. Japanese Pharmacopoeia (17th Edition). Japan: The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare; p. 110-3 (2016)
8. Kikuchi Y, Haishima Y, Fukui C, Murai T, Nakagawa Y, Ebisawa A, et al. Collaborative study on the bacterial endotoxins test using recombinant Factor C-based procedure for detection of lipopolysaccharides. PMDRS; 48:252-60 (2017)
9. U.S. Food & Drug Administration Guidance for industry: pyrogen and endotoxins testing: questions and answers (2012).
10. United States Pharmacopeial, In-Process Revision: <1085> Guidelines on the endotoxins test. Pharmacopeial Forum Online, 4 (2018)
11. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, European Pharmacopoeia 10th Edition: Chapter 5.1.10. Guidelines for using the test for bacterial endotoxins. EDQM Publications: Strasbourg, France (2016)
12. European Pharmacopeia, Pharmeuropa 31.1 , New chapter 2.6.32 "Test for Bacterial Endotoxins using recombinant factor C" , published in Ph. Eur. Version 10.2 and applicable in version 10.3 (January 2021)
13. PMDA, Japan. Publication new draft for comments "Bacterial Endotoxins Test and alternative methods using recombinant protein-reagents for endotoxin assay" (October 2019)
14. United states Pharmacopeia, Pharmacopeial Forum 46 (3). New Stimuli to the revision process "Application of Recombinant Factor C Reagent for the Detection of Bacterial Endotoxins in Pharmaceutical Products and Comparability to Limulus Amebocyte Lysate", Jay Bolden (2020)

Pouvez-vous identifier cet organisme? Nous le pouvons.

Rapidement et jusqu'au niveau de l'espèce. Une identification inexacte peut augmenter le risque lié à une contamination. Une identification retardée peut coûter des milliers d'Euros en terme de rappels de produit et altérer votre image de marque. Alors pourquoi prendre ce risque?

Profitez de l'accès à plus de 12,000+ organismes présents dans nos bibliothèques Accugenix® validées, adaptées et continuellement mises à jour, à une technologie d'identification qui a fait ses preuves et à des outils de suivi et de tendances de données, pour garder le contrôle en toute confiance.



www.criver.com/microbialsolutions

charles river

Méthode alternative d'identification. Exemple d'une implémentation d'un système Maldi Tof au laboratoire de contrôle.

Par Alexis BILLARD - STALLERGENES GREER
alexis.billard@stallergenesgreer.com

Ces dernières années, la microbiologie pasteurienne a quelque peu été bousculée, les méthodes "rapides" ou dorénavant "alternative" sont désormais démocratisées et même suggérées dans certains textes récents. Suivant alors la monographie Phar Eur 5.1.6 "Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique", le microbiologiste se voit alors devoir valider de la spécificité, de l'exactitude ou même étudier une robustesse. Un décryptage et un retour d'expérience sur la validation et l'implémentation réussie d'un système d'identification Maldi-Tof au laboratoire de contrôle sera discutée.

1. Introduction

Existe-t-il encore un Microbiologiste aujourd'hui n'ayant pas entendu parler des Méthodes Alternatives en Microbiologie (MAM) ? Entre les catalogues et les propositions des fournisseurs, les agendas des symposiums et des congrès, les articles de la presse spécialisée et désormais les nouvelles versions des principaux textes régissant nos quotidiens (e.g. draft Annexe 1 des BPF), il semblerait que ces méthodes soient partout. Partout oui, mais finalement très peu en routine au sein de nos laboratoires … Exceptées dans certaines grosses structures, ces méthodes et technologies sont encore peu ou pas représentées pour des analyses libératoires. Les raisons à cela peuvent être à trouver dans :

- La méconnaissance et le manque de recul sur les technologies disponibles, la difficulté de se projeter au quotidien avec une nouvelle méthode (e.g. ne plus exprimer un résultat de dénombrement en UFC),
- Les blocages internes liés aux dossiers réglementaires, changer de méthode est synonyme de variations, qui peuvent être parfois longues, couteuses et inclus dès l'établissement du business case,
- La validation d'une méthode alternative, si la montée de version récente de la monographie Phar Eur 5.1.6 a permis une meilleure compréhension des principes et des requis alors les

⇢

principes sont différents par rapport aux monographies classiques en microbiologie (i.e. 2.6.12..). Certains systèmes sont bien sûr plus simples à valider que d'autres mais désormais nous devons nous approprier le langage de nos collègues physico-chimistes, en parlant d'équivalence, d'exactitude, de spécificité, limite de quantification, de robustesse ou encore de linéarité.

• Enfin, la difficulté majeure est de justifier un investissement couteux auprès de son organisation. Si l'exercice est plus aisé pour des cas très particuliers, comme la mise en place d'un test rapide de stérilité pour des produits finis à péremption très courtes. Remplacer un test de dénombrement traditionnel peu couteux, par un investissement de plusieurs dizaines de milliers d'euros, nécessitant des réactifs pointus et du personnel qualifié et demander des mois de travaux de validation/qualification... ceci pour gagner quelques heures ou quelques jours, peut se révéler être un combat difficile à mener.

Dans cet article est présenté un retour d'expérience sur l'implémentation au laboratoire d'un système alternatif Maldi Tof d'identification ; de la genèse du projet, au choix de la technologie, au décryptage et à la validation selon la monographie Phar Eur 5.1.6 "*Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique*" ainsi que l'utilisation en routine.

2. Genèse du projet et choix de la technologie

Dans un souci d'amélioration continue, une évaluation sur l'optimisation des différentes activités au laboratoire a été initiée il y a quelques années. De par son volume annuel, l'identification des micro-organismes au laboratoire par un système type "biochimique automatisé" est apparue comme une activité couteuse en temps.

L'identification au laboratoire est un requis qui concerne à la fois l'analyse des produits et les monitorings environnementaux. Identifier participe à garantir la sécurité des patients, par exemple, les enquêtes objectionnables pour les produits non obligatoirement stériles, ou encore de suivre l'évolution de la flore microbienne des unités de production pour permettre de visualiser et d'anticiper les dérives. Identifier efficacement au laboratoire a donc un impact direct sur les délais de libération au laboratoire de contrôle.

Les technologies d'identification alternatives disponibles à ce jour sont : la génétique (ou technologie de 3ème génération) reconnue comme "*gold standard*"depuis plus de 20 ans, elle est même suggérée par certains textes (i.e. *FDA guideline on Sterile Drug Products, 2004*). La 4ème génération : le Maldi Tof, une identification phénotypique basée sur la comparaison des profils protéolytique des cellules. Plusieurs études ces dernières années ont démontré une performance similaire à la génétique tout en étant plus rapide, moins cher et plus simple à mettre en œuvre au quotidien au laboratoire (Chao et al., 2014).

Maldi-tof, principe pour l'identification microbienne

La colonie inconnue est directement étalée une sur plaque appelée "cible", après ajout d'acide formique pour faciliter la lyse des cellules, une matrice "HCCA" est uniformément déposé sur l'ensemble. Son rôle est de générer des ions de différentes tailles sous l'action d'un laser. Les différents ions de m/z (masse/charge) sont alors différenciés lors de leur temps de parcours dans un champs magnétique. Les ions les plus légers arriveront plus tôt au détecteur que les plus lourds. Ce détecteur convertit alors les signaux en spectres m/z qui sont alors comparés à une bibliothèque de spectres de référence, générant alors le résultat d'identification si le score de comparaison est significatif.

3. Contexte règlementaire et évolution

Les principaux référentiels évoquant les méthodes rapides ou alternatives en microbiologie, leurs descriptions, principes de validation et d'implémentations sont :

• PDA Technical Report 33, première édition en 2000, revu en 2013

• Monographie 5.1.6 de la Pharmacopée européenne, revue en juillet 2017

• La monographie USP <1113> concerne la validation des méthodes d'identification dont les méthodes alternatives et la monographie <1123> plus largement l'ensemble des méthodes alternatives.

Pour les méthodes d'identification, les monographies dédiées Phar Eur 5.1.6 et USP <1113> sont suffisantes pour effectuer une implémentation. Si les grands principes sont proches, la vérification de méthode selon l'USP propose 3 approches différentes :

• L'analyse en parallèle de 50 isolats avec un système existant,

• L'Analyse de 12 à 15 isolats représentatifs de la variabilité taxonomique que peut identifier le système,

• Une confirmation sur 20 à 50 identifications comprenant 15 à 20 espèces différentes vis-à-vis d'un laboratoire de référence.

Concernant la monographie européenne, la possibilité que des technologies différentes puissent générer des résultats différents est clairement exprimée. Dès lors, la comparaison de systèmes de technologies différentes ou pire, de générations différentes n'est pas nécessaire. Il s'agit d'un point très important ici dans la mesure où très souvent les notions de "comparabilité" sont rapidement évoquées dès lors qu'un changement ou remplacement d'une méthode ou d'un équipement est initié. D'expérience ; la réponse à donner est : "*Compareriez-vous les top résultats issus de moteurs de recherche internet différents ?*".

Une comparaison intéressante entre les textes Phar Eur 5.1.6 et USP <1113> a été effectuée par Tim Sandle en 2013.

4. Stratégie de validation

Si cela reste à l'appréciation de chacun, l'approche européenne nous est apparue plus cohérente dans la façon d'aborder l'implémentation d'un nouveau système. Une fois les requis de qualification de l'équipement (Qi, Qo) et du système informatique finalisés, la validation du système d'identification selon les paramètres définis dans la monographie 5.1.6 peuvent être déclinés :

• Exactitude : "*Capacité à identifier le micro-organisme étudié au niveau taxonomique requis*"

• Spécificité : "*Capacité à opérer une discrimination entre les micro-organismes effectivement présents et les facteurs d'interférence entraînant de fausses identifications*"

• Robustesse : "*Capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de paramètres associés à la méthode*".

La validation débute par l'étude de robustesse afin de maitriser l'ensemble du périmètre et d'estimer la totale capacité du système.

Choix des micro-organismes

Quinze micro-organismes différents ont été utilisés pour la validation (Tableau 1). Ces micro-organismes ont été sélectionnés pour couvrir les différentes catégories taxonomiques de bactéries

⇢

Espèces	Origine de la sélection	Taxonomie / groupe
Candida albicans	Compendia	Yeast
Pseudomonas aeruginosa	Compendia	Gram negative rod
Staphylococcus aureus	Compendia	Gram positive cocci
Clostridium sporogenes	Compendia	Gram negative rod
Escherichia coli	Compendia	Gram negative rod
Bacillus subtilis	Compendia	Gram-positive spore-forming rod
Micrococcus luteus	Site	Gram-positive cocci
Bacillus pumilus	Site	Gram-positive spore-forming rod
Ralstonia pickettii	Site	Gram-negative rod
Burkholderia cepacia	Littérature	Gram negative rod
Staphylococcus epidermidis	Littérature	Gram positive cocci
Bacillus cereus	Littérature	Gram-positive spore-forming rod
Bacillus circulans	Littérature	Gram-positive spore-forming rod
Micrococcus lylae	Littérature	Gram-positive cocci
Kocuria varians	Littérature	Gram-positive cocci

Tableau 1 : Micro-organismes sélectionnés pour la validation du système

Step	Expected result	Risk	Causes	Consequences of the identified risk	Prevention possibility	Detection already in place	Level 1	Level 2	Level 3	Parameter to characterize
Direct smear method	Perform a smear able to be identified	Unfit smear	Too much or not enough biomass	Impact on identification score	Operator practical training	Visual inspection		2		NA
			Smear does not recover all spot	Impact on identification	Operator practical training	Visual inspection		2		NA
			Formic acid: wrong volume or deposal homogeneity		Operator practical training			2		NA
			After acid formic, smear still wet or too dry		Operator practical training				3	Assess impact of smear still wet & too dry
			HCCA: wrong volume or deposal homogeneity		Operator practical training			2		NA
			Final smear still wet or too dry		Operator practical training				3	Assess impact of smear still wet & too dry

Tableau 2 : Extrait de l'analyse de risque méthode

Etapes	Paramètres à tester en robustesse
Production des colonies	Tous milieux du laboratoire après 24h, 48h, 72h & 96h & 7 jours d'incubation
Stress froid	Impact d'un stockage au froid des colonies 24h
Dépôt direct	Temps de séchages des réactifs sur la cible
Analyse	- 3 analyses sur un même dépôt - Analyse d'une cible préparée après 6, 24, 48 & 72 heures
Stabilité des réactifs	Modification des conditions de stockage

Exactitude	Critères d'acceptation
$\frac{\text{Nombre total d'identification de l'espèce attendue}}{\text{Nombre total d'identification}} \times 100$	R ≥ 97 %

Tableau 3 : Paramètres d'étude retenus pour la robustesse

ou levures constituant la bibliothèque de spectres de référence. Les paramètres de sélection ont été :

- Présence dans les principales monographies pharmacopées internationales,
- Historique de détection issu du monitoring environnemental,
- Revue de la littérature sur les tendances de contamination des environnements pharmaceutiques.

Robustesse : choix des paramètres

Les paramètres d'étude ont été définis par une approche classique "d'analyse de risque méthode". Chaque étape de la procédure d'identification est séparée et analysée indépendamment dans sa capacité à influer sur la qualité du résultat final. Sur les 3 niveaux de criticité utilisés, seuls les paramètres identifiés comme "niveau 3" ont été soumis à étude.

La procédure est divisée en : microbiologie, extraction, dépôt direct, tests, équipement, lancement analyse et réactifs.
Exemple d'évaluation de l'étape "dépôt direct" (Tableau 2) : les paramètres identifiés comme nécessaire à étudier sont présentés dans le Tableau 3, avec comme principaux axes d'étude : la qualité initiale des colonies, la préparation de la cible et la qualité des réactifs.

Exactitude & spécificité : modalités d'étude et critères d'acceptation

L'évaluation du critère d'exactitude est obtenue à partir des recouvrements obtenus entre le nombre d'identifications jusqu'à l'espèce avec un score significatif sur le nombre total

⇢

N° mélange	Type de mélange	Espèces	Groupe taxonomique
1	Mélange levure / bactérie	*Candida albicans*	Yeast
		Pseudomonas aeruginosa	Gram negative rod
2	Mélange Gram-	*Escherichia coli*	Gram negative rod
		Pseudomonas aeruginosa	Gram negative rod
3	Mélange Gram+	*Staphylococcus aureus*	Gram positive cocci
		Kocuria varians	Gram positive cocci
4	Mélange Gram+ / Gram-	*Staphylococcus aureus*	Gram positive cocci
		Escherichia coli	Gram negative rod
5	Mélange *Bacillus*	*Bacillus subtilis*	Gram-positive spore-forming
		Bacillus cereus	Gram-positive spore-forming
6	Mélange *Staphylococcus*	*Staphylococcus aureus*	Gram positive cocci
		Staphylococcus epidermidis	Gram positive cocci

Tableau 4 : Mélanges de micro-organismes utilisés pour l'étude de la spécificité

d'identifications effectuées lors de l'essai. L'identification des quinze micro-organismes a préalablement été confirmée sur un système équivalent.

Concernant le critère d'acceptation, dans la littérature la précision du système MALDI TOF pour les identifications microbiennes, se situe entre 94 et 98 % pour des micro-organismes courants selon les publications (Bilecen et al., 2015 ; Croxatto et al., 2012). Dans notre cas, un taux de précision de 97% a été choisi, cette valeur correspond à celle donnée par fabricant et est en accord avec les taux généralement admis dans la littérature.

Pour la spécificité, le principe est la capacité à discriminer les micro-organismes effectivement présents de facteurs interférents, pouvant conduire à de fausses identifications. Ces facteurs peuvent être des mélanges de micro-organismes conduisant à l'identification de micro-organismes qui ne sont en réalité pas présents dans l'échantillon. Des mélanges, des plus éloignés taxonomiquement au plus proches ont été élaborés et analysés (Tableau 4).

5. Résultats et interprétation

Robustesse

Si les études de robustesse sont des requis réglementaires, il s'agit également d'un excellent moyen de mieux caractériser le système pour en faciliter l'usage futur. C'est la conclusion majeure qui a pu être tirée de l'ensemble de cette étude. Pour cela, il est critique d'analyser précisément chaque étape de l'ensemble de la procédure d'identification lors de "l'analyse de risque méthode".

Rapidement lors de l'analyse de risque, beaucoup de questionnements sont apparus sur la partie amont "microbiologie et culture" car le système Maldi Tof est très simple et ne nécessite que très peu de préparation d'échantillon, la qualité initiale de la matière à analyser s'en retrouve donc cruciale.
Les recommandations pour effectuer des identifications par Maldi-tof sont généralement : "utiliser une colonie fraiche". S'il est relativement simple de comprendre cette notion pour un microbiologiste, techniquement lors de l'écriture d'une procédure d'analyse, comment qualifier une "colonie fraiche" ? moins de 2 jours ? 3 jours ? et ce valable sur l'ensemble des différents types de milieux utilisés au laboratoire ? l'appréciation de "fraiche" est-elle identique entre opérateurs ? une colonie conservée au frigo pendant 3 jours est-elle encore considérée comme fraiche ?...
L'essentiel de l'étude a donc été porté sur cet aspect, un exemple de comparaison de conditions est présenté dans le tableau 5.

Ci-dessous les principales conclusions issues de l'étude de robustesse :

- Un milieu gélose au sang ou trypcase soja doit être privilégié,
- Une identification effectuée avant 72 heures garantie les meilleurs résultats,
- Le milieu R2A est trop pauvre pour pouvoir donner une bonne identification rapidement sous 72heures ; les meilleurs résultats sont obtenus sous 5 à 7 jours,
- Les milieux Cétrimide & Mannitol Sel génèrent des résultats similaires à ceux obtenus sur TSA.
- Pour les levures, les identifications peuvent être effectuée jusqu'à 120 heures,
- Un stockage des colonies à froid (+ 2/8°C) pendant 24 heures n'engendre pas d'impact,
- L'étape de dépôt d'acide formique ne doit pas dépasser 30 minutes, il s'agit d'une étape critique,
- Pour la matrice HCCA, le run peut être lancé dès que le dépôt est visuellement sec,
- La réalisation d'au moins 3 tests d'identification sur un dépôt n'a aucun impact sur l'identification.
- Une plaque peut être analysée plusieurs jours après sa préparation. Toutefois, une analyse lancée à 48 heures maximum assure les meilleurs résultats.

Au-delà de la caractérisation et de la connaissance qu'offre une étude de robustesse sur le système, nous nous sommes rapidement aperçus que ces informations allaient être extrêmement précieuses pour l'élaboration de procédures précises ainsi que pour la gestion de déviations associées.

Exactitude & Spécificité

Concernant l'exactitude, pour les quinze souches testées, une identification significative et conforme a été obtenue pour chacune des souches au niveau de l'espèce, la précision est donc de 100%.
La spécificité est évaluée en utilisant un mélange de micro-organismes, selon la monographie 5.1.6 le système doit identifier une, deux espèces ou aucune. Pour chaque mélange, au moins une ou deux espèces ont été identifiées, ce résultat souligne la performance du Maldi Tof sur ses capacités de discrimination. Compte tenu de la performance des systèmes génétiques que protéolytiques actuels, notamment vis-à-vis des systèmes biochimiques, la probabilité d'identifier une espèce autre par un mélange est aujourd'hui peu probable.

Conclusion

Si la validation d'un système d'identification alternatif requiert un investissement financier et humain, l'étape la plus difficile est peut-être de convaincre son organisation d'investir dans ce projet. De manière classique, vous allez devoir établir un "business case" compilant l'avantage en termes de coûts réactifs, de gains de temps technique... Malgré les nombreux avantages, un système Maldi Tof reste un investissement conséquent, sans parler du coût de qualification, notamment des systèmes informatiques. De notre expérience, si d'un point de vue mathématique et financier, le retour sur investissement peut sembler compliqué à justifier, il faut savoir que

⇢

24h		TSA MEDIUM			TS contact MEDIUM			R2A MEDIUM			BLOOD AGAR MEDIUM		
Species	Results	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
Candida albicans	Score	2.137	2.164	2.161	2.038	2.117	2.042	2.082	1.748	2.067	1.916	2.257	2.121
	Mean	2.15			2.07			1.97			2.10		
Pseudomonas aeruginosa	Score	2.138	2.087	2.112	2.242	2.377	2.151	2.449	2.49	2.526	2.198	2.214	2.327
	Mean	2.11			2.26			2.49			2.25		
Staphylococcus aureus	Score	2.034	2.544	2.494	2.351	2.375	2.264	2.367	2.436	2.475	2.402	2.412	2.454
	Mean	2.36			2.33			2.43			2.42		
Clostridium sporogenes	Score	2.143	2.215	2.038	2.216	2.23	1.993	0	0	0	1.837	0	2.167
	Mean	2.13			2.15			NI			2.00		
Escherichia coli	Score	2.217	2.239	2.14	2.064	2.286	2.226	2.409	2.239	2.353	2.362	2.376	2.233
	Mean	2.20			2.19			2.33			2.32		
Bacillus subtilis	Score	2.065	2.17	2.035	1.979	2.155	1.758	1.794	1.19	0	2.24	2.159	2.168
	Mean	2.09			1.96			1.49			2.19		
Micrococcus luteus	Score	2.421	2.43	2.227	2.529	0	2.419	0	0	0	2.508	2.439	2.549
	Mean	2.36			1.65			NI			2.50		
Bacillus pumilus	Score	1.481	1.462	1.589	1.572	1.703	1.916	1.77	1.591	1.453	1.621	1.716	1.846
	Mean	1.51			1.73			1.60			1.73		
Ralstonia pickettii	Score	1.404	0	0	0	0	1.416	1.382	1.538	1.481	0	0	0
	Mean	1.40			1.42			1.47			NI		
Burkholderia cepacia	Score	1.939	1.754	1.87	1.768	1.771	1.84	1.854	1.573	1.757	1.663	1.88	1.822
	Mean	1.85			1.79			1.73			1.79		
Staphylococcus epidermidis	Score	1.834	1.904	1.807	1.978	0	0	2.075	2.081	2.228	1.875	1.997	2.014
	Mean	1.85			1.98			2.13			1.96		
Bacillus cereus	Score	2.171	2.167	2.277	2.292	2.174	2.182	0	0	0	2.262	2.221	2.235
	Mean	2.21			2.22			NI			2.24		
Bacillus circulans	Score	2.044	2.188	2.152	1.98	2.109	2.124	1.986	1.977	1.991	2.018	2.181	2.105
	Mean	2.13			2.07			1.98			2.10		
Micrococcus lylae	Score	0	0	2.03	2.25	0	1.595	2.102	1.551	1.748	2.335	0	0
	Mean	2.03			1.92			1.80			2.34		
Kocuria varians	Score	2.007	0	1.702	1.849	1.609	1.828	2.097	1.896	2.206	1.947	1.872	1.786
	Mean	1.85			1.76			2.07			1.87		
Mean all scores		2.02			1.97			1.57			1.99		
ID > 1.750		13/15			11/15			8/15			13/15		

NI No Identification*

Tableau 5 : Exemple de résultat de robustesse, ici la comparaison de 4 types de milieux de culture après 24h d'incubation

Mélanges	Scores	Aucun spectre	Au moins 1 identification à l'espèce	Les 2 espèces identifiées	Identification autre
Candida albicans *Pseudomonas aeruginosa*	Spot 1	-	1.792	-	-
	Spot 2	-	2.064	-	-
	Spot 3	-	2.089	-	-
Escherichia coli *Pseudomonas aeruginosa*	Spot 1	-	-	2.090 / 1.905	-
	Spot 2	-	-	1.901 / 1.853	-
	Spot 3	-	-	1.922 / 1.871	-
Staphylococcus aureus *Kocuria varians*	Spot 1	-	2.074	-	-
	Spot 2	-	2.115	-	-
	Spot 3	-	2.245	-	-
Staphylococcus aureus *Escherichia coli*	Spot 1	-	-	2.066 / 1.997	-
	Spot 2	-	-	2.002 / 1.979	-
	Spot 3	-	-	2.021 / 1.913	-
Bacillus subtilis *Bacillus cereus*	Spot 1	-	1.870	-	-
	Spot 2	-	1.922	-	-
	Spot 3	-	1.921	-	-
Staphylococcus aureus *Staphylococcus epidermidis*	Spot 1	-	-	2.064 / 1.915	-
	Spot 2	-	-	2.068 / 1.777	-
	Spot 3	-	-	2.004 / 1.939	

Tableau 6 : Résultat de l'étude de la spécificité

les gains les plus importants d'une identification alternative sont clairement les plus difficilement chiffrables, car comment estimer le gain :

- De résoudre une investigation "production" 3, 4 ou 5 jours plus tôt ?
- Libérer un lot commercial plus rapidement ?
- De remplacer l'identification "Gram" par le niveau taxonomique "espèce" sur toutes ses identifications ?
- D'avoir un niveau de confiance proche de 100 % dans ses résultats d'identification ?
- De connaitre ses tendances de contamination plus précisément ?

Après plusieurs mois d'implémentation, ce sont ces avantages qui ont modifiés le quotidien au laboratoire de contrôle, bien avant les gains sur les temps standards techniques.

Glossaire

HCCA Acide 2-cyano-3-(4-hydroxyphényl) acrylique
MALDI TOF Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight
MAM Méthode Alternative en Microbiologie
R2A Reasoner's 2A Agar
UFC Unité formant colonie

Références

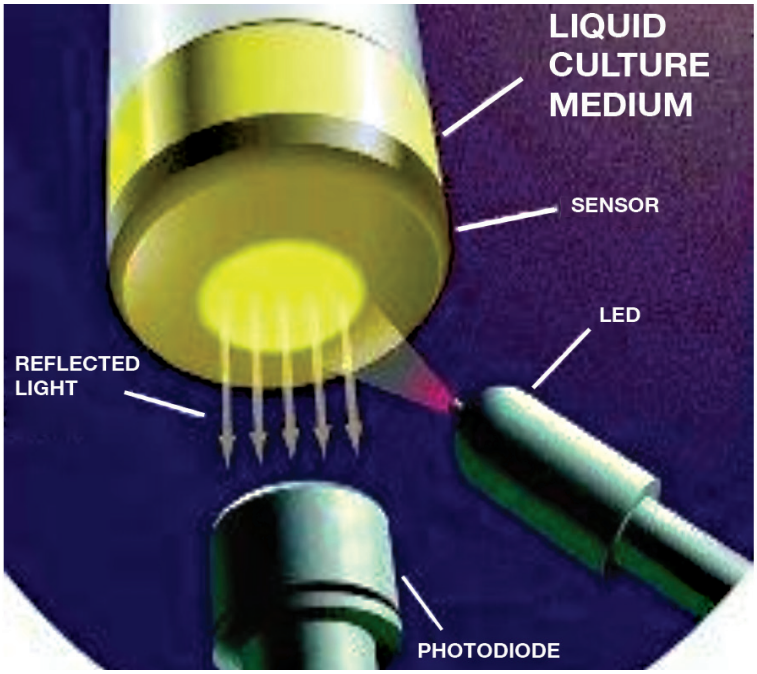
K. Bilecen, G. Yaman, U. Ciftci & Y. Rauf Laleli. 2015. Performances and Reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF Mass Spectrometry Systems for the Identification of Clinical Microorganisms. BioMed Research International. Volume 2015, Article ID 516410
A. Croxatto G. Prod'hom & G. Greub. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiology Reviews, Volume 36, Issue 2, 1, Pages 380–407
Q-T Chao, T-F Lee, S-H Teng, L-Y Peng, P-H Chen, et al. 2014 Comparison of the Accuracy of Two Conventional Phenotypic Methods and Two MALDI-TOF MS Systems with That of DNA Sequencing Analysis for Correctly Identifying Clinically Encountered Yeasts. PLoS ONE 9(10)
W. Gen-fu & L. Xiao-hua. 2007. Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. J Zhejiang Univ Sci B, 8(9):666-672
W.A. Hyde. 1998. Origin of Bacteria in the Clean Room and Their Growth Requirements. PDA J Pharm Sci and Tech, 52 154-158
L. Jimenez. 2007. Microbial Diversity in Pharmaceutical Product Recalls and Environments. PDA J Pharm Sci and Tech, 61 383-399
F.L.C. Pacheco & T.J.A. Pinto. 2010. The Bacterial Diversity of Pharmaceutical Clean Rooms Analyzed by the Fatty Acid Methyl Ester Technique. PDA J Pharm Sci and Tech, 64 156-166
T. Sandle. 2011. A Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends, and Patterns. PDA J Pharm Sci and Tech, 65 392-403
T. Sandle. 2013. Automated Microbial Identification: A Comparison of USP and EP Approaches. American Pharmaceutical Review 16(4):56-61
Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice. Guidance for Industry. Oct. 2004
PDA Technical Report 33 (Revised). Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods; Parenteral Drug Association: Bethesda, MD, 2013; 30–33
General Chapter USP 1223 Validation of alternative microbiological methods, current edition
General Chapter USP 1113 Microbial characterization, identification, and strain typing, current edition
Monographie 5.1.6. Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique :: 07/2017

Implantation d'une méthode microbiologique alternative et polyvalente au laboratoire.

Exemple du BACTALERT 3D®

Par Eric PETAT & Guillaume PINON - ACM PHARMA
eric.petat@terangagroupe.com / guillaume.pinon@acmpharma.com

Le déploiement des méthodes alternatives est toujours un challenge dans nos laboratoires car elle nécessite de satisfaire un nombre important de pré-requis et d'exigences spécifiques.
Le système BacT/ALERT 3D®, opérationnel en routine sur plusieurs applications (Essai de stérilité, mesure de contamination microbienne) est implanté au laboratoire depuis quelques années et répond à nos attentes dans des cadres méthodologiques précis avec des avantages et des limites …



Principe de détection

La méthode basée sur une détection directe de la croissance microbienne n'est pas adaptée à la détection de germes spécifiés par exemple. La validation de cette méthode alternative selon les recommandations des Pharmacopées est nécessaire pour démontrer au minimum l'équivalence et optimiser sa performance. Le cas particulier du contrôle de stérilité des produits cellulaires sera également abordé.

1. Introduction

Un des objectifs du laboratoire de contrôle qualité est de produire des résultats fiables et de qualité, répondant aux différentes exigences réglementaires, dans des délais toujours optimisés. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer et de maitriser les méthodes alternatives car elles seules peuvent permettre de répondre à cette équation complexe.

Le déploiement du système BacT/ALERT® 3D pour les analyses de mesure de contamination microbienne (produits cosmétiques) et pour les essais de stérilité (produits "standards" et produits biologiques) répond à ces exigences. L'automatisation plus ou moins aboutie du système peut permettre également le traitement de grandes séries simultanément. Nous allons développer la conduite de cette implémentation (validation puis mise en contrôle de routine) au sein de notre laboratoire.

2. Contexte réglementaire

Afin d'encadrer et d'harmoniser la mise en place des méthodes alternatives en microbiologie, ⇢

les pharmacopées, notamment PE et USP ont défini les principes méthodologiques pour valider les méthodes. On pourrait débattre de la pertinence de certains de ces tests dans la mesure où ce sont les méthodes traditionnelles décrites qui sont "par définition" considérées méthodes de référence…

Dans ce contexte, une méthode non décrite dans la Pharmacopée devient une méthode alternative (sans préjuger des moyens techniques mis en œuvre) et doit démontrer une performance au moins équivalente à la méthode décrite.

Plusieurs chapitres développent ce thème :

- Pharmacopée européenne Chapitre 5.1.6 : Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique
- USP <1223>: Validation of alternative microbiological methods
- Pharmacopée européenne Chapitre 2.6.1 : Stérilité
- USP<71> : Sterility
- USP <1071> : Rapid Sterility Testing of Short Life Products A Risk Based Approach
- Pharmacopée Européenne Chapitre 2.6.12 : Contrôle microbiologique des produits stériles
- Pharmacopée européenne Chapitre 2.6.27 : Contrôle microbiologique des produits cellulaires

Ainsi que sur différents textes comme :

- PDA Technical report N°33 (Revised 2013): Evaluation, Validation and Implementation of Alternatives and Rapid Microbiological Methods

Ces textes permettent de mettre en place un protocole de test robuste pour valider de façon scientifique la fiabilité de cette méthode.

3. Présentation du système

Bien qu'initialement développé et toujours utilisé pour la détection de micro-organismes dans les hémocultures, ce système répond de par sa technologie et sa rapidité de détection aux principes même d'une méthode alternative transposable dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques.

L'automate BacT/ALERT® 3D se compose de plusieurs modules (photo 1 : présentation du système) avec la possibilité de gérer de 1 à 6 modules d'incubation (240 à 1440 Flacons) avec agitation et sur plusieurs plages de températures de 20°C (avec un module de réfrigération) à 37 °C.
Il détecte la production de CO_2 par une réaction colorimétrique. Son principe de détection répond à la catégorie suivante d'automate reprise dans la Pharmacopée européenne :

- **Méthode automatisée basée sur la croissance de micro-organismes**.

Photo 1 : présentation du système

Lorsque des micro-organismes sont présents dans le milieu de culture, du dioxyde de carbone (CO_2) est produit au fur et à mesure que les micro-organismes métabolisent les substrats contenus dans le milieu. Le CO_2 produit pendant la croissance du germe entraîne une acidification du milieu qui provoque la modification de couleur du détecteur colorimétrique situé au fond de chaque flacon de culture (photo 2 : milieu de culture et sensor) passant d'une couleur foncée à une couleur plus claire.

Photo 2 : Milieux de culture et "sensor"

De nombreux milieux sont disponibles afin de répondre à un nombre important de matrices d'utilisation (iAST, i-LYM, IFA….). Chaque milieu possède une caractéristique spécifique (présence de billes de polymères pour capter les antibiotiques, absence d'oxygène pour les germes anaérobies….)

Une diode électroluminescente (DEL) projette de la lumière sur le détecteur colorimétrique (Schéma : principe de détection). La lumière réfléchie est mesurée par un photo-détecteur. Cette mesure est comparée au taux initial indiqué par le détecteur et prise lors de l'introduction du flacon dans l'automate.
Si, à l'issue du temps préalablement défini pour un essai, le taux de CO_2 ne change pas significativement, aucune détection n'est enregistrée et l'échantillon est estimé négatif, sauf dans le cas d'une détection visuelle (voir moisissures).

Cette détection, de type présence/absence permet donc en théorie de répondre aux exigences de l'essai de stérilité. Afin d'obtenir un résultat semi-quantitatif et répondre à une utilisation pour une mesure de contamination microbienne, l'interprétation est possible pour l'inoculation d'une quantité définie d'une dilution et ainsi répondre au seuil de cette dilution (ex : 1ml d'une dilution au 1/10 permet de rendre un résultat < 10 UFC/g dans le cas de l'absence de détection).

4. Mise en situation opérationnelle

A la suite de l'abandon des méthodes impédance-métriques qui ont été proposées par différents fournisseurs depuis les années 1990, ce système a été implanté dans notre laboratoire et développé pour deux manipulations d'intérêts parce que soumises à des délais importants d'analyses et/ou pour un besoin de libération rapide.

- Contamination microbienne sur des produits cosmétiques
- Essai de stérilité sur les produits biologiques

4.1 Contamination microbienne (produits cosmétiques)

L'objectif de l'implémentation de cette technologie est la diminution du délai de libération des résultats (48 h au lieu de 5 jours).

→

	Milieu	T°C	Résultats des 3 flacons	Temps moyen (jours)	Résultat des 3 flacons	Temps moyen (jours)	Résultat des 3 flacons	Temps moyen (jours)
Escherichia coli	iAST	30-35°C	+++	0.70	+++	0.69	+++	0.67
Pseudomonas aeruginosa	iAST	30-35°C	+++	1.00	+++	0.97	+++	0.89
Staphylococcus aureus	iAST	30-35°C	+++	0.72	+++	0.69	+++	0.70
Bacillus subtilis	iAST	30-35°C	+++	1.14	+++	1.24	+++	1.07
Candida albicans	iAST	30-35°C	+++	1.28	+++	1.27	+++	1.26
	iLYM	20-25°C	+++	2.57	+++	2.34	+++	2.18
Aspergillus brasiliensis	iAST	30-35°C	+++*	2.43	+++*	2.47	+++*	2.20
	iLYM	20-25°C	+++*	3.07	+++*	2.77	+++*	2.74
Penicillium brevicompactum	iAST	30-35°C	- - +	2.20	---	0.00	---	0.00
	iLYM	20-25°C	+++**	2.80 #	+++**	2.73 #	+++**	2.82

*Moisissures visuellement présentes dans les flacons avant 48h
** Moisissure visuellement présentes dans les bouchons et flacons avant 48h

Tabl1 : Temps de détection des souches

Avant la mise en place de la méthode en contrôle de routine, une validation suivant les recommandations (voir textes chapitre 1) est un pré-requis réglementaire indispensable afin de garantir la fiabilité des résultats et démontrer la performance de la méthode alternative versus la méthode traditionnelle.
On notera que cette méthodologie peut aussi être appliquée à des produits pharmaceutiques en alternative à la méthode du chapitre 2.6.12 de la PE après avoir défini et appliqué un protocole de validation adapté.

Les points prévus par ces textes pour une méthode qualitative sont les suivants (Définitions disponibles dans l'ICH Q2 (1) mais tous les critères ne sont pas applicables pour les méthodes microbiologiques) :

- Spécificité
- Limite de détection
- Robustesse
- Exactitude
- Fidélité intermédiaire

Deux milieux de culture ont été sélectionnés (IAST à 30-35°C pour les bactéries et les levures et moisissures et ILYM à 20-25°C uniquement pour les levures et moisissures). Les souches sélectionnées sont les suivantes car issues des textes règlementaires pour cette application. La souche de Penicillium a été choisie sur la base de ses caractéristiques de croissance.

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus brasiliensis*
- *Penicillium brevicompactum*

Les résultats des essais de validation sont tous conformes (spécificité, limite de détection avec inoculum < 10 UFC, robustesse, exactitude, fidélité intermédiaire).
Le point d'intérêt, outre les résultats conformes par rapport aux critères de référence précédemment décrits, est porté sur le temps de détection des souches par l'automate. En effet le gain de temps dans le développement de ce type de méthode est un élément clé à prendre en considération. Ces essais montrent qu'en moins de 48 heures, le système permet une détection de l'ensemble des micro-organismes sur au moins un des deux milieux de culture excepté pour les moisissures (*Aspergillus brasiliensis* et *Penicillium brevicompactum*) qui sont détectées sur un temps légèrement supérieur (moins de 3 jours). Les souches sont cependant visibles dans les flacons après 48h d'incubation.

Les temps de détection de ces deux souches ne sont pas anormaux car la vitesse de croissance de ce type de germes est plus lente avec une libération de résidus de croissance modifiant moins le pH des milieux plus tardives.

La souche de *Candida albicans* montre un comportement différent entre les 2 milieux de culture. Bien que le milieu ILYM soit privilégié pour les levures et moisissures, elle est détectée en plus de 2 jours sur le milieu ILYM (20-25°C) mais en moins de 1.5 jours sur le milieu IAST (30-35°C). Le comportement de cette souche n'est pas étonnant avec une température de croissance plus mésophile au regard de son habitat naturel humain.

L'implémentation en routine sur ce système se fait avec le protocole suivant :

- **Etape N°1** : réalisation d'un essai d'applicabilité pour déterminer les paramètres de la méthode (diluant, facteur de dilution…) notamment vérifier l'efficacité de la neutralisation et l'absence d'effet matrice.
- **Etape N°2** : Mise en analyse avec 1ml d'une dilution au 1/10 (si applicabilité conforme à cette dilution) dans chaque flacon (IAST et ILYM).
- **Etape N°3** : Incubation 48 h
- **Etape N°4** : Lecture automatisée. Particularité : Le milieu ILYM où les essais de validation de la méthode ont montré la nécessité de réaliser une inspection visuelle des flacons afin de vérifier l'absence de moisissures dans les flacons.

Les avantages de cette mise en place dans le contrôle de routine sont :
- Une diminution significative du délai de rendu de résultats, avec libération de la grande majorité des lots qui sont conformes.
- La gestion simultanée et automatisée d'un grand nombre d'échantillons avec un temps de détection inversement proportionnel à la contamination.
- Il faut également noter que dès qu'une détection est confirmée, le résultat est disponible permettant ainsi une prise en compte avant la fin des 48 heures d'incubation.
- Cette technologie prend tout son intérêt pour la libération de lots qui sont "normalement" propres ce qui représente la très grande majorité de ces lots dans un process de production maîtrisé. Etant entendu que les lots détectés non conformes sont bloqués et repris en méthode traditionnelle.
- La possibilité de réaliser un repiquage sur milieu gélosé en vue de l'identification du micro-organisme.

Les limites sont :
- L'absence de dénombrement précis (méthode semi – quantitative)
- L'utilisation de cette technique (méthode qualitative) est préférentiellement orientée vers les produits "propres". Les résultats sans détection sont libérés après 48 h mais dans le cas d'une détection, il est nécessaire de reprendre l'échantillon en méthode traditionnelle.
- Le pH des produits. Le pH extrême de certains produits est potentiellement un frein à l'utilisation de cette technologie car pouvant induire de faux positifs. Cette notion est à prendre en compte lors de l'applicabilité de la méthode afin de déterminer l'influence de ce facteur dans la détection.
- Lorsqu'une reprise par méthode traditionnelle est mise en œuvre au

bout de 48 H pour dénombrement, la contamination de l'échantillon réanalysé ne sera pas forcément le reflet fidèle du niveau de contamination du produit 48 heures auparavant. Cette situation n'est pas spécifique à l'utilisation d'une méthode alternative … mais reste liée à l'instabilité potentielle du niveau de contamination d'un produit !

4.2 Essai de stérilité

La mise en place d'une méthode alternative pour les essais de stérilité n'est que très peu réalisée sur des produits "standard" issue du chapitre 2.6.1. A ce jour, voici quelques exemples de dépôt de dossier (Produits de la médecine régénérative pour la réparation des lésions du cartilage du genou -Déposé à partir de 2004 en stérilité alternative avec BacT/ALERT® 3D en 7j à la place de 14j aux US et en Europe / Produits injectables stériles type antibiotique avec l'ATP bioluminescence avec le système Rapid Milliflex® - Stérilité alternative en 5j à la place de 14j, utilisation de la cytométrie sur filtre système Chemscan pour le contrôle de produits oculaires).

Il est indéniable qu'à ce jour et malgré les nombreux développements techniques existants et les travaux engagés dans ce domaine depuis près de 30 ans peu de méthodes sont intégrées dans les dossiers d'essais de stérilité.
La demande du marché est moins importante car la mise en place d'une validation de méthode est lourde, couteuse et nécessitant un temps de développement assez conséquent et le passage en méthode alternative nécessite la modification du dossier d'enregistrement auprès des autorités. Cependant, cette méthode peut être déployée pour l'évaluation du bioburden avant filtration stérilisante.

Produits biologiques
L'intérêt de cette technologie pour le contrôle des produits biologiques répondant au chapitre 2.6.27 est bien plus grand. En effet les caractéristiques de ces produits (durée de conservation limitée, quantité faible disponible, taille de l'échantillon, administration précoce au patient) sont des éléments importants à prendre en considération car des facteurs limitants pour la prise en charge au laboratoire et un rendu de résultat pertinent.

La mise en place de contrôle de stérilité sur des produits biologiques suivant le chapitre 2.6.27 a été réalisée au laboratoire pour deux types de produits (milieux de conservation biologiques contenant des antibiotiques).

Un essai de stérilité étant une étape de contrôle critique, la sécurité lors de la mise en œuvre des essais de contrôle est un point primordial. La pharmacopée demande de réaliser cet essai dans des conditions aseptiques. Le choix de prédilection est le traitement sous un isolateur afin de garantir des conditions d'asepsie moins risquées d'un point de vue contamination microbiologique que dans un environnement de type classe A dans B. L'avantage de la méthode BacT/ALERT® 3D est que les milieux de culture sont compatibles avec un cycle de décontamination utilisant du peroxyde d'hydrogène par exemple (flacons étanches, ce point a fait l'objet d'une validation spécifique au sein de notre isolateur à peroxyde).

Les méthodes automatisées fondées sur la croissance ne sont pas soumises au chapitre de validation des méthodes alternatives (5.1.6). Cette particularité inscrite dans le chapitre 2.6.27 est un élément important car l'utilisation du système BacT/ALERT® 3D permet un gain de temps non négligeable lors du développement de la méthode.
Malgré tout, la méthode doit à minima avoir au préalable été validée avec les paramètres suivants :

- Spécificité: Capacité du système à détecter exclusivement les micro-organismes afin d'éviter les faux +.
- Sensibilité/limite de détection: capacité du système à détecter le plus petit nombre de micro-organismes.
- Reproductibilité: Fidélité intermédiaire inter-laboratoire
- Robustesse: Capacité du système à ne pas être affecté par des modifications faibles (jours/opérateurs/ lot de milieux de culture…)

Ces quelques résultats (Tableau 2) montrent la performance du système sur cette application. Par rapport à une méthode classique d'essai de stérilité suivant le chapitre 2.6.1, la détection de micro-organismes est meilleure. Cependant une souche ne répond pas plus rapidement que la méthode traditionnelle. Il s'agit de *Propionibacterium acnes* (Souche avec un métabolisme et une vitesse de croissance plus lente). Cette souche est très intéressante car c'est le marqueur d'une bonne optimisation de la méthode de détection.

Après ce prérequis, seuls les essais de **fertilité des milieux de culture** et une **applicabilité sur 3 réplicats** sont requis dans le chapitre 2.6.27. Ces seuls points à tester font que le système est simple à déployer et ne demande pas plus de ressources qu'une applicabilité de méthode.
La mise en place avant implémentation en routine consiste à la rédaction d'un protocole expérimental de test avec la définition des paramètres suivants (exemple d'un produit biologique avec antibiotiques) :

- **Choix des milieux de culture** : FN+ : milieu anaérobie avec billes polymériques absorbantes pour neutralisation de l'antibiotique et FA+ : milieu aérobie avec billes polymériques absorbantes pour neutralisation de l'antibiotique.

- **Choix des souches** : Ce choix se base sur les référentiels mais pas uniquement. L'objectif d'une applicabilité est de démontrer que la méthode permet dans des conditions de routine, de détecter la présence de micro-organismes susceptibles d'être présents dans le produit en fonction de son origine (produits biologiques, cultures cellulaires etc…) et de son environnement de fabrication. Dans la plupart des contaminations industrielles, il s'agit de micro-organismes aux caractéristiques culturales plus complexes que celles des souches de référence !
  Pour cette raison, il est primordial d'inclure dans une étude de faisabilité, la présence de germes d'intérêt pour le patient et/ou connus pour être contaminants du produit et de l'environnement de fabrication). On pourra donc sélectionner *Candida albicans-Pseudomonas aeruginosa-Staphylococcus aureus- Escherichia coli- Sphingomonas paucimobilis- Streptococcus pyogenes en milieu Aérobie/Bacteroides fragilis – Clostridium sporogenes-Propionbacterium acnes en milieu anaérobie.*
- **Choix des températures d'incubation** (35-37°C car compatible avec la matrice)
- **Choix du temps d'incubation** (7 jours : temps minimal prescrit par le référentiel)

Les résultats de cette étude montrent que :

- Les souches *Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes sur milieu aérobie et Bacteroides fragilis, Clostridium sporogenes* sur milieu anaérobie montrent des résultats satisfaisants (détection dans les délais impartis).
- Deux souches se distinguent par l'absence de détection :
  Sphingomonas paucimobilis n'est détecté que dans 33% des essais réalisés. L'impact de la température sur cette souche environnementale est le point identifié.

Propiobnibacterium acnes n'est pas détecté dans les temps impartis. Cette souche est cependant detécté lorsque le temps d'incubation est prolongé et la détection se réalise vers 10 jours.

Ces 2 souches nous montrent l'importance de tester des souches environnementales/d'intérêt et qu'il est nécessaire d'adapter le

⇢

Souches	Temps de détection au BacT/ALERT*3D (Méthode alternative)							Temps moyen (jours)							
								Filtration sur membrane				Incorporation directe			
	Test N°1		Test N°2		Test N°3		Total (Moyenne)	Test N°1	Test N°2	Test N°3	Totale (Moyenne)	Test N°1	Test N°2	Test N°3	Total (Moyenne)
***Staphylococcus aureus* iAST**	1.14		1.1		1.11			2	2	2		2	2	2	
	1.14		>14*		1.17		1.14	2	3	3	2.22	2	2	2	2
	1.08		1.2		1.15			2	2	2		2	2	>14*	
***Pseudomonas aeruginosa* iAST**	0.90		0.90		0.92			3	2	2		>14*	2	1	
	0.88		>7*		0.91		0.90	3	2	1	2.33	2	3	1	1.80
	0.86		0.92		0.88			2	2	3		>14*	>14*	>14*	
***Bacillus subtilis* iAST**	0.70		1.70		1.77			>14*	2	2		3	2	2	
	0.71		1.63		1.94		1.43	2	2	2	2	3	2	2	2.44
	0.72		1.83		1.86			2	2	2		4	2	2	
***Clostridium sporogenes* iNST**	1.16		1.51		0.97			3	2	>14*		2	2	1	
	1.09		1.13		0.93		1.09	3	3	2	2.43	2	2	2	1.89
	1.05		1.00		0.99			2	>14*	2		2	2	2	
***Propionibacterium acnes* iNST**	5.54		6.08		11.62			8	7	6		>14*	>14*	8	
	6.33		6.15		11.43		7.80	8	7	3	6.67	>14*	>14*	6	7.75
	5.59		6.29		11.17			8	7	6		11	>14*	6	
	iAST	iLYM	iAST	iLYM	iAST	iLYM									
Aspergillus brasiliensis	>14*	3.06	8**	2.99	6.62	2.65		4	3	3		4	4	3	
	7.87	2.96	7.62	2.74	6.56	2.75	iAST: 7.67 iLYM: 2.85	4	3	>14*	3.38	4	4	3	3.67
	11**	2.83	>14*	2.81	6.00	2.82		4	3	3		4	4	3	
Candida albicans	2.40	1.94	2.36	2.04	2.37	1.85		4	3	3		4	3	3	
	2.48	1.94	2.41	1.95	2.24	1.96	iAST: 2.37 iLYM: 1.99	4	3	2	3.22	3	3	3	3.22
	2.54	2.03	>14*	2.20	2.18	2.00		3	3	4		4	3	3	
Penicillium brevicompactum	7**	3.37	>14*	3.64	6.15	3**		3	3	4		4	4	4	
	5**	3.64	6.16	3.94	10**	>14*	iAST: 5.98 iLYM: 3.54	4	3	>14*	3.38	4	4	>14*	3.75
	5.6	3.67	>14*	>14*	4**	>14*		3	3	4		3	4	3	

Tab2 : Tableau des résultats équivalence méthode de référence/méthode Bactalert

protocole pour permettre la détection de ce type de souche.

Les avantages de cette mise en place dans le contrôle de routine sont :

- Une diminution du délai de rendu de résultats même si cette information doit être mise en parallèle du type de souche à détecter (Propionibacterium par exemple)
- Une détection 24h/24 7j/7 avec un relevé toutes les 10 minutes

La limite principale est la limite de détection de souches particulières. Ce sujet pourrait être débattu également pour les méthodes traditionnelles notamment au regard de la nature des milieux mis en œuvre ….

5. Conclusion

Depuis plus de 25 ans de nombreuses approches ont eu lieu pour améliorer les méthodes traditionnelles pastoriennes qui font de la résistance et ont encore de beaux jours devant elles !.

Cependant les exigences sans cesse plus grandes en matière de performances (rapidité, sensibilité, automatisation etc…) et les progrès technologiques ont permis le développement de nombreuses méthodes pertinentes. Ces méthodes peuvent substituer complètement la technique historique (contrôles en ligne des particules viables et non viables par exemple), en améliorer une ou plusieurs étapes, sans oublier les progrès spectaculaires des techniques de biologie moléculaire qui ouvrent de nouveaux horizons très prometteurs tels que les explorations des microbiotes !

Les deux exemples développés dans cet article à partir du système BacT/ALERT® 3D démontrent plusieurs gains significatifs en termes de :

- Simplification des manipulations avec une seule étape : l'ensemencement.
- Automatisation de l'incubation et de la lecture (plus de manipulation nécessaire pour les étapes ultérieures).
- Capacité de prise en charge d'échantillons dans un volume plus restreint.
- Détection automatisée d'autant plus précoce que le niveau de contamination du produit testé est élevé.
- Délai d'obtention des résultats considérablement réduit : 48 à 72 heures.
- Possibilité de réisoler et de travailler sur les micro-organismes détectés.
- Couts d'investissement et de fonctionnement maîtrisés.

La méthode BacT/ALERT® 3D est une méthode polyvalente, simple d'utilisation, automatisée avec une seule étape (pas de besoin de réactif spécifique) basée sur la croissance microbienne. Elle ne se destine pas uniquement à une seule application ce qui en fait un automate intéressant car non spécifique. Essai de stérilité, Contamination microbienne, prélèvement d'environnement sur écouvillon…

6. Perspectives

Les méthodes alternatives dans l'ensemble sont encore largement sous-utilisées dans nos industries ce qui mériterait un intérêt plus important. Les gains tant d'un point de vue productivité que qualité permettent de fiabiliser les résultats de nos laboratoires.

Les méthodes traditionnelles permettent-elles encore de se rassurer car mettant en évidence des colonies visibles ?

Références

1. Guidance for industry : ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology

2. PDA : " Validation of BacT/ALERT®Media for sterility in a Skan PSI Isolator after Three H2O2 decontamination cycles " - Mary Beth Anheuser1, Daniel Eichengerger3, Diana Tehsmann3, Carolyn Beres1, Machael Ullery1, Scott Jeffrey2, Jessica Cook1, Gregory Devulder1 - 1 Biomérieux, Inc. Hazelwood, MO / 2 Biomérieux, Inc. Durham, NC / 3SKAN AG, Switzerland

Glossaire

USP: United States Pharmacopoeia
PE: Pharmacopée Européenne
PDA: Parenteral Drug Association
ICH: International Conference of Harmonization

Avec 30 ans d'expérience dans la fabrication de produits pour la maitrise de la contamination en salles blanches, nous pouvons vous aider à mettre en place la défense la plus efficace contre la contamination microbienne, y compris le virus SARS-CoV-2.

Nos désinfectants pour salles blanches ont prouvé leur efficacité contre les virus et sont maintenant disponibles dans des formats économiques pour les zones non classifiées. Pour en savoir plus, consultez notre site www.contecinc.com/eu

CONTEC® | WHATEVER IT TAKES™

From Variable Operator Numeration To The Standardized 3P® Station Automated Colony Counting On Environmental Monitoring Culture Media Plates.

By Arnaud PARIS - BIOMERIEUX & Lucile PLOURDE-OWOBI - SANOFI
arnaud.paris@biomerieux.com - lucile.plourde@sanofi.com

Regulatory requirements for cleanrooms classification and monitoring are detailed by EU GMP (Annex 1) or the FDA cGMP Guidance for industry, USP<1116>[1], ISO 14644 & 14698 and PDA - TR N°13. Those reference documents describe the Environmental Monitoring (EM) as a key element to ensure that an aseptic processing area is preserved in an adequate level of control while maintaining the full data integrity of the sample during the whole workflow of the analysis. The only technique to understand and follow the contamination of these critical clean rooms is the use of specific irradiated culture media plates that can recover the environmental flora.

The common accepted inspection practice of plates consists, after appropriate incubation temperatures and time, to enumerate colony forming units (CFU) by a qualified operator. The microorganisms should grow into distinct macroscopic colonies visible by a person without the support of magnifying devices.

But what is the limit that qualify a macroscopic object? And at which size can we consider the human detection accurate and reproducible? Would the use of automated microbiology methods for EM allow for better standardization and reproducibility of those numeration results? Also, how can we limit human errors and the risks of deviation and data integrity breach?

To answer those questions, we will present a global EM study in three chapters. At first, we will present the "BEADS STUDY", a standardized methodology to evaluate the highly variable human performances of manual reading. In a second step, from a collaborative study between 4 pharmaceutical industries, the performance evaluation of a prototype automated system for incubation and numeration of colonies on plates at Sanofi Pasteur will be presented: the "INDUSTRIAL COLLABORATIVE STUDY". And finally, the latest counting performance results of a fully integrated 3P® STATION compendial

⇢

incubation and numeration solution are presented in regard to the traditional reading: the "3P STATION PERFORMANCE STUDY".

1. Introduction

EM trend analysis rely on the accuracy of the results recovered on all Petri dishes used in the critical production environments. The analysis is quantitative, the results are expressed in numbers of CFUs with different specifications depending on the clean room classification, having the most drastic requirement of 0 CFU contamination in class A environment. The visual examination of these solid culture media is done by qualified operators who must comply with the microbiological best laboratory practices described in the USP chapter <1117>[2]. In addition to a solid educational background, an internal training with initial and periodic evaluations must be followed to ensure accurate and reproducible results. Theoretically, there is no reason to have discrepancies on results between different trained operators. However, standardized results are difficult to achieve due to several factors such as the natural human variation in sight and evaluation or the huge variety of microorganisms colony morphology and growth patterns (sizes, shapes, translucent, proximal, spreading, …). The correct detection and enumeration of microbial colonies on plates is therefore in some cases a real challenge: this is illustrated by numerous FDA 483 forms (12) issued between 2011 and 2018 due to bad practices during Petri dishes inspection[3]. Half of them are attributable to counting errors! This questions of the accuracy of the results generated during visual inspection Petri dishes.

- For this reason, we firstly developed the "BEADS STUDY" with a specific methodology to standardize and measure the quality of human detection on culture media dedicated to EM, including challenging events.
- Following the findings of this study, we developed an automated prototype, capable of incubating culture media plates and counting colonies (based on kinetic image analysis), and with the collaboration of several pharmaceutical industries during the "INDUSTRIAL COLLABORATIVE STUDY", we defined the potential improvements to bring to this prototype to develop a final version.
- And finally, the final high capacity 3P STATION system was upgraded and qualified through the "3P STATION PERFORMANCE STUDY", and integrated as part of the complete workflow of Environmental Monitoring through the 3P ENTERPRISE solution.

2. Materials and Methods

2.1 BEADS STUDY

Calibrated beads (from Cospheric LLC.) were used to mimic CFU on culture media plates (Table 1):

Type of beads	53-63 µm	90-106 µm	212-250 µm	425-500 µm
Black Polyethylene Microspheres ref.	BKPMS-1.2 53-63 µm-10g	BKPMS-1.2 90-106 µm-10g	BKPMS-1.2 212-250 µm-10g	BKPMS-1.2 425-500 µm-10g
Clear Polyethylene Microspheres ref.	CPMS-1.2 53-63 µm-10g	CPMS-1.2 90-106 µm-10g	CPMS-1.2 212-250 µm-10g	CPMS-1.2 425-500 µm-10g

Table 1: References of the specific beads used in the study.

Petri dishes and culture media

A specific medium with no growth performance was developed in an EM dedicated LockSure® Petri dish: its formulation was established to prevent microbial growth and cross contaminations (mix of antibiotics) while allowing multiple readings by several people with the same quality. The Petri dishes were poured with a volume of 30 mL and the final aspect of the plates was identical to a regular EM culture media.

Samples preparation

The different beads were directly dropped onto the agar plates. The bead size of 425-450 µm allowed the handling directly with tweezers. For the other sizes, beads were, beforehand, introduced in a sterile saline solution and diluted to achieve the expected concentration of beads in 50 µl of solution. The application on the agar was realized with the help of a CMOS image sensor camera (Genie Nano XL® C5100 Color, ref. G3-GC30-C5105 - Teledyne Dasla) positioned on a dedicated backlit bench (Figure 1).

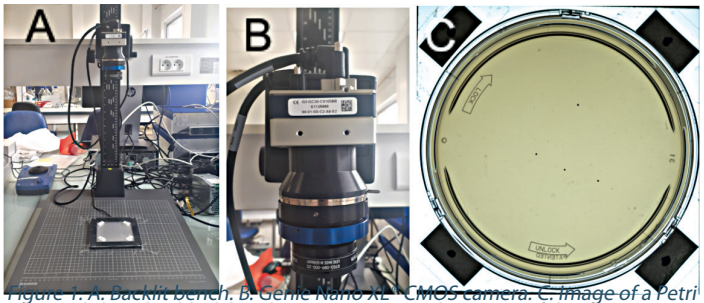


Figure 1: A. Backlit bench. B. Genie Nano XL® CMOS camera. C. Image of a Petri dish with 4 black beads (425-500 µm) in the center of the plate.

Methodology

A design of experiments (DOE) was realized to mix the following parameters (Table 2):

Parameter	Range of variation of the parameter			
Beads size	53-63 µm	90-106 µm	212-250 µm	425-500 µm
Contrast	Strong (black beads)		Weak (white beads)	
Position on the agar	Middle		Edge	
Number of beads	0	1	2-5	6-12

Table 2: Repartition of the different parameters taken into account in the beads study.

In total 1,088 plates were prepared, 79% negative and 21% inoculated with beads, with the purpose to mimic the higher ratio of negative plates observed in high grade clean room areas.

12 trained and qualified operators from 3 laboratories read independently each plate: 2 labs from bioMérieux (microbiology R&D team and culture media Quality Control team) and 1 pharmaceutical contract laboratory. The numeration was spread over a 5 days period to limit a potential impact of tiredness on the quality of the results. The plates examination was realized in the validated routine conditions with the possibility to use black and white backgrounds as well as additional lighting. No magnifying instrument were allowed.

A total of 13,056 results (10,296 on negative plates and 2,760 on positive plates) was generated. For positive results the total amount of data per parameter is explained below in Figure 2:

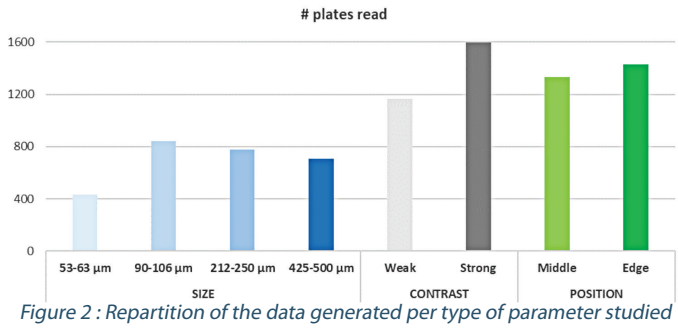


Figure 2 : Repartition of the data generated per type of parameter studied

The deposit of accurate numbers of 53-63 µm white beads was impossible even using the high magnifiying camera, therefore those specific size and constrast beads were not analysed here in this study.

Analysis were performed using the SAS Entreprise Guide v7.1 and Rstudio V1.1.442 softwares.

2.2 INDUSTRIAL COLLABORATIVE STUDY

This collaborative study was designed with 4 pharmaceutical industries to evaluate the performances of an initial 3P STATION Prototype with

→

an incubation capacity of 100 culture media plates. The data shown in this study refers only to the Sanofi Pasteur evaluation.

Prototype equipment
The prototype equipment was a specifically customized ScanStation 100 from Interscience with preliminary algorithm version 1.17.

Culture media plates
COUNT-TACT 3P® Plates (CT3P, bioMérieux ref. 43699) and 90 mm TSA 3P® Plates (TSA3P, bioMérieux ref. 43169) were used in this collaborative study.

Counting performances on culture media plates
A DOE was set up with 5 pharmacopoeia strains and 3 environmental isolates (Table 3) prepared at 3 target concentrations (5, 25 and 50 CFU per plate) and then plated with five replicates split evenly between both CT3P and TSA3P Plates. This represents a total of 240 spiked plates and 4,697 individual colonies.

Strains	Preparation	Incubation Temperature	Incubation Time
S. aureus	BIOBALL®	30-35°C	24 hours
B. subtilis	BIOBALL®	30-35°C	24 hours
P. aeruginosa	BIOBALL®	30-35°C	24 hours
C. albicans	BIOBALL®	30-35°C	40 hours
A. brasiliensis	BIOBALL®	20-25°C	40 hours
Corynebacterium tuberculostearicum	External calibrated bank	30-35°C	5 days
Kocuria rhizophilia	Laboratory calibrated bank	30-35°C	5 days
Neosartorya sp.	External calibrated bank	30-35°C	5 days

Table 3: Microbial strains and culture media plate incubation conditions

Each set of strains and plates was incubated and the remaining free positions in the incubator were filled by negative control plates. All plates were numerated by both the 3P STATION Prototype and the operators in order to measure and compare their reading performances.

Counting methodology
For each plate, numeration was done both by the 3P STATION Prototype with a kinetic approach (numeration every 1 hour during the incubation), and by 3 operators independently inspecting each plate with and end-point approach (after the full incubation cycle).

A "Reference Count" tool was developed to measure the performances of the operators and of the 3P STATION Prototype to improve as much as possible the detection algorithm.

The protocol to define the Reference Count for each plate after incubation is the following:

- The 3P STATION Prototype gives its final numeration and 3 operators independently enumerate the same plate,
- All counting results are reviewed and compared by the 3 operators,
- For each individual count, with the physical plate in hand and thanks to the video and images availability to "scroll back in time" the operators can better visualize colonies growing and agree afterward on a consensus to define the Reference Count for each plate.

Finally, each plate numeration result (operator or prototype solution) is compared against the Reference Count and assigned the false positives and the false negatives rates at the colony level where necessary.

Growth equivalency with automated incubation
To demonstrate the capability of the system to grow and recover microbial strains compared to a traditional incubation chamber, the 8 strains were spiked at a target concentration of 50 CFU/plate with five replicates on 90 mm TSA3P plates and incubated for 1, 2 or 5 days at 30-35°C in parallel between the 3P STATION Prototype and the traditional laboratory incubator (warm room chambers). The numeration was done by one operator and the 3P STATION.

Cross-contamination evaluation
To show the absence of cross contamination in the 3P STATION Prototype incubator, 20 TSA3P plates spiked with high level 50 CFU/plate of *Aspergillus brasiliensis*, were incubated together with 80 negative plates for 4 days at 20°C-25°C and 3 days at 30°C-35°C. Two air sampler tests were done with AIR IDEAL 3P inside the 3P STATION at the beginning and the end of the incubation, to check that no spores of *A. brasiliensis* contaminated the incubator during the incubation cycle.

2.3 3P STATION PERFORMANCE STUDY

3P STATION final design and performance metrics
Based on the initial findings of studies 1 and 2, a final version of the 3P STATION with a higher capacity of 300 culture media plates was designed (Figure 3).

Performance metrics and criteria were defined for the 3P STATION instrument alone. For the False Negative rates determination (Table 4) the 3P STATION and one operator numeration were compared to the Reference Count for all the plates with less than 10 cfu/plate, which represents a total of 116 colonies.

Metrics	Criteria
FP at plate level	< 5%
FN at colony level [0-10 cfu]	Not higher than operator
% Recovery	90 < % recovery < 110
R^2	> 0.95
Bias	0 < Bias < 1
Slope	0.9 < Slope < 1.1

Table 4: Performance metrics and criteria defined for the numeration performance of CFUs on culture media plates (either by the operators or the 3P STATION)

Definition of the Metrics
False Positive (FP) at plate level occurs when the plate is negative and a numeration is given by the 3P STATION
False Negative (FN) at colony level occurs when a colony present on the plate (Reference Count) is missed
Percent Recovery is the ratio of the colonies detected on a plate by the 3P STATION over the Reference Count
R^2 is the coefficient of correlation between the determined count and the Reference Count
Slope & Bias are obtained with the regression analysis parameters between 3P STATION & the Reference Count as in the formula hereuner $Y = aX+b$ with where Y = 3P STATION counts, X = Reference Count, and a = slope, b = bias

Methodology
A specific DOE was established to define the level of performances of the 300 culture media plates capacity 3P STATION.

→

The verification was done on 88 culture media plates: one batch of 76 plates (86%) being either negative or inoculated with the same pharmaocopoeia strains as the Industrial Collaborative Study, and one batch of 12 plates (14%) being either inoculated with molds or with transluscent strains (Table 5).
Colonies were inoculated between 0 and 50 CFU and evenly spread on each plate.

Strains	Preparation	Incubation Temperature	Incubation Time
S. aureus	BIOBALL®	30-35°C	until visible
B. subtilis	BIOBALL®	30-35°C	until visible
P. aeruginosa	BIOBALL®	30-35°C	until visible
C. albicans	BIOBALL®	30-35°C	until visible
A. brasiliensis	BIOBALL®	20-25°C	until visible
A. versicolor	Laboratory calibrated bank	20-25°C	until visible
T. asahii	Laboratory calibrated bank	20-25°C	until visible
S. paucimobilis	Laboratory calibrated bank	30-35°C	until visible
B. megaterium	Laboratory calibrated bank	30-35°C	until visible

Table 5: Microbial strains and culture media plate incubation conditions.

Numeration was done both by the 3P STATION and the operators, and compared to the Reference Count to assign the false positives and false negatives rates for each plate where necessary.

3. Results and discussion

3.1 BEADS STUDY

Analysis at the plate level

The objective of this analysis is to evaluate the natural perception of the operators during visual inspection and their capabilities to discriminate positive results from negative results.
In this part, only the performance of detection of positive plates (plates with bead(s)) versus negative plates was evaluated, without taking into account of the accuracy of the enumeration: presence/absence triage test. The results are expressed as shown in the Table 6.

		Evaluated by the operator	
		Plate +	Plate -
Real result	Plate +	True positive (TP)	False negative (FN)
	Plate -	False positive (FP)	True negative (TN)

Table 6: Performance detection matrix to define TP, FP, TN and FN counts

The performance of detection per operator is presented in the Figures 4 and 5. The Figures 4 and 5 show a huge variability in the results between the different operators. This tends to demonstrate that there is a huge level of subjectivity regarding the way a plate is considered positive or negative by an operator.
A possible explanation of these results could be the difficulty for the human eye to differentiate tiny objects in addition of the subjectivity to assess them as relevant or not. All the plated beads were equal or below a 500 µm size that can be considered as very small objects compared to microbiological colonies that can measure several millimeters, but also representative of slow growing stressed environmental isolates found in cleanrooms.

Therefore based on this beads study, it seems reasonable to extrapolate that the current reading and detection performances of trained operators of colonies on culture media plates is highly variable, generating a huge risk of false negative or positive results and a lack of data integrity due to the subjectivity of the test by design.

Figure 3: 3P STATION solution with the 300 culture media plate capacity

Analysis of the different parameters impact

This part of the analysis is focusing only on positives plates to evaluate the accuracy of the enumeration at the bead level provided by the different operators. The results of the 12 operators were pooled together to evaluate the parameters that globally impact the visual inspection (Figure 6).

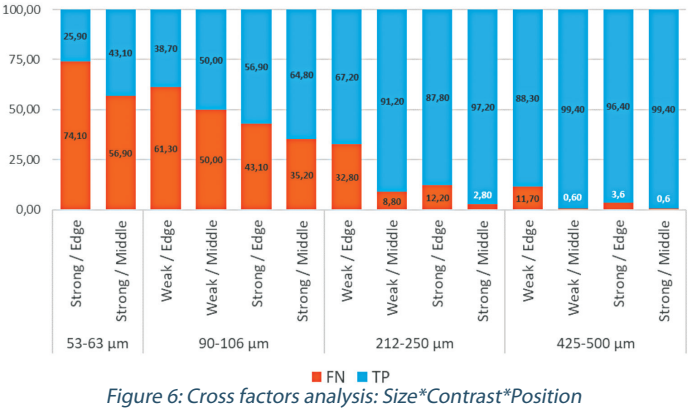


*Figure 6: Cross factors analysis: Size*Contrast*Position*

From the 3 criteria analyzed influencing the detection accuracy, the most impactful appears to be the beads sizes, and the less impactful appears to be their contrast.

- The figure 5 shows a clear correlation between the beads size and the detection performance. Below 212-250 µm up to 74% of incorrect results are measured, and the smaller the beads, the worse the numeration error level is.
- As for the location on the plate, between the middle or the edge position of the 212-250 µm beads, we observe a huge diminution of the percentage of correct results, respectively from 91.20% to 67.20%.
- The contrast influence is less significant but is well noticeable for beads around 212-250 µm with a logical better detection with more contrast.

Based on those results, we can reasonably consider that the accurate limit of detection for the human eye is close to 250 µm. Under this threshold, the percentage of missed objects becomes really high (more than 1/3 of false negative results). Therefore like the human operators, an automated detection technology should also be able to accurately detect 250 µm microbial with low variability.

3.2 INDUSTRIAL COLLABORATIVE STUDY

The objective of this study was to evaluate the performance of the 3P STATION Prototype in an industrial environment and to evaluate its performances to further identify potential improvements for the High Capacity 3P STATION. Out of the 4 collaborative sites, the data shown here are the ones generated by Sanofi Pasteur, at Marcy L'Etoile

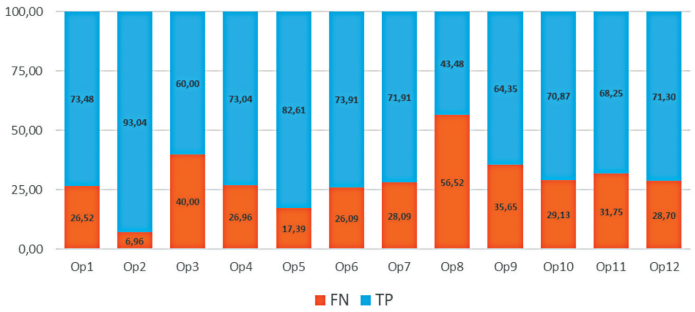


*Figure 4: False negative and true positive percentages measured per operator **on positive plates***

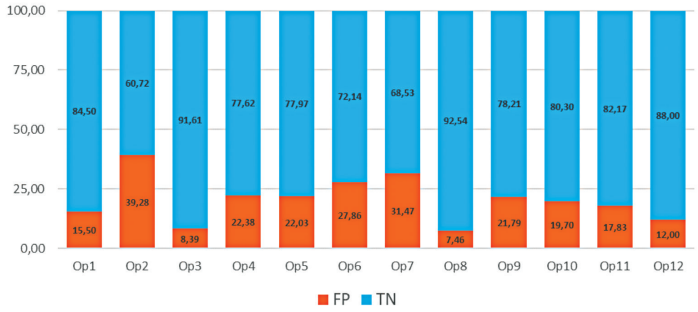


*Figure 5: False positive and true negative positive percentages measured per operator **on negative plates***

(France).

Counting performances on pharmacopoeia strains

The regression analysis on each individual strain counted by the 3P STATION Prototype vs the operators (data not shown here) gives at least a R^2>0.97. When analyzing all the strains together (Figure 7), the 3P STATION Prototype manages to obtain a R^2=0.99 compared to the operators.

So the correlation between the 3P STATION Prototype and the operators is extremely strong and tight. And the dispersion of the count is even lower at low inoculum levels (<10CFU) specific to Class A cleanrooms.

And when performing the regression analysis on another angle on all the strain numerations vs the Reference Count, the correlation of the 3P STATION Prototype with an R^2=1 was superior to that of the operators who have a tendency to under-numerate (Figure 8) with a higher dispersion.

The end-point reading of the operators seems to generate more counting errors than the kinetic method of the 3P STATION, and based on the R^2, the slope and the intercept, the 3P STATIONS brings more robustness and reliability of the results.

Counting performances on environmental strains

When performing the regression analysis on the environmental strain numerations by the operators and the 3P STATION vs the Reference Count, the correlation of the 3P STATION with a R^2=0,96 is again far superior to that of the operators who have a tendency to under-numerate (Figure 9) with a much higher dispersion on higher counts.

This confirms the initial findings that end-point reading by the operators seems to generate more counting errors than the more accurate kinetic method of the 3P STATION.

Growth equivalency with automated incubation

The average recovery rate between the 3P STATION and the operator numeration after incubating the plates in the traditional incubator was 107%, in accordance with the performance criteria set at 70% recovery rate acceptance.

Therefore, it is accepted that the incubators capacities to recover strains are statistically the same between the 3P STATION and Sanofi Pasteur's current incubation chamber.

Cross-contamination evaluation

After the 7 days of incubation of the 20 spiked culture media plates in the 3P STATION, no contamination by *Aspergillus brasiliensis* was found on any of the 80 negative plates.

One plate was found to be contaminated, but with a different strain that was identified as *Micrococcus luteus sensu lato* and investigated to be an operator contamination. And the active air sampling after the incubation cycle didn't reveal any *Aspergillus brasiliensis* contamination either.

Therefore the absence of cross-contamination in the incubator was demonstrated.

Note : in case it would be required, 2 specific protocols exist for either the cleaning or the decontamination of the incubator.

3.3 3P STATION PERFORMANCE STUDY

The objective of this study was to determine the performance of the High Capacity 3P STATION after the optimization brought to the solution thanks to the collaborative study.

The analysis of all the defined metrics was therefore performed on the 88 plates (Table 7), and the False Negative rate was compared between the 3P STATION and the operators.

Metrics	Criteria	3P® STATION results
FP at plate level	< 5%	At target
FN at colony level [0-10 cfu]	Not higher than operator	At target
% Recovery	90 < % recovery < 110	At target
R^2	> 0.95	At target
Bias	0 < Bias < 1	At target
Slope	0.9 < Slope < 1.1	At target

Table 7: Performance result analysis of the 3P STATION solution on colony detection on culture media plates.

False Positive (FP) rate

The FP rate measured at the plate level – triage between negative and positive plates – was much lower than the acceptable specification, and well within the acceptance criteria set for the system.

False Negative (FN) rate

When comparing the operators and the 3P STATION performances, it is clear that the automation of the reading and the reproducibility of the algorithm allows for better performances with the 3P STATION. It is especially interesting to note that for low contamination rates (<10 CFU/plate) as it could be found in Class A & B cleanrooms, the operators had a FN rate above 5% when compared to the Reference Count, while the 3P STATION showed a much lower FN rate.

The conformity of the Recovery, R^2, Bias and Slope criteria demonstrate a highly reliable, robust and perfectly aligned 3P STATION solution compared to the Reference Count. All the criteria were at target with the defined specifications, and with a FN rate much lower than the operators, the 3P STATION is a well-adapted automated compendial method for EM plate numeration, as good or better than the human detection capability.

Conclusion

In 2011, Sutton published an article about accuracy of plate counts showing the high variability of the operators and that microbiology itself is a real limit to generate reliable data[4]. In this paper, the correlation between the ⇢

estimated error rate and the observed low plate count is clearly demonstrated. With the data of our BEADS STUDY, we demonstrate the natural variability of skilled operators that are performing the visual inspection of Petri dishes dedicated to EM. In the case of challenging detections, there is a part of subjectivity in the discrimination of small objects. We can then understand the impact of the background noise level on the quality of the detection. Depending on how operators identify objects as relevant or not, the balance of false positive and false negative can be dramatically different. On top of the natural differences of people performing the EM plates inspection, the study shows common influencing factors, the main one being the beads size.

Reasonably, we can consider that the accurate limit of detection for the human eye is close to 250 µm. In addition to the size, the position and the contrast may play a role in the quality of the detection. EM visual inspection is a manual task, performed by people with variable performances by nature, creating issues of False Positive of False Negative numerations of colonies on plates. Improving the data quality, reliability and integrity from EM sample results can only be achieved with the implementation of automated compendial methods. As an opportunity of change and improvement, the Pharmaceutical industry should already consider automated solutions, replacing the traditional plate enumeration by automated incubators and plates counters. We have shown in our INDUSTRIAL COLLABORATIVE STUDY and our 3P STATION PERFORMANCE STUDY that the current EM culture media plate inspection method with operators (and sometime with a double reading) is not the state of the art anymore, and that automation should be the way to go forward.

Newly available automated technologies allow to reduce drastically the level of False Positive and False Negative results from EM counts, while still maintaining the highest level of data integrity and compliance thanks to the digitalization of the information.

Aknowledgement

We warmly thank Laurent Leblanc, Lisa Mallam and Katia Imhof for their key contribution to this article. We also thank Clément Dilas, Matthieu Ribon, Laura Bailac and Franck Guilloteau who contributed to this project and helped in the design and roll-out of the studies and the analysis of the data.

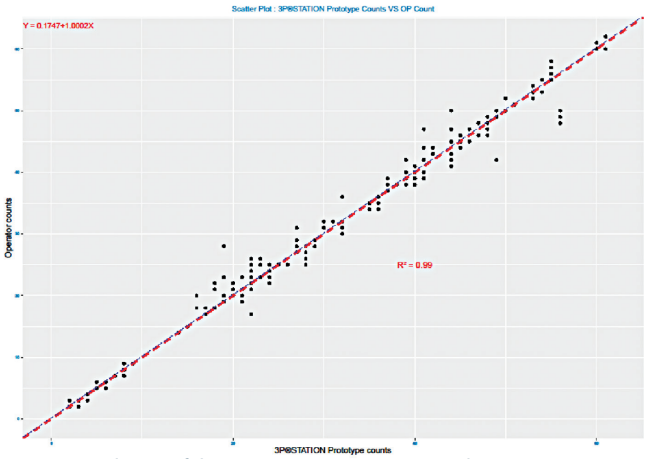


Fig 7: Correlation of the 3P STATION counts versus the operators counts

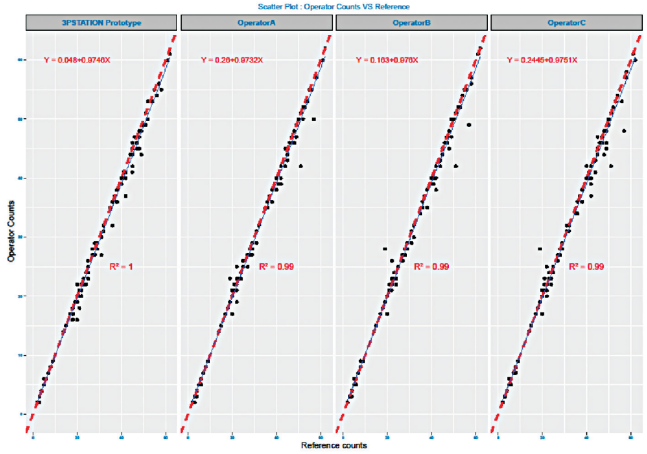


Fig 8: Correlation of the 3P STATION Prototype counts and each operator counts vs the Reference Count on the 5 pharmacopoeia strains

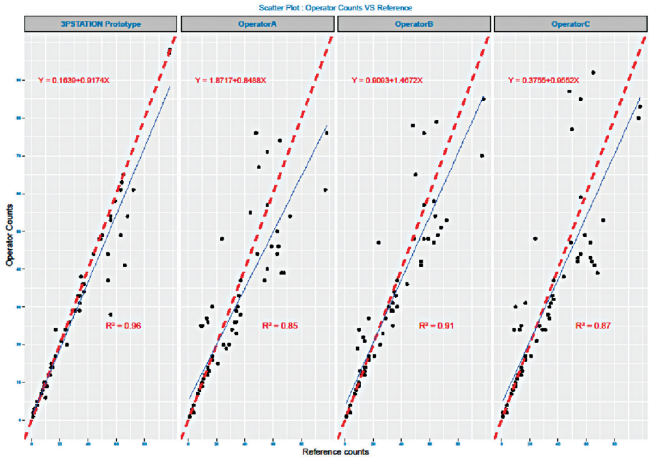


Fig 9: Correlation of the 3P STATION counts and each operator counts vs the Reference Count on the 3 environmental isolates

Glossary

GMP: Good Manufacturing Practices
EM: Environmental Monitoring
CFU: Colony Forming Unit
3P: Pharmaceutical Proven Performances
DOE: Design Of Experiments

References

1. GUSP, "1116 Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments", USP 34, United States Pharmacopoeia.
2. USP, "1117 Microbiological Best Laboratory Practices", USP 34, United States Pharmacopoeia.
3. FDA U.S. Food & Drug Administration; Waring letters References: 320-11-013, 320-11-015, 320-12-019, 320-13-09, 320-13-09, 320-16-08, 320-17-01, 31-17, 320-18-35, 320-18-55; 483 Forms References: 3005531475, 3008386908
4. Scott Sutton, "Accuracy of Plate Counts", Journal of Validation Technology, Vol. 17 n°3, pp. 42-46, 2011

ASSOCIATES OF CAPE COD, INC.

HORSESHOE CRAB SUSTAINABILITY PROJECT

Internally funded initiative.

Focuses on supporting fisheries worldwide and ensuring the genetic diversity of the horseshoe crab.

You can view our video to learn more about this exciting new program by visiting acciuk.co.uk.

Associates of Cape Cod Int'l., Inc.
Your Endotoxin & Glucan Experts
www.acciuk.co.uk • (+44) 151.547.7444

PR-18-035

Analyse de la charge microbienne en temps réel pour prévenir les risques de contamination et mieux contrôler les procédés.

Par Paul Arthur SOL - METTLER TOLEDO SAS
mtpro-f@mt.com

Les eaux à usage pharmaceutique comme l'eau pour préparation injectable (EPPI) et l'eau purifiée (EP) sont les principales matières premières utilisées sur l'ensemble de la production de médicaments et de dispositifs médicaux. La pureté de l'eau est régie par des normes publiées par les pharmacopées. Les sociétés pharmaceutiques qui produisent leurs propres eaux sont tenues de respecter ces normes.

Dans le cadre de la fabrication de produits répondant aux exigences en matière de sécurité, de qualité et d'efficacité, la charge microbienne est l'un des contaminant qui doit être contrôlé et surveillé afin de rester en dessous des limites définies par la pharmacopée. La contamination microbienne est le risque le plus important auquel l'industrie pharmaceutique est confrontée actuellement. Pour cette industrie, la mesure en ligne permet de répondre plus efficacement aux défis posés par la qualité de l'eau. Pour la détection de contamination organique et minérale, le Carbone Organique Total (COT) et la conductivité sont deux paramètres clés de l'analyse des procédés où les mesures en ligne/en production sont possibles depuis plusieurs décennies. Cependant, en ce qui concerne le contrôle de la contamination de la charge microbienne dans l'eau très pure, le marché s'appuie sur des méthodes de laboratoire mises au point il y a plus d'un siècle.

1. Une méthode universelle qui affiche pourtant ses limites

La technologie basée sur le comptage sur plaques des colonies qu'un micro-organisme est capable de former est la méthode couramment utilisée pour tester la présence de micro-organismes dans l'eau. L'utilisation de cette technologie, qui date de plus de 125 ans, repose sur la collecte d'eau à différents points essentiels, déterminés par la validation du système de distribution d'eau, puis de l'analyse de l'eau sur des boîtes de Petri.

La filtration sur membrane est la méthode de comptage sur plaque la plus couramment utilisée. Les régulateurs et les experts de l'industrie reconnaissent que cette méthode comporte des limites. Voici quelques exemples soulignés par la pharmacopée américaine (USP) :

⇢

I. Cette méthode est propice aux erreurs d'échantillonnage et d'analyse
USP<1231> "Les tests d'échantillons d'eau prélevés sur un système de distribution d'eau sont essentiels pour assurer un contrôle continu du système et évaluer la qualité de l'eau utilisée. Si un échantillon est mal prélevé, on risque d'obtenir un résultat de test non représentatif de l'objet de l'échantillon. Cela peut entraîner une inaction alors qu'il faut procéder à une réparation ou entraîner une réparation superflue alors que cela n'est pas nécessaire."

II. Avec 5 à 7 jours pour obtenir des résultats, l'eau utilisée comporte un risque.
USP<1231> "Il est plus difficile d'obtenir des données microbiennes précises par rapport aux attributs chimiques et physiques. Cela prend souvent plusieurs jours. Cela limite la capacité de contrôle des attributs microbiens en temps voulu."

III. Les temps d'échantillonnage sont basés sur la commodité et les ressources disponibles.
USP<1231> "En ce qui concerne l'étendue des répercussions, moins l'échantillonnage est fréquent, plus les produits et les procédés seront affectés par un résultat de test défavorable."
USP< 231 > "Il convient d'assurer le contrôle des systèmes de distribution d'eau à usage pharmaceutique à une fréquence qui permette de garantir que le système est sous contrôle et continue de produire une eau de qualité acceptable."

IV. La méthode de comptage sur plaque comporte des variabilités et des limites technologiques.
USP<1223> "Les limites réelles de détection des méthodes microbiologiques officinales n'ont jamais été établies de manière quantitative, et il est entendu que de nombreuses variables peuvent affecter la récupération des micro-organismes. Ces variables comprennent la sélection du milieu de croissance, les conditions d'incubation, les besoins nutritionnels des micro-organismes qui peuvent être présents, l'état physique des micro-organismes et les caractéristiques de l'article officinal faisant l'objet du test."
USP<1231> "Toutefois, il est possible que les limites nutritionnelles du milieu de croissance ne remplissent pas les exigences de croissance des organismes présents dans le système de distribution d'eau qui proviennent d'un biofilm. Par conséquent, il se peut que les méthodes de culture traditionnelles ne détectent qu'une fraction des bactéries du biofilm présentes dans l'échantillon d'eau."
USP<1223> "Des études sur la récupération de micro-organismes dans les eaux potables et environnementales ont montré que les méthodes traditionnelles de comptage sur plaques peuvent ne reporter que 0,1% à 1% des cellules microbiennes réellement présentes dans un échantillon."

De part ces limitations clairement exprimées, l'industrie pharmaceutique et ses organismes de réglementation admettent, reconnaissent et approuvent la nécessité de pouvoir contrôler la contamination de la charge microbienne en temps réel par de nouveaux outils plus innovants. En exemple, cet extrait de USP<1231> "L'analyse en ligne permet d'éviter le potentiel de contamination exogène des échantillonnages, qui pourrait entraîner des tendances de données variables artificiellement et la prise de décisions erronées sur les performances du système, sa maintenance et la qualité de l'eau utilisée, et qui pourrait déclencher des enquêtes causales inutiles."
On retrouve du côté des instances européennes le même encouragement, comme cet extrait de EMA : GMP Annexe 1 "L'utilisation de méthodes microbiologiques rapides devrait être envisagées dans le cadre de la stratégie de contrôle globale du système."

Mais concrètement, en quoi l'intégration de la mesure de la charge microbienne en production en continu et en temps réel offre des avantages majeurs pour garantir que le système est sous contrôle ?

2. Un meilleur contrôle du procédé grâce à la mesure en ligne

Le contrôle en ligne permet un contrôle continu de l'eau à un point donné. L'industrie pharmaceutique et les pharmacopées s'accordent sur un point clé de contrôle, le retour de boucle de distribution. Il n'est donc pas hasardeux de retrouver sur de nombreuses boucles, une conductivité et un COTmètre en ligne sur ce point de retour de boucle. Le principe est le suivant, si une contamination survient dans la boucle, celle-ci passera nécessairement par le retour de boucle. Si absence de contamination constatée, il est considéré que le système est sous-contrôle. En ce qui concerne la contamination microbienne, le point à privilégier serait donc selon le même raisonnement le retour de boucle. De nombreux avantages de ce contrôle en découleraient, dont une liste non exhaustive va être présentée ci-dessous.

I. Pas besoin d'échantillonnage, pas besoin de prélèvement
C'est le principe même de la mesure en ligne, il n'y a pas d'intervention humaine, pas de possible modification de l'échantillon due à une mauvaise manipulation, pas de contamination de l'échantillon par la méthode de prélèvement. L'eau est acheminée directement jusqu'à l'appareil en ligne. En fonction de la technologie utilisée, l'eau sera alors soit éliminée à l'égout (comme pour la mesure du TOC) ou conservée car la mesure est directement dans la boucle (comme pour la conductivité). On note alors l'importance, si l'eau est détournée vers l'égout, de limiter au maximum pour les fournisseurs, la consommation d'eau de leurs appareils de mesure.

II. Réaction rapide en cas de contamination
En règle générale, les investigations pour contamination microbienne et le rappel de l'eau sont des réactions aux résultats du comptage sur plaque. Ces résultats ne sont pas en mesure de fournir des détails sur les pics comme la gravité de la contamination ou leur temporalité.
Lorsqu'un évènement intervient, il n'est pas possible de prendre une mesure immédiatement en n'en ayant aucune connaissance. Cette inaction dure jusqu'à l'analyse de l'échantillon pris le jour où la contamination est survenue. Cependant, avec des données continues, il est possible d'utiliser les informations sur les tendances de manière proactive afin de réduire et d'atténuer le risque de libération d'eau contaminée. Une fois qu'une installation a établi une base de référence ou un niveau moyen au cours d'un fonctionnement normal, un utilisateur peut analyser comment la dynamique du système hydraulique peut avoir un impact sur la quantité de micro-organismes dans le système hydraulique.
Il en résulte une plus grande transparence des procédés et une meilleure compréhension de la façon dont les changements au niveau du système hydraulique, comme les fluctuations de la demande, la maintenance, etc., peuvent influer sur le risque de contamination.

III. Réductions significatives des désinfections grâce à la meilleure compréhension du système d'eau
La désinfection d'un système hydraulique peut être coûteuse, accroître l'usure de certains composants et elle limite le temps de production ou de libération de l'eau. Généralement, la fréquence de désinfection est basée sur les informations historiques relatives au contrôle du système hydraulique à travers une multitude de paramètres qui fournissent des résultats en ligne continus, tels que le COT et la conductivité.

Avec la méthode de comptage sur plaque traditionnelle pour

⇢

les mesures de la charge microbienne en laboratoire, un aperçu de la contamination du système hydraulique est fourni au mieux cinq jours après le prélèvement de l'échantillon. Les sociétés pharmaceutiques fonctionnent actuellement selon deux schémas, une désinfection préventive dont la fréquence a été déterminée par une analyse de risques préalable, et des désinfections correctives en cas de prélèvements positifs.

Avec une méthode d'analyse en ligne et en temps réel, le personnel en charge des désinfections peut décider si un cycle de désinfection est nécessaire en raison d'une augmentation mesurée de la charge microbienne dans un système hydraulique. Le personnel du site peut également utiliser les données continues pour analyser les changements avant et après la désinfection et juger à la fois de la pertinence et de l'efficacité de la désinfection. Une analyse en ligne permet donc de répondre à plusieurs questions. Est-il nécessaire de procéder à une désinfection ? La désinfection a-t-elle été efficace ? Mon système hydraulique est-il réellement sous contrôle ?
En optimisant la fréquence de désinfection, un site peut non seulement réduire les coûts de désinfection mais également réduire l'usure de certains composants du système hydraulique.

IV. Des temps de rinçage plus courts pour une productivité accrue en totale confiance
Lorsque l'on se fie à des mesures de la charge microbienne en laboratoire, la qualité de l'eau et le niveau de risque peuvent se révéler incertains. Que ce soit pour l'optimisation de la fréquence de désinfection ou la gestion du cycle de rinçage après la désinfection, la mesure en continu reste toujours disponible sur l'appareil en ligne et peut être comparée à la mesure de référence du système sous contrôle.
Avec la capacité d'observer la tendance à la baisse des données et revenant à la mesure de référence, le personnel peut déterminer avec confiance lorsqu'il n'y a plus de risque. La production est influencée positivement par la capacité à libérer l'eau plus tôt parce que l'opérateur a la certitude que la durée de rinçage était suffisante et que le système hydraulique est toujours sous contrôle.

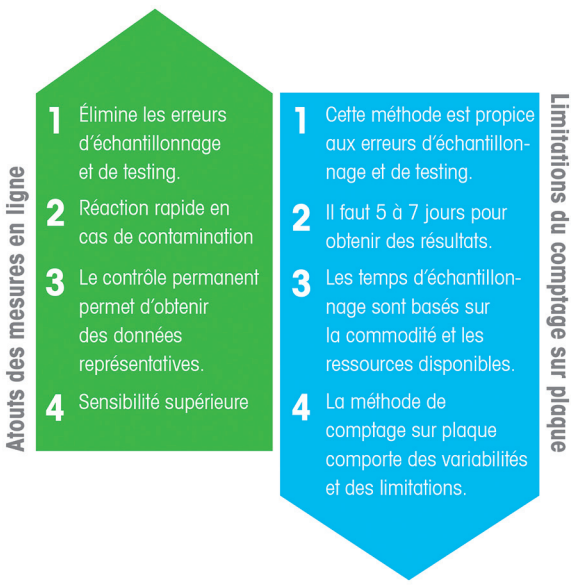


Figure 1: Bénéfices de l'analyse en ligne

3. Cas concret avec l'implémentation en ligne du 7000RMS pour le contrôle de procédé

L'appareil et son fonctionnement

Le 7000RMS™ de METTLER TOLEDO Thornton est un analyseur en ligne conçu pour effectuer des mesures continues et en temps réel de la charge microbienne dans les eaux à usage pharmaceutique. Il utilise la technologie de fluorescence induite par laser pour mesurer instantanément la charge microbienne, sans avoir recours à des consommables ni respecter des périodes d'incubation. L'appareil utilise deux principes de mesures déjà largement utilisés par la communauté scientifique, la fluorescence et la diffusion de Mie. La diffusion se produit lorsque la lumière rencontre des particules en traversant un milieu transparent. Plus la longueur d'onde est petite, plus la diffusion est importante. La théorie de Mie, est une théorie de la diffraction de la lumière par des particules sphériques. Les propriétés de diffusion des particules dépendent de leur taille, de leur forme et de leurs constantes intrinsèques. Selon Mie, la quantité d'énergie diffusée vers l'avant est plus importante que dans n'importe quelle autre direction. Lorsque la taille de la particule augmente, la diffusion vers l'avant augmente également.

Une prise d'échantillonnage du circuit d'alimentation en eau est branchée sur l'instrument. La circulation d'eau dans l'analyseur s'effectue à un débit contrôlé, nécessaire et suffisant, de 30 mL/min.
Lorsque l'eau s'écoule à travers la cellule de débit, elle est éclairée par un laser 405 nm, qui entraîne la fluorescence du NADH et de la Riboflavine, métabolites présents dans tous les micro-organismes. Un module de détection optique capture alors ce signal de fluorescence. Simultanément, la diffusion de Mie se produit lorsqu'une particule est éclairée par le rayon laser. Un deuxième module optique capture le signal de diffusion Mie. Les données provenant des deux détecteurs sont traitées à l'aide d'algorithmes avancés. Lorsque les deux signaux atteignent simultanément un ensemble de critères donnés, détection d'une particule dont la taille correspond et d'une fluorescence, une unité auto fluorescente (AFU) est signalée. Une AFU possède une taille supérieure à 0,3µm et possède des métabolites contenant du NADH et de la Riboflavine. La détection se fait ainsi à partir d'une seule et unique cellule, contrairement à la méthode traditionnelle sur plaque qui compte des colonies (CFU). La sensibilité et la précision du système sont donc accrues pour toujours plus de sécurité et de confiance dans le procédé.

L'analyseur de détection de la charge microbienne 7000RMS™ de METTLER TOLEDO Thornton est une solution innovante qui répond au besoin de l'industrie et du marché de contrôler plus efficacement le procédé de surveillance de la charge microbienne. Comme décrit ici, cet analyseur at-line compte chaque micro-organisme, ou AFU, dans de l'eau très pure en temps réel en utilisant deux techniques de mesure optique éprouvées. Cette technique a la capacité de fournir ce comptage de la charge microbienne à une fréquence élevée, à savoir au minimum toutes les deux secondes, ou 1 mL de flux d'échantillon, ce qui permet d'observer les tendances. Pour se rapprocher des mesures traditionnelles, nous conseillons toutefois d'actualiser les mesures tous les 10mL ou tous les 100mL.

→

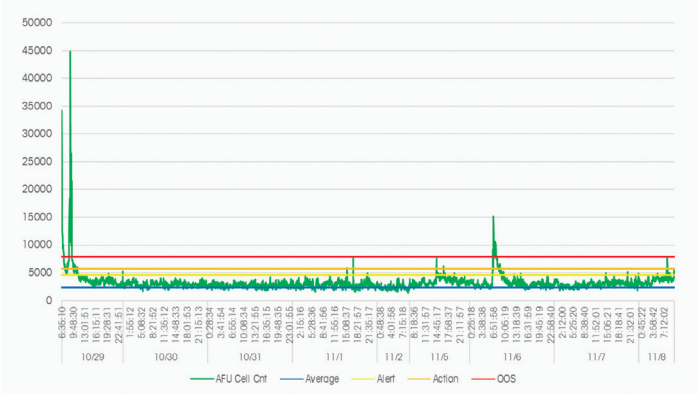


Fig 2: Données du 7000RMS du 29 octobre au 8 Novembre

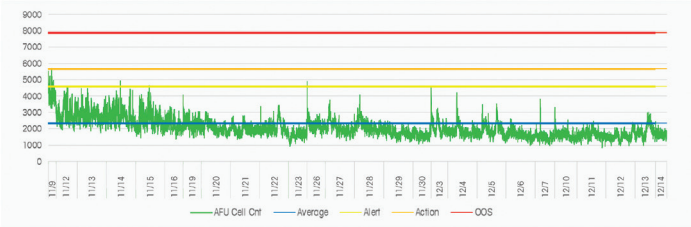


Fig 3: Données du 7000RMS du 9 novembre au 14 décembre

Et concrètement chez un client ?

Un grand fabricant de produits pharmaceutiques a observé des résultats positifs sur ses tests réalisés en laboratoire par méthode traditionnelle, ce qui menait à une suspicion d'une contamination du système d'eau. Lors de l'analyse des causes, la société a suspecté la formation d'un biofilm dans le système. Si c'était réellement le cas, la société devait prendre une action immédiate sous peine d'impacts substantiels sur le revenu et la profitabilité du site. Dues aux limitations des tests par méthode traditionnelle, comme notamment le délai d'incubation des cultures, le site pharmaceutique n'a pu établir avec certitude la cause du problème. De plus, avec des résultats à J+5, cette analyse était très gourmande en temps et en argent. Afin d'accélérer cette investigation, la société s'est tournée vers une solution alternative et a choisi le 7000RMS de METTLER TOLEDO Thornton.
Grâce à cet appareil installé en ligne, l'entreprise a obtenu des données en temps réel, ce qui leur a permis d'identifier directement un évènement hors ligne de base. En conséquence, l'appareil leur a fourni une vision complète sur leur système d'eau et leur a ainsi permis de créer un plan d'action pour résoudre l'origine du problème. Le but de cette utilisation est clair : un meilleur contrôle du système d'eau pour l'identification de l'origine des contaminations.

En parallèle, les tests laboratoires demeuraient la référence pour la libération des lots. Avec cette démarche, il n'y a pas eu d'interrogations lors d'audit sur l'utilisation du 7000RMS.
Cet analyseur ne remettait pas en cause le processus de libération des lots et s'ajoutait en tant qu'outil pour faciliter le contrôle du système d'eau grâce à une compréhension et à un contrôle accru.

4. Le succès du contrôle procédé et de l'optimisation

Le 29 octobre, après l'installation et le rinçage initial de l'analyseur au démarrage, celui-ci s'est stabilisé à une valeur différente de 0 (voir figure 2). Cette valeur en AFU est considérée comme la ligne de base du système d'eau, lors d'un fonctionnement normal de la boucle. Avec l'obtention d'une ligne de base stable (obtenue après quelques jours), la société a pu identifier tout évènement, toute mesure, s'éloignant de cette valeur de référence d'AFU. Ce sont ces déviations qui sont observées les 5, 6 et 8 novembre (voir figure 2), et qui ont été identifiées comme des conséquences d'activités sur le site. Ils ont ainsi réussi à stabiliser leur système d'eau de manière proactive grâce à ce contrôle en ligne, tout en continuant à le contrôler au fur et à mesure.
L'entreprise a également noté que le 7000RMS n'avait pas indiqué de déviation après le 9 novembre (voir figure 3). Dans le même temps, plusieurs résultats du laboratoire sont revenus positifs. Ces résultats ont mené le site à reprendre les procédures de prélèvements. Des pistes d'améliorations ont été identifiées pour minimiser les contaminations des prélèvements qui entrainaient des faux positifs.
Avec l'installation du 7000RMS, ce site pharmaceutique a pu mieux comprendre son système d'eau, puis l'optimiser afin de minimiser les impacts sur la qualité de l'eau. De plus, l'analyse en temps réel a mis en lumière les failles des procédures d'échantillonnage, ce qui leur a permis d'expliquer les déviations originales lors d'un audit ultérieur.

Conclusion

Les risques liés à une contamination microbienne dans les systèmes de distribution d'eau peuvent être catastrophiques pour une société pharmaceutique. Le manque de sécurité, de qualité et d'efficacité des produits fabriqués par ces entreprises pourrait coûter cher tant au niveau de la qualité du produit et la santé du patient que du point de vue juridique avec les organismes de réglementation voire des patients ayant déjà utilisé le produit fini. Les méthodes de comptage traditionnelles actuelles basées sur la croissance offrent quelques bénéfices pour réduire les risques, mais comportent beaucoup de limitations technologiques. Ces limitations signifient que le risque de contamination microbienne dans le produit fini est encore considérablement élevé.

L'analyseur 7000RMS est un instrument de contrôle de procédé qui permet de réduire considérablement le risque de prolifération microbienne dans le système de distribution d'eau en surveillant en temps réel l'évolution de la charge microbienne dans les eaux pharmaceutiques. Cet outil vient en complément des méthodes traditionnelles en proposant une meilleure visibilité du procédé de production et distribution de l'eau ultrapure. Les entreprises sont ainsi en mesure de fabriquer en toute confiance des produits conformes aux exigences de santé, sécurité, de qualité et d'efficacité pour le patient, tout en réduisant les risques de pertes de produits pour l'entreprise.

Glossary

GAFU: : unité auto fluorescente
RMS: Real-Time Microbial System

References

http://physique.unice.fr/sem6/2008-2009/PagesWeb/SBM/D_un_point_de_vue_physique....html

ISO 22519 PW/WFI production systems standard: Quality aspects.

Par Keren ZALKIND ZIGELBOIM & Shlomo SACKSTEIN- BIOPUREMAX
kerenz@biopuremax.com / shlomo@biopuremax.com

Typical pharmaceutical quality teams that work with regulations that are compliant to Good Manufacturing Practice (cGMP), are responsible for demonstrating control over all plant systems and processes.
This article will discuss the challenges that quality teams face while specifying new or upgraded water systems and the ways to handle them according to the ISO22519.

cGMP compliance of water systems is a continuous problem and the number of regulatory authorities' observations and warning letters that pharmaceutical companies receive, due to wrong handling and controlling of water systems, indicates that the core problem is many times at the design stage of the water production systems.

1. Quality aspects of ISO22519 for water production systems

ISO22519 for "Purified water and water for injection pretreatment and production systems" emphasizes the importance of designing a cGMP water production system holistically, from the raw water feed to the PW/WFI fill valve. The system must be designed for quality in a true Quality by Design (QbD) concept and as adopted in principle by the FDA. For example, the ISO talks about a "build clean" concept, during the installation of PW/WFI Pretreatment and Production systems: supply of piping/tubing and equipment in clean condition and installation methods that prevent ingress of contaminants.
The ISO gives guidance on how to design, build and operate a water system that is simple environmentally friendly and cost effective. This will lead to minimum maintenance and to a reliable system that will meet all the pharmaceutical cGMP requirements. The following paragraphs review the quality aspects of the ISO22519.

1.1 Continues improvement in system parameters

The ISO based its policy of improvement on the European polices for high quality systems used for production of WFI with membranes as formulated in the "Questions and answers on production of water for injections by non-distillation methods – reverse osmosis and biofilms and control strategies[1]". The document was written to provide clarification and guidance in relation to the use of reverse osmosis in the manufacture of Water for Injection and also to provide more detailed guidance on the control of Biofilms.

⇢

The emphasis on biofilm is because RO systems typically operate at ambient temperatures and as such offer an ideal environment for the development of a biofilm. Biofilms are notoriously difficult to remove so the main aim of any pretreatment and production system should be to forestall their formation.
The main parameters for improvement are: microbial count, conductivity and total organic carbon (TOC).
In 2008, the EMEA published a reflection paper on WFI prepared by reverse osmosis (RO). This publication stated that the major problem for production of WFI with RO is the microbiological aspect, and the "net effect is that the RO membrane will become, in practice, a bacterial fermenter"[2]. This was one of the leading considerations that delayed the change of the European Pharmacopeia from WFI production by distillation only to the additional option of using membranes.
This paper set the stage for dealing with the most challenging parameter in cold water systems: the microbial growth.
With this mode of thinking the ISO has formulated the "improvement principal" for both PW and WFI. As written in the ISO: "The PW/WFI Pretreatment and Production water quality shall show improvement in all quality parameters as the water advances through the system."
The ISO gives guidance as to what type of equipment, and in what configuration, can be installed to minimize the microbial growth. A big part of the solution is prevention and keeping tight control of the microbial parameters. The principal is to keep the in-system levels lower than the municipal feed levels. So the microbial total count at the RO feed should be <500 (cfu/ml); and after the RO should be <200 (cfu/ml). The low level of RO feed is needed so as to stop the RO membranes becoming a biological hazard that could grow through the membrane and threaten the product quality.

1.2 Sanitization

Sanitization is a key component of microbial control. Sanitization with chemicals is time consuming, costly and hazardous. The chemical agent must be analyzed before use for efficacy and analysis of product must be done post sanitization to assure full removal of cleaning agent before return to operation. Even assuming automatic chemical sanitization, that minimizes the above drawbacks, the underlying challenge of chemical sanitization is the uncertainty of its effectiveness. Even relatively undeveloped biofilms can be a challenge to neutralize and remove by chemical agents. On the other hand, hot water sanitization is much more effective in penetrating biofilms even if the biofilm removal is only partial.
The thermal sanitization will give robustness to the production method and this is in line with the European policies[3].
In this line, thermal sanitization is an ISO stipulated must.

1.3 Equipment

An exhaustive list of process equipment is given with pros and cons. Techniques such as raw water ultrafiltration, electrical scale control, water softening, carbon filters, UV dechlorination, filtration and degasification are all discussed. The systems with the organic medias (softeners, carbon filters) were not recommended as these collect contamination and are hotspots of bacterial proliferation.

1.4 Sampling

According to the standard, and common practice, every relevant unit should have a sample valve before and after the component. Such components will be those that could affect the microbial or chemical quality; the minimum sampling points and locations are listed in the standard.
Recommendations for areas to be microbiologically sampled can be found in the ISPE Good Practice Guide: Sampling for Pharmaceutical Water, Steam and Process Gases[4]. Points to be concentrated on: deionization steps, carbon filters, depth filters, Reverse Osmosis (RO), Ultrafiltration (UF) and the final deionization process.
These recommendations were embraced in the ISO standard.
The standard goes into proper installation details of the sample valves and its environs. The valves must be zero dead leg valves throughout the system so as to minimize false positives, the valves should be mounted on short outlet tees above drainage points. In addition, operator comfort is important as this is a factor in keeping the samples clean, so clearance of the sample bottle between the valve and the drain is stipulated.

1.5 Documentation

The standard lists the minimum needed documentation: URS, SOP's, Design Qualification (DQ), Installation Qualification (IQ), Operational Qualification (OQ) and Performance Qualification (PQ) protocols.
An exhaustive list of recommended engineering documentation is listed. The list includes: user guide, software documentation, electrical drawings, mechanical documentation, instrumentation certifications, spare parts list and more. Signage is also stipulated and detailed.

1.6 Specific Good Manufacturing Practice (GMP) requirements

The goal of this clause is to describe the Specific Good Manufacturing Practice (GMP) requirements that are relevant to PW and WFI production systems.
The standard refers to the following requirements:

- Physical breaks of at least 50 mm shall be provided at all drain lines.
- No piping bypass on filters.
- Separation between systems to prevent cross-contamination.
- System monitoring and recording with alert/action limits.

Another issue that this chapter discussed is the commissioning and qualification requirements and the tests that shall be performed.
Validation protocols should be written and performed for the pretreatment and production water system.

1.7 Control philosophy and Alarms

The ISO standard dedicates two clauses for control and alarms systems. The control clause describes the "Minimum control loops needed for installation", and the alarm clause describes the required and recommended alarms.

2. Conclusion

The ISO 22519 is not only a standard for engineers and maintenance personnel but also for QA/QC as quality was a leading consideration in the composition of the standard.
While planning a new or upgrading a PW/WFI water system it is important to engage the concerned teams, especially quality teams, to make sure they are involved in the critical decisions, even if the interests of those conflict with the engineering teams . It is important to solve the problems at the design stage. Having the design stage under the sole ownership of the engineering team is not the best way to head off possible quality issues.
The new ISO 22519 standard will help those teams to make the right choices and will direct them through the right way to achieve a reliable and safe system that eventually will meet all microbial, chemical and physical criteria.

References

[1] EMA, "Questions and answers on production of water for injections by non-distillation methods – reverse osmosis and biofilms and control strategies", EMA/INS/GMP/443117/2017, GMP/GDP Inspectors Working Group.
[2] EMEA, "Reflection Paper on Water for Injection Prepared by Reverse Osmosis", March 2008
[3] Press Release, 154th Session held in Strasbourg, France, European Pharmacopoeia Commission adopts revised monograph on Water for Injections allowing production by non-distillation technologies, March 2016
[4] ISPE Good Practice Guide: Sampling for Pharmaceutical Water, Steam and Process Gases, 2.3.5.6 Performance Qualification Sampling, Table 2.2, ISPE 2016.
[5] PDA, Technical Report #69: "Bioburden and Biofilm Management in Pharmaceutical Manufacturing Operations", Paragraph 6.2.1.4, 2015

Eau pour préparations injectables en vrac (productions, coûts). Étude de cas axée sur la qualité microbiologique.

Par Olivier CHANCEL, Sylvie GENOUX AUBERT & Robert NERI
Olivier.chancel@boehringer-ingelheim.com / sylvie.genoux@biomerieux.com / robertneri55@gmail.com

Le premier objectif est de permettre à tous les utilisateurs d'eau pour préparations injectables vrac (EPPIV) de choisir en comparant les technologies les plus appropriées pour produire de l'EPPIV en conformité avec les Pharmacopées et les Bonnes Pratiques de Fabrication Européenne et les Good Manufacturing Practice (GMP) Américaine.
Le second objectif est de vérifier qu'il est possible de réaliser des économies importantes de coûts en produisant du l'EPPIV via une production membranaire. Puis en dernier, une présentation d'une étude de cas concernant l'aspect microbiologique d'une production et distribution d'EPPIV (par une production d'EPPIV membranaire).

Pharmacopées / Mode de production	Eau pour préparations injectables en vrac		
	E.P. 9.8 Par Distillation ou par un procédé de purification membranaire équivalent à la distillation	USP 42 Par distillation ou par un procédé de purification équivalent ou supérieur à la distillation pour éliminer les produits chimiques et les micro-organismes	F.B. 5 Ed. Par distillation ou par un procédé équivalent ou supérieur à la distillation, élimination des contaminants chimiques, des micro-organismes et des endotoxines bactériennes
Source	Eau potable	US, EU, Japan, OMS Eau bonne à la consommation humaine	A água potável que passou por algum tipo de tratamento para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos nessa monografia
Conductivité	Elle répond aux exigences du tableau 0169.-1. Monographie de l'eau ≤ 1.1 µS/cm (20°C) [1]	Elle répond aux exigences du paragraphe <645> ≤ 1.1 µS/cm (20°C) [1]	Elle répond aux exigences du paragraphe 5.2.24 ≤ 1.1 µS/cm (20°C) [1]
Microbiologie (action limite)	10 CFU/100 ml	10 CFU/100 ml	10 UFC/ 100 ml
Endotoxines (action limite)	0.25 IU/ml	0.25 EU/ml	0.25 UI/ml
TOC/COT	<0.5 mg/l	<0.5 mg/l	<0.5 mg/l
Nitrates	< 0.2 ppm	Pas analysé	< 0.2 ppm
Aluminium (Pour la dialyse)	≤ 0.2 ppm	Pas analysé	Pas analysé

(1) Les limites de conductivité sont indiquées dans un tableau en fonction des températures :
< 1,1 µS/cm (20°C); < 1,3 µS/cm (25°C); < 1,5 µS/cm (35°C); < 1,7 µS/cm (40°C); < 1,8 µS/cm (45°C); < 1,9 µS/cm (50°C); < 2,1 µS/cm (55°C); <2,2 µS/cm (60°C); < 2,4 µS/cm (65°C); < 2,5 µS/cm (70°C); < 2,7 µS/cm (75 ÷ 90°C); < 2,9 µS/cm (95°C)

Pharmacopées / Mode de production	Eau pour préparations injectables en vrac			
	JP XVI Par Distillation ou RO/UF alimenté en eau prétraité ou en eau purifiée en vrac	ChP 20152 Seulement par distillation alimenté en eau purifiée en vrac	ФС 42-0325-09 Par distillation	IP 2018 Par distillation alimenté en eau potable ou en eau purifiée en vrac
Source	Spécifications JP pour l'eau	Eau potable	Eau potable	Eau potable
Conductivité	≤ 2.1 µS/cm offline	≤ 1.3 µS/cm (25°C) [1]	≤ 1.3 µS/cm (25°C) [1]	≤ 1.3 µS/cm (25°C) [1]
Microbiologie (action limite)	10 CFU/100 ml [2]	10 CFU/100 ml	10 UFC/ 100 ml	10 UFC/ 100 ml
Endotoxines (action limite)	0.25 EU/ml	0.25 EU/ml	0.25 EU/ml	0.25 EU/ml
TOC/COT	< 0.5 mg/l (0.3 pour contrôle)	< 0.5 mg/l	Pas analysé	< 0.5 mg/l

(1) Les limites de conductivité sont indiquées dans un tableau en fonction des températures :
< 1,1 µS/cm (20°C); < 1,3 µS/cm (25°C); < 1,5 µS/cm (35°C); < 1,7 µS/cm (40°C); < 1,8 µS/cm (45°C); < 1,9 µS/cm (50°C); < 2,1 µS/cm (55°C); <2,2 µS/cm (60°C); < 2,4 µS/cm (65°C); < 2,5 µS/cm (70°C); < 2,7 µS/cm (75 ÷ 90°C); < 2,9 µS/cm (95°C)
(2) Réglementé en matière d'eau potable

1. Producteurs et coûts de l'eau pour préparations injectables en vrac

a) Les eaux à usage pharmaceutique (EUP)

Les Eaux à Usage Pharmaceutique (EUP) sont considérées comme essentielles dans le processus de fabrication du médicament et elles existent sous deux formes différentes en vrac.
L'eau purifiée en vrac (EPV) et l'eau pour préparations injectables en vrac (EPPIV) sont toutes les deux décrites en détail dans toutes les Pharmacopées, notamment les pharmacopées américaine, européenne, japonaise, chinoise, brésilienne, russe, indienne….

b) Production de médicaments

Pour la production des médicaments liquides, solides ou injectables, l'industrie pharmaceutique utilise ces deux qualités d'eaux : EPV et EPPIV.
Différentes technologies de purification de l'eau potable (bonne à la consommation humaine) sont disponibles pour produire ces deux qualités d'eaux à usage pharmaceutique.
Les performances de chaque technologie sont ⇢

liées à la qualité de l'eau potable d'alimentation ou rendue potable et à la qualité de l'eau à usage pharmaceutique demandée, au coût d'investissement, au coût de fonctionnement, à sa fiabilité, à sa robustesse, à sa durabilité et à l'élimination ou la diminution des risques liés à la technologie choisie.

c) Pharmacopées Européenne et Américaine

La Pharmacopée Américaine permet la production d'EPPIV par distillation ou par des moyens équivalents ou supérieurs à la distillation depuis plus de 30 ans. Ces moyens équivalents ou supérieurs à la distillation sont tout de même peu répandus sur le marché nord-américain et nombre d'entreprises pharmaceutiques opérant aux USA privilégient l'usage de distillateurs.
Jusqu'à récemment, la Pharmacopée Européenne exigeait l'utilisation de la distillation. Historiquement, la distillation a été l'unique technologie utilisée en Europe pour la production d'EPPIV. La Pharmacopée Européenne a révisé sa monographie pour proposer un "procédé de purification équivalent à la distillation, telle que l'osmose inverse, associé à des techniques appropriées".

d) Harmonisation

La Pharmacopée Européenne a modifié la monographie de l'EPPIV pour harmoniser avec la Pharmacopée Américaine.

e) Annexe 1

Dans le texte de l'Annexe 1, rédigé par l'EMA, un paragraphe concernant l'EPPIV a été intégré et à ce jour l'annexe 1 révisée n'est toujours pas approuvée.
Un des risques perçus par l'EMA est la gestion d'un biofilm sur les membranes d'osmose inverse. L'EMA avait même présenté lors d'une réunion à l'EDQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé située à Strasbourg) des photographies de membranes d'osmose inverse contaminées par un biofilm et demander comment résoudre ce problème.
Suite à la révision de la monographie de la Pharmacopée Européenne, l'EMA a publié "Questions et réponses sur la production d'eau pour préparations injectables en vrac" par des méthodes autres que la distillation. L'EMA a fait part une nouvelle fois de sa préoccupation liée à la qualité microbiologique de l'EPPIV produite et des contrôles analytiques mis en place pour minimiser les risques de contamination de la production membranaire d'EPPIV.
Pour rappel, l'efficacité des distillateurs à multiples effets (MES) ou à thermo compression (TCS) de la vapeur ne sont plus à démontrer pour produire de l'EPPIV quel que soit son mode de fonctionnement.

f) Productions d'EPPIV

Vous trouverez ci-dessous une brève analyse des coûts de quatre producteurs d'EPPIV choisis en fonction des usages et des Pharmacopées Européenne et Américaine :

- Distillateur multi-effets (MES)/boucle chaude ou boucle froide ozonée.
- Système membranaire/boucle froide ozonée ou boucle chaude.
- Distillateur par thermocompression de la vapeur (TCS) boucle chaude ou froide.
- Ultrafiltration (UF) ou osmose inverse (RO)/Distillateur par thermocompression de la vapeur (TCS) boucle chaude ou froide.

Chaque technologie proposée est commentée et est recommandée ou pas. La fiabilité, la robustesse et la durabilité bien qu'étant des facteurs importants, ne sont pas considérés ici mais seront à prendre en compte bien évidemment dans vos études comparatives.

Les coûts d'investissement incluent la mise en route, la formation, l'exécution des protocoles de qualification d'installation (QI)/de qualification opérationnelle QO/hors qualification de performance (QP), la qualification ou validation mais hors transport et installation (ne connaissant ni le lieu et ni le local d'implantation).

Les coûts de fonctionnement pour chacun des quatre producteurs incluent l'eau potable, les énergies, la vapeur industrielle, l'électricité, l'eau de refroidissement (les utilités), l'air comprimé, les eaux usées, la maintenance (pièces de rechange, consommables et main d'œuvre inclus).
Chaque utilisateur réalise sa QP et ensuite son programme d'analyses en routine, ce qui ne permet pas de prendre en considération le coût analytique.

Fonctionnement

Les coûts de chacune des quatre productions sont évalués à partir d'un débit de production de 1,5 m^3/h, son fonctionnement est de 16 h par jour, de 7 jours / 7 et de 50 semaines / an soit une production d'EPPIV de (1,5x16x7x50 =) 8400 m^3/ an.
Tous les producteurs sont alimentés avec la même qualité d'eau potable. L'eau potable ou bonne à la consommation humaine d'alimentation doit répondre aux normes de potabilité. Dans tous les cas, une analyse spécifique et complète de l'eau potable d'alimentation doit être fournie par l'utilisateur pour finaliser la conception du producteur et du prétraitement.
A chacun de déterminer ce qui est ou non acceptable en réalisant une analyse de risques :

- Contamination probable due à un biofilm présent dans la production.
- Bactéries présentes dans le biofilm dont certaines produisent des endotoxines non détectables à l'aide du test LAL, probablement issues de Sphingomonas paucimobilis qui est l'exception car non détectés par le test LAL car sans LPS.
- L'ozone est issu d'une réaction chimique interne sans ajout externe de produits chimiques et une concentration comprise entre 0 et 5 ppb reste présente dans l'EPPIV produite (O_3 est un élément provenant d'une réaction chimique !),
- Le coût d'une non-conformité.
- Le coût analytique renforcé par rapport à un distillateur.

Synthèse des coûts (*Amortissement sur 10 ans*)

Producteur	Désignation	Investissement €HT/m³	Fonctionnement €HT/m³	Global €HT/m³	Classement
1	MES	**8**			**3**
1	MES		17 ou 24		**4**
1	MES			**25 ou 32**	**4**
2	RO / EDI /UF	**6**			**1**
2	RO / EDI /UF		**12**		**3**
2	RO / EDI /UF			**18**	**2**
3	TCS	**7**			**2**
3	TCS		**9**		**1**
3	TCS			**16**	**1**
4	UF / TCS	**8,6**			**4**
4	UF / TCS		**10,7**		**2**
4	UF / TCS			**19,3**	**3**

Les meilleurs coûts de fonctionnement sont réalisés avec les producteur TCS ou UF (RO) / TCS, cette technologie de production d'EPPIV est très robuste et facile à maintenir.
Les coûts de fonctionnement de production membranaire d'EPPIV est en troisième position. Bien évidemment la production d'EPPIV par MES a les coûts de fonctionnement les plus élevés.
Concernant les coûts globaux, le constat est que la distillation par TCS est en première position puis la production membranaire RO / EDI / UF en 2nde position. Si nous parlons de robustesse et de fiabilité, nous pouvons classer les producteurs de la manière suivante : 1er MES ou 1er TCS, 3ème UF (RO) / TCS, 4ème RO / EDI / UF.

2. Aspect microbiologique et retour d'expérience

L'idée de ce chapitre n'est pas tant d'apprécier ces technologies quant à leurs capacités à produire de l'EPPIV répondant aux différentes monographies d'un point de vue microbiologique car elles le sont toutes mais d'illustrer les risques potentiels.

⇢

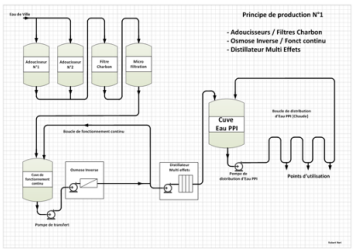
Production d'EPPI par distillation à effets multiples (MES)

Principe de production 1
Prétraitement/RO/MES/distribution chaude

L'adoucissement de l'eau potable réalisé par un duplex d'adoucisseurs élimine la dureté de l'eau potable.
Une filtration sur charbon actif élimine le chlore résiduel présent dans l'eau adoucie,
L'osmoseur équipé de membranes d'osmose inverse ayant un seuil de coupure de 300 daltons, produit de l'eau déminéralisée qui alimente le MES, le concentra est éliminé à l'égout.
Le distillateur à effets multiples (MES) produit de l'EPPIV.
La distillation à effets multiples est la méthode la plus couramment utilisée dans le monde pour la production de l'EPPIV. L'efficacité énergétique d'un distillateur à multiples effets dépend du nombre de colonnes utilisées. La qualité de l'EPPIV produite ne dépend pas du nombre de colonnes.
La distribution est réalisée à l'aide d'une boucle chaude recommandée par les GMP (65°C) et par les BPF (70°C).

Recommandations des Bonnes Pratiques de Fabrication

59. Les installations de traitement et de distribution de l'eau doivent être conçues, construites et entretenues en vue d'assurer de façon fiable une production d'eau de qualité appropriée. Elles ne doivent pas être utilisées au-delà de leur capacité nominale. L'eau destinée aux préparations injectables doit être produite, stockée et distribuée de façon à inhiber la croissance de micro-organismes, par exemple par une circulation constante à une température supérieure à 70°C.



Le coût d'investissement fournis par Stilmas et MECO
peut être estimé à 675 000 € HT.
La distribution (stockage et boucle) n'est pas prise en considération.

Nous considérons que l'installation de production est amortie
sur 10 ans : 675 000 € HT / 8400 m3/ 10 ans
=> 8 € HT.

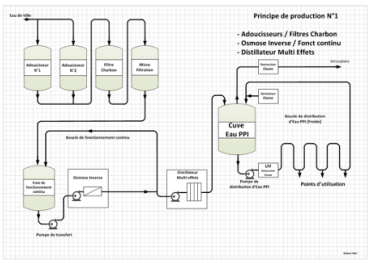
Les coûts de fonctionnement sont estimés à 140 000 € HT / 8400 m³ => 17 € HT le m3 d'EPPIV produit.

Le MES est alimenté à partir de RO : 25 € HT/ m³.
Le MES est alimenté à partir d'EPV : 32 € HT/ m³.

Conclusion (nous considérons que le coût de l'EPV produite
est de 7 € HT/m³)
Le coût global sur 10 ans = 25 (32) € HT/m³.
Le coût hors investissement = 17 (24) € HT/m³

Principe de production 1 bis
Prétraitement/RO/MES/distribution froide ozonée

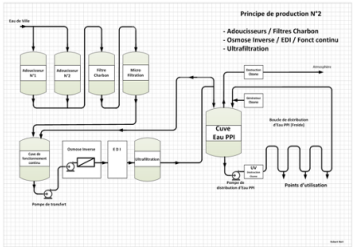
Idem Principe de production 1.
La distribution est réalisée à l'aide d'une boucle froide ozonée non recommandée.
Cette solution est tout de même présentée car proposée par certain fournisseur (boucle froide ou boucle froide ozonée).



Production d'EPPI par un ensemble membranaire

Principe de production 2
Prétraitement/RO/EDI/UF distribution froide ozonée

L'adoucissement de l'eau potable réalisé par un duplex d'adoucisseurs élimine la dureté de l'eau potable.
Une filtration sur charbon actif élimine le chlore résiduel présent dans l'eau adoucie.
Une filtration de 5 micron élimine les particules provenant du filtre charbon actif.
Une cuve de dis-connexion ayant un fonctionnement continu de la production membranaire permet le maintien d'une qualité microbiologique de l'EPPIV produite constante en sortie de RO/EDI/UF.
L'osmoseur équipé de membranes d'osmose inverse ayant un seuil de coupure de 300 daltons produit de l'eau déminéralisée qui alimente l'EDI, le concentra est éliminé à l'égout.
L'EDI élimine les ions résiduels mais n'a aucune influence sur les matières organiques.
L'eau déminéralisée produite par l'EDI alimente une ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 6000 daltons qui élimine les endotoxines présentes dans l'eau déminéralisée.
Le rendement est 67,5%, si nous considérons le producteur dans sa globalité (RO/EDI/UF).
La distribution est réalisée à l'aide d'une boucle froide ou froide ozonée non recommandée.
Cette solution est tout de même présentée car proposée par certain fournisseur (boucle froide ou boucle froide ozonée).



Le coût d'investissement fournis par Stilmas et MECO peut être estimé à 515 000 € HT.
La distribution (stockage et boucle) n'est pas prise en considération.

Nous considérons que l'installation de production est amortie sur 10 ans :
515 000 € HT / 8400 m³/ 10 ans => 6 € HT/m³.

Les coûts de fonctionnement sont estimés à 101 000 € HT / 8400 m³
=> 12 € HT le m³ d'EPPIV produit.

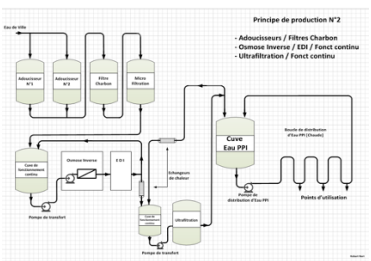
Conclusion
Le coût global sur 10 ans = 18 € HT/m³.
Le coût hors investissement = 12 € HT/m³

Principe de production 2bis
Prétraitement/RO/EDI/UF distribution chaude

L'adoucissement de l'eau potable réalisé par un duplex d'adoucisseurs élimine la dureté de l'eau potable,
Une filtration sur charbon actif élimine le chlore résiduel présent dans l'eau adoucie.
Une filtration de 5 micron élimine les particules provenant du filtre charbon acti.
Une cuve de disconnexion ayant un fonctionnement continu de la production membranaire RO/EDI permet un meilleur maintien de la qualité microbiologique.
L'osmoseur équipé de membranes d'osmose inverse ayant un seuil de coupure de 300 daltons produit de l'eau déminéralisée qui alimente l'EDI, le concentra est éliminé à l'égout.
L'EDI élimine les ions résiduels mais n'a aucune influence sur les matières organiques.
L'eau déminéralisée produite par l'EDI alimente une ultrafiltration chaude (70°C) circulant sur elle-même ayant un seuil de coupure de 6000 daltons qui élimine les endotoxines présentes dans l'eau déminéralisée et alimente la cuve de stockage à chaud.
La distribution est réalisée à l'aide d'une boucle chaude recommandée.

Recommandations des Bonnes Pratiques de Fabrication

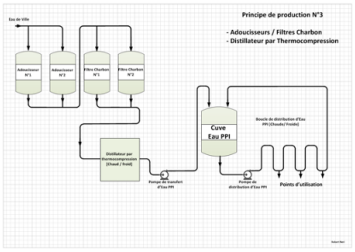
§ Water for injections (WFI) should be produced from purified water, stored and distributed in a manner which prevents microbial growth, for example by constant circulation at a temperature above 70°C. Where the WFI is produced by methods other than distillation rther techniques post Reverse osmosis (RO) membrane should be considered such as nofiltration, and ultra-filtration.



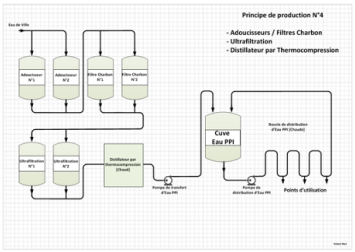
Il est probable qu'un distillateur faisant l'objet d'une maintenance préventive non adaptée produira quand même une EPPIV de qualité et ce quelle que soit la qualité de l'eau déminéralisée d'alimentation. En revanche, il est certain qu'un système membranaire mal entretenu ne pourra pas produire la qualité attendue. De même, nul besoin de préciser qu'une boucle de distribution froide de l'EPPIV nécessitera un niveau de maitrise très élevé pour fournir la même qualité qu'une boucle de distribution chaude. En effet, une EPPIV à une température supérieure à 65°C en chaque point de la boucle de distribution et donc de surcroit à 70°C ou 80°C ou plus

⇢

Production d'EPPI par distillation de type Thermo Compression de la vapeur (TCS)

Principe de production 3 Prétraitement/TCS/distribution chaude ou froide ozonée		Coût
L'adoucissement de l'eau potable réalisé par un duplex d'adoucisseurs élimine la dureté de l'eau potable. Une filtration sur charbon actif élimine le chlore résiduel présent dans l'eau adoucie. Une filtration de 5 micron élimine les particules provenant du filtre charbon actif. L'eau adoucie, dé-chlorée, filtrée produite alimente le distillateur par thermo compression de la vapeur (TCS). La distribution est réalisée à l'aide d'une boucle chaude recommandée ou froide ozonée non recommandée.		Le coût d'investissement fournis par Stilmas et MECO peut être estimé à 609 000 € HT. La distribution (stockage et boucle) n'est pas prise en considération. Nous considérons que l'installation de production est amortie sur 10 ans : 609 000 € HT / 8400 m³/ 10 ans => 7 € HT/m³. Les coûts de fonctionnement sont estimés à 75 000 € HT / 8400 m³ => 9 € HT le m³ d'EPPIV produit. Conclusion Le coût global sur 10 ans = 16 € HT/m³. Le coût hors investissement = 9 € HT/m³

Production d'EPPI par distillation de type Thermo Compression de la vapeur (TCS)

Principe de production 4 Prétraitement/UF ou RO/TCS/distribution chaude ou froide ozonée		Coût
L'adoucissement de l'eau potable réalisé par un duplex d'adoucisseurs élimine la dureté de l'eau potable. Une filtration sur charbon actif élimine le chlore résiduel présent dans l'eau adoucie. Une ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 80 à 100 000 daltons élimine les particules et la contamination bactérienne ou une osmose inverse qui permet également d'éliminer la silice présente. L'eau adoucie, dé-chlorée, filtrée produite alimente le distillateur par thermo compression de la vapeur (TCS). La distribution est réalisée à l'aide d'une boucle chaude recommandée ou froide ozonée non recommandée.		Le coût d'investissement fournis par Stilmas et MECO peut être estimé à 720 000 € HT. La distribution (stockage et boucle) n'est pas prise en considération. Nous considérons que l'installation de production est amortie sur 10 ans : 720 000 € HT / 8400 m³/ 10 ans => 8,6 € HT/m³. Les coûts de fonctionnement sont estimés à 90 000 € HT / 8400 m³ => 10,7 € HT le m³ d'EPPIV produit. Conclusion Le coût global sur 10 ans = 19,3 € HT/m³. Le coût hors investissement = 10,7 € HT/m³

offre une sécurité microbiologique très appréciable quand bien même quelques petits péchés de design auraient été commis. *Annexe 1: "7.7 Water treatment plants and distribution systems should be designed, constructed and maintained to minimize the risk of microbial contamination and proliferation so as to ensure a reliable source of water of an appropriate quality. Water produced should comply with the current monograph of the relevant Pharmacopeia."*

Prenons le retour d'expérience ci-dessous qui a eu lieu il y a deux ans dans un pays d'Asie et qui concerne une contamination massive d'une installation de production et de distribution d'EPPIV froide.

L'eau de ville est adoucie, traitée sur charbon actif puis micro filtrée puis alimente une double osmose inverse avant d'être distribuée à froid. Après un an d'exploitation, cette récente unité de production et de distribution d'EPPIV n'offre pas les tendances microbiologiques attendues :

- Contaminations fréquentes par *Pseudomonas spp* (identifications biochimiques),
- Aucune contamination détectée de l'unité de production,
- Aucune détection d'endotoxines par test LAL.

Quelles sont les actions immédiatement prises ? Le site concerné ouvre une déviation et commence une investigation. Comme action corrective, une désinfection thermique de la boucle de distribution avec de l'eau surchauffée est lancée. Le laboratoire arrive rapidement à la conclusion que cette contamination est le résultat de mauvaises pratiques de prélèvement de l'EPPIV.

Quelques mois plus tard le microbiologiste avouera qu'il avait un doute car il s'était attendu à trouver également des germes de la peau des préleveurs ou des bacilles sporulants en plus des *Pseudomonas* si la cause n'avait été liée qu'aux pratiques de prélèvement. De fait, et au titre des actions dites préventives, les techniciens du contrôle qualité, responsables des prélèvements d'EPPIV, ont fait l'objet d'une nouvelle formation.

Pour quel résultat ? Cela n'a absolument rien changé. Les prélèvements étaient de plus en plus contaminés. Pire, la boucle se contaminait à nouveau de plus en plus rapidement après les désinfections thermiques à l'eau surchauffée au point de justifier une désinfection thermique chaque week-end là ou une désinfection thermique annuelle préventive est généralement suffisante.

Si les prélèvements ne sont pas la cause des contaminations alors quel est le problème ?

Le site a évolué et a logiquement considéré que la boucle de distribution à froid d'EPPIV était finalement contaminée en son sein par un biofilm. C'est certainement assez logique compte tenu du fait que *Pseudomonas* est un classique du phénomène. Un biofilm dans les boucles de distribution d'eaux à usage pharmaceutique est une stratégie d'adaptation courante pour la survie de nombreux micro-organismes. La matrice du biofilm est composée de plusieurs éléments chimiques. La température appliquée et appropriée est la meilleure prévention d'un biofilm dans une boucle de distribution d'eaux à usage pharmaceutique. Mais une fois contaminée, un traitement thermique à lui seul tuera probablement tous les contaminants, ce qui est un bon début, mais a un impact très limité sur l'élimination de la matrice elle-même.

Si un biofilm n'est pas correctement éliminé, les débris organiques et cellulaires résiduels peuvent favoriser la croissance de nouvelles bactéries ubiquitaires et la colonisation par un nouveau biofilm : les eaux pharmaceutiques, y compris l'EPPIV, ne sont en réalité pas stériles et peuvent ensemencer de nouvelles bactéries véhiculées par l'eau…

Le risque est de finalement déclencher un cercle vicieux : plus le traitement thermique est fréquent, plus le biofilm revient vite et plus fort si la matrice cellulaire n'est pas retirée. Le retrait de la matrice est donc une étape nécessaire dans tout processus de restauration et un nettoyage en profondeur de la tuyauterie est un élément nécessaire du contrôle de la contamination. Pour éliminer efficacement les biofilms, il est généralement nécessaire tout d'abord, de procéder à un traitement alcalin (par exemple NaOH, KOH) pour hydrolyser le biofilm et aider à le décrocher de la surface de la tuyauterie ; puis, un traitement thermique à l'aide d'eau surchauffée par exemple peut être efficace APRÈS l'élimination initiale en raison de la pénétration de la chaleur dans les crevasses où le biofilm pourrait résider.

Le site a finalement fait l'acquisition d'un système d'ozonation pour désinfecter chimiquement la boucle de distribution d'EPPIV toutes les nuits. Cette action pourrait être une très belle action préventive si le biofilm ou la température de distribution de l'EPPIV était la cause racine. Mais il n'en était

···→

rien ! Pire, l'ozone a eu un effet paradoxal en masquant la contamination initiale qui finalement n'était pas dans la boucle de distribution mais dans le producteur d'EPPIV. **Dit autrement, la contamination détectée dans la boucle n'était finalement que la conséquence d'une contamination plus en amont.**

Quelle était alors la vraie cause racine ?
En première intention, et après une progression centimètre par centimètre le long des équipements de cette installation, il a fallu considérer que la cause racine était finalement la maintenance préventive du filtre à charbon actif. Au lieu d'être noir, le charbon était vert-bleu. Ce charbon actif a pour objet de retirer le chlore dans sa totalité de l'eau de ville autrement c'est un poison pour les membranes d'osmose inverse. C'est également un excellent support pour les biofilms. Il était remplacé une fois par an.

Mais pourquoi comparer avec l'Europe ? Tout le monde sait que pour trouver une cause racine il est utile de se poser un certain nombre de fois pourquoi ? pourquoi ? pourquoi ?
Cinq fois habituellement pour conserver la tradition. De fait, pourquoi ce filtre à charbon actif était remplacé une seule fois par an dans ce contexte ? Parce que l'installation avait été construite à l'identique, design ET procédures d'utilisation, d'une première installation construite en Europe avec de l'eau potable en début de procédé de production. La vraie cause racine, celle dite finale, était culturelle.
Le site européen a souhaité que le site asiatique exploite une installation de production d'EPPIV selon des standards propres à l'Europe en surestimant sans doute la capacité d'un système membranaire à retirer suffisamment les micro-organismes à partir d'eau de ville qui n'est pas encore au standard européen.

Quelle est la réponse préventive la plus appropriée ? En première intention, la bonne réponse préventive était pour ainsi dire une meilleure adaptation de la fréquence de changement du filtre à charbon actif pour tenir compte de la réalité microbiologique de l'eau de "Ville " et de la non présence de chlore. C'est effectivement ce qui a été réalisé.
En seconde intention, peut-être aurait-il fallu tenir compte également de la cause la plus en amont et finalement d'une mauvaise adéquation d'un système de production d'EPPIV membranaire pour ce contexte asiatique. Sans doute qu'une distillation aurait été beaucoup plus indépendante de la qualité de l'eau initiale et donc plus adaptée à ce contexte.

Retour d'expérience sur les risques associés à une boucle de distribution.
Le présent retour porte sur la même installation décrite et sur le même épisode de contamination. Il s'intéresse à la présence d'endotoxines et donc davantage aux conséquences d'une contamination microbiologique d'une boucle d'EPPIV. Ce retour n'est finalement pas directement lié au fait que la boucle de distribution est froide mais en est tout de même une résultante. En effet, la boucle aurait été chaude que le risque de biofilm aurait été réduit…
Cette introduction peut être trompeuse. Elle peut laisser penser que le site a constaté une présence excessive d'endotoxines du fait de la contamination microbienne de la boucle d'EPPIV. Et bien, ce n'est finalement pas le cas. C'est en fait l'inverse ! Malgré les contaminations récurrentes par *Pseudomonas* (identification biochimique) aucun signal faible en endotoxines n'a pu être détecté. Puisque tous les tests LAL étaient inférieurs à la limite de détection lors des épisodes de contamination par Pseudomonas (identification biochimique), bacille à Gram négatif, l'EPPIV était donc conformes aux monographies usuelles, y compris US, EU et JP.
Cette non détection a été vue comme un fait rassurant dans le cadre de l'analyse d'impact initialement réalisée par le site, en aucun cas comme un faux négatif. Quelques semaines après le début de l'épisode de contamination, le contaminant s'est finalement révélé être un *Sphingomonas paucimobilis* par identification génotypique (PCR) au lieu d'un *Pseudomonas spp* par identification biochimique.
Cela change beaucoup de chose. Il faut en cas de dénombrement s'assurer d'avoir une méthode d'identification approprié et fiable. L'Annexe 1 dit clairement que les méthodes utilisées doivent être fiable et scientifiquement à jour. Le test LAL détecte les LPS des bactéries Gram négatif or le *Sphingomonas paucimobilis* est la seul exception de Gram négatif sans LPS. Donc il est normal que le LAL ne le détecte pas.
Les résultats LAL NE PEUVENT PAS être considérés car le test LAL n'est PAS pertinent et entraînera un FAUX NÉGATIF…La présence et l'adaptation de *Sphingomonas spp* dans de l'EPPIV, a déjà été largement documentée. Le test LAL consiste à détecter ou à quantifier les endotoxines de bactéries à Gram négatif à l'aide du lysat d'amebocytes de Limule ou "crabe fer à cheval".
Le test LAL réagit avec les Lipo Poly Saccharide (LPS), qui sont un composant membranaire des bactéries à Gram négatif. Mais voilà, *Sphingomonas spp*, contrairement aux autres bacilles à Gram négatif, ne contient pas de LPS dans sa capsule externe mais contient des Glyco Sphingo Lipid (GSL). Par conséquent, et malgré la présence de GSL dans l'EPPIV vrac, le test LAL ne peut pas réagir et ne peut donc pas détecter ce type d'endotoxines.
Dit autrement et en fonction du contexte un résultat du type <0,25 UI/mL dans un certificat d'analyse d'EPPIV ne signifie pas nécessairement que l'EPPIV est conforme !!

3. Conclusion

Productions et distributions d'EPPIV
Concernant la production membranaire d'EPPIV Une défaillance de l'une des trois technologies (RO/EDI (ou RO) /UF) a un impact négatif sur la qualité de l'EPPIV produite. Les coûts de la maintenance d'une production membranaire est supérieure à des distillateurs de type un MES et TCS car la maintenance est réduite (pas de membranes RO, pas de membrane EDI, pas d'UF et également aucun test d'intégrité réalisé sur les UF). Les exigences analytiques sont supérieures pour une production membranaire car le risque de contamination bactérienne est plus important que pour un distillateur (aucun risque de présence de biofilm).
La qualité de l'EPPIV produite par distillation est indépendante de la qualité de l'eau potable d'alimentation, tandis que la qualité de l'EPPIV produite à l'aide d'une production membranaire est directement influencée par la qualité de l'eau potable.
La distillation par thermo compression de vapeur alimentée en eau adoucie et dé-chlorée est le moyen le plus économe en énergie pour produire de l'EPPIV.
Le TCS a un rendement supérieur aux autres technologies. L'évaporation de l'eau adoucie et dé-chlorée alimentant le distillateur TCS se fait à une température de 135°C. L'évaporation de l'eau déminéralisée alimentant le distillateur MES se fait à une température de 165°C. Les distillateurs à MES sont donc plus sensibles à l'entartrage et à la corrosion. Le distillateur TCS n'est pas soumis à un contrôle tous les 10 ans (équipement sous vide).

Microbiologie
Les tests de détection des endotoxines utilisant les réactifs LAL (Limulus Amebocyte Lysate) ou rFC (recombinant FacteurC) détectent la présence de LPS (Lipopolysaccharide) partie interne de la membrane des bactéries Gram négatif.
Dans le cas cité, le *Sphingomonas paucimobilis* identifié tardivement par technique PCR et bien qu'étant Gram négatif, n'a pas de LPS dans sa membrane et n'est donc pas détectable par les tests LAL ou rFC. Dans ce cas bien particulier, les différents tests de routine réalisés pour analyser la qualité de l'EPPIV prennent toutes leurs importances. Bien que le taux d'endotoxines soit inférieur à la limite de 0,25 EU/ml, qu'en est-il de la recherche de germes totaux, le Sphingomonas ne présentant pas d'exigences particulières de culture a été détecté mais mal identifié et a conduit à de mauvaises investigations sachant qu'il est possible d'avoir une absence de LPS malgré une présence de germes. Le test BET est bien complémentaire au Bioburden. D'autres tests pourraient permettre la détection de germes Gram- sans endotoxines, comme le test lapin (Rabbit Pyrogen Test-RPT) ou le test MAT (Monocytes Activation Test), ces tests permettent la détection de toutes substances pyrogènes dont celles non détectées par les tests endotoxines. Le *Shingomonas* devrait être détecté par cette méthode. Qu'aurait apporté une réponse positive ? Est-ce l'identification par PCR n'aurait pas attiré l'attention plus rapidement ? Plus spécifique, des laboratoires spécialisés peuvent mettre en évidence le GSL (Glycosphingophospolipides) par technique ELISA utilisant des anticorps spécifiques.
D'un point de vue santé publique, des cas de ⇢

bactériémies à *Sphingomonas paucimobilis* (Sp) avec hyperthermie suites à des perfusions d'immunoglobulines ont été rapportés. Les hémocultures positives à *Sphingomonas Sp* ont permis le diagnostic de bactériémie sur cathéter. L'évolution a été favorable sous antibiothérapie et retrait du matériel mis en cause. *Sphingomonas paucimobilis* est un bacille Gram-négatif non fermentant (BGNF), aérobie, pigmenté, possiblement pathogène pour l'homme notamment en présence de matériel étranger ou d'immunodépression. Germe environnemental, de la famille des *Sphingomonadaceae*, il est cependant beaucoup plus facile à traiter que les autres BGNF. Les cas décrits dans la littérature sont souvent bénins et associés à des dispositifs invasifs. La faible mortalité est probablement due à l'absence de lipopolysaccharides typiques et d'endotoxine. L'antibiothérapie doit être associée au retrait des dispositifs invasifs.

Glossaire

OMS Organisation Mondiale de la Santé
WHO World Health Organisation
GMP Good Manufacturing Practice
BPF Bonnes Pratiques de Fabrications
ICH International Conference on Harmonisation
EPA Environmental Protection Agency
FDA Food and Drug Administration
EMA Agence Européenne des Médicaments
ANSM Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
EPV Eau Purifiée Vrac
EPPIV Eau Pour Préparations Injectables Vrac
PS Pure Steam
VP Vapeur Pure
WPU Water For Pharmaceutical Use
EUP Eaux à Usage Pharmaceutique
RO Reverse Osmosis (Osmose Inverse)
EDI Electro-Dé-Ionisation

Bibliographie

- EMA-ICH Q7A (API GMP)
- EU-GMP annex 15: Qualification & Validation
- EMA-CPMP/QWP/158/01 (Note for Guidance on Pharma. Water Quality)
- European Pharmacopoeia-9.3th Ed. (Water Monograph & Tests)
- USP 41 (Water Monograph & Tests)
- WHO Annex 3- Water for Pharmaceutical Use (WPU)

WHO GMP Annex 2: Water for Pharmaceutical Use (WPU)

- Farmacopeia Brasileira, 5° Ed. November 2010
- Pharmacopoeia of the Russian Federation- Parts 1 &2 (2010)
- FDA-Guide to Inspection of High Purity Water Systems-1993
- PIC/S PI009-3 Pharmaceutical Inspection Convention &Pharmaceutical Inspection CO-operation Scheme, Aide memoire: Inspection of utilities
- ICH Q9_Quality Risk Management
- Pharmacopoeia: Chine / Japon / Canada …
- PDA-Technical Report No4 "Design Concepts for the Validation of a Water for Injection System"
- ASME BPE 2016 Bioprocessing Equipment
- ISPE Baseline Pharmaceutical Engineering Guide_Vol.4: "Water and Steam Systems" December 2011_Second Edition
- ISPE Approaches to Commissioning and Qualifications of Pharmaceutical Water and Steam Systems (2014)
- Water and Steam Systems 2019 – Volume 4
- GAMP5_A Risk-based approach to Complaint Gxp Computerized Systems (2008)
- ISPE GAMP- A Risk-based approach to Complaint Gxp Computerized Systems (2nd Ed. 2011)
- ISO 22519 First edition 2019-06 Purified water and water for injection pretreatment and production systems
- MECO www.meco.com
- Stilmas www.stilmas.com
- DOC www.docvalidation.it
- G-06 Bactériémies à Sphingomonas paucimobilis et perfusion d'immunoglobuline intraveineuse. À propos de 3 cas ; 03/07/08. Doi : 10.1016/S0399-077X (08)73125-1. J.P. Lanoix, A. Borel, V. Salle, A. Smail, D. Thomas, J.L. Schmit. CHU Amiens, 80054 Amiens, France
- https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/557459-Endotoxin-Testing-as-a-Detection-Method-for-Bacterial-Biofilms

BWT

La qualité de l'eau purifiée et de l'eau pour préparations injectables, parfaitement démontrable à chaque instant.

BWT présente l'AQU@Sense MB, un système fiable, éprouvé et précis de mesure en continu des TCC (total cell count) grâce à la cytométrie de flux.

bwt-pharma.com

Coming to basics on rouging.

By Mongy SAKLY - SANOFI PASTEUR
Mongi.Sakly@sanofi.com

The presence of rouging in high purity water distribution system is stated as a troubleshooting well known but definitely difficult to explain. However the last few years the default is highly increasing. This paper statement is intended to bring to debate a further point of view on learning experience and to share with the other colleagues their point of view. Basically, its purpose is to offer some practical guidance on what to do when rouge appears in the system and what to consider in terms of its impact on the operation

1. What is rouge ?

Rouge is discolouring typically found on the internal surface of water system based on SS and operated at elevated temperature over 65°C. The name rouge comes from the likeness in appearance to the extremely fine powder used by jewellers for polishing purpose. In pharmaceutical water system, rouge is interpreted simply oxidation-corrosion. The appearance of red/brown discolouration on the internal water surface of stainless steel is always alarming!

The rouge is considered as a product of corrosion phenomenon of iron which leads to 'ferrite'. Rouge is consists of a mixture of iron oxides and hydroxides. The metallurgical specialists describe many kinds of rouge from grey through pink to black colour depending on the environment. We can distinguish 3 classes of rouge:

Class 1 rouge: the rouge is migratory type coming from external source (rouge coming from an external pipe to the system such as the carbon steel of feeding water).

Class 2 rouge: initiated by presence of chlorides or halides which are, the residue from process installation or from water soluble halide ions. These aggressive chemical products destroy the passive layer. ⇢

Class 3 rouge: black in colour associated with high temperature e.g. steam. This form of rouge leads to pitting corrosion.

2. Where is rouge found ?

Many observations have been found rouge in the following equipment:

- Pump impellers
- PTFE surface such as tri clamp gaskets
- Connections hoses nylon/Silicon / PTFE
- Storage vessel surfaces
- In line filters and housings
- Vessel spray balls.

3. When is rouge found ?

The Rouge formation request basically three ingredients:

- High purity of water system constructed from SS,
- Polished surface to give suitable internal environment on welded
- Construction Operation at high elevated temperature.

When new water system has been installed, commissioned and validated, it starts free of rouge. Most installation contractors these days employ commissioning procedures such as:

- Degreasing
- Chemical passivation using nitric acid at 2% -3% volume

The purpose of passivation process is to remove grease, ferrite particles and to create a passivation layer which will protect the internal surface SS from the aggressive environment.
For Rouging one can assume that the chromium oxyde layer has been broken or has not been regularly formed on the metallic surface.

How important is the polishing surface for the SS?
Generally, electro polishing process seems to offer protection from surface vessels because polishing occurs after the manufacturing is complete. How ever rouge seems to appear in pipe work systems whether mechanically polished or elecropolished material has been employed.

4. Where does rouge come from ?

In pharmaceutical water system rouge emanates from aggressive pure water on the ferrite content of the SS. So, one obvious way to avoid it is simply not employ SS in the first place. But we couldn't since the SS material is accepted as the most and best hydro-hygienic material.

But what about the grade of SS?
We remind that SS contains chromium (16,18%), nickel (10-15%) and molybdenum (2 to 3%) in the necessary proportion. The applicable norms as ASTM 270, DIN 17457 or BS 316S12 defines the composition of SS in quite variation.

	ASTM 270	DIN 17457	BS 316S12
Cr	16 - 18	16,5 - 18	6,5 - 18,5
Ni	10 - 15	12,5 - 15	11 - 14
Mo	2 - 3	2,5 - 3	2,25 – 3
Total	28 to 36%	31,5 to 36%	24,25 to 35,5%

So we can see that the acceptable limits of SS regarding the ASTM can vary +- 8%. In other words the ferrite proportion can also vary by 8%.

5. External indicators of rouging

We have mentioned before that rouging is found on elastomeric surfaces, nylon and silicon rubbers. We have seen rouge discolouration appears in translucent silicone hoses used in tubing connecting TOC instruments.
This area could be used as a reference to check whether rouging is in the circuit.

6. What is the impact of rouge on quality of a water system ?

We should carry out a risk assessment before to decide to continue using pharmaceutical water. The presence of high amount of rouge will affect definitely the conductivity. It has been found that the presence of rouge will not affect the conductivity limits specified in USP 28.

7. How to avoid rouge ?

System design, specification and construction are the main subjects to be carefully followed according to cGMP and cGEP:

- Employ 316 L
- Consider electro-polishing processes vessels and piping Ra 0,4 to 0,6 µm
- Material certificate 3.1.B
- Follow correct welding specification
- In process control of installation and welding consistency
- Correct degreasing
- Correct passivation procedure
- Use test ferroxyl test piece or similar to demonstrate passivation.
- Consider lowering the operating temperature a little if rouging appears
- Select observation points in the system and check regularly the rouge.

Winning combination: Reducing particles in RTU packaging by aligning lid material, adhesive and sealing parameters in a holistic approach.

Par John BERGGREN & Gregor DEUTSCHLE - SCHOTT AG
john.berggren@us.schott.com / gregor.deutschle@schott.com

Sterile injectable drugs play a crucial role in the treatment of disease. The global sterile injectable drugs market was valued at approximately USD 369.7 Bn in 2017 and expected to grow to around USD 779.9 Bn by 2024[1]. All stakeholders in this industry have the inherent goal to make injectable drugs safe and effective. This includes an expectation that every lot be essentially free from visible particulates, as described in various USP chapters and pharmacopeias[2], and that manufacturers strive to minimize all particulate and foreign contamination[3].

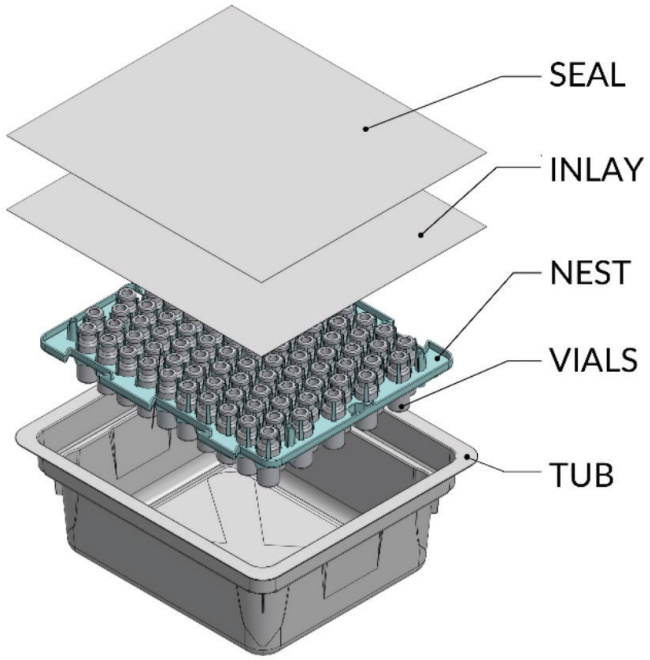


Figure 1 : Illustration of a typical RTU vial packaging with a sealing lid

Numerous guidance documents assist manufacturers in achieving quality, efficacy, and adherence to safety standards. However, there is currently no road map to achieving drugs that are essentially free from foreign matter. With all the discussions since the first PDA/FDA Glass Quality Conference in May 2011, there are still product recalls related to visible particulate matter[4, 5]. These one off failures (a single particle) still have resulted in drug manufacturers pulling entire lots of drugs from the market sacrificing commercial interests, for patient safety and regulatory scrutiny. These decisions have resulted in drug shortages. At the time of this case study, there are 123 drugs on the US FDA's drug shortage list[6].

Primary packaging (the container/closure) is one of the lead sources of "visible" particles in parenteral drugs[7]. Ready-to-use (RTU) components are delivered in a so-called nested configuration, which prevents glass-to-glass contact and reduces defects like scratches, breakage, and particles. These packaging materials are an additional source of foreign contamination.

In this paper we focus on the sealing lid as one source for particles in RTU containers. We believe we can achieve improved particle control by matching lid material, adhesive, and processing parameters (Part I), and subsequently we will discuss five focus areas for pharma manufacturers and their suppliers to further reduce particle risk (Part II).

1. Lids as a source of particles in RTU containers

The application of 'peelable' adhesives to the roll stock and die-cutting may result in loose fibers and/

⇢

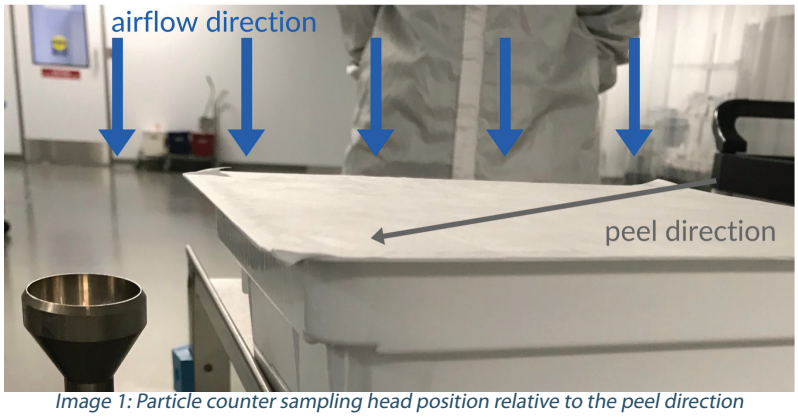


Image 1: Particle counter sampling head position relative to the peel direction

Image 2: Particle counter sampling head position and meter location

or adhesive artifacts as the tub/tray sealing lid is in immediate proximity to, and occasionally in direct contact with the nested containers/ closures. High peel forces may further stress these materials leading to additional contamination risk [7]. Selecting the right combination of lid material and adhesive, along with strict process controls, can influence the performance of the entire RTU packaging system.

To increase the practical benefit of this case study, we concentrate on materials known under the brand name DuPont™ Tyvek® - hereinafter referred to as sealing material or lid material. It is, to our knowledge, the most common sealing material for this purpose and used by all major suppliers of RTU containers. We want to point out that DuPont was neither involved in the testing nor the creation of this paper. However, we do want to underline how collaboration along the supply chain, including lead pharma customer(s), helps to reduce the risk of visible particulates significantly.

Study design

We evaluated six different sealing material/adhesive combinations, both hot melt and water-based, in standard, commercially available configurations. More precisely, the combinations were tested on the SCHOTT iQ® RTU Platform, which comprises pre-filled syringes, vials, and cartridge packaged in the industry-standard nest & tub (ISO 11040-7) configuration.

Seal qualification was performed for all study materials before initiation to optimize sealing parameters: time, pressure, and temperature. This optimization included studies to achieve the minimum required peel force while also leading to a better understanding of influences on adhesive migration into the porous material - which can lead to a thinner layer of adhesive at the material interface - and less variation among all four sides of the applied seals. This has resulted in lower peel force standard deviation, reduced adhesive migration, a cleaner visual transfer which is free from bubbles, gaps, channels and/or delamination, and better seal integrity as tested by dye ingress.

Forty tubs of each format were sealed and tested both pre and post standard Ethylene Oxide (EtO) sterilization to evaluate the impact, if any, of the sterilization cycle on critical product attributes. It must be noted that each filling line manufacturer performs delidding in a slightly different manner, i.e., peeling in multiple directions or heating to soften or melt the adhesive, to name a few. In this evaluation, we simulate what we consider a worst-case condition: ambient temperature, low angle, single direction, manual peeling.

Materials and Equipment

- 1073B Tyvek® with various adhesives
- Polystyrene (HIPS) injection molded tub
- Microscope Olympus SZX-10 Stereo microscope equipped with Infinity Camera
- Contact adhesive roller
- Instron 5542A single testing column system
- Hach Met-1 3400 series particle counter.

After a minimum hold time of two weeks post-processing each configuration was subject to the following testing:

1. Seal strength (Instron Peel force in Newtons). Five tubs, 4 coupons per tub (n=20), 25mm in width were cut and evaluated. Max, min, mean, and standard deviation were compared for each iteration.

2. Peel force (manual). Twenty samples each were evaluated for consistency peel forces across the entire seal and visually inspected according to ASTM F 1886/F1886M-09 Test method for determining the integrity of seals for flexible packaging by visual inspection.

3. Shed airborne particulates during peeling (non-viable particle counts). The work surface was pre-cleaned with a contact roller and other materials removed except the tub being tested and the particle counter. Lid peeling was performed at ambient temperatures in an ISO-7 environment to better control the air velocity during sampling. The peel was slow (5-6 seconds) using even pressure at a low angle (15-20 degrees) in a single direction (diagonally) across the seal surface towards the sample head. The sample head was positioned 30mm below the tub flange. A 6-second delay/purge was followed by a 20-second sample collection at the maximum sampling rate of 1.77 ft^3/min. Particle counts were recorded, noting the average and standard deviation for both the 0.5 µm, and 5µm size bins.

4. Loose particulate on both the tub seal and the lid material (adhesive side only) - Visual inspection of adhesive residues on the tub seal surface **post peeling**. A head-to-head comparison of the potential for shed particles was accomplished utilizing a contact adhesive roller to evaluate loose particles resulting from adhesive residues and strain/tearing of the sealing lid. The roller lifts particles off the tub seal surface and the lid directly. The number of collected particles were compared for each format.

5. Microscopic inspection 10-63X of the Tyvek® post peeling. For each configuration, a microscopic inspection was performed on the edges of five (5) lid sheets. Photos were taken of any loose fibers, tears, or related structural defects and formats compared.

⇢

Image 3 and 4 represent labile particles isolated from the tub surface and the lid (adhesive side only) post peeling. Using this technique, labile particles can be sized, quantified, characterized, and contrasted.

Image 3: Representative photos of shed particles recovered from the tub seal surface (high particle load)

Image 4: Representative photos of shed particles recovered from the lid's surface (low particle load)

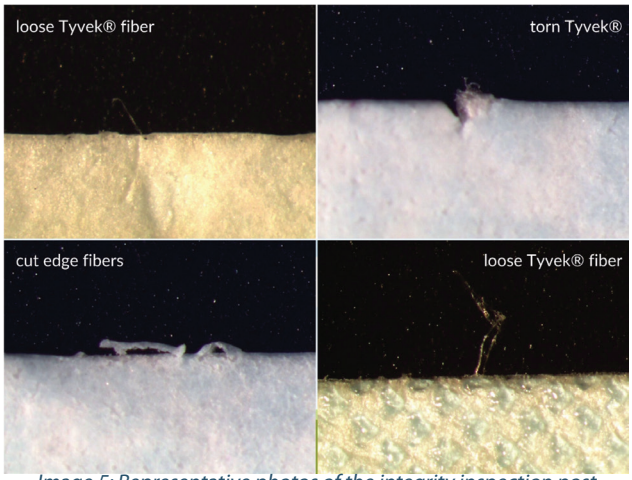


Image 5: Representative photos of the integrity inspection post peeling

Results Summary

Adhesive configuration	Adhesive A	Adhesive B-1	Adhesive B-2	Adhesive C	Adhesive D-1	Adhesive D-2
Sealing parameters	113°C; 5.0 sec; 4.13 bar	121°C; 2.0 sec; 4.13 bar	121°C; 2.0 sec; 4.13 bar	116°C; 2.0 sec; 4.13 bar	121°C; 2.0 sec; 4.13 bar	121°C; 4.0 sec; 4.13 bar
Visual Inspection of Tub Seals (20 tubs per configuration	Wrinkling	No Defects	Seal width 3-4 mm	Bleed through parameters adjusted	Bleed through parameters adjusted	Bleed through parameters adjusted
Dye Penetration (n=20)	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Manual Peel Force; easiest (1) to hardest (6) (n=20)	6	2	1	4	5	3
Instron Peel Force Mean (n=10)	7.89	6.31	6.04	8.54	6.53	7.90
Instron Peel Force - Standard Deviation	1.02	1.01	0.48	1.10	0.53	0.47
Airborne Particulate > 0.5µm (Particles/m³) (n=20)	200.7	383.4	359.3	41.9	25648.5	3299.3
Airborne Particulate > 5.0µm (Particles/m³) (n=20)	8.0	4.0	4.0	12.0	443.2	111.8
Visible Particles on tub flange (n=20)	160	269	187	>800	>800	>800
Visible Particles on Tyvek® (n=20)	96	57	51	60	132	97
Tyvek® Integrity - total defects (n=20)	9	5	3	2	11	20

Table 1: Preliminary screening of adhesives to identify lead candidate
Based on the pre-screening, we selected the adhesive A, B-1, and B-2 for further studies, including the performance pre and post sterilization. s

Discussion

From the data, we draw the following conclusions:

- Various attributes were weighted, and the lead candidate was identified as adhesive A.
- Peel forces (>10N) increased by an average of 12% after EtO sterilization.
- Shed airborne particles >0.5µm for one iteration in particular (B-1) increased >7x after sterilization.
- Higher peel forces were correlated with lower shedding of airborne particles and lid damage.
- Loose particles on the tub flange and seal surface decreased significantly with EtO sterilization. This may be due to the cross-linking of the adhesive by the sterilization process. Further study is required.
- Loose particles were higher on the tub seal surface when compared to the lid post peeling. This poses a problem as the lid is typically discarded after removing while the tub may index deeper into the filling operation when used as secondary containment for the vials.

Based on these findings, further opportunities for improvement were identified and subjected to further studies. The results of these studies are pending.

2. Five focus areas to tackle particle risk

The approach behind these results, which led to reducing the particles generated from the lid material, can be structured in five parameters. In this case study, it was applied at an RTU container supplier, but it could ⇢

Adhesive configuration	Pre-Sterilization			Post-Sterilization		
	Adhesive A	Adhesive B-1	Adhesive B-2	Adhesive A	Adhesive B-1	Adhesive B-2
Sealing parameters	113°C; 5.0 sec; 4.13 bar	121°C; 2.0 sec; 4.13 bar	121°C; 4.0 sec; 4.13 bar	113°C; 5.0 sec; 4.13 bar	121°C; 2.0 sec; 4.13 bar	121°C; 4.0 sec; 4.13 bar
Visual Inspection of Tub Seals (n=20)	No Defects	No Defects	No Defects	No Defects	No Defects	No Defects
Dye Penetration (n=20)	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Manual Peel Force; easiest (1) to hardest (3) (n=20)	3	2	1	3	2	1
Instron Peel Force - Mean (n=20)	7.8	6.7	6.0	8.8	7.4	6.7
Instron Peel Force - Standard Deviation	0.7	0.3	0.5	0.9	0.5	0.7
Airborne Particulate > 0.5µm (Particles/m³); (n=20)	201	383	359	280	2735	879
Airborne Particulate > 5.0µm (Particles/m³); (n=20)	8	4	4	8	24	8
Visible Particles on tub flange (n=20)	160	269	187	25	51	11
Visible Particles on Tyvek® (n=20)	96	57	51	1	5	1
Tyvek® Integrity - total defects (n=20)	9	5	3	26	1	0

Table 2: Lead candidate result summary - Study Phase 2; Pre vs. Post EtO sterilization

easily be applied to a pharmaceutical manufacturing environment as well. Figure 2 outlines the five parameters

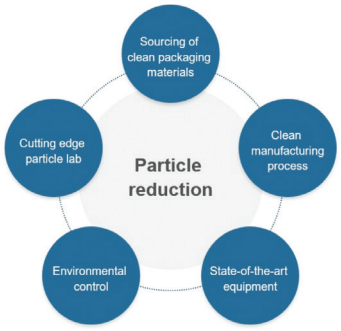


Figure 2: Five steps for particle reduction – a holistic approach

This holistic approach to particle reduction includes sourcing of clean components or packaging materials. When looking at all potential sources of contamination, it is much more effective to collaborate with suppliers that also have controls in place. It helps to understand the capabilities and the manufacturing environment for all incoming materials. Suppliers of non-shedding equipment (cleaning materials, gloves, gowning supplies) or trace-clean contact materials (transfer tubing, HEPA filters, sterilizing filter membranes, housings) will allow the drug manufacturer to focus on utilities, process, and product contact surfaces within the filling suite.

With regards to the RTU packaging itself, it is advantageous for the pharma company if their supplier follows a platform approach since this will lead to more predictable particle scenarios. For example, the SCHOTT iQ® platform uses the industry-standard tub (ISO 11040-7) for all RTU containers. This harmonization allows the use of standard components like the same inlay and lid material across product groups.

Next, special attention is given to a clean manufacturing process and the respective equipment. Legacy production equipment may generate and spread source contamination (belts, accumulation tables, etc.), so state-of-the-art equipment should be evaluated for the potential to reduce particles further.

Understanding the sources of particles and implementing effective controls in production and packaging areas will further reduce contamination. Tight environmental monitoring is an additional feedback loop required for success. In this context, it is important to understand that bioburden control programs do not necessarily double as particle control programs. Individual components must rather be tested 'as received' and verified lot-to-lot as non-shedding. Otherwise, in-house cleaning programs may be required.

All these steps can be augmented only with robust capabilities in lab equipment, isolation techniques, and expertise for particle analysis. For example, in-house forensics lab capabilities are required to isolate, quantify, identify and mitigate sources of contamination. Developing a master reference library (FTIR/ATR; SEM-EDS and elemental) for all materials introduced into the filling suite makes tracking down the source(s) much more efficient. The finished product can tell what is wrong, but it is always too late to do something about it.

There are many opportunities to reduce sources of extrinsic contamination. Following a holistic approach and cooperating closely along the value chain can lead to true innovation in contamination control programs. Eventually, this will bring the pharma industry closer to its goal of becoming 'essentially free from visible particles'.

References

1. Zion Market Research (2019): Global Sterile Injectable Drugs Market https://www.zionmarketresearch.com/news/sterile-injectable-drugs-market [26th May 2019]
2. U.S. Pharmacopeia (2014): USP Chapter [1] Injections, <790> Visible Particulates in Injections, USP 37/NF 32.
3. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology (2015): Industry Perspective on the medical risk of visible particles in injectable drugs products, Vol. 69, No.1
4. Journal of Pharmacovigilance (2014): Particulate Matter in Injectables: Main cause for Recalls, Vol. 3:1 / https://www.longdom.org/open-access/particulate-matter-in-injectables-main-cause-for-recalls-2329-6887-3-e128.pdf [26th May 2019]
5. Laguna Treatment Hospital (2019): Examining FDA Drug Recalls and Adverse Reactions, https://lagunatreatment.com/fda-drug-recalls/, [26th May 2019]
6. PDA (2018): FDA is Advancing New Efforts to Address Drug Shortages, https://www.fda.gov/news-events/fda-voices/fda-advancing-new-efforts-address-drug-shortages [26th May 2019]
7. FDA.(2019): Archive for Recalls, Market Withdrawals & Safety Alerts. https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/archive-recalls-market-withdrawals-safety-alerts [26th May 2019]

eurofins | BioPharma Product Testing

Contact
Laura Hoyez
laurahoyez@eurofins.com

CONTAMINATION MICROBIENNE : VOS ENJEUX, NOTRE EXPERTISE

GÉRER UNE SITUATION DE RISQUE AVÉRÉ :

- Gestion des non conformités
- Identification unilocus/multilocus, typage moléculaire
- *Burkholderia cepacia complex* : prise en charge de A à Z (fertilité, biocidie, USP <60>, identification)

MAITRISER LE RISQUE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS ET LEUR ENVIRONNEMENT :

- Mapping environnemental
- Stratégie de maîtrise de la contamination
- Prélèvement et stockage de vos souches
- Validation de la fertilité des milieux de culture
- Qualification de performance des PSM et hottes à flux laminaire

ANALYSES :

- Gaz, eaux, air, surface
- Filtres (intégrité et étanchéité)
- Produits stériles et non stériles

Qualité microbiologique
Tests de stérilité
Pyrogènes
Challenge tests
ADN résiduel
Activité des biocides
Titrage des antibiotiques
Mycoplasme
Bioburden