

# La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 74 | Juillet 2022  
Trimestriel

Considerations  
for Validating  
Aseptic  
Manufacturing  
Processes?

How manage  
Extractables &  
Leachables Qualification  
of the in-process  
materials?

L'isolateur jetable  
pour le remplissage  
aseptique,  
innovation  
ou hérésie ?

A3P/AFI Survey on  
Sampling & Testing  
Practices for In-Process  
Pre-Filtration Bioburden  
for Sterile Products

## Procédés Aseptiques

# Sommaire

N°74 // Juillet 2022

<b>Édito</b> I Remplissage aseptique .....	3
<b>Ils ont participé à ce numéro</b> I Nos contributeurs .....	4
<b>Billet d'humeur</b> I .....	5
<b>Actualités A3P</b> I Vos prochains rendez-vous A3P .....	6
<b>Réglementaire</b> I Toutes les évolutions .....	7
<b>Actualités A3P</b> I Congrès International A3P / Biarritz .....	9
<b>Procédé Aseptique</b> I Considerations for Validating Aseptic Manufacturing Processes.....	12
<b>Procédé Aseptique</b> I Simulation des procédés de fabrication aseptique de suspensions de nanoparticules ou microsphères : Challenges et facteurs de succès au travers d'un retour d'expérience ...	17
<b>Procédé Aseptique</b> I L'isolateur jetable pour le remplissage aseptique, innovation ou hérésie ? .....	20
<b>Microbiologie</b> I A3P/AFI Survey on Sampling & Testing Practices for In-Process Pre-Filtration Bioburden for Sterile Products: Presentation of the Results & Critical Discussion.....	24
<b>Microbiologie</b> I Projet de norme internationale amené à être amendé PR ISO 11737-3 .....	31
<b>Contrôle environnemental</b> I Real-time detection of CFU growth with the ScanStation® smart incubator expedites the environmental monitoring process.....	37
<b>Automation</b> I MTP: What It is, Why It Matters. Module type package standard is a major step forward for plug-and-produce manufacturing.....	44
<b>Process</b> I How Pemflow / D.O.C. manage Extractables and Leachables Qualification of the in-process materials & primary packaging? .....	47

## La Vague

Revue trimestrielle N° 74 - Juillet 2022  
Numéro offert aux adhérents de l'Association (valeur 10€)

- Directeur de la Publication  
Didier MEYER, Vice-Président A3P  
[dgastonmeyer@gmail.com](mailto:dgastonmeyer@gmail.com)
- Rédactrice en chef  
Anne RIGOULOT
- Comité de lecture  
Frédéric BAR, Frédéric ESTASSY, Arnaud HUC, Hervé TASSERY, Lauriane ZUCHUAT
- Coordination & DA-conception  
Sophie TORGUE  
[storgue@a3pservices.com](mailto:storgue@a3pservices.com)
- Impression  
VL développement  
42000 Saint-Just-Saint-Rambert
- Editeur  
A3P Association  
30, rue Pré Gaudry - 69007 Lyon
- Dépot légal à parution  
N° d'ISSN : 1298-0471

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

Imprimé sur du papier issu de forêts durables.



## L'adhésion A3P évolue !



Inscrivez le site\* de votre entreprise & faites bénéficier de tous les avantages à l'ensemble de vos collaborateurs.

Faire partie du réseau A3P, recevoir tous les trimestres sur votre bureau la version papier du magazine, et depuis votre espace personnalisé sur le site A3P, bénéficier de tous les contenus techniques, scientifiques et réglementaires, accéder aux annuaires adhérents et sociétés, participer à des événements privilégiés, utiliser l'application mobile, ...



Tout le contenu des événements A3P  
conférences, ateliers, ...



Réglementaire  
veille, warning letter, ...



Tous les Guides Techniques & scientifiques



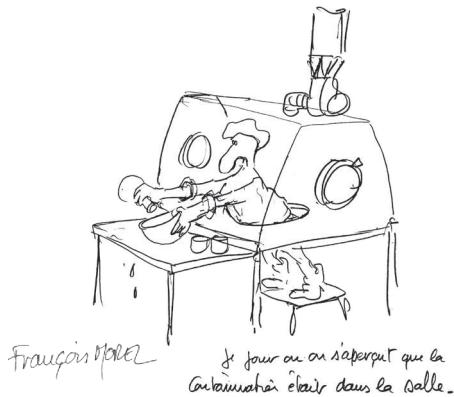
Annuaire des membres du réseau

Toutes les infos sur [www.a3p.org/adhesion/](http://www.a3p.org/adhesion/)

\*La cotisation Site fait référence à une adresse postale d'un laboratoire de production d'une société prestataire / fournisseur ou d'un siège social. Le montant est défini selon le nombre de salariés attachés au site. Cotisation valable 1 an de date à date et dans tous les pays où l'Association A3P est représentée.

Edito  
Par Julien TRIQUET - membres du CA A3P

# Remplissage aseptique.



Nous exerçons l'un des métiers les plus réglementés de l'industrie.

Aux chapitres généraux des GMP, s'ajoute l'Annex 1 qui est spécifique de la fabrication des médicaments stériles.

Depuis 2014, A3P s'est engagé auprès de l'EMA dans le process de révision de l'EU GMP Annex 1 aux côtés d'autres associations. Le nouveau texte proposera une évolution majeure de notre environnement réglementaire et sera articulé autour de sa colonne vertébrale qu'est la Contamination Control Strategy : de la conception, à l'exécution opérationnelle des procédés et enfin à leur surveillance.

Ne perdons jamais de vue que ces requis réglementaires sont la garantie de fabriquer des médicaments stériles et injectables sûrs pour nos patients. Poussée par les pandémies, et par la nécessité de réduire le "time to market" au bénéfice des patients, une mutation s'opère dans le développement et la fabrication des médicaments stériles. Ils couvrent des produits de plus en plus personnalisés et individualisés pour les patients, des produits issues de la biotechnologie, des Médicaments de Thérapies Innovantes qui représentent parfois un seul lot de petite taille administré en temps réel à un patient, ainsi que des productions de vaccins et produits stériles classiques à grande échelle produits par des procédés à haute cadence.

Les GMP n'ont pas vocation à décrire tous les process et à couvrir toutes ces typologies de produits, c'est donc ici que leur interprétation et l'utilisation de QRM (Quality Risk Management) pour concevoir des process aseptiques innovants et parfois alternatifs, prennent tout leur sens. Ce contexte nouveau transforme l'industrie et impactera les choix technologiques ainsi que nos façons de travailler pour les décennies à venir. Les enjeux pour notre industrie sont donc majeurs et il n'a jamais été aussi important de les comprendre.

Les nouvelles plateformes technologiques doivent donc répondre à la conformité aux exigences de l'Annex 1 dans leur design et dans leur exécution, favorisant l'utilisation des systèmes clos et systèmes à usage unique, des Technologies Barrière, de l'automatisation et de la robotique pour améliorer l'efficacité des process aseptiques et surtout la maîtrise de la contamination, tout en diminuant les process plus manuels sources d'erreurs humaines et la présence des opérateurs au plus proches des activités aseptiques.

Enfin, l'évolution des process aseptiques ne se résume pas à la technologie. Les équipes et leurs compétences sont des facteurs clés de succès. La future Annexe 1 insiste d'ailleurs largement sur les compétences stériles et les besoins de formations spécifiques associés. À présent les grandes lignes de la future Annex 1 sont connues et notre industrie a déjà pris le virage de sa mise en conformité. Le défi que nous devons relever se projette donc sur deux axes : le déploiement de ces requis réglementaires d'une part, dans un contexte d'accélération pour préserver l'agilité de nos process et donc leur modularité et leur flexibilité, d'autre part. Certains diront que ces deux axes pourraient être antagonistes, faisons en sorte qu'ils deviennent complémentaires !

**Et vous, êtes-vous "Annex 1 ready" et prêts à relever ce défi ?**

## Merci à nos Contributeurs

# Ils ont participé à ce numéro

**David BARBER****Richard CHAI**  
STERIS**Rédacteurs de " MTP: Considerations for Validating Aseptic Manufacturing Processes"**

David Barber was an independent Consultant in China between 2013 and 2021, following a career in medical device and pharmaceutical manufacturing with expertise in parenteral drugs, quality systems, GMP compliance and guiding plants through regulatory inspections. From 1981-2000 he held positions with BD, Fisons, Delta Biotech and Serono, and from 2000-2012 supply chain QA positions with GE Healthcare in Ireland, Norway, and China and led a company sterility assurance Centre of Excellence from 2008-2011. Prior to 1981 he obtained a PhD from University of Salford in UK, held research positions at the Universities of Notre Dame and Texas in USA, and was a Research Fellow in pharmaceutical microbiology at the University of Manchester, UK.

Richard Chai is a Technical Service Manager in the Life Sciences Division of STERIS Corporation. He currently provides global technical support related to process equipment cleaning and contamination control in cleanrooms. Richard has more than 20 years of industry experience in manufacturing, validation, consultancy and technical support. He has published several articles in contamination control, and has visited manufacturing facilities in the US, Europe and across Asia providing technical support and training. Richard holds a bachelor's degree in Mechanical and Production Engineering from Nanyang Technological University, Singapore.

**Franck PAVAN**  
GTP BIOWAYS**Rédacteur de " L'isolateur jetable pour le remplissage aseptique, innovation ou hérésie ?"**

Directeur de GTP Nano, Franck est diplômé de l'INSAT en génie biochimique. Il a occupé différents postes de direction opérationnelles et stratégique au sein de plusieurs laboratoires pharmaceutiques français et européens. Actuellement en charge du développement et des activités de formulation et de Répartition aseptiques de thérapies innovantes, il est à l'initiative depuis plusieurs années d'innovations importantes dans le domaine du remplissage aseptique. Il dispose de plusieurs décennies d'expérience dans les flacons, les ampoules et seringues liquides ou lyophilisées avec une spécialisation dans les stériles toxiques.

**Derrick TAPSCOTT**

GLOBAL INDUSTRY CONSULTANT LEADER

**TVijayant KAURA**

CPG &amp; LIFE SCIENCES

**Rédacteurs de " MTP: What It Is, Why It Matters"**

Derrick leads a team of consultants who help customers with their biggest industry challenges. He has 25 years of experience in process industries and actively participates in BioPhorum's Plug and Play, Big Data to Smart Data, and Digital Roadmapping activities.

Vijayant has more than 28 years of experience supporting OEMs and integrators across a variety of industries while providing his expertise with machine and line upgrades, as well as new-machine and new-line integrations.

**Isabelle HOENEN**

LILLY FRANCE S.A.S

**Rédactrice de " A3P/AFI Survey on Sampling & Testing Practices for In-Process Pre-Filtration Bioburden for Sterile Products: Presentation of the Results & Critical Discussion."**

Isabelle received her Doctorate in Pharmacy and Master's Degree in Industrial Microbiology from the University Louis Pasteur, Strasbourg in 1994. Prior to Lilly, she worked as an aseptic practices trainer at Rhone Poulen Rorer near to Paris. In 1995, Isabelle joined the Quality Department at Lilly Fegersheim where she occupied several roles including Environmental Monitoring Team Leader, Sterility Assurance Specialist, Project Leader, Quality Lead for a Global Worldwide Cartridge lines implementation program. Isabelle is also a certified Six sigma green belt. Since June 2017, Isabelle works as Quality Consultant for Sterility Assurance, providing deep compliance and technical expertise during site and global assessments, projects, investigations, technical audits, regulatory inspections and new requirements. Isabelle is also active in several technical and scientific industries associations such as A3P, PHSS, ECA, EPIA, LEEM (with among other topics, special focus on the new revision of the EU GMP Annex 1, Contamination Control Strategy, Aseptic Processing) and member of the PDA & ISPE.

**Céline PEREZ**

GROUPE ICARE

**Rédactrice de " Projet de norme int. amené à être amendé PR ISO 11737-3**

Docteur en Pharmacie, Céline travaille dans le domaine des dispositifs médicaux depuis près de 20 ans. Elle est maintenant Pharmacien Responsable et Directrice des affaires réglementaires au sein du groupe ICARE, expert dans la maîtrise de la sécurité des produits de santé depuis plus de 25 ans. Elle est également membre de plusieurs commissions de normalisation françaises et européennes (Evaluation biologique des dispositifs médicaux, salles propres, stérilisation et désinfection) afin d'anticiper et de participer aux nombreuses évolutions normatives du secteur.

**Sonia TOUKAM**

DELPHARM

**Cédric PALOMARES**

DELPHARM

**Rédacteurs de " Simulation des procédés de fabrication aseptique de suspensions de nanoparticules ou microsphères"**

Sonia assure ce poste de chef de projet depuis 2015. Titulaire d'un diplôme de pharmacie ; j'ai débuté ma carrière à Sanofi Le Trait (dans le secteur du miroir des seringues remplies de suspension d'anticorps monoclonaux), puis à Ceva Santé animale à Libourne (transfert d'un produit injectable d'un site de production à un autre) et aujourd'hui à Delpharm Dijon où je travaille dans le développement et transfert d'une suspension de nanoparticule.

Cédric PALOMARES travaille pour Delpharm Dijon, dans le service des nouvelles technologies en tant que chef de projet. Sa mission principale est le développement, le transfert et la mise en routine de la fabrication de microsphères et de leur répartition aseptique.

Il est titulaire d'un diplôme de pharmacien et est ingénieur en génie des procédés.

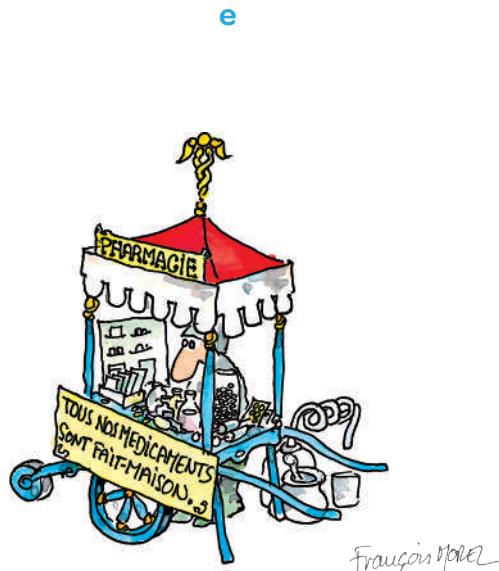
**Antonio LEGNANI****Rédacteur de "How Pemflow / D.O.C. manage Extractables and Leachables Qualification of the in-process materials and primary packaging"**

Antonio Legnani graduated in Biology with master's degree in microbiology and Molecular Biology at Milan University (Italy) in 1992. Pemflow & Antonio Legnani are currently answering the current needs of the Biopharm Industry to secure the supplies of Qualified and Validated Filtration and SUT products. He worked in Pall Corporation for more than 20 years covering the area of Process Validation Services for the Pharmaceutical and Medical division starting as Head of Microbiological and Validation Laboratory Dpt and then appointed as Technical Director of Pall Italy s.r.l. From March 2015 Technical Director/Validation Director in D.O.C. srl Consultancy & Validation company within MASCO group (RAG). He is a steering committee member of Parenteral Drug Association (PDA Italy Chapter) and he is a qualified trainer for regulatory agencies (AIFA, ANM, EOF, ANVISA).

**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 Olivier CHANCEL - Membre du CA A3P



François Morel

*Je dois l'avouer et même si je suis beaucoup moins atteint que d'autres dans mon entourage, le contexte actuel me pèse bien un peu. Les conflits armés, les périodes d'élection, la situation économique, la pandémie... finissent bien par m'alourdir l'esprit.*

*Heureusement, le pilier familial reste un support sans égal permettant de retrouver le sourire et de se rappeler où se trouve l'essentiel, de rappeler ce pourquoi nous peinons, ce qui doit être défendu coûte que coûte.*

*Support sans égal ? quoi que...*

Récemment, mes enfants m'ont un peu frustré parce que lorsque je leur ai demandé de faire des soi-disant "corvées" dans la maison pendant une période de vacances, ils ont fait de leur mieux pour le faire en un minimum de temps sans trop regarder le résultat. Inévitablement, j'ai dû les rappeler pour finir et, tristement, je me suis rendu compte que mes enfants avaient perdu de vue l'importance et la satisfaction du linge bien plié, du sol bien propre, du couvert mis à l'heure... bref, l'importance du "travail bien fait" ! Il faut se rendre à l'évidence, je n'avais pas réussi à leur faire apprécier que la récompense de tout labeur commence par un travail bien fait ou par la satisfaction d'être fier de son travail.

Cela m'a fait réfléchir. A quelle fréquence, en tant qu'adultes, fuyons-nous nos responsabilités au travail et dans la vie lorsque la tâche n'est pas notre préférée ou n'est pas dans notre description de travail ? À quel moment sommes-nous en train de terminer un travail pour passer à quelque chose que nous aimons davantage au lieu de nous concentrer sur le travail bien fait ? Et ce faisant, que perdons-nous ? Que perdons-nous au fond de nous-même ?

Loin d'être désuète, la valeur d'un travail bien fait ne change pas seulement la qualité de notre travail, cela nous réengage. La satisfaction qui consiste à rechercher des éloges et de l'attention est éphémère. Elle n'est pas durable et a toujours besoin d'être nourrie par davantage d'éloges et d'attention. En revanche, creuser plus profond et produire des résultats de qualité supérieure, peuvent nous pousser à être plus concentrés, créatifs, réfléchis, collaboratifs, etc... Et cerise sur le gâteau, notre plaisir et notre satisfaction dans le travail peuvent s'en trouver considérablement augmentés.

Nul doute qu'il y a beaucoup de gens dans notre entourage professionnel ou affectif qui se sentent parfois sous-estimés et certains méritent à juste titre des promotions et des augmentations. Inversement, d'autres personnes ne recevront pas de grandes rémunérations mais continueront à se réaliser pleinement dans leurs réalisations. Peu importe la situation, et sans remettre en cause la juste rémunération du travail, un travail bien fait peut changer à la fois notre expérience de travail et celle de vie en rapportant probablement de plus gros dividendes à la fin, à la fois en termes de satisfaction personnelle et très probablement de réussite professionnelle.

En fin de compte, la seule personne que je contrôle, c'est moi-même et ce n'est peut-être pas si mal. Que faire à mon niveau contre les tyrans, la COVID ou l'inflation ou dans des domaines que je ne maîtrise pas ? Je ne sais pas. En revanche, quel bénéfice, quelle satisfaction immédiate et durable que le sentiment du travail bien fait... et de faire comprendre aux enfants qu'ils n'ont plus besoin d'argent de poche pour plier le linge dans les règles de l'art !!



## A3P continue de vous accompagner. Découvrez les thèmes abordés au second semestre

### ROUGING / DEROUGING

Impact produit / Gestion & Analyse de risque / Prévenir, Limiter & Dérouger / Identification, Monitoring & Analyse

**21, 22 SEPTEMBRE**



Lyon

### SINGLE USE

Forum A3P Suisse

**27 SEPTEMBRE**



Lausanne (SUISSE)

### CONGRES INTERNATIONAL A3P

Procédés aseptiques / Inspection visuelle / CCIT / Les bénéfices d'une production responsable

**11, 12, 13 OCTOBRE**



Biarritz

### ASEPTIC PROCESSING: ISOLATORS & RABS

Barrier systems/Impact of Annex1/Glove management/ Media fill approaches...

**27 OCTOBRE**



Barcelone (ESPAGNE)

### A3P BELGIQUE

Usine 4.0 : Digitalisation d'une usine de production

**17 NOVEMBRE**



Liege (BELGIQUE)

### BARRIER TECHNOLOGY

Rabs & Isolateurs

**17 NOVEMBRE**



Milan (ITALIE)

### PURIFICATION DSP

Clarification / Chromatographie / Nanofiltration / Concentration / Diafiltration ...

**29 NOVEMBRE**



Lyon



Programmes & inscription  
[www.a3p.org](http://www.a3p.org)

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
EDQM	<b>Publication de Pharmeuropa 34.1</b> <i>Tous les nouveaux textes et les textes révisés pour des raisons techniques sont publiés dans Pharmeuropa pour enquête publique. La date limite de réception des commentaires pour Pharmeuropa 34.1 est le 31 mars 2022. Parmi les 56 projets de textes publiés, on trouve notamment le chapitre général 5.27. Comparabilité des procédures analytiques alternatives</i>	Draft	4/04/2022
EMA	<b>EMA/409815/2020 Rev.9 - Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products</b> <i>Révision du Q&amp;A de l'EMA sur l'évaluation des risques liés aux nitrosamines</i>	Q&A	25/05/2022
FDA	<b>Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production Guidance for Industry</b> <i>Cette ligne directrice propose une approche sur l'investigation des résultats des tests OOS, en intégrant les responsabilités du personnel de laboratoire, la phase d'investigation au sein du laboratoire et les tests complémentaires qui peuvent être nécessaires. Elle traite également du moment où l'investigation est étendue en dehors du laboratoire, et de l'évaluation finale de tous les résultats des tests.</i>	Final	16/05/2022
ICH	<b>Guideline for Elemental Impurities Q3D(R2)</b> <i>Publication en step 4 d'une nouvelle version du guide ICH Q3D(R2) sur les impuretés élémentaires. Les modifications concernent la correction des PDE pour l'or, l'argent et le nickel, et la définition des limites des impuretés élémentaires par voie cutanée et voie transcutanée (nouvelle annexe 5).</i>	Final	26/04/2022
MHLW / PMDA	<b>Japanese Pharmacopoeia 18th Edition</b> <i>Publication en anglais de la 18eme édition de la Pharmacopée Japonaise</i>	Final	15/04/2022
USP	<b>USPNF 2022 Issue 2</b> <i>Publication de nouveaux chapitres généraux et monographies, applicables à partir du 1er mai 2022 ou 1er août 2022. A noter le nouveau chapitre général &lt;665&gt; "Plastic Components and Systems used to Manufacture Pharmaceutical Drug Products and Biopharmaceutical Drug Substances and Products", applicable au 1er mai 2026.</i>	Final	26/04/2022
USP	<b>USPNF 2022 Issue 3</b> <i>Publication de nouveaux chapitres généraux et monographies, applicables à partir du 1er décembre 2022 ou 1er juin 2023.</i>	Final	1/06/2022

### Inspection – Inspection

Origine	Titre	Type	Date
PIC/S	<b>PIC/S Work Plan for 2022</b> <i>Publication du plan de travail du PIC/S pour 2022, présentant, entre autres, les projets d'harmonisation des GMP ou de révisions de guidances.</i>	Plan	16/05/2022

## Développement - Development

Origine	Titre	Type	Date
FDA	<b>Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials - Guidance for Industry</b> <i>Lignes directrices sur le développement de médicaments à usage humain dans lesquels un nanomatériau est présent dans le produit fini.</i>	Final	21/04/2022
FDA	<b>Benefit-Risk Considerations for Product Quality Assessments</b> <i>Ce guide décrit les principes de bénéfices-risques appliqués par la fDA lors des évaluations relatives à la qualité du produit des informations CMC.</i>	Draft	9/05/2022

## Dispositifs Médicaux - Produits Combinés

Origine	Titre	Type	Date
EC	<b>MDCG 2022-5 - Guidance on borderline between medical devices and medicinal products under Regulation (EU) 2017/745 on medical devices</b> <i>Document de clarification sur l'application du règlement sur les dispositifs médicaux (MDR) pour les produits « borderline » entre dispositifs médicaux et médicaments à usage humain.</i>	Final	26/04/2022
EC	<b>MDCG 2022-11 - MDCG Position Paper: Notice to manufacturers to ensure timely compliance with MDR requirements</b> <i>Précisions sur les conditions d'implémentation du MDR.</i>	Proposition	13/06/2022
FDA	<b>Cybersecurity in Medical Devices: Quality System Considerations and Content of Premarket Submissions: Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff</b> <i>Ce document s'applique aux dispositifs médicaux qui contiennent un logiciel (y compris firmware) ou un programme, ainsi qu'aux dispositif médicaux logiciels (SaMD). Ce guide décrit les recommandations concernant les informations à soumettre en termes de cybersécurité.</i>	Draft	8/04/2022

## Fabrication – Manufacturing

Origine	Titre	Type	Date
EMA	<b>Annual report of the Good Manufacturing and Distribution Practice Inspectors Working Group 2021</b> <i>Publication du rapport annuel du groupe de travail des inspecteurs GMP/GDP (GMP/GDP IWG) pour l'année 2021</i>	Rapport	20/04/2022

## Système Qualité - Quality

Origine	Titre	Type	Date
EMA	<b>Overview of comments received on ICH guideline Q9 (R1) on quality risk management (EMA/CHMP/ICH/24235/2006)</b> <i>Synthèse des commentaires reçus par l'EMA après la publication en novembre 2021 du draft de la révision 1 du guide ICH Q9</i>	Draft	20/04/2022
EMA	<b>Public Consultation Concerning the Physical Attendance and the Location of Personal Residency of the Qualified Person</b> <i>Consultation publique de l'EMA visant à alimenter la réflexion du groupe de travail des inspecteurs GMDP sur le besoin de flexibilité concernant les exigences de présence physique du QP sur site pour la libération des lots en routine, en dehors d'une situation d'urgence.</i>	Consult. public	11/05/2022

## Conditionnement/Distribution - Packaging/Distribution

Origine	Titre	Type	Date
FDA	<b>Risk Management Plans to Mitigate the Potential for Drug Shortages</b> <i>Proposition de ligne directrice pour la mise en œuvre d'un plan de gestion des risques (PGR) afin de prévenir les pénuries de médicaments à usage humain et de produits biologiques</i>	Draft	19/05/2022

En collaboration avec



## Actualité



# CONGRES INTERNATIONAL A3P

**1 ville :** Biarritz

**3 jours :** 11, 12 & 13 octobre

**3 formats :** conférences, ateliers, exposition

**3 thèmes :** Inspection visuelle, Procédés Aseptiques, Bénéfices d'une production responsable

## 19 Conférences

### Inspection visuelle - CCIT

❖ Présentation du sujet "Inspection visuelle - CCIT"	Cécile CHOPINET SANOFI & Valérie RAUTUREAU LILLY
❖ Principaux constats relatifs aux inspections ANSM en 2020 et 2021 Annex1 : retour sur les chapitres dédiés aux mirages.	Gabriel BERBARI ANSM
❖ Validation d'un procédé d'inspection visuelle. Etablissement d'un standard et des critères d'acceptation pour la qualification et démonstration d'équivalence.	Cécile CHOPINET SANOFI & Valérie RAUTUREAU LILLY
❖ Comment surveiller et réduire le faux-rejets lors du mirage automatique ?	Alban LANGLOIS ASPEN & Steven MAZOUIN NOVONORDISK
❖ Comment évaluer la qualité d'un lot à partir des rejets et comment prévenir d'un risque lié à la génération de défauts.	Delphine AMOURET ASPEN & Sabrina DI VICO LEO PHARMA
❖ Mirage d'une solution alcool/huile, approche et défi technique	Anne JORGET & Florent MABBOUX DELPHARM
❖ En route vers la digitalisation de l'inspection visuelle	Romain VEILLON GSK
❖ Avantages et faiblesses de la méthode d'inspection de fuites par le HSA	Aurélien GENET GSK
❖ Ensuring Container Closure Integrity of a COVID-19 Vaccine Product Requiring Ultra-Cold Chain Storage and Distribution: A Holistic Science-Based Approach.🇬🇧	Michael EDEY PFIZER & Derek DUNCAN LIGHTHOUSE

### Procédés Aseptiques (Annex1, MFT, APS ...)

❖ Présentation du sujet "Procédés Aseptiques (Annex1, MFT, APS ...)" Deploying Annex 1 Changes ...The skills and competencies required 🇬🇧	Julian KAY GSK & Julien TRIQUET GSK VACCINES
❖ Titre à confirmer	Abdelaali SARAKHA ANSM
❖ Intégration PUPSIT dans le contexte CMO	Pierre DEVAUX THERAXEL & TBC
❖ Comment définir et garantir les conditions "worst case" lors de la réalisation d'un test de simulation (APS) pour un produit lyophilisé	Sandrine FAVRE OCTAPHARMA & Dominique SIERAKOWSKI DS ASEPTIC COMPLIANCE
❖ Points clés, tendances et défis actuels relatifs aux simulations des processus aseptiques	Isabelle HOENEN LILLY
❖ La dynamique humaine et l'intelligence collective au service de risk based approach. Comment améliorer l'assurance de la stérilité (CCS) et la performance ?	Antoine AKAR HUMANIM LIFE SCIENCES & TBC

### Bénéfices d'une production responsable

❖ Présentation du sujet "Bénéfices d'une production responsable"	Samah Ringa VEOLIA
❖ Novo Nordisk. Le développement déjà engagé pour une santé durable	Xavier ROQUES NOVONORDISK
❖ Evolutive Vaccine Facility et neutralité carbone. Quelles solutions durables innovantes pour une nouvelle unité de production agile ?	Ana ALVES & Patrick POMMARÈS SANOFI
❖ Evolution des considérations environnementales d'un site de Biomanufacturing	Jerome PINCHON & Jean-François MICHEL MERCK BIODEVELOPMENT

## Actualité

# CONGRES INTERNATIONAL A3P

## 17 Ateliers

-  #1 Contamination Control Strategy : comment déployer une CCS (niveau débutant)
-  #2 Contamination Control Strategy : étude de cas (niveau confirmé)
-  #3 Prévention des contaminations lors des productions aseptiques ou stériles
-  #4 Pas de problème = pas d'amélioration.  
Les outils Lean, l'état d'esprit LEAN et des solutions concrètes pour augmenter les performances
-  #5 Monitoring et data integrity. La clé de la maîtrise de la qualité des eaux pharmaceutiques
-  #6 Apprivoiser mes émotions et celles des autres pour adopter une gestion du stress efficace.
-  #7 Comparaison de deux approches pour la Qualification à l'inspection visuelle et la démonstration d'équivalence (inspection manuelle, semi-automatique et automatique)
-  #8 Utilisation d'un équipement d'inspection automatique en routine et conservation de son état qualifié
-  #9 Comment documenter simplement les activités de remplissage aseptique pour que l'opérateur les comprenne et les respecte ?
-  #10 Mise en place d'une technologie barrière sur un process existant : options étudiées, challenges sur la solution retenue
-  #11 CCIT
-  #12 Comment définir la criticité d'une déviation et la profondeur d'investigation
-  #13 Mise en œuvre d'un projet de nouvelle unité de production à technologie Single Use
-  #14 Maîtrise de la cross-contamination dans les technologies barrières
-  #15 Impact de l'évolution de l'annexe 1 sur la validation du bio-nettoyage
-  #16 Vérification des méthodes Pharmacopée
-  #17 Atelier étudiant.  
Une journée d'immersion dans l'industrie pharmaceutique : l'eau EPPI, l'environnement et ZAC, le contrôle et la qualité, le réglementaire



## Actualité

# CONGRES INTERNATIONAL A3P



### + de 120 exposants

ABC TRANSFER / AEROMETRIK / AKTEHOM / ALBHADES / ALFA LAVAL / AMPHENOL ADVANCED SENSORS – KAYE / AMSONIC – HAMO / ASSOCIATES OF CAPE COD / ATEC PHARMATECHNIK / ATRYON / AVN / AZBIL TELSTAR FRANCE / BACCINEX / BATIMPRO CHARRIER / BAUSCH + STRÖBEL / BECKMAN COULTER / BIOMERIEUX / BIOPHARMA TECHNOLOGIES / BWT / CARBOGEN AMCIS / CARSO LSEHL / CCIT / CHARGEPOINT TECHNOLOGY / CHARLES RIVER LABORATORY / CHRISTEYNS / CONFARMA FRANCE / CONFORMAT / CONTEC INC / COPHACLEAN / DEVEA / ECOLAB / ELIS CLEANROOM / ELLAB / ENDRESS+HAUSER / EREA / EUROFINS BPT / FPS / GASPOROX / GETINGE FRANCE / GIVE & TECH / GOMETROLOGIE / GROUPE ICARE / GROUPE JBT / HAMILTON BONADUZ / ILC DOVER / IMA FRANCE / INITIAL-CLEANROOMS / INTERSCIENCE/ INTERTEK FRANCE / IWT CLEANING EXCELLENCE / JCE BIOTECHNOLOGY / KÖRBER / LABORATOIRE HUCKERT / LAPORTE EURO / LDI BOURSIER SOGREG / LIVES INTERNATIONAL / LONZA / LSB LA SALLE BLANCHE / LUCISBIO / MERCK / MESALABS / METTLER TOLEDO / NEOVIX BIOSCIENCES / NORDTEST / NOVATEK INTERNATIONAL / OPTIMA PHARMA / OXY'PHARM / PALL CORPORATION / PAMAS / PARKER HANNIFIN FRANCE / PFEIFFER VACUUM / PHARMAPLAN (TTP GROUP) / PHARMASEP / PHARMTEC / PMT FRANCE / PQE FRANCE / PROSYS ISOLATORS / RAPID MICRO BIOSYSTEMS / REALCO / REPHINE / ROMACO / ROMMELAG / RT2I / SALAMANDERU / SARTORIUS / SCHOTT / SCHREINER MEDIPHARM / SCHÜLKE FRANCE / SGS HEALTH SCIENCE / SIDJI / SKAN / SOFAST / SOLIDFOG TECHNOLOGIES / STÄUBLI / STERIFLOW / STERIGENE / STERILINE / STERIS LIFE SCIENCES / SUEZ WATER TECHNOLOGIES ET SOLUTIONS / SWAN / SYMBIOSE ENVIRONNEMENT / SYNTEGON TECHNOLOGY / SYSTEM C INDUSTRIE / TECHNIP ENERGIES / TECHNOCHIM / TEG / TERANGA GROUPE / THERAXEL / TISELAB / VALTRIA / VENAIR / VEOLIA WATER TECHNOLOGIES / WARANET SOLUTIONS / WILCO

Programme & inscription  
[www.a3p.org](http://www.a3p.org)



# Considerations for Validating Aseptic Manufacturing Processes.

Richard Chai & David Barber - Steris

Richard\_Chai@steris.com

In contrast to manufacturing process validation (PV), aseptic processing validation demonstrates a low level of contamination risk associated with the aseptic process by simulating the manufacturing process using microbiological growth media in place of the intended drug solution. The use of media for this purpose is known as Aseptic Process Simulation (APS) or “media fills”<sup>(1)</sup>, and regulators require demonstration of the aseptic capability of such processes, where terminal sterilization cannot be used.



A successful APS program has four requirements:

- 1) significant operator training, skills, and supervision;
- 2) effective maintenance, cleaning, and disinfection;
- 3) operational oversight by quality assurance; and
- 4) microbiological monitoring. Sterility assurance in aseptic processing requires all contributing elements to be qualified or validated—such as the heating ventilation and air conditioning (HVAC) systems, cleanroom environment, material transfer, equipment, and manufacturing process steps, including sterilization processes and sterilizing filtration—and for operating personnel to be trained and qualified.

An APS program consists of a minimum of three successful initial media simulations, followed by repeat media simulations at six-monthly intervals. Any media fill failures require thorough investigation and root cause analysis; further media simulations may be required.

Aseptic manufacturing is typically carried out in conventional cleanrooms with container filling and stoppering in Grade A laminar airflow (LAF) in a Grade B background environment. The filling environment may be further protected by a restricted-access barrier system (RABS) with glove ports to access the filling line, or processing equipment for critical steps may be enclosed in glove boxes or isolators. Each of these enhances the sterility assurance of the filling process and presents challenges for material transfer, operator access, environmental monitoring, and APS.

## 1. Overview of Global Regulations

Aseptic manufacturing and validation follow current GMPs and related GMP Annexes or guidance documents. The regulations govern the validation, manufacture, and control of sterile products for injection (also eye drops and advanced therapy medicinal products). Current guidelines<sup>[2-10]</sup> come from the European Union/Pharmaceutical Inspection Convention (EU/PICS), the United States Food and Drug Administration

(US FDA), and the World Health Organisation (WHO) and may be inspired by the International Organisation for Standardization (ISO) and the Parenteral Drug Association (PDA) monographs<sup>[11-14]</sup>, such as those relating to cleanroom air-cleanliness classification<sup>[13]</sup> and particle monitoring<sup>[14]</sup>.

Parenteral drug products are assessed as having a high safety risk profile; thus, the protocols, results, and reports for APS form an integral part of regulatory submissions such as investigational new drug (IND) applications, new drug applications (NDAs), and marketing authorizations (MA). GMP documents such as training records, environmental monitoring reports, deviations and investigations, and qualification of facilities, equipment, and utilities may be scrutinized during regulatory inspections.

APS must achieve three consecutive media fill batches meeting target acceptance criteria. The solution filtration process must be validated against a microbial challenge with 107 colony-forming units per square centimeter of the filter medium of *Brevundimonas diminuta*, a small-celled Gram-negative bacterium to be suspended in the drug solution. Media fill batch sizes and acceptance criteria incorporated in GMP Annex<sup>[3]</sup> and Guidance<sup>[7, 8]</sup> include:

- Filling less than 5,000 units, zero contaminated units should be detected. A contaminated unit is considered a cause for revalidation following an investigation.
- Filling 5,000 to 10,000 units; one contaminated unit should lead to an investigation, including consideration of a repeat media fill. Following the investigation, two or more contaminated units are cause for revalidation.
- Filling more than 10,000 units; one contaminated unit should lead to an investigation, and two or more contaminated units are cause for revalidation.

Regulatory inspections in aseptic manufacturing companies have increased, and the number of monoclonal antibody and advanced therapy medicinal products requiring aseptic filling has grown.

Some typical examples of GMP failures and APS issues that have appeared in warning letters and summaries by regulators are as follows:

#### **"Inadequate Smoke Studies**

Our inspection found that you lacked smoke studies to evaluate whether unidirectional airflow exists on your (b)(4) ointment aseptic processing line.

#### **Inadequate Media Fills**

Your media fill program was inadequate. Simulations were not performed at a sufficient frequency and were not representative of worst-case production conditions."

FDA Warning Letter 320-17-48 dated August 31, 2017

Other typical audit observations related to media fills are shown below:

- Media Fill Design
- Fill and incubate insufficient vials
- Incorrect incubation conditions or duration
- Failure to carry out adequate growth promotion testing of media batches

- Lack of evaluation by smoke studies on the effects of interventions on unidirectional (laminar) airflow
- Interventions in media fill not representative of actual process interventions by operators
  - Operational
  - Failure to reconcile and incubate all integral media filled vials
  - Media fill is not performed after significant activities such as major facility shutdowns that may compromise cleanroom state of control.
  - Media Fill Failure Investigations
  - Failure to identify the microorganisms in contaminated media units to species level.
  - Thorough investigation not performed to determine the root cause prior to repeating media fill.
  - Operator behavior
  - Poor aseptic technique such as rapid movement in critical areas, and failure to sanitize gloved hands periodically.
  - Inadequate training of media vial inspectors to examine media-filled units following incubation.

## **2. Points to consider for media fills**

The following points should be considered when designing the media fill study for an aseptic manufacturing process.

#### **Worst-Case Approach in APS**

The aseptic manufacturing process should involve a "worst-case" approach as a challenge to the robustness of the aseptic operations. Risk assessment principles should be used to determine the worst-case challenges related to line speed, container size, batch size, holding times, configurations, and operating conditions.

Examples of worst-case challenges:

#### **Operating conditions**

- Maximum number of personnel in aseptic area
- Shift changes, personnel changes, and operator breaks
- Equipment/room clean hold time
- Equipment sterilization hold time
  - **Filling process**
- Aseptic assembly of equipment and aseptic connections prior to filling
- Slowest filling speed with widest opening vials/containers
- Maximum fill volume for small vials/containers
- Maximum batch filling duration (including lyophilizer loading and door opening duration)
- Operator fatigue as contamination risk

#### **Process Interventions**

The regulatory expectation is that interventions included in APS must be compliant with current GMPs, and APS must not be used to justify poor aseptic practice or equipment design.

Routine interventions should be performed as per standard operating procedures or batch records. They may include charging stopper and seal hoppers, removing jammed stoppers or toppled vials, and collecting samples for environmental monitoring or in-process control. Interventions to be followed in the event of

...→

machine jams and spills may include partial line clearances, including removal of exposed units. Nonroutine interventions may include changing filling needles or unexpected events such as breakdown maintenance, line stoppages, machine adjustments, and material transfers. Interventions may be grouped by access point, and their risk assessed so that worst-case (highest risk) interventions are included in the study.

### **Simulation of Lyophilization in APS**

EudraLex Annex 1 (2009)<sup>[3]</sup> states, "The process simulation test should imitate as closely as possible the routine aseptic manufacturing process...". It is unlikely that a product lyophilization cycle can be replicated during media simulations due to the constraint of maintaining the media's ability to support microbial growth; deviation from the production cycle must be justified in the protocol.

Based on risk analysis, the aeration or vacuum-break step in the lyophilization cycle may have a higher risk of contamination because of turbulence<sup>[15]</sup> and the possibility of entrained particles entering the containers. As the application of full vacuum is not possible during APS, multiple partial vacuum steps should be considered to simulate the worst-case aeration. The media volume in the vials before lyophilization must ensure that the wetted surface of the container mimics the production case.

Media simulation of lyophilization should involve loading the required number of media-filled vials as per routine production procedures. An important consideration is to ensure that the duration the lyophilizer door is open to the cleanroom environment is at least the maximum time incurred when loading a production batch.

At the end of the lyophilization cycle in APS, sterile-filtered compressed air should be used to break the chamber vacuum to avoid inhibiting microbial recovery and growth in the stoppered vials. Nitrogen gas is used to break the vacuum only if an anaerobic media simulation is undertaken.

### **Incubation and Inspection**

Visual inspection is performed for APS batches after filling, stoppering and sealing to identify defects such as visible foreign matter, high or low fill volumes, and damaged vials, stoppers, or seals. These defective units would normally be removed (rejected) from product batches, but all defective units must be retained and all integral containers incubated in APS batches. Non-integral (broken or otherwise damaged) containers must be recorded and reconciled with the batch quantities. The incubation conditions are selected to be optimal for recovery and allow for detection of both slow-growing and normal contaminating organisms, i.e., to detect microorganisms that might otherwise be difficult to culture. The incubation conditions used generally are 20°C to 25°C for seven days (lower temperature first) followed by 30°C to 35°C for an additional seven days.

Containers during incubation must be turned to ensure that growth medium contacts the entire interior surfaces. Chart printouts or electronic records of the incubation conditions must be maintained, including the date and time of incubation commencement, turning of vials, transfer to the second incubator, and further turning and completion of incubation. Incubated vials must be inspected by operators qualified to distinguish sterile vials ("no growth") from vials showing microbial growth (surface pellicle or turbidity in the solution). A small number of filled vials with no microbial growth should be selected for use as "after-test" growth controls.

### **Microbiological Growth Medium**

Media for microbial recovery and growth are defined in pharmacopoeias—such as the United States (USP), European (Ph. Eur.), Chinese (ChP), and Japanese (JP) Pharmacopoeia—and should be made, sterilized, and used for media fills as per the manufacturer's instructions. Generally, tryptone soya broth (TSB) or equivalent, which supports the recovery and growth of viable aerobic microorganisms, is used. Special circumstances may require considering anaerobic growth media such as fluid thioglycolate medium (FTM), which supports the recovery and growth of obligate or facultative anaerobic bacteria. The growth medium, supplied as a powder, is a critical material for APS.

The manufacturer is recommended to be qualified and monitored as an approved supplier; growth promotion certificates may be obtained with each media powder batch. Before release, batches of the media for APS should be reconstituted, sterilized, and subjected to quality control for growth promotion by inoculating with ≤100 colony-forming units (CFUs) of representative compendial strains of microorganisms (a strain from environmental monitoring may be included).

### **Environmental Monitoring during Media Fills**

All routine and normal processes (such as cleaning, disinfection, and maintenance) should maintain the cleanroom environment in its qualified status. Maintenance includes particulate and microbiological environmental monitoring to demonstrate that the specified cleanroom environment conditions are maintained. Monitoring results may also provide key information for investigating a failed media fill.

Particulate monitoring consists of continuous monitoring for particulates in the <0.5 µm and <5.0 µm ranges, using a particle sampler attached to an isokinetic probe located near the fill point in the Grade A area. A permanent record of the particle counter's printout (or certified true copy if the printout is on thermal paper) must be attached to the APS or product batch record. The regulatory/ action limits per m<sup>3</sup> air volume are not more than 3,520 particles in the <0.5 µm particle size range and not more than 20 particles in the <5.0 µm range.

Each batch of environmental sampling plates must be tested for sterility and growth promotion capability against the recommended compendial strains of microorganisms before releasing for use. The microbiological methods should include a map of the locations where samples are to be taken or plates exposed. The methods are as stated in EudraLex, current Annex 1<sup>[3]</sup>; active air sampling (1 m<sup>3</sup> sample volume) onto 90 mm agar plates; settling plates 90 mm in diameter with exposure up to four hours (if the APS or production filling lasts longer, new settling plates must be exposed for subsequent four-hour periods); surface contact plates, 55 mm in diameter, which are contacted against cleanroom walls, floors, or operator gowns; and finger plate samples, performed by cleanroom operators during the filling period and upon leaving the cleanroom (four fingers and thumb onto the surface of a 90 mm TSA settle plate).

Media are usually tryptone soya agar (TSA) for viable aerobes and sabouraud dextrose agar (SDA) for fungi (molds) and yeasts. Surface contact plates may be TSA, incorporating a neutralizing agent to counter detergent residues from surfaces - agar residues are removed from the sampled locations by wiping with 70% alcohol.

The regulatory action limits for the microbiological monitoring results of the Grade A cleanroom areas (Grade A LAF in Grade B background, RABS, or isolator) in CFUs, are as tabulated in EudraLex, current Annex 1<sup>[3]</sup>. Adjacent Grade B, C, or D cleanrooms through which operator gowning and material transfer for APS occur should also be monitored; the stated regulatory limits for these cleanroom grades are also included in EudraLex, current Annex 1<sup>[3]</sup>. The frequency of monitoring Grade C and D cleanrooms is determined based on quality risk assessment; however, such monitoring at the time of a media fill may assist the investigation of a discrepancy or failure.

For media fills, the number of CFUs on the environmental monitoring plates in Grade A (LAF, RABS, or isolator) and Grade B areas must be enumerated and identified to species using available biochemical or nucleic acid identification methods. The isolates can be compared with organisms in any contaminated units. Information regarding the numbers, species, and locations of contaminating microorganisms may prove crucial in investigating a failed media fill (also from monitoring of Grade C and D areas).

### **Operator Training and Qualification**

Staff qualified to work in aseptic manufacturing, including maintenance and quality personnel, must participate in media fills.

Operators performing APS and aseptic manufacture must be trained in relevant procedures, including cleanroom gowning and aseptic behaviour (as well as product-specific procedures):

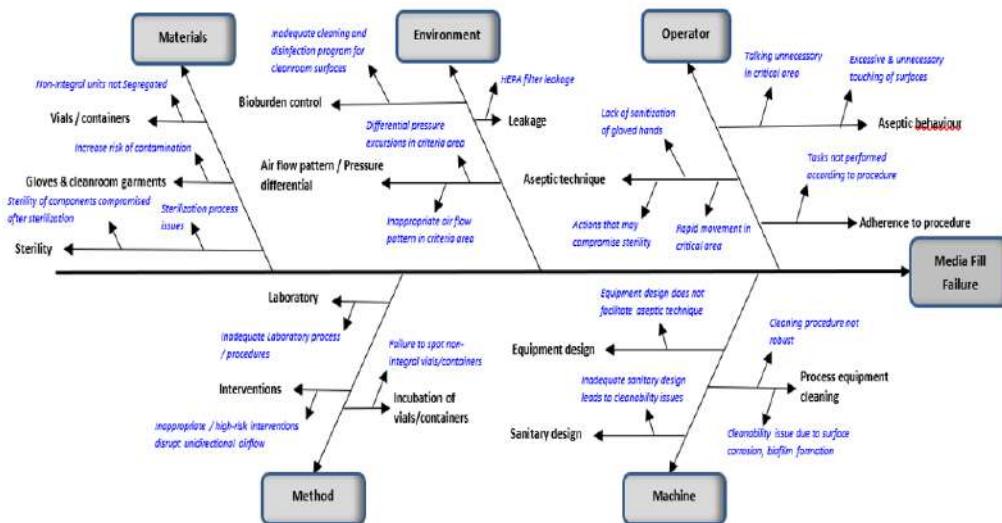


Diagram 1. Media Fill Failure - Root Cause Identification

- After initial theoretical training, aseptic operators should be allowed to practice their manipulations in a mock-up or nonsterile practice environment before participating in cleanroom operations.
- Sterile materials and equipment are handled only with sterilized instruments, such as forceps. Between uses, instruments should be protected from contamination.
- After initial gowning, sterile gloves are regularly sanitized by spraying with a qualified sanitizing agent such as sterile 70% isopropyl alcohol (IPA) to minimize the risk of contamination. Personnel should not directly contact sterile products, containers, components, or critical surfaces.
- Rapid movements create turbulence, threatening the integrity of sterile environments and entraining particles. Operator movements should be slow and deliberate and should not disrupt LAF designed to protect critical processes.
- When performing aseptic manipulations (such as making aseptic connections, removing samples, or retrieving fallen or jammed components from a filling line), operators should be trained to approach the location slowly and deliberately from the side to avoid disrupting LAF.

### 3. Media Fill Failures - Root Cause Determination and Remediation

A critical step in the investigation is identifying species of the microorganism(s) in positive media vials, and of any colonies appearing on environmental monitoring plates, particularly those from the Grade A/B environments, including from RABS/Isolator monitoring. Identifying from colonies on plates exposed in the lower-Grade adjacent cleanrooms is also crucial, as materials or personnel have accessed the filling rooms through these lower grade cleanrooms. The ability to match the identification of an environmental isolate from the current (or recent) batch with the identity of the contaminating organism in the failed media units provides important clues to the root cause determination.

The review of the deviation should encompass the preparation and manufacturing processes, including cleaning and disinfection of the cleanrooms, sanitization/sterilization, and transfer processes for components and materials, HVAC and cleanroom operating parameters during the filling period, operation of the filtration process, and integrity tests and filling, stoppering and capping equipment, and taking and transfer of in-process or environmental samples. The review should focus on documentation, including any deviations or atypical events, and documented interviews with operators. The review should also include recent engineering work prior to media-fill batches. The

key is to detect any significant processing discrepancy or error and equipment failure.

A fishbone diagram can be a valuable tool to investigate media fill failures and help identify the potential causes. Diagram 1 below shows an example of the fishbone diagram utilized.

Based on the potential failure modes identified in Diagram 1, the corresponding risk mitigation measures for the respective possible failure mode can be determined.

Operators play an essential role in ensuring the sterility of products is not compromised. Aseptic behavior, aseptic technique, and compliance to standard operating procedures are critical in aseptic manufacturing processes. Risk mitigation typically involves periodic aseptic behavior and aseptic technique training. Audits can also be conducted periodically to ensure strict adherence to the procedures. Equipment design that does not facilitate aseptic interventions can increase the risk of contamination during an intervention. Inadequate sanitary design in process equipment can lead to cleanability issues. Design qualification (DQ) and modifications may be required to mitigate the risk.

Process equipment cleaning needs to have a robust cleaning procedure considering the type of soil, cleaning parameters, and the use of an appropriate cleaning detergent if required. Periodic maintenance of stainless-steel surfaces can minimize the risk of corrosion, which can cause cleanability issues that can also lead to biofilm formation. Designing a robust cleaning and disinfection program utilizing sanitizers, disinfectants, and sporicidal agents is critical for bioburden control. Inappropriate air flow patterns in critical areas need to be remediated to minimize risk of contamination to products. Periodic maintenance and leak tests of the HEPA filters in critical areas ensure the integrity of the air filtration system.

Review and remediate laboratory procedures to minimize errors. High-risk interventions disrupt unidirectional (laminar) airflow and increase the risk of contamination. Smoke studies should be conducted and evaluated for risk of contamination (turbulence) for each intervention. Train inspectors to spot and segregate non-integral vials/containers so as to avoid incubation and causing media fill failure. Verify sterilization processes meet acceptance criteria, and any deviation requires impact assessment. Contamination of sterile parts/ packaging components can occur after the sterilization process and during storage prior to use if there are minimal protective measures in place. Ensure these components are protected from contamination after sterilization by using an appropriate protective barrier.

## CONCLUSION

The objective of the aseptic process simulation is to assess the likelihood of microbial contamination of the product during the aseptic manufacturing process. A critical aspect of designing a robust APS involves understanding the regulatory expectations and using risk assessment tools in the worst-case challenge design, including representative process interventions. Equally important are sound and effective programs for cleaning and disinfection of clean rooms, for equipment cleaning and maintenance, and for validation of sterilization processes. Competent operators and support staff, well-trained in aseptic techniques and behavior, with adequate knowledge of microbiology and deviation- and failure-investigation skills, should ensure compliance with CGMP regulations, and a successful APS program.

## Bibliographie

1. Chai, R and Barber D. Pharmaceutical "Validation of Aseptic Processes", Pharmaceutical Engineering, Volume 42 No. 2, March-April 2022.
2. European Commission. "EudraLex, Volume 4: EU Guidelines for GMPs for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Part 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practice (GMP) Specific to Advanced Therapy Medicinal Products." November 2017. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017\\_11\\_22\\_guidelines\\_gmp\\_for\\_atmps.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf)
3. European Commission. "EudraLex, Volume 4: EU Guidelines for GMPs for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products." Published 2008. [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/files/gmp/2017\\_12\\_pc\\_annex1\\_consultation\\_document.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/files/gmp/2017_12_pc_annex1_consultation_document.pdf)
4. European Commission. "EudraLex, Volume 4: EU Guidelines for Good Manufacturing Practices for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 13: Investigational Medicinal Products." Published 2017. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2009\\_06\\_annex13.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2009_06_annex13.pdf)
5. US 21 Code of Federal Regulations Part 210 Current GMP in Manufacturing, Processing, Packing or Holding of Drugs; General. Updated September 13, 2021. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-C/part-210>
6. US 21 Code of Federal Regulations Part 211 Current GMP for Finished Drug Products. Updated September 14, 2021. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-C/part-211>
7. US Food and Drug Administration. "Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing—Current Good Manufacturing Practice." September 2004. <https://www.fda.gov/media/71026/download>
8. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 2 WHO Good manufacturing practices for pharmaceutical industries; Main Principles. Published 2014.
9. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Annex 4 General requirements for sterility of biological substances. Published 1973.
10. Pharmaceutical Inspection Convention/Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme. "Recommendation on the Validation of Aseptic Processes." Published January 2011. <https://picscheme.org/docview/3446>
11. PDA Technical Report #22, "Process Simulation for Aseptically Filled Products." Revised 2011.
12. ISO Standard 13408-1. "Aseptic Processing of Health Care Products – Part 1: General Requirements." Published June 2008. <https://www.iso.org/standard/37842.html>
13. ISO Standard 14644-1:2015. "Cleanrooms and Associated Controlled Environments — Part 1 Classification of Air Cleanliness by Particle Concentration." Published 2015. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14644:-1:ed-2:v1:en>
14. ISO Standard 14644-1:2015. "Cleanrooms and Associated Controlled Environments — Part 2: Monitoring to Provide Evidence of Cleanroom Performance Related to Air Cleanliness by Particle Concentration." Published 2015. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14644:-2:ed-2:v1:en>
15. Hamilton, D., T. Tharp, O. McGarvey, M. Frei, M. Dekner, S.B. Mehta, X. Chen, N. Zinfollino, S. Schneid, J. Briggs, M. Schreyer, and D. Hill. "A Better Approach to Aseptic Process Simulation For Lyophilized Products" Outsourced Pharma Published May 9, 2021. <https://www.outsourcedpharma.com/doc/a-better-approach-to-aseptic-process-simulation-for-lyophilized-products-0001>

**TERANGA**  
GROUPE

## L'alliance des compétences au service de la qualité

**L**a holding indépendante TERANGA associe la synergie d'un groupe à la flexibilité d'entreprises à taille humaine. Grâce à leurs offres et expériences complémentaires, ACM Pharma, Cebiphar, UPS Consultants et ACD Swiss constituent un groupe leader dédié aux industries de santé et cosmétiques.

### Votre partenaire expert en développement pharmaceutique et contrôle qualité :

- Contrôle et expertise microbiologiques
- Tests biologiques et biologie moléculaire
- Développement analytique
- Études de stabilité
- Contrôle qualité physico-chimique
- Affaires technico-réglementaires
- Études vétérinaires
- Validation de nettoyage
- Validation qualification des ZAC
- Formation
- Audit et Conseil



### NOTRE VISION

Être un partenaire fiable et disponible au delà d'une simple relation client-fournisseur.



### NOS MISSIONS

Apporter des solutions techniques et réglementaires durant les différentes phases de développement et de contrôle de vos produits.



### NOS VALEURS

Le sens du service, notre proactivité et l'épanouissement de nos équipes sont des éléments clés de la réussite de vos projets.



# Simulation des procédés de fabrication aseptique de suspensions de nanoparticules ou microsphères : Challenges & facteurs de succès au travers d'un retour d'expérience.

Par Sonia TOUKAM & Cédric PALOMARES - Delpharm

**L**a plupart des produits injectables sont issus de procédés ayant une étape de stérilisation terminale, post remplissage et scellage, soit par la chaleur (autoclavage) soit plus rarement par rayonnement (gamma ou beta). Ces procédés doivent être privilégiés au regard de la réglementation qui spécifie que tout procédé ne subissant pas une étape de stérilisation terminale doit être justifié. Cf BPF annexe 1, 94<sup>(1)</sup>



Fig. 1 : Systèmes à usage unique remplis de milieu de culture

Cependant, tous les produits thermosensibles ou non radio-stérilisables devront être fabriqués dans des conditions aseptiques. Pour tous les médicaments filtrables, la stérilisation du produit sera réalisée par filtration au point le plus proche du remplissage donc par filtration en ligne pendant la répartition du produit. Ainsi la maîtrise de l'asepsie concerne les étapes de la filtration stérilisante au scellage du contenant : filtration stérilisante, remplissage et scellage pour les ampoules ou bouchage pour les flacons ou seringues et lyophilisation si applicable.

Avec l'émergence des produits issus des biotechnologies ou des technologies telles que les microsphères ou nanoparticules, certains produits ne peuvent pas être stérilisés par filtration au point de remplissage. Ces nouvelles technologies font émerger de nouveaux défis auxquels les industriels doivent faire face tant sur le design du procédé que sur les approches d'assurance de la stérilité. En effet, dans ce cas, l'ensemble des étapes de fabrication de la substance active dans sa forme finale et du produit fini devront être réalisées en conditions aseptiques.

Les principaux challenges seront donc, de définir les conditions d'asepsie pour un procédé utilisant des technologies complexes, avec plusieurs étapes souvent peu automatisées et se déroulant sur plusieurs jours et de démontrer la maîtrise de cette asepsie tout au long du procédé au travers des exercices de simulation ou APS (Aseptic Process Simulation).

**Nous présenterons donc dans cet article, quels sont ces challenges et les facteurs de succès au travers d'une étude de cas.**

## 1. APS ou MFT : aspects réglementaires et spécificités

En accord avec la réglementation et plus spécifiquement l'annexe 1 des GMP, une vérification périodique des procédés aseptiques doit être réalisée via un test de simulation utilisant un milieu de culture stérile. Auparavant, cette simulation, principalement réservée aux procédés de remplissage était plus connue sous le nom de "Media Fill Test". Aujourd'hui de plus en plus de procédés aseptiques couvrent beaucoup

### Acronymes

<b>AMDEC</b>	Analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité
<b>APR</b>	Analyse Préliminaire des Risques
<b>APS</b>	Aseptic Process Simulation
<b>EPPI</b>	Eau pour Preparation Injectable
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practices
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>MFT</b>	Media Fill Test
<b>RRF</b>	Risk Ranking & Filtering
<b>SU</b>	Singe Use

plus d'étapes que celles de remplissage, bouchage et scellage. C'est pourquoi, on retrouve de plus en plus la dénomination APS pour Aseptic Process Simulation. Le draft de l'annexe 1 utilise notamment ce terme permettant ainsi d'étendre le scope de l'annexe 1 à tous les procédés aseptiques qu'ils soient simples ou complexes.

La production de principes actifs à libération prolongée utilisant la technologie des microsphères ou nanoparticules, requiert un nombre important d'étapes de fabrication complexes en conditions aseptiques avant d'atteindre l'étape de remplissage et scellage tout en ayant la plupart du temps une étape de stockage de la substance active formulée de plusieurs semaines.

Même si le draft de la nouvelle annexe 1 prend en compte quelques spécificités, comme par exemple l'impact d'étapes pouvant impacter la viabilité de certains microorganismes: "§ 9.34 Where processing stages may indirectly impact the viability of any introduced microbial contamination, (e.g. sterile aseptically produced semi-solids, powders, solid materials, microspheres, liposomes and other formulations where product is cooled or heated or lyophilized), alternative procedures that represent the operations as closely as possible can be developed and justified", elle reste très orientée sur les étapes de remplissage.

En effet, comme on peut le voir dans les exemples ci-après, des règles sont données sur le nombre d'unités à remplir, sur la nécessité d'agiter les unités remplies pour assurer un contact du milieu de simulation avec la surface totale du contenant.

§ 9.42 *The number of units processed (filled) for APS tests should be sufficient to effectively simulate all activities that are representative of the aseptic manufacturing process. Justification for the number of units to be filled should be clearly captured in the PQS. Typically, a minimum of 5000 to 10000 units are filled. For small batches (e.g. those under 5000 units), the number of containers for media fill should at least equal the size of the production batch.*

§9.43 *Filled APS units should be agitated, swirled or inverted before incubation to ensure contact of the media with all interior surfaces in the container.*

Face à une réglementation ne prenant pas complètement en compte ces spécificités et face à des procédés complexes et constitués d'une succession d'étapes de plusieurs jours, parfois manuelles, l'industriel doit s'appuyer sur une démarche structurée basée sur une évaluation des risques exhaustive et argumentée pour refléter au mieux les conditions de production pendant ces exercices de simulation afin de pouvoir assurer la stérilité du produit et sécuriser le patient.

## 2. Retour d'expérience

Une approche structurée sur le design et la réalisation des APS est clé pour garantir la représentativité du procédé et des opérations réalisées par les opérateurs. L'approche est décomposée en 5 parties que l'on se propose de décrire ici.

### 1. La description détaillée du procédé.

La description détaillée du procédé a pour objet comme son nom l'indique de recenser chaque étape du procédé et ensuite de détailler toutes les opérations rattachées à chaque étape de manière à pouvoir identifier, d'un point de vue assurance de stérilité et maîtrise de l'asepsie, les opérations à risque et donc critiques. Une opération critique est ainsi définie comme une opération qui a une forte probabilité de rompre l'asepsie du procédé.

La difficulté principale dans cet exercice de recensement est d'établir une liste exhaustive des situations et des opérations. Plus le procédé est manuel et complexe, plus le recensement devra être précis et l'analyse de risque prépondérante. Afin d'y parvenir, le travail pluridisciplinaire est un atout majeur. Cet exercice devra intégrer à minima les opérateurs de production, la qualité opérationnelle, l'expert procédé, le responsable assurance de stérilité, un expert en microbiologie...

Dans le cadre de la fabrication de microsphères, par exemple, 9 étapes et 27 opérations ont été identifiées. Parmi ces étapes, on retrouve par exemple des étapes d'extraction de solvant, de concentration ou de lavage de microsphères. Alors que les opérations sont par exemple une connexion ou déconnexion aseptique, ouverture manuelle de vanne...

Pour chaque opération, la situation à risque, c'est-à-dire le risque de contaminer le produit, doit être décrite de manière précise afin de faciliter le travail sur les étapes suivantes.

L'objectif est de déterminer les causes potentielles de cette situation à risque ainsi que les conséquences. S'il existe des moyens de préventions, ils seront indiqués dans le tableau afin de conclure sur l'acceptabilité ou non du risque.

### 2. Réalisation de l'analyse de risque

#### a. Choix de l'outil

La rédaction et le travail sur l'analyse de risque est le socle pour l'établissement de la stratégie et de la réalisation des APS. Ce travail est un travail d'équipe, basé sur des données scientifiques.

L'objectif de l'analyse de risque se doit d'être clair, de lister l'ensemble des actions pouvant être réalisées pendant un lot de production normale afin de couvrir le risque de contamination.

Une cotation des risques est alors effectué suite à son établissement. Cette criticité est un des facteurs justifiant la fréquence de réalisation de ces actions pendant les APS.

Le choix de la méthodologie pour la réalisation de l'analyse de risque impactera les données de sortie. Il n'existe pas d'outil universel, ils sont complémentaires et doivent être cohérents avec l'objectif de l'analyse. Parmi les différents outils, on distingue l'AMDEC, l'APR, le RRF, ou encore la HACCP.

Seuls l'AMDEC et l'APR seront discutés ici.

- **L'AMDEC** permet d'identifier des dysfonctionnements potentiels, d'analyser, de coter et d'évaluer des modes de défaillance, les hiérarchiser afin de les maîtriser et peut se découper en 5 étapes distinctes, décrites dans le schéma Flg2.
- **L'APR** permet d'identifier et d'analyser des risques à partir d'une liste préétablie de situations dangereuses. Le but est d'identifier les risques associés à un processus.

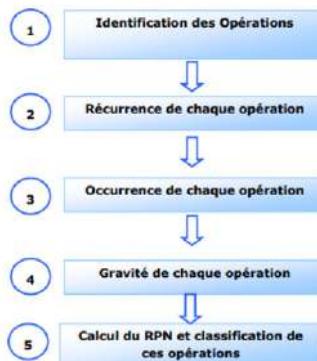


Fig.2 : Méthodologie lors de la mise en place de l'outil AMDEC

Il peut se découper en 3 étapes distinctes : 1) Découper le processus en éléments unitaires ; 2) Créer la liste de situations de danger associées au processus d'audits ; 3) Sur une des étapes du procédé : identifier les risques, leurs causes et leurs conséquences.

Dans notre cas, le choix de l'outil s'est porté sur l'APR.

#### b. Réalisation de l'analyse de risque

L'objectif est de déterminer les causes potentielles de la situation à risques, ainsi que ses conséquences. S'il existe des moyens de préventions, ils seront indiqués afin de statuer sur l'acceptabilité ou non du risque.

Le challenge de cette partie consiste à décrire des scenarios s'étant déjà réalisé, mais également à penser à des situations n'ayant jamais eu lieu, mais qu'il serait possible d'observer.

Un des facteurs de réussite est l'implication des personnes expertes du procédé mais également de personnes candides afin d'apporter un œil neuf. Les opérateurs travaillant sur le procédé doivent être impliqués dans la réalisation de ce travail. La dimension opérationnelle prend alors tout son sens.

### 3. Plan de mitigation

Après avoir décrit les moyens de prévention / détection, l'acceptabilité du risque doit être statuée. Effectivement, la mise en place d'actions peut diminuer le risque de contamination tout au long du procédé. Ces actions de réduction des risques seront alors mises en place non seulement pour la réalisation des APS mais également en routine de production.



Fig3 : schéma macroscopique des étapes d'un procédé de fabrication de microsphères

Sur la fabrication de microsphères, les systèmes à usage unique sont très utilisés et nécessitent de réaliser des beaucoup de connexions / déconnexions aseptiques pouvant impacter l'asepsie du procédé et provoquer la fin prématurée d'un lot. Il s'agit d'une situation à risque. Afin de réduire les risques, des modes opératoires détaillés sur la réalisation de ces opérations, associés à une formation complète des opérateurs, ont été mis en place. De plus, des contrôles d'intégrité des connections ont été implémentés. Comme cette opération est critique, elle sera simulée en APS et la réalisation de cette opération en production de routine est soumise à habilitation APS.

#### **4. Simulation du procédé de fabrication**

##### a. Spécificités du procédé de fabrication

Les conditions opératoires de réalisation du procédé peuvent impacter la stratégie de validation initiale et de routine des APS. Dans le cadre d'un procédé utilisant de l'azote comme gaz d'inertage, la qualification initiale du procédé aseptique est alors réalisée dans les deux conditions : en aérobiose et en anaérobiose et augmente donc le nombre d'APS à réaliser.

Dans le schéma Fig3, quelques étapes d'un procédé de fabrication de microsphères ont été représentées afin de montrer la complexité et la diversité des étapes concernées par la maîtrise de l'asepsie et donc des APS.

Ce procédé de fabrication dure environ 100h du lundi matin au vendredi après-midi et comporte des étapes statiques et dynamiques. Chaque étape peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours. Par exemple, la première étape de filtration est de l'ordre de plusieurs dizaines de minutes, l'étape d'émulsification est de l'ordre de quelques heures et celle du séchage de plusieurs dizaines d'heures. De plus,

- Pour les étapes statiques qui durent plusieurs heures ou jours comme par exemple une phase d'extraction, le milieu de culture est laissé dans la cuve pendant toute la durée de cette extraction avec ou sans la présence des opérateurs.

- Toutes les étapes dynamiques (exemple une phase de concentration), elles sont également simulées sur la durée complète.

Dans le but de couvrir de potentielles difficultés en cours de production, une majoration de temps réel de production ou des temps de pause sont appliqués à chaque étape.

##### b. Stratégie d'habilitation

La stratégie d'habilitation des opérateurs découle de l'analyse de risque.

- Durant les étapes de préparation des phases, ou d'émulsification, l'habilitation portera sur les nombreuses connexions / déconnexions aseptiques (une quinzaine de connexions et une trentaine de déconnexions). Chaque opérateur doit effectuer un nombre minimum de connexions et déconnexions à chaque APS afin d'être habilité.

- Durant l'étape de déchargement, des soudures sont effectués sur le sac de déchargement. Les soudures sont tracées et chaque opérateur doit réaliser à minima une soudure pendant l'APS

La difficulté réside lorsqu'il n'est pas possible de réaliser plusieurs fois la même opération durant l'APS. La génération des microsphères est une émulsification par le biais d'un système à membrane. L'opération très manuelle de ce montage ne peut être effectuée qu'une seule fois par APS. En validation de routine (2 APS par an), l'action ne peut être réalisée que par 2 opérateurs.

#### **5. Interprétation et résultats APS : spécificités**

##### a. Récupération des unités à incuber

A la fin d'une simulation aseptique, le milieu de culture est récolté

dans des poches ou contenants à usage unique qui sont directement incubées. Voir exemple de poches avec milieu de culture (Fig1).

Ce tableau recapitule les différences en termes APS (bags) vs MFT (ampoules/flacons ..)

Table 1 : Tableau récapitulatif différences APS / MFT

	APS	MFT
<b>Contenants remplis en fin du précédent de simulation aseptique</b>	1-10 unités	> 10 unités (généralement égale à la taille d'un lot de fabrication)
<b>Incubation</b>	Gain de place dans l'incubateur	Nécessite des incubateurs plus volumineux
<b>Lecture intermédiaire &amp; finale</b>	Assez rapide	Long et fastidieux
<b>Test de fertilité</b>	Assez rapide	Assez long

##### b. Incubation, lectures et formations

La cartographie des étuvées utilisées dans le cadre d'incubation de poches de plusieurs dizaines de litres doit tenir compte de leur forme. La cartographie doit donc être faite en conséquence. En effet, la présence d'ampoules/flacons ou de poches impacte l'aéraulique au sein même de l'enceinte et donc l'état qualifié de ces enceintes. La formation pour la lecture de ces poches peut cependant être plus complexe et ainsi nécessiter des formations/habillations plus poussées. La manipulation des poches n'est pas aisée car elles peuvent être de dimensions importantes et impacter l'ergonomie du poste notamment lors du retournement des contenants remplis avant mise en incubation pour garantir la mise en contact du milieu avec toute la surface du contenant et du système de fermeture. Enfin, le test de fertilité sera réalisé sur chaque élément incubé.

##### c. Réconciliation

La réconciliation des unités est plus facile que dans le cas d'un MFT et aucune unité contaminée n'est acceptée.

#### **3. Conclusion**

Au-delà des requis réglementaires, les industriels produisant des produits stériles issus de procédés aseptiques depuis la fabrication de la substance active formulée jusqu'à la répartition en contenant final scellé sont confrontés à de nombreux défis. Ils doivent, dans un premier temps, définir un procédé suffisamment robuste d'un point de vue maîtrise de l'asepsie en maximisant les systèmes clos par exemple. Ensuite les équipes opérationnelles doivent comprendre les enjeux et les risques associés au procédé et être formées et habilitées dans la durée. Les compétences techniques ne sont pas suffisantes, des opérateurs avec une gestuelle et une attitude adaptée sont clés. Enfin, le design des APS doit être représentatif afin de démontrer de manière fiable que le procédé dans sa globalité permet de produire un produit stérile pour sécuriser la santé du patient. L'APS ne doit être qu'une vérification de la stabilité du couple procédé/opérateur alors que le fondement de l'asepsie repose sur un design adapté et des opérateurs experts.

Même si l'approche et les principes de maîtrise de l'asepsie sont identiques aux procédés de répartition, la technologie complexe des procédés de fabrication des substances actives aseptiques comme par exemple la production de microsphères ou nanoparticules, requiert une équipe dédiée ayant une compréhension approfondie de ces procédés permettant d'assurer la qualité du produit et la sécurité du patient tout au long du cycle de vie du produit.

# L'isolateur jetable pour le remplissage aseptique, innovation ou hérésie ?

Par Franck PAVAN - GTP Bioways

franck.pavan@gtp-bioways.com

**G**TP Nano fait partie de la nouvelle CDMO dédiée aux thérapies innovantes GTP Bioways. Cette société, créée en 2018, a pour objectif d'offrir des services de nano-fabrication de médicaments stériles et de remplissage aseptique d'unités thérapeutiques pour le secteur des thérapies innovantes (protéines, cellulaire, génique...). GTP Nano se concentre sur la formulation des produits stériles et leur répartition aseptique pour le compte d'autrui. Le site sur lequel elle occupe un bâtiment



Fig1

de 700 m<sup>2</sup> n'existe pas et devait être construit de toute pièce pour satisfaire aux exigences européennes et mondiales en termes de fabrication de médicaments.

## 1. Les exigences réglementaires et l'innovation

D'aucun se serait satisfait d'une ligne de fabrication standard qui répond de manière simple et éprouvée aux prérequis de la fabrication stérile, une ligne de fabrication de produit stérile sous isolateur fixe est connue et reconnue depuis maintenant plus de 30 ans.

Les améliorations industrielles ont permis de ne plus ajouter des systèmes de bio-décontamination de surface sous forme de matériel supplémentaire afin de satisfaire aux exigences de l'asepsie. On n'a souvent plus besoin d'expert sur la technologie de vaporisation du peroxyde d'hydrogène pour pouvoir maintenant qualifier et valider les cycles en environnement isolateurs, chaque constructeur ayant une solution éprouvée fournie avec l'équipement et complètement intégrée aux isolateurs. Les exigences réglementaires ne sont plus une barrière à la mise en œuvre de ces isolateurs qui sont maintenant vu comme le futur du remplissage aseptique car ils permettent d'atteindre des niveaux d'assurance de stérilité que les salles blanches classiques ne permettent pas.

Combien de laboratoires essaient de valider 3 logs de réduction de *G. Stéarothermophilus* en environnement A/B alors que ces classes acceptent la présence d'humain à proximité de la zone critique, l'isolateur empêchant la présence d'humain à proximité de la zone à risque, permet lui d'atteindre plus de 6 logs de réduction voire pour certains fans de l'assurance de stérilité de notre industrie 12 logs de réduction. C'est parfois le paradoxe de notre métier de devoir valider des niveaux extrêmes sur des environnements qui ne sont pas à risque, je vous laisse méditer sur ce constat car on s'attendrait plutôt à valider 12 logs quand il y



Fig2



Fig3

a présence de l'homme et 3 logs en son absence ?

A ce jour, l'isolateur représente donc la meilleure solution technique au remplissage aseptique de produit en environnement BPF avec toutes les contraintes que cela représente. Je reprendrai pour cela l'image de mon ancien patron qui a mis en place la première ligne de remplissage sous isolateur en France pour des cytotoxiques : "l'isolateur et la classe A/B sont comme le ping pong et le tennis, dans un cas, tu entres sur le terrain de jeu et dans l'autre tu restes en dehors".

Bien que la nouvelle annexe 1 des BPF donne une place importante à l'utilisation et la gestion de ce type d'équipement, elle ne permet pas de mettre en exergue les avantages de cette technologie face aux autres types de fabrication, sans doute pour garder un niveau d'exigence toujours plus important pour faire face aux risques de contamination.

Il faut donc mettre en place des solutions innovantes de ces isolateurs qui puissent répondre à l'ensemble des exigences réglementaires que je connais bien pour avoir été lecteur de tous ces guides et relecteur de celle de l'ASPEC :

- FDA 2004 : Sterile drug products produced by aseptic processing- current good manufacturing practices
- PIC/S PI014-3, 2007: Isolators used for aseptic processing and sterility testing
- PDA TR 28 : Process simulation
- PDA TR34 : Design and validation of isolator systems for the manufacturing and testing of health care products.
- EU GMP Annex 1 version 2008
- ASPEC 2015 : Les isolateurs : qualifications et maintenance
- ISO 13408-6, 2004 : Aseptic processing of health care products- Part 6 Isolator systems
- USP 35 <1208> : Sterility testing: validation of isolator systems.

De multiples solutions s'offrent à nous pour la mise en place de solution pérenne en vue de la fabrication de produits stériles et potentiellement CMR (Cytotoxiques, Mutagène, Reprotoxiques) particulièrement lorsque vous fabriquez des chimiothérapies.

Ces molécules éthiques, sont très difficilement mise en œuvre et un degré de protection adéquat doit être mis en place afin de pouvoir protéger nos opérateurs et les patients et médecins qui sont par la suite en contact avec le produit fini.

Cependant, lorsque nous nous intéressons à la fabrication de ce type de produits et au fait que les sociétés telles que GTP Nano ainsi que l'ensemble des CDMO qui en produisent ou en produiront, le problème principal n'est plus la mise en place de ces isolateurs mais surtout la capacité de ceux-ci à permettre la mise en place de plusieurs produits au sein de la même ligne de fabrication.

A ce titre, la capacité du système à pouvoir être nettoyé rapidement et de manière sûre et certaine est la priorité de notre système. Pour cela, j'ai eu à une époque de ma carrière à concevoir et mettre en place un système de décontamination en place d'isolateurs de fabrication alors que peu ou pas de laboratoire n'avait innové sur ce point. A ce stade,

lors de la création de notre infrastructure, nous avons pu réfléchir à la meilleure solution à apporter à notre outil afin de pouvoir s'affranchir des contraintes liées à ce nettoyage. A l'époque, l'utilisation de matériel jetable n'était pas aussi répandue.

Beaucoup de matériels à usage unique sont désormais en place afin de répondre à cette problématique de notre industrie et de pouvoir éliminer les sources de contamination de ce type.

Néanmoins, seul l'isolateur restait fixe et multi-usage. Pourtant, il était envisageable du fait des nouvelles applications de la plasturgie et de la maîtrise des environnements classés de mettre en place ce type de technologie en vue de rendre cet équipement jetable et franchir une nouvelle étape dans le procédé de remplissage aseptique.

## 2. Un isolateur jetable, comment ça marche ?

Le mode de fonctionnement des isolateurs de classe A est bien décrit et doit suivre un fonctionnement parfaitement rodé de nos jours. L'utilisation d'isolateurs jetables dans l'industrie du médicament ne représente pas, en soi, une réelle innovation : plusieurs sociétés vendent ce type de systèmes pour la mise en œuvre, de manière confinée, des molécules dangereuses. A ce stade, la création d'un isolateur jetable n'est donc pas une prouesse technique. Cependant, l'utilisation d'un isolateur jetable dans le cadre de l'intégration dans une ligne de remplissage de médicaments stériles en vue de la mise en œuvre de lots de quantités importantes représente par contre une réelle innovation technologique. En effet, l'isolateur ainsi que l'ensemble des données d'entrées et de sorties doivent être parfaitement connues et maîtrisées afin de pouvoir bâtir un Cahier Des Charges permettant de répondre aux besoins de la fabrication des médicaments stériles, notamment la mise en place d'un flux laminaire ou unidirectionnel au niveau du remplissage et du bouchage.

L'isolateur en lui-même doit être intelligemment conçu afin d'éviter/de limiter des aménagements/réglages spécifiques à chaque projet. Son fonctionnement doit être simple et reproductible afin de pouvoir être mis en œuvre rapidement et démonté dans les meilleurs délais afin de pouvoir s'affranchir des contraintes citées plus haut.

Il doit assurer un fonctionnement sûr et maîtrisé afin de permettre son utilisation en classe A. L'expérience du milieu industriel et des contraintes de remplissage aseptique en confinement ont permis de rapidement identifier le type d'isolateur qu'il est important de considérer pour l'utilisation en jetable.

En effet, si l'on considère l'ensemble des isolateurs d'une ligne de remplissage classique, voici les différentes fonctions qu'ils peuvent assurer :

- Stérilisation des contenants et des systèmes de bouchages
- Chargement des équipements
- Préparation avant remplissage/accumulation
- Remplissage/bouchage
- Capsulage.

Ils n'ont pas tous les mêmes risques de contamination par le produit et ne nécessitent pas forcément le même traitement.

...→

D'autant que la société GTP Nano a pour objectif d'être compétitive sur le marché du CDMO et à ce titre ne peut pas se permettre de changer la ligne de remplissage complète à chaque remplissage.

A ce titre, seul l'isolateur de remplissage/bouchage était le plus important à considérer comme jetable. Les produits étant remplis et bouchés dans cet isolateur, le risque de contamination de l'environnement y est évidemment le plus important.

Si lors des phases effectives de remplissage et de bouchage, cet isolateur peut être isolé du reste de la ligne et ainsi confiner le risque ; il est évident que nous limitons les phases de dispersion de la contamination et nous pouvons nous attreindre à ne jeter que cet isolateur. Enfin, si nous nous astreignons à mettre en place un système de capsulage empêchant toute casse de flacons pendant cette étape, alors les risques de contamination seraient totalement évités et l'utilisation d'un isolateur à usage unique superflu.

Le choix de l'isolateur jetable s'est donc porté naturellement sur l'isolateur de remplissage bouchage et nous avons choisi d'insérer cet isolateur dans une ligne munie de 3 autres isolateurs fixes afin de satisfaire aux exigences de cet isolateur essentiel et primordial pour la ligne complète.

Cet isolateur devait avoir des possibilités de manutention afin de pouvoir mettre en œuvre les articles de conditionnement, pour cela nous avons demandé la présence de 2 gants au minimum pour les manipulations. De plus, il fallait répondre aux besoins de remplissage et de bouchage aseptique du 21<sup>e</sup> siècle.

Notre choix s'est donc fondamentalement affiné, en ajoutant la mise en œuvre de robot 6 axes afin de réduire l'intervention humaine et le risque de contamination associé.

Plusieurs sociétés reconnues dans l'industrie fournissent déjà des lignes de remplissage ou les manipulations sont réalisées par des robots de ce type mais ils sont systématiquement intégrés dans l'environnement critique de remplissage et doivent donc être des robots de classe A. Dès le départ notre souhait a été de sortir les robots de l'environnement critique, pour plusieurs raisons d'ailleurs :

- Maintenant des robots en cas de panne ou de dysfonctionnement possible sans rompre la stérilité de l'isolateur de remplissage ;
- Réduction des coûts de fabrication des robots choisis et possibilité de mise en place dans un environnement de classe D ou C ;
- Automatisation du remplissage afin de maîtriser les phases de remplissage et de bouchage et limiter la phase ouverte des unités remplies ;
- Utilisation de recettes plutôt que des pièces de format pour le remplissage de tout type d'articles de conditionnement ;
- Changement de format SMED (Single Minute Exchange Design).

Nous avons donc imaginé un isolateur muni de manchettes de connexion afin d'assurer les fonctions des robots. Ceci avait pour conséquence de mettre en place des systèmes de plug des bras des robots extrêmement reproductibles et ayant un très faible jeu pour permettre le montage et le démontage des outils de préhension de remplissage et bouchage, assurer la reproductibilité du remplissage et du bouchage avec un minimum de variabilité et pouvoir introduire une aiguille de remplissage dans un col de 6,25 mm et boucher des seringues dont le bouchon mesure 6 mm de diamètre.

Le cahier des charges que nous avons mis en place nous a donc permis d'assurer les éléments de dimensionnement et de conduite permettant de répondre positivement à l'ensemble des contraintes que nous venons d'énumérer. (voir Fig1, Fig2 & Fig3)

### 3. Utilisation et contrainte de l'isolateur jetable.

Un isolateur jetable ne signifie pas un isolateur au rabais. Il s'agit en tout point d'un isolateur identique à un isolateur de remplissage fixe mais avec la capacité de n'être utilisé qu'une seule et unique fois. Il doit donc répondre à l'ensemble des recommandations de la norme NF ISO 14644 et à ce titre subir l'ensemble des tests et des qualifications requises.

Il s'agit également d'un outil de fabrication et à ce titre, implique une parfaite maîtrise du fournisseur de l'ensemble des prérequis nécessaires à la qualification de celui-ci comme sous-traitant de l'industrie stérile.

Nous avons fait le choix d'un fournisseur français pour la mise en œuvre de la solution finale, nous avons demandé à ce fournisseur de mettre en place un système flexible pour le remplissage aseptique par l'utilisation de deux types de pompes, l'une pour les liquides visqueux (pompes volumétriques) et l'autre pour les liquides conventionnels nécessitant l'utilisation de matériels jetables.

Le système jetable s'intègre donc parfaitement dans un continuum d'isolateurs qui ont chacun leur fonction.

Il ne s'agit pas d'une ligne ouverte mais bien d'une ligne de remplissage fermée qui intègre les contraintes du remplissage en continu mais de manière séquentielle. Ceci permet aux opérateurs de conduire la ligne de remplissage avec un minimum de main d'œuvre. Les opérateurs ne se concentrent que sur les tâches d'approvisionnement de l'outil de remplissage aseptique et de bouchage afin de laisser les activités à risque à la parfaite automatisation du système qui peut prendre en charge l'ensemble de la zone à risque.

La qualification de ce type de système nécessite également la parfaite connaissance des activités de remplissage aseptique afin de pouvoir modéliser et simuler les opérations pour la validation de l'ensemble du procédé et la mise en place d'une stratégie de MFT (Media Fill Test) qui satisfasse les exigences réglementaires

Il est difficile de savoir comment notre industrie et les organismes réglementaires vont réagir à cette prouesse technologique, notamment car il n'existe pas d'équivalent dans le milieu des grands laboratoires pharmaceutiques.

L'innovation se trouve dans les capacités que nous allons devoir mettre en place dans un avenir proche pour servir des patients avec des thérapies ciblées permettant de traiter des pathologies de plus en plus finement diagnostiquées et dont le produit doit être adapté à chacun. Pour cela, le temps des hautes cadences et des outils de production précisément dimensionnés pour un produit unique est désormais révolu et les unités de production devront satisfaire à la fois à la rentabilité de petites séries et à la mise en place de fabrication de petites quantités afin de ne pas stocker des produits trop longtemps ce qui entraînerait une perte pour les laboratoires pharmaceutiques. Le fait que cet isolateur soit jetable n'affecte pas l'ensemble des activités de qualification et de validation. Malgré le fait qu'il ne soit utilisé qu'une seule et unique fois, c'est d'ailleurs une question qu'il faut peut-être poser aux régulateurs (Quels sont les tests de qualification de performance minimum à effectuer sur l'isolateur afin de satisfaire aux exigences réglementaires sur un équipement standardisé et reproduit à l'identique à chaque fabrication ?). Les filtres, les systèmes de connexion, l'enveloppe de l'isolateur ainsi que les éléments de design doivent faire l'objet des mêmes contraintes que celles d'un isolateur fixe.

### 4. L'isolateur à usage unique dans la durée

L'isolateur que nous avons conçu avec notre fournisseur et qui fait l'objet de toutes les validations possibles est un outil très robuste. Plusieurs dizaines de milliers de flacons de MFT ont été remplis dans toutes les conditions possibles afin de qualifier la sûreté de fonctionnement du système et de ce fait, éprouver le design de cet équipement.

La stérilité du système après irradiation peut être garantie de manière sûre pendant plusieurs jours et l'assurance de stérilité du système permet d'appréhender le remplissage de produits stériles sous les meilleurs hospices.

Le système de remplissage est également flexible et permet de remplir tous types de fluides, visqueux aussi bien que peu visqueux. Ceci grâce à la possibilité d'utiliser plusieurs types de pompes comme expliqué plus haut.

La technologie de l'isolateur souple est maintenant mature et offre une niveau de finition permettant de répondre aux attentes des utilisateurs industriels du stérile.

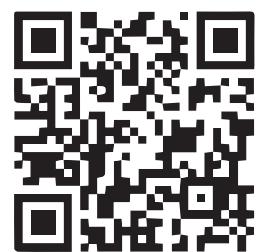
## CONCLUSION

De nos jours, il n'y a plus d'ouverture de laboratoire pharmaceutique dans la production de produits pour le compte de tiers. Si vous regardez le marché de la sous-traitance stérile, il n'y a plus de création d'usine de production, le marché se satisfait de reprendre et de récupérer des acteurs déjà existants. En effet, la seule usine de production créée récemment pour la sous-traitance de médicament stériles date de plus de 10 ans maintenant, si nous faisons abstraction de GTP Nano et de GTP Bioways.

L'isolateur jetable, représente une réelle avancée technologique et un réel intérêt qui a sa place dans une industrie qui n'accepte de changer que dans la continuité. Nous devons revoir notre position pour faire en sorte que les innovations technologiques disruptives représentent une opportunité et non pas une solution forcément discutable et discuté. C'est à ce prix que l'industrie française notamment pourra envisager de relocaliser nos ressources et la fabrication de nos médicaments dans un marché où la plupart sont importés sans forcement d'ailleurs que les mêmes exigences soient imposées.

Rendez-vous en juin 2023  
pour notre événement  
A3P Technologie Barrière

Toutes les infos [www.a3p.org](http://www.a3p.org)



## SOLUTIONS PERSONNALISÉES POUR LES TRANSFERTS ASEPTIQUES

Transferez vos liquides en toute sécurité sans rupture de confinement  
grâce au système MW LTS®

## Concevez votre système de transfert liquide MW LTS®

- Connectique MWS Type RTP 190/105/50 mm :  
1 à plusieurs voies selon diamètre
- Single Use ou Autoclavable
- Port RTP Beta : PEHD, Inox 316L...
- Tubes : Selon vos URS (Ex : Silicone platinum cured, TPE,...)
- Raccords aseptiques : Selon vos URS
- Conditionnement : Sous Iso 5, double ou triple emballage
- Gamma Stérilisation

## Nous le réalisons selon votre process



# A3P/AFI Survey on Sampling & Testing Practices for In-Process Pre-Filtration Bioburden for Sterile Products: Presentation of the Results & Critical Discussion.

Par Isabelle HOENEN - Lilly France S.A.S & Key contributors: Thierry Bonnevay, Di Morris & Radhakrishna Tirumalai  
hoenen\_isabelle@lilly.com

For sterile products and especially for parenteral products sterilized by filtration, the in-process pre-filtration bioburden test results are considered as key data for the assessment of the overall contamination control strategy performance.



This is clearly stated in the Introduction of the **USP chapter <1229.3> "Monitoring of Bioburden"**: "*Monitoring of in-process bioburden of pharmaceutical components and products is an essential element of the overall contamination-control program for appropriate sterilisation process control. Bioburden monitoring should be designed for the recovery of a broad range of microorganisms that are likely to be present in the material being processed. Sterilisation processes are implemented in order to eliminate bioburden in materials and the products, ensuring both adequate process control and end-user safety. Bioburden is a potential risk to the patient not only because the sterilisation process might not be completely effective, but also post-processing because of the possible presence of residual materials such as allergens, endotoxins, and exotoxins. It may also have adverse impact on product quality and stability. Therefore, although bioburden may be confidently killed by destructive sterilisation processes or removed by retentive processes (filtration), [...] its proliferation before sterilisation should be avoided. Process controls and cleaning, sanitization, and disinfection programs provide active means for the control of bioburden population and support the sampling, enumeration, and characterization of bioburden necessary to assure that sterilisation processes are effective*".

Key current regulatory expectations related to the in-process pre-filtration bioburden sampling and testing strategy for sterile products can be found in:

- The current version of the **EU GMP Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products at point 80** "*The bioburden should be monitored before sterilisation. There should be working limits on contamination immediately before sterilisation, which are related to the efficiency of the method to be used. Bioburden assay should be performed on each batch*" [...] "*and considered as an in-process test. Where appropriate the level of endotoxins should be monitored*".
- The **EMA Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container (March 2019) at point 4.1.5** "*For routine commercial manufacturing, bioburden testing should be performed on the bulk solution immediately before sterile filtration. In most situations, a limit of NMT 10 CFU/100 ml (TAMC) would be acceptable for bioburden testing. If a pre-*

filter is added as a precaution only and not because the unfiltered bulk solution has a higher bioburden, this limit is applicable also before the pre-filter and is strongly recommended from a GMP point of view". "Bioburden should be tested in a bulk sample of 100 ml in order to ensure the sensitivity of the method. Other testing regimes to control bioburden at the defined level should be justified".

- The **FDA guidance for sterile products produced by aseptic techniques in section X.C. Prefiltration Bioburden**

"Manufacturing process controls should be designed to minimize the bioburden in the unfiltered product. In addition to increasing the challenge to the sterilizing filter, bioburden can contribute impurities (e.g., endotoxin) to, and lead to degradation of, the drug product. A prefiltration bioburden limit should be established".

**The EU GMP Annex 1 revision draft from February 2020** contains some new or modified requirements which underline an increasing emphasis put on this in-process test:

- **Point 8.94** "Bioburden samples should be taken from the bulk product and immediately prior to the final sterile filtration. Systems for taking samples should be designed so as not to introduce contamination".

- **Point 10.3** "The bioburden assay should be performed on each batch for both aseptically filled product and terminally sterilized products and the results considered as part of the final batch review. There should be defined limits for bioburden immediately before the sterilizing filter or the terminal sterilization process, which are related to the efficiency of the method to be used. Samples should be taken to be representative of the worst case scenario (e.g. at the end of hold time)".

- **Point 10.4** "A pre-sterilization bioburden monitoring program for the product and components should be developed to support parametric release. The bioburden should be performed for each batch. The sampling locations of filled units before sterilization should be based on a worst case scenario and be representative of the batch. Any organisms found during bioburden testing should be identified and their impact on the effectiveness of the sterilizing process determined. Where appropriate, the level of pyrogen (endotoxins) should be monitored".

This situation, with on one side, a growing emphasis on the in-process pre-filtration bioburden test for sterile products, and with on the other side, the current limited guidance on how to precisely perform the sampling, testing and how to manage the testing results, was **at the origin of the survey on the current industry practices for this In-Process Bioburden test for sterile products launched by the A3P and the AFI in Q3 of 2021**.

#### **The objectives of the survey were:**

- To collect current industry practices and trends ;
- To capture the differences in interpretation of the pre-filtration bioburden management expectations ;
- To assess any potential need for further clarification in current regulatory and pharmacopeial expectations for Parenteral Products in-Process Bioburden sampling, testing and results management.

The present article is divided in **2 parts**.

**The first part provides the main outcomes of that survey and opens the discussion around some concerns and clarification needs** raised by the participants to ensure in the future more robust control strategies and to facilitate aligned interpretation between industry and regulatory authorities.

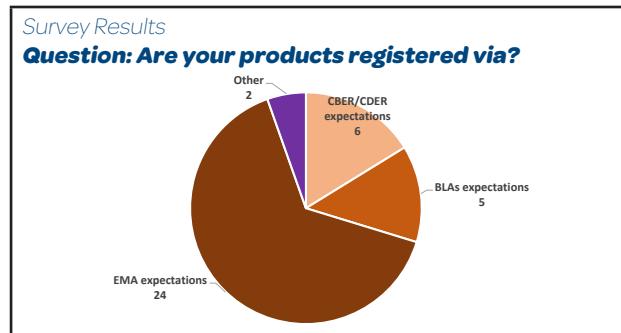
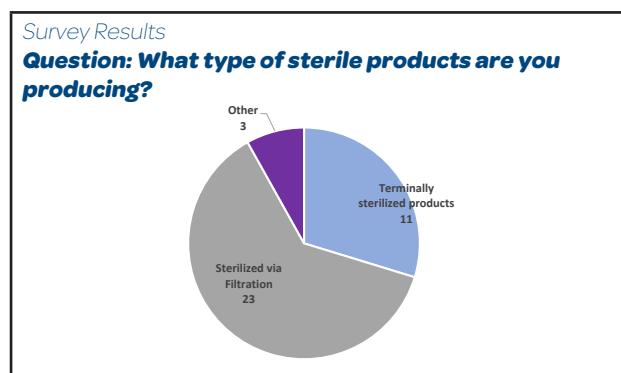
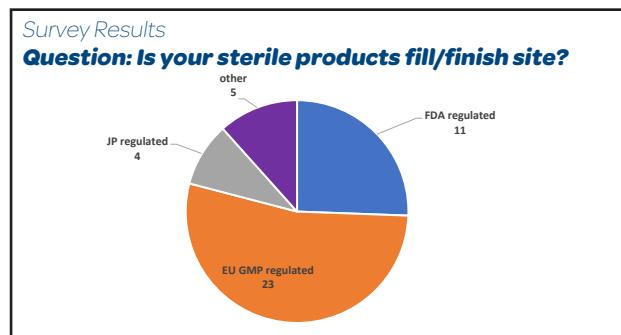
**The second part of the article includes the inputs from recognized microbiological methods specialists who shared their opinion and perspective on the current status of the in-process pre-filtration expectations for sterile products:**

- Thierry Bonnevay, Global Microbiology Analytical Expert, Sanofi Vaccines / Member of the European Pharmacopeia Expert Group N°1 (Microbiology).
- Radhakrishna Tirumalai, Senior Principal Scientist, Merck Research Laboratories Center for Excellence in Microbiology / Former Senior Principal Scientist and Liaison to the USP General Chapters-Microbiology Expert Committee at USP Convention
- Di Morris, PHSS Vice Chairperson / Former Medicines Inspector of the UK Department of Health.

## 1. Survey Results

### 1.1 Key Figures

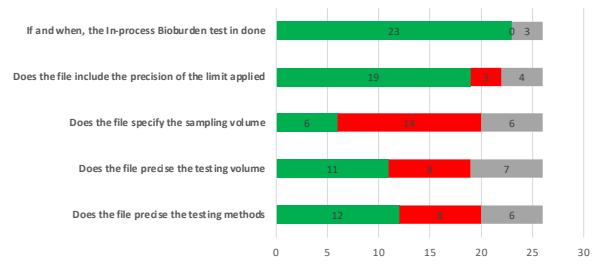
The survey included 20 questions posted during Q3/Q4 2021 by the A3P and AFI. For the purpose of the following results analysis, the answers to several questions or sub-questions were grouped. There were 26 participants, mainly EU or FDA GMP regulated sites, producing parenteral products sterilized by filtration and registered as per EMA expectations (Other: Global Markets, Russia, Swiss Medic).



## 1.2 Registration practices

### Survey Results

#### Question: What is the level of detail provided in your registration files with regard to In-Process Bioburden test?



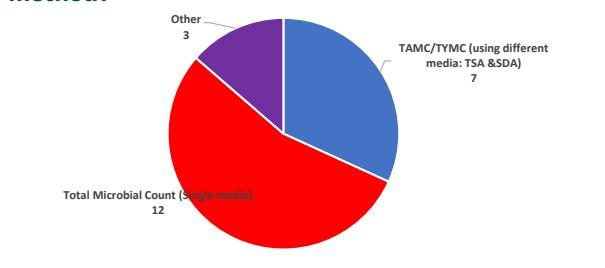
- A large majority of the participants register the in-process bioburden test, its associated limit and the location of the sampling

- Almost 50 % precise the testing method and volume. Sampling volume is less frequently included (6/26)

- It is noticed that 4 companies participating to the survey have answered yes to all these questions with the precision in the comments sections that this level of precision was directly expected by the registration dossier assessors.

### Survey Results

#### Question: Does the registration file precise the method?



- More than 50% of the participants register Total Microbial Count (TMC) using Trypticase Soy Agar media (TSA) as the method test for in-process bioburden

- 7/26 declare Total Aerobic Microbial Count (TAMC with TSA media) and Total Yeasts and Molds Count (TYMC using Sabouraud Dextrose Agar SDA); among them 3 participants add a selective growth agent into the SDA media.

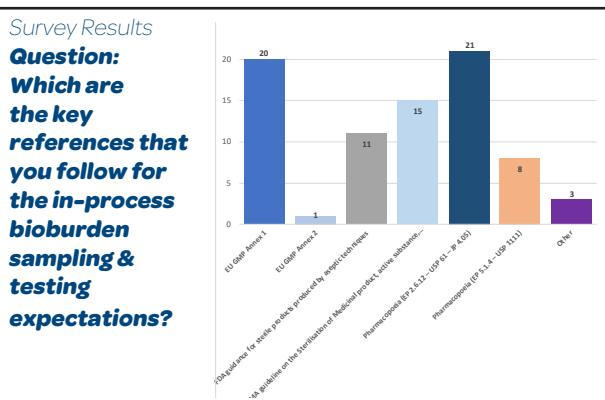
- 2 participants have also registered TMC or TAMC and TYMC depending on the registration period.

- 3 participants did not answer this question.

## 1.3 Sampling Practices

### Survey Results

#### Question: Which are the key references that you follow for the in-process bioburden sampling & testing expectations?

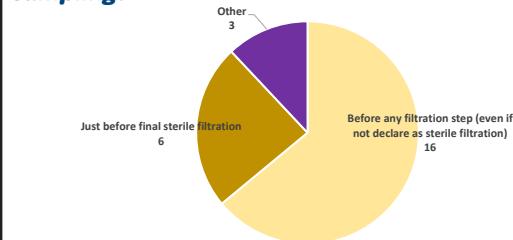


- With regard to sampling and testing requirements for In-Process Pre-Filtration Bioburden test of Sterile Products, a large majority of participants (21/26) do apply the Pharmacopeial expectations for the Microbial Numeration test to use for the release of Non-Sterile Products (EP 2.2.12 – USP 61 - JP 4.05)

- 20/26 use also the EU GMP Annex 1 and 15/26 the EMA guideline on the Sterilisation of medicinal product, active substance, excipient and primary container. Most of them use these references in addition to the pharmacopeias.

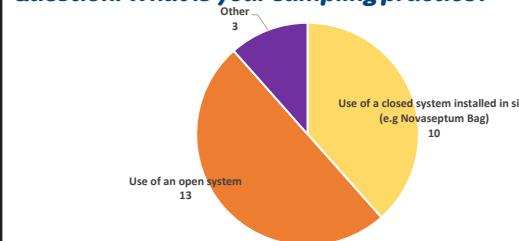
### Survey Results

#### Question: Are you performing In-Process Bioburden sampling?



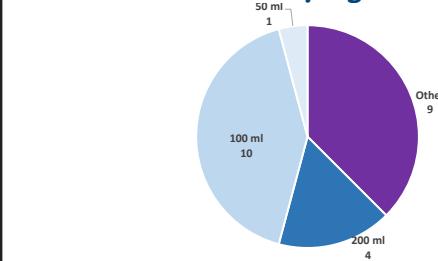
### Survey Results

#### Question: What is your sampling practice?



### Survey Results

#### Question: What is the sampling volume?



- 16/26 perform a product bioburden sample before any filtration step

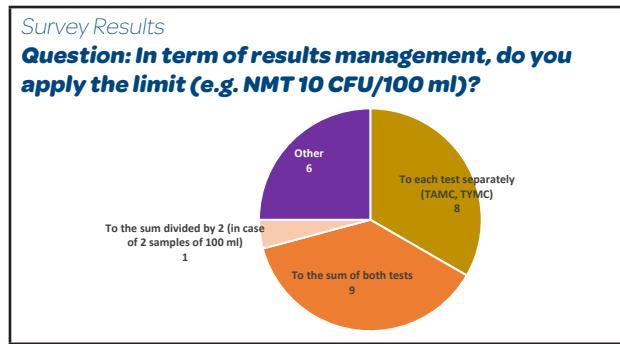
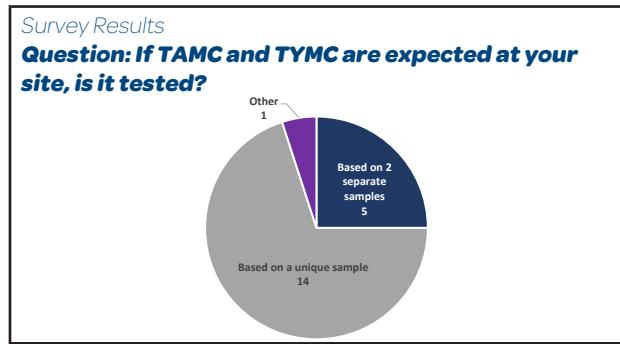
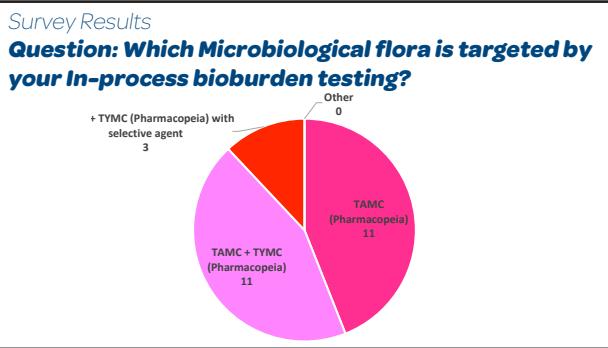
- 13/26 continue to use open systems to collect that sample

- We can observe that several different sampling volumes are used; a detailed analysis of individuals answers shows that 15/26 have a sampling volume of 100 mL or a larger volume (200 – 250 – 300 mL)

- In the case of small bioproducts production batches, the trend is to sample less than 100 mL

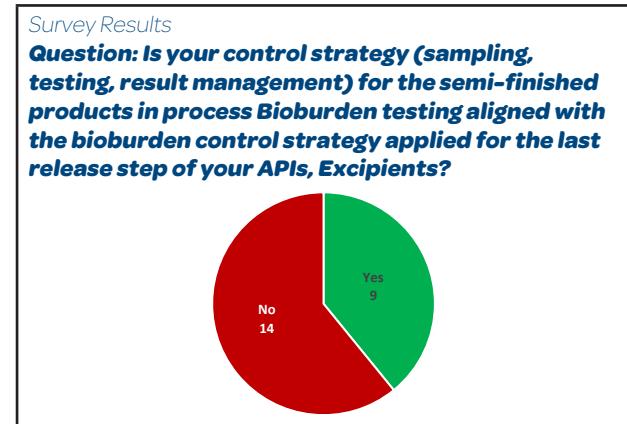
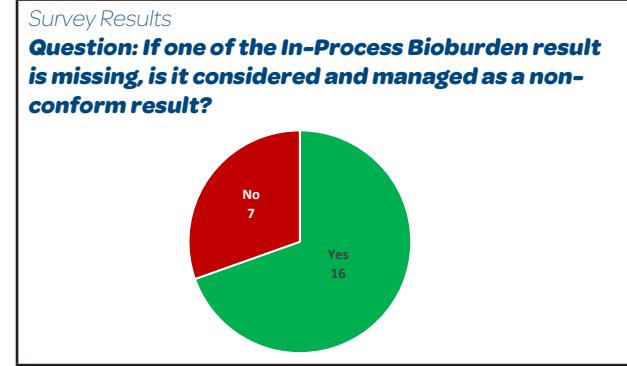
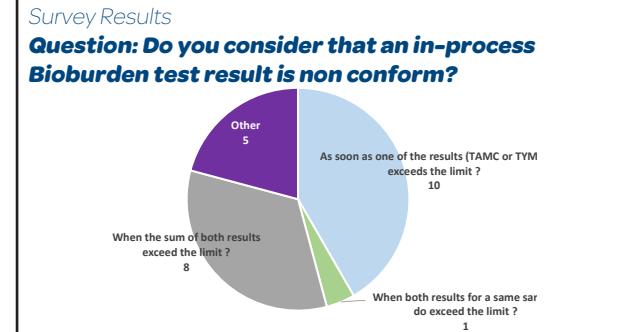
- One answer included as a comment that 100 mL is the sampling volume before the sterilizing filter, but a lower volume (10 mL or even 1 mL) is sampled before the bioburden reduction filter.

## 1.4 QC Lab testing practices



- The microbiological flora targeted is TAMC and TMYC in a short majority (14/26). A detailed analysis of the individual answers shows that among these 14 answers, the TAMC and TMYC tests are done based on a unique sample of product around 75 % of the cases and done on 2 separate samples in the other 25 %.
- There is no real trend observed in term of results management as approximately 50 % of the respondents (8/18 for that question) do apply the limit of NMT 10 CFU/100 ml to each test method separately and approximately 50 % (9/18) on the sum of both test methods.
- 1/18 respondents makes the sum of the results of TAMC + TMYC divided by 2 and applies the limit of NMT 10 CFU/100 mL to the obtained result.
- The rationale provided by the participants who are targeting "TAMC only" is that the EMA guideline for sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container sterilisation provides this limit of NMT 10/100 mL for TAMC "acceptable in most situations".
- Among the participants who are targeting TAMC + TMYC, 3 have added a selective agent to avoid that bacteria such as Gram positive spore formers (that can be recovered on both media) are counted twice and so the limit of NMT 10/100 mL applied to the sum of the 2 results may be seen as more relevant.

## 1.5 QA/QC practices



- 10/24 respondents do consider that the in-process bioburden test is non-conform as soon as one of the results (TAMC or TMYC) exceeds the limit. 8/24 only when the sum of both exceeds the limit.
- The majority (16/23) handle a missed bioburden sample as they would for a non-conform result (decision on the impacted batch based on the investigation, the additional process and other product testing data, microbiological test results for APIs and excipients, filter validation data, absence of observed trend for the in-process bioburden test results, etc).
- 14/25 respondents do not have the same strategy for bioburden sampling, testing and results management between the last release step of their API and for the in-process bioburden of the semi-finished products using the API.

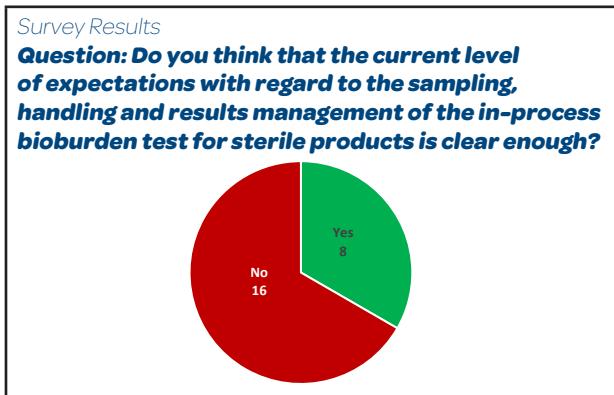
## 1.6 Registration and Regulatory Inspections Trends



## Reported Challenges / Observations:

- "No bioburden sampled before first filtration step"
- "Use of an open system for the sampling"
- "Non adequate specification used for the bioburden performed on the compounding tank before the clarification filtration (= before the storage and before sterile filtration)"
- "Bioburden sampling is done prior to the filling, only at the beginning and not at the end of final transfer"
- "EU Authorities: sampling volume non conform to 100 mL indicated in the guideline for sterilisation of medicinal products"
- "Absence of rationale to support the fact that we do not test 100 mL but 10 mL on TSA and 10 mL on SDA"
- "In-Process Pre-filtration Bioburden limit of 10 CFU/100 mL not applied to the sum of TAMC+TYMC result as done for raw materials"

## 1.7 Key potential clarification needs



### Abstract of collected Comments and Expressed Needs:

- "Some margin must be left to companies depending on the product context and risk profile".
- "Missing information about the expected rationale if volume differs from 100mL. Same for the calculation method for combining TAMC and TYMC".
- "No regulation clearly describes the bioburden before a sterile filtration or for contamination control strategy. Too much confusion with microbial count for non-sterile products".
- "We should clarify the result management when we test on TSA and SDA and the need to perform the sum".
- "Need to understand the management of the results".
- "Clarification on the method to be used for the expected result of bioburden of NMT 10 CFU/ 100 mL for the pre-sterilisation bioburden and a guideline for other filtration steps reference limits will be the best to avoid the multiple interpretations and strategies adopted by the different companies and in some cases also different sites of the same company".
- "Unfortunately, due to categorization of IPC, pharmacopeias do not want to describe the method to be applied in detail. Some Inspectors make the confusion with microbiological quality of final non-sterile products".

## 1.8 Discussion & Conclusion

The presented survey results on the current practices on in-process pre-filtration bioburden for sterile products show a real variability of in sampling, testing, results management and a certain level of confusion and misalignment on the interpretation of applicable regulatory or pharmacopeial expectations at industry and at inspection levels.

The direct application of release testing monographies for non-sterile products to in-process testing for sterile products without considering the overall bioburden control program in a sterile product facility for a specific production and sterilisation process, so as the product specificities seems inadequate.

The **USP chapter <1229.3> Monitoring of Bioburden** provides the following important knowledge elements.

### a. On semi-finished product specificities

"Many products are inherently antimicrobial, and some formulations contain antimicrobial preservatives, both of which can limit bioburden recovery. Products that are outside of the pH range of approximately 4-9 are strongly hypertonic or strongly hypotonic, or have low water activity, may reduce the level of recoverable microorganisms"

### b. On product bioburden control strategy

A typical bioburden-control program includes review and analysis of potential sources of contamination as well as sound process design and preventive and monitoring measures. The microbiological contamination-control program should be developed to identify and control bioburden and to assess product risk based on a formal assessment of risk modalities. The bioburden risk assessment should result in the establishment of critical control points and should include consideration of the following elements:

- Microbiological attributes of materials before sterilization and the manufacturing process used for the materials (if applicable)
- Inherent antimicrobial properties of the materials
- Time limits for process execution
- Water activity of the material
- Environmental conditions within the facility
- Equipment design and cleaning
- Sanitization, decontamination, and other active microbial control processes (such as prefiltration, temperature, pH, osmolarity, etc.)

Controlling the bioburden of materials and products to be sterilized will ensure conformance to the levels required by the sterilization process validation. Additionally, controlling the bioburden levels of the items to be sterilized assures that residuals (e.g., allergens, endotoxins, and exotoxins) from that population will also be controlled. This is important because direct detection of these materials is challenging.

### c. On sampling and testing considerations

"Bioburden evaluation should focus on micro-organisms that represent the greater concern on the sterilisation process. Total count methods should consider the properties of both the product under evaluation and the characteristics of the process". "Bioburden of greatest concern for a sterilizing filtration are *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Ralstonia* and *Mycoplasma*"

"The methods listed in Microbiological Examination of NonSterile Products: Microbial Enumeration Tests <61> may be appropriate for bioburden evaluation, although they may require modification".

In conclusion, based on the survey results, trends and concerns/difficulties raised by the participants but also by taking into account the listed knowledge elements, it appears that there is an opportunity for adequate experts to develop additional guidance that would help the industries and the regulators to align on a best practice in term of sampling, contamination screening, testing methods and test results management for sterile products in process pre-filtration bioburden.

## 2. Experts view

This second part of the article consists in the presentation of the interview answers from 3 experts to a questionnaire focused on the 3 main concerns/difficulties raised in the first part.

Our expert panel includes:

- **Thierry Bonnevay**, Global Microbiology Analytical Expert from Sanofi Vaccines, Member of the European Pharmacopoeia Microbiological Methods Experts Group N°1 Microbiology ► [answers in green](#).

- **Radhakrishna Tirumalai**, Senior Principal Scientist, Merck Research Laboratories Center for Excellence in Microbiology Former Senior Principal Scientist and Liaison to the USP General Chapters-Microbiology Expert Committee at USP Convention ► [answers in blue](#).

- **Di Morris**, PHSS Vice Chairperson, former Medicines Inspector of the UK Department of Health ► [answers in purple](#).

### Topic 1: Applicable expectations to in-process pre-filtration bioburden for parenteral products

**Question 1:** Which is the most relevant regulatory expectation or guidance to follow to ensure a compliant and relevant strategy for in-process pre-filtration bioburden strategy for parenteral products?

"The EMA Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container (March 2019)" because it's the only regulatory document that precises the volume to be tested (100 mL), the specification to be applied (NMT 10 CFU / 100 mL) and the method to be used (TAMC, so only Soybean soja agar

*media incubated at 30-35°C during 3 to 5 days)" (TB)*

*- "I am not aware if any relevant regulatory guidance exists on this topic that can be followed without modification" (RT)*

*- "The EMA Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container (from March 2019 = EMA/CHMP/CVMP/QWP/850374/2015 that came into force 1 October 2019)*

- This guideline replaces the document Decision trees for the selection of sterilisation methods (CPMP/QWP/054/98), which is an annex to the note for guidance on development pharmacaceutics (CPMP/QWP/155/96) and the document Decision trees for the selection of sterilisation methods (EMEA/CVMP/065/99) which is an annex to the note for guidance: Development pharmacaceutics for veterinary medicinal products (EMEA/CVMP/315/98).*

*However, it missed the reference to CPMP/QWP/486/95 – but it contains the same information*

- Legal Status - This guideline should be read in conjunction with Directive 2001/83/EC on the community code relating to medicinal products for human use, Directive 2001/82/EC on medicinal products for veterinary use as amended and also the current European Pharmacopoeia. It is legally binding and should be followed.*

- In addition, this guideline should be read in conjunction with all other relevant directives and regulations, and all relevant Commission, (V)ICH and CXMP guidelines, Q&A documents and other documents as linked to or published on the EMA website ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))*

*The product bioburden is a requirement of the dossier and not the Pharmacopoeia or Annex 1 with regard to the pre filtration bioburden limit. It has a link to GMP hence inspectorates are checking bioburden results." (DM)*

**Question 2: What do you think about the extension of some microbial enumeration requirements for final release of non-sterile products to in-process pre-filtration bioburden testing of parenteral products?**

*"These are just two different things: IPC bioburden before filtration is a quantification and identification of the bioburden done to know what is immediately going on the filter for assessment of the efficacy of sterile filtration (Microbial retention). For final non-sterile product, it reflects the final non-sterile product microbiological quality that results from the entire processing steps (storage and shelf life included)." (DM)*

*- "Yes, if so, only TAMC as an approximation, with an Endotoxin specification, as well". (RT)*

*"That assessment has to be included in the Contamination Control Strategy – for a sterile product the expectations for the enumeration are clear – NMT10cfu/10mL for the solution prior to the final filtration. The regulatory and inspectorate position is that the bioburden has to meet these limits using the test method from the Ph.Eur. and that it is the solution before the sterilising filter – ie the one as close as possible to the fill line as per Annex 1 that has to comply with NMT10cfu/100mL. The regulation is clear – it specifies the value and when it should be taken. It states the test to be used in the Ph.Eur. It states that it has to be part of the description in the dossier and it has its legal basis in the directives." (DM)*

**Question 3: How far is this relevant? (e.g systematic search of yeast and molds on an additional media that is not necessarily selective enough, make the sum of the TAMC and TYMC results generated on 2 separate testing samples of 100 mL and applying the acceptance criteria of NMT 10 CFU/100 mL on that sum, etc...)**

*"IPC for Product bioburden before filtration has the same specification as Water for Injection. Testing 100 mL for high production volumes for TAMC only is sufficient based on the fact that the product sampling is performed in a filling area Grade A/B, with no molds at all or less than 0,1% of mold recovery in the environment, that TAMC method enables the recovery of a large variety of molds et molds are the less challenging micro-organisms to retain by filtration (x10 at least bigger than bacteria). So only TAMC, with 100 mL product analyzed by membrane filtration, one final result and specification < 10 CFU / 100*

*mL is appropriate. Don't forget that this test is not only a quantitative assay but also a qualitative assay, any CFU recover by the method should be identified to the species level even if you are compliant to the specification (less or equal to 10 CFU). In the case of bulk size less than 5 liters, you could sample about 1% of the total production volume." (TB)*

*- "An additional general media would be the best solution." (RT)*

*- "EP 2.6.12 allows for a single media which has yeast and mould growth promotion. I do not understand why organisations think they need to do a separate Yeasts and Moulds (unless mandated by a competent authority) – if that was the case, we would still be using both media all the time in our EM programmes. I think the bigger picture is why are folks thinking they need to use SDA - both the regulation and E.P. 2.6.12 refer to TMAC and not Yeasts and Moulds knowing that this is the test to be applied with as I said the correct growth promotion.*

*We know that the media we use is already limited and does not recover the vast majority of organisms and will not recover sub-lethally challenged organisms hence the importance of controlling bioburden from the start of the process and is the main impact of a Contamination Control Strategy". (DM)*

**Topic 2: Control strategy details (flora targeted, media to use, sampling & testing volume, limit)**

**Question 1: Based on the survey questionnaire results, we observe that different control strategies are applied that are not always based on strong rationales. How can we explain this variability in the current interpretation of the applicable expectations at industry and regulatory inspection level?**

*- "Because there is clearly a confusion at industry and inspectors levels between regulations that are clear for release test of final non sterile product and an IPC test for immediate bioburden to challenge the filter used for sterilisation purpose". (TB)*

*- "Lack of clear guidance or understanding and misapplication of methods including sampling". (RT)*

*- "It goes back to people just using the PhEur and not reading the regulation that goes with it for pre filtration bioburden. It is clear that not everyone is aware of the legal duties and expectations and that not all assessors are working to the same requirements" (DM)*

**Question 2: In the context of the new EU GMP Annex 1 revision that promotes the use and documentation of risk-based strategies, do you think that an appropriate process/product risk assessment as the basis of the strategy would be better accepted in the future by the inspection authorities?**

*- "Yes. Explain and justify why only TAMC with 100 mL and specification < 10 CFU/100mL are sufficient". (TB)*

*- "Yes, I agree with a risk-based approach". (RT)*

*- "No, because risk assessments performed by most of the industry is to provide a justification for not doing something rather than the full impact to the patient; a risk assessment should be to meet the regulation but in a different way – the regulation already allows for a different process with appropriate justification". (DM)*

**Question 3: If yes, which aspects should be included in such a risk assessment?**

*- "The challenge used for the sterilizing filter, the very low mold recovery in the production areas, the fact that almost all the main encountered molds can grow well on TAMC test media. In addition, most of us do not use the Sabouraud as part of our environmental monitoring program for the same reasons". (TB)*

*- "total counts, type (gram negative, for example) and size". (RT)*

**Topic 3: Possible clarifications at pharmacopeial level? Or in any other regulatory reference?**

**Question 1: Is there any initiative in-progress at pharmacopeial level to clarify the expectations regarding in-process pre-filtration bioburden for parenteral products? at other regulatory institution level?**

....

- "Not for Ph Eur, and I'm not aware about such clarification for other Pharmacopeias. If so, would be more a guideline than a compendial assay". (TB)

- "Yes, at USP". (RT)

- "It is clear already – organisations just need to understand the basis for the regulation". (DM)

#### **Question 2: If yes, please share the scope and status of current actions?**

- "Either a new chapter or revisions to existing USP chapter <1229.3> + an article clearly describing the intent and limitations of USP <61> is planned. A chapter on Definitions (lexicon) is also being proposed. The target for these changes is a publication at the Pharmacopeial Forum by mid-2023". (RT)

#### **Question 3: What would you recommend to ensure a stronger understanding of the real expectation for that test and a better alignment in term of interpretation of the expectations between industries and authorities?**

- "Scientific articles (PDA, biological, USP, A3P La Vague, etc..), future guideline in pharmacopeias, oral presentations during conferences advocate and explain to microbiology QC head as well as to inspectors the current regulation to avoid wrong extension of non-sterile product release test expectations to an In Process Control test before the sterile filtration for parenteral products". (TB)

- "We have to understand correctly the definition of Bioburden and apply/develop a method that will address bioburden. We know that bioburden is not merely sum of TAMC and TYMC". (RT)

- "That QA and regulatory compliance ensure they understand the legal basis for the requirements and top follow them, EMA has not helped by not ensuring consistency in the history between the documents as they have been updated but regulatory departments should be following the changes. The expectation for the test is to ensure there is a low bioburden in the solution before it reaches the

final filtration. A low bioburden should reduce the risks on endotoxin and exotoxins contaminating the final product and passing the LAL test – which has its own limitations and is a key part of a products sterility assurance and patient safety." (DM)

#### **Conclusion for the experts' views part:**

Each of our 3 interviewed specialists has provided his/her own perspective and opinion based on expertise background, experience, sensibility and regional interpretation (each expert comes from another country France, USA or UK). The legal fundamentals were reminded and summarized so as the way we must apply the texts. Multiple rationale elements have been provided that could be further re-used to develop additional risk-based guidance for sampling, testing methods and testing results management.

Work is in-progress at USP level that hopefully will bring clarity in how far the application of pharmacopeial expectations for non-sterile products release test can be extended to the in-process bioburden test for sterile products.

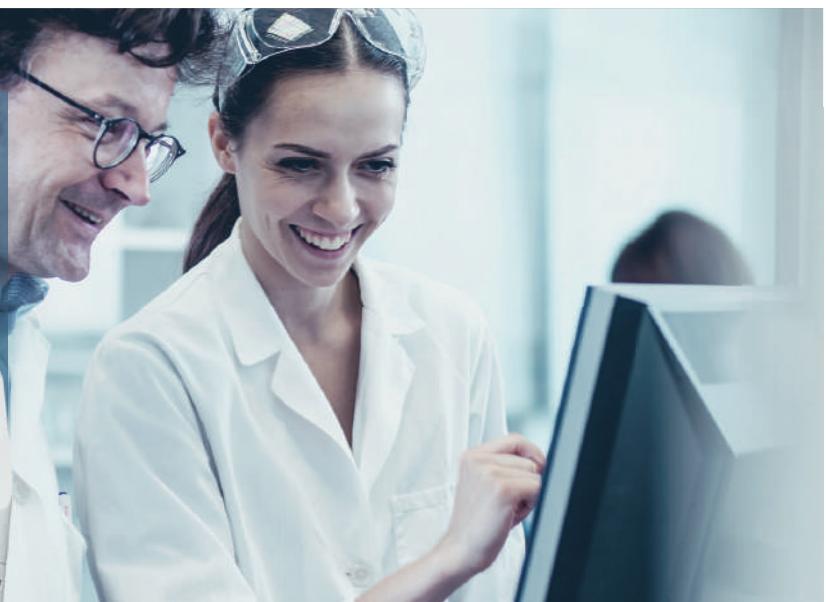
#### **References**

- Current EU GMP Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products (2008)
- EU GMP draft revision Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal (2020)
- FDA guidance for sterile products produced by aseptic techniques (2004)
- EMA Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container (2019)
- USP chapter <1229.3> Monitoring of Bioburden
- Harmonized Pharmacopeia (EP 2.6.12 – USP 61 – JP 4.05) Microbial Enumeration Test for NonSterile Products
- USP chapter <1229.4> Sterilizing Filtration of Liquids
- Hoenen I, Short overview of the A3P/AFI group Survey Results on In-Process Pre-Filtration Bioburden Testing for Sterile Products, A3P Microbiological Form, Lyon, June 2022.



# L'avenir du contrôle microbiologique en ligne

BWT AQU@SENSE MB



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.

# Projet de norme int. amené à être amendé PR ISO 11737-3 : Stérilisation des produits de santé - Méthodes microbiologiques - Partie 3 : essai des endotoxines bactériennes.

Par Céline PEREZ, Pr Edith FILAIRE, Dr Christian POINSOT- Groupe ICARE

[celine.perez@groupeicare.com](mailto:celine.perez@groupeicare.com)

Les Essais des Endotoxines Bactériennes (EEB) sur les dispositifs médicaux (DM) et produits de santé sont conduits actuellement selon des méthodes décrites dans les référentiels suivants :

- PE 2.6.14 : Essais des endotoxines bactériennes
- USP <85> : BACTERIAL ENDOTOXINS TEST
- USP <161> MEDICAL DEVICES: BACTERIAL ENDOTOXIN AND PYROGEN TESTS
- l'ANSI/AAMI ST72 : 2019 (Bacterial endotoxins-Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing)



Les méthodes des Pharmacopées européennes et américaines concernent davantage les produits pharmaceutiques et ne sont pas spécifiques aux DM, à l'exception de l'USP <161>. L'ANSI/AAMI ST72 étant une norme américaine, ce projet de norme internationale est donc indispensable pour combler le vide normatif au niveau international. Ce dernier a débuté en 2018 et est actuellement au stade DIS d'Enquête Publique (Résultats du dépouillement de l'enquête communiqués le 25/03/2022), la publication de la nouvelle norme devrait avoir lieu en 2023. Il s'est largement inspiré de l'ANSI/AAMI ST72 : 2019, même si plusieurs sections, tant dans la partie normative que dans la partie informative, ont été réorganisées, étendues ou modifiées.

À la suite des récents résultats du dépouillement de l'enquête publique montrant une opposition majoritaire à ce projet en raison du fait de l'exclusion de méthodes alternatives, ce dernier sera amené à être modifié. Dans l'attente de la version finale de la norme, l'objet de cet article est de mesurer l'impact qu'elle pourra avoir sur les EEB des fabricants de produits de santé et de DM en particulier, en détaillant les principales modifications des méthodologies engendrées versus celles des Pharmacopées (PE ou USP).

## 1. Objet / Domaine d'application

L'enjeu de cette nouvelle norme est de décrire les critères généraux à appliquer pour la détermination des endotoxines bactériennes présentes sur ou dans les produits de santé, les composants ou les matières premières en utilisant les méthodes d'EEB, à l'aide des réactifs de Lysat d'Amébocyte de Limule (LAL). Elle ne s'applique donc pas à l'évaluation des pyrogènes autres que les endotoxines bactériennes.

Les autres méthodologies de détection des endotoxines (Essais d'Activation des Monocytes ou MAT et le facteur C recombinant ou rFc), ne sont pas incluses. Les spécifications particulières de limites d'endotoxines ne sont pas non plus abordées dans cette norme.

Des recommandations sont formulées au sujet de la sélection des unités de produit, de la validation des

méthodes, de l'utilisation des techniques pour les essais de routine, de l'interprétation des résultats d'essai, des alternatives aux essais par lots et à l'évaluation des risques.

Les essais décrits dans cette norme portent notamment sur les produits devant être non pyrogènes en raison de leur usage prévu et/ou de la mention "non pyrogène" sur l'étiquette.

Les produits qui doivent être non pyrogènes ou qui sont étiquetés comme tels (Tableau 1) doivent faire l'objet d'une justification explicite au moyen d'une méthode EEB appropriée.

Caractéristiques	Dispositif qui doit être non pyrogène en raison de l'usage prévu	Dispositif qui n'est pas tenu d'être non pyrogène
<b>MENTION NON PYROGÈNE SUR L'ÉTIQUETTE</b>	Essais requis	Essais requis
<b>AUCUNE MENTION NON PYROGÈNE SUR L'ÉTIQUETTE</b>	Essais requis	Essais non requis

Tableau 1 : Exigences d'EEB pour les produits étiquetés non pyrogènes

Cette justification doit comprendre au moins l'un des éléments suivants qui constituent les 2 types de plans d'échantillonnage :

- Essais sur le produit fini pour chaque lot (essais par lots)
- Alternative aux essais par lots.

## 2. Sélection des unités de produits et Plans d'échantillonnage des essais EEB

La sélection des unités de produits pour les essais EEB doit être fondée sur des critères définis dans le plan d'échantillonnage qui doit comporter les échantillons représentatifs des familles de produits établies sur la base d'une évaluation des produits, des procédés de fabrication, des composants et des matériaux.

Des recommandations pour définir ces groupes d'échantillonnage comme lot de production aux fins de l'essai des endotoxines (plusieurs types ou groupes de produits similaires présentant le même risque d'endotoxines) sont données en Annexe A de la norme.

Ce plan d'échantillonnage peut être de 2 types :

- **Essais par lots**

L'absence de pyrogène est confirmée par l'utilisation d'essais sur le produit fini.

Le lot peut être défini comme étant chaque lot de production ou un groupe d'échantillonnage autre que le lot de production sur la base d'une justification documentée ou d'une évaluation des risques.

Des recommandations sont données dans cette nouvelle norme pour déterminer le nombre d'échantillons nécessaires en fonction de la taille du lot (Tableau 2).

Taille du lot	Nombre d'échantillons
<30	2
30 À 100	3
≥101	3% du lot, maximum de 10

Tableau 2 : Nombre d'échantillons nécessaires en fonction de la taille du lot

Dans la plupart des cas, chaque lot de produit doit être soumis à essai en utilisant un nombre approprié d'échantillons, ne dépassant pas 10, pris au hasard pour représenter la qualité du lot. Les plans d'échantillonnage alternatifs qui utilisent des échantillons de petite taille ou qui ne soumettent pas à essai chaque lot de produit doivent être clairement définis et étayés/justifiés par une évaluation des risques.

D'autres plans d'échantillonnage dérivés statistiquement, nécessitant parfois un plus grand nombre d'échantillons, peuvent être nécessaires à des fins de validation ou d'investigation.

Si les plans d'échantillonnage utilisés nécessitent la sélection de plus de 10 échantillons d'un lot, il convient de ne pas regrouper plus de 10 échantillons dans un essai.

### • Alternatives aux essais par lots

Des alternatives aux essais par lots peuvent être utilisées s'il a été démontré que les procédés de fabrication, les matériaux et l'environnement de fabrication sont bien contrôlés.

Si des alternatives aux essais par lots sont utilisées, une évaluation des risques doit être effectuée afin d'évaluer les critères utilisés pour établir le plan d'échantillonnage : voir Paragraphe 7.

Les échantillons sélectionnés pour les essais doivent inclure tous les facteurs susceptibles d'avoir une incidence sur les niveaux d'endotoxines ou d'y contribuer.

## 3. Méthodes pour l'EEB

Il n'existe aucune différence de méthodologies avec celles décrites dans les Pharmacopées Européenne et Américaine PE 2.6.14, USP <85> et USP <161> :

Les trois techniques pour les EEB décrites dans la Norme sont les mêmes que celles des Pharmacopées précitées :

- Techniques par gélification : essai limite et méthodes de dosage
- Techniques en point final : colorimétrie en point final
- Techniques cinétiques : colorimétrie et turbidimétrie cinétiques.

Concernant les calculs de la limite d'endotoxines applicable pour la solution d'extrait et de la Dilution Maximale Significative (DMS), les formules de calcul sont les mêmes que celles décrites dans la Pharmacopée américaine USP <161>.

Les paramètres d'essais critiques, équipements / matériaux et réactifs recommandés sont également les mêmes que ceux décrits dans les Pharmacopées Européenne et Américaine.

## 4. Validation des méthodes pour l'EEB

Elle comprend la validation du produit et de la méthode d'essai, la préparation des échantillons ainsi que la qualification des réactifs et des analystes. Au moins un lot par produit ou famille de produits doit être utilisé afin de démontrer la validation du produit et de la méthode d'essai.

### 4.1 Validation du produit et de la méthode d'essai

Quelle que soit la technique utilisée (méthodes par gélification, cinétique ou en point final), les exigences pour la validation du produit/ de la méthode d'essai et le nombre de répliques (ou d'exemplaires) restent les mêmes que celles des Pharmacopées européenne et Américaine.

Les seules différences apportées par la Norme par rapport à ces dernières ont trait :

- Au calcul du recouvrement moyen de l'endotoxine ajoutée (PPC): "Calculer le recouvrement moyen en soustrayant la concentration moyenne en endotoxine dans la solution d'échantillon de la concentration moyenne en endotoxine dans le contrôle positif du produit et en divisant par la concentration en endotoxine connue" (alors qu'il est écrit dans les Pharmacopées : "Calculez le

recouvrement moyen des endotoxines ajoutées en soustrayant la concentration moyenne en endotoxines de la solution seule de celle obtenue pour la solution contenant les endotoxines ajoutées".

- Aux critères de validation de la méthode : Les 3 critères cités dans la Norme sont identiques à ceux des Pharmacopées excepté celui concernant le résultat obtenu pour le contrôle négatif (Solution D) : La Norme précise que "le temps de réaction moyen du contrôle négatif doit être supérieur au temps de réaction moyen du standard le plus faible de la série de contrôles" alors que les Pharmacopées demandent que le "résultat obtenu pour la solution D (témoin négatif) ne soit pas supérieur à la limite spécifiée pour le blanc dans la description du lysat utilisé, ou est inférieur à la limite de détection de ce lysat."
- A la possibilité d'utiliser des Courbes d'étalonnage archivées (Tableau 3) pour la série de contrôle standard lors de la validation des méthodes d'essais pour les méthodes cinétiques et en point final, ce qui peut constituer un gain de temps appréciable et limiter les manipulations source d'erreur.

#### **L'Annexe B.15 apporte les précisions suivantes**

Depuis la publication de l'ANSI/AAMI ST72 : 2019, des techniques et des équipements automatisés permettant de réduire les variations et les erreurs ont été développés et utilisés plus largement. Par exemple, un système automatisé de manipulation des liquides, l'utilisation de robots, etc. La plateforme mesure l'absorbance et compare la valeur observée avec une courbe d'étalonnage archivée.

Weber et al. (2014) ont rapporté que l'unité a réduit la manipulation des échantillons, le temps d'essai, les écarts et les investigations liées aux EEB.

#### **4.2 Préparation des échantillons**

Des recommandations sont apportées pour la préparation et l'extraction (ou non) des échantillons en fonction de leurs caractéristiques physiques (produits de santé solides, aqueux).

Des solutions pour pallier les interférences de l'échantillon (inhibition ou activation) sont également proposées : les extraits de l'échantillon peuvent être dilués sans dépasser la DMS et/ou traités par filtration, neutralisation, dialyse ou traitement thermique.

Ces traitements doivent être validés ou leur adéquation doit être démontrée sans perte d'endotoxines.

Toutes les manipulations d'échantillons doivent être spécifiées dans les données/rapports sur la validation de la méthode, et le même procédé doit être suivi pendant les essais de routine.

Contrairement à la Norme ISO 11737-1 pour laquelle une validation de l'efficacité de récupération de la biocharge est requise, la validation de l'efficacité de l'extraction pour les essais de détection d'endotoxines n'est non seulement pas demandée, mais elle n'est pas recommandée. En effet, le groupe de travail sur les méthodes microbiologiques du comité de stérilisation de l'American Association of Medical Instrumentation (AAMI) chargé en 2004 d'évaluer la pertinence de l'efficacité de la récupération des endotoxines pour l'extraction de produits de santé en vue d'essais sur les endotoxines, a montré que les limites d'endotoxines établies par la FDA et l'USP ont un facteur de sécurité adéquat basé sur une récupération inférieure à 100 % et a décidé que la validation de l'efficacité de l'extraction pour les essais de détection d'endotoxines n'est pas recommandée (Bryans et al. 2004). Le Sterilization Working Group 8 de l'AAMI (AAMI STWG08, Microbiological Methods) a adopté ces mêmes conclusions au cours des plus récents procédés de révision, et aucune exigence supplémentaire n'a été ajoutée concernant la nécessité de valider l'efficacité de l'extraction (ANSI AAMI ST72).

#### **4.3 Qualification des réactifs**

Quelle que soit la technique utilisée (méthodes par gélification, cinétiques ou en point final), la qualification des réactifs reste la même

que celles de la Pharmacopée Européenne 2.6.14 et de l'USP <85>.

Les seules différences apportées par la norme concernent les méthodes cinétiques et les méthodes en point final. En effet, il convient que la courbe d'étalonnage ne soit pas supérieure à 4 log, car une courbe de 5 log ou plus peut être interprétée de manière incorrecte dans la partie médiane de la courbe.

Si la courbe d'étalonnage est inférieure à 2 log, il est suggéré d'effectuer des dilutions de facteur 2 de la courbe d'étalonnage.

#### **4.4 Qualification de l'analyste : Nouvelle exigence demandée**

Il convient de démontrer le maintien des compétences de l'analyste afin de s'assurer qu'un analyste qualifié conserve les compétences et la formation appropriées pour effectuer un dosage, après sa qualification initiale.

Chaque analyste effectuant l'EEB doit démontrer ses compétences en menant à bien la méthode de qualification des réactifs. Ces compétences peuvent être démontrées par :

- La démonstration d'une performance acceptable constante du dosage (tendance)
- L'essai d'aptitude
- La requalification de l'analyste ; et/ou
- L'analyse des tendances des non-conformités.

#### **5. Essais de routine, surveillance et interprétation des données :**

Quelle que soit la technique utilisée (méthodes par gélification, cinétique ou en point final), les exigences des essais de routine et du nombre de réplicats restent les mêmes que celles de la Pharmacopée Européenne 2.6.14 et de l'USP <85>.

Cependant, pour les Méthodes par gélification, l'interprétation des résultats est différente de celle de la Pharmacopée Européenne 2.6.14 et de l'USP <85> en cas de résultat positif dans l'un des tubes :

*"L'élément soumis à essai est acceptable [...] lorsque des résultats négatifs sont obtenus dans les deux tubes contenant la solution d'échantillon.*

*Si des résultats positifs sont obtenus dans l'un des tubes contenant la solution d'échantillon, lors de l'essai à la DMS, l'élément soumis à essai dépasse la spécification relative aux endotoxines. Se référer aux recommandations relatives à l'investigation associée un résultat de limites hors spécifications (Annexe C)".*

Alors que pour la PE 2.6.14 et l'USP <85>, l'essai devait être répété en cas de résultat positif dans l'un des tubes : *"Si l'un des résultats obtenus avec la solution A est positif et l'autre négatif, répétez l'essai. Si, lors de la répétition, les 2 résultats obtenus avec la solution A sont négatifs, la préparation à examiner satisfait à l'essai ; si l'un des résultats obtenus pour la solution A (ou les deux) est positif, la préparation à examiner ne satisfait pas à l'essai."*

#### **6. Maintenance de la méthode EEB / Études d'adéquation, évaluation, réévaluation : Nouvelles exigences de la norme**

Afin de détecter les changements involontaires susceptibles d'entraîner des résultats d'essai invalides, une démonstration périodique de l'adéquation continue doit être effectuée si cette adéquation n'est pas systématiquement démontrée par un PPC (Positive Product Control) positif valide utilisant des méthodes cinétiques.

Les contrôles positifs de produit ou PPC de routine de la méthode d'essai cinétique peuvent permettre d'atteindre cet objectif.

Pour les modifications de produits, il convient d'effectuer des évaluations permettant de confirmer que le procédé de fabrication peut produire des produits respectant les limites établies après la modification. Il convient de justifier le nombre d'échantillons/de lots soumis à essai.

Une réévaluation (nouvelle étude d'adéquation) doit être effectuée pour tout changement susceptible de présenter un impact sur l'essai (susceptibles de modifier les niveaux d'endotoxines bactériennes) tels que :

- Modification apportée au produit : introduction de nouveaux matériaux, nouvelle configuration du produit...
- Modification apportée au procédé de fabrication : nouveau process de nettoyage, nouveau traitement de surface, nouveau process de stérilisation (pour les essais de post-stérilisation), site de fabrication différent...
- Modifications apportées à une méthode d'EEB : modifications de la méthode d'extraction, de la technique d'EEB (ex : gélification au lieu de méthode cinétique, utilisation d'un système cinétique colorimétrique à cartouche...), changement de fabricant de lysat, changement de laboratoire, d'analyste, de matériaux ou d'équipements de laboratoire.

Cette (Ré)évaluation doit comporter une évaluation de l'impact de la modification sur le résultat de l'essai. Les résultats de cette réévaluation doivent être consignés, et les études d'adéquation doivent être répétées si nécessaire.

Pour les méthodes cinétiques et les méthodes en point final, si un essai valide est obtenu, y compris un PPC valide, une étude d'adéquation portant sur un lot est considérée comme suffisante.

## 7. Alternatives aux essais par Lots

Dans la pratique, l'absence d'endotoxines et de pyrogènes en général est confirmée par l'utilisation des essais par lots du produit fini pour la libération de ce dernier. Les alternatives aux essais par lots peuvent être utilisées s'il a été démontré que le procédé de fabrication, les éléments d'entrée du procédé (matériaux, services collectifs) et l'environnement de fabrication sont bien contrôlés et capables de produire des produits dont les niveaux d'endotoxines sont constamment conformes aux limites spécifiées. Elles nécessitent une évaluation des risques qui doit être revue régulièrement (à chaque modification ayant un impact potentiel sur le niveau d'endotoxines) afin d'évaluer les critères utilisés pour établir le plan d'échantillonnage et des données correspondantes démontrant que le procédé de fabrication peut produire un produit respectant systématiquement les limites d'endotoxines spécifiées.

Ces données comprennent généralement l'essai d'un nombre spécifié de lots, l'essai sur une période de temps spécifiée, l'essai de produits principaux représentatifs, l'essai de matières premières/composants et/ou de procédés en cours de fabrication, la vérification des contrôles opérationnels de fabrication, en particulier des eaux de process potentiellement contaminées.

Les critères pour établir des alternatives aux essais par lots sont :

- L'identification des étapes clés du procédé ou des points de contrôle, ainsi qu'une évaluation supplémentaire des risques visant à démontrer que le procédé de fabrication aboutit à un produit respectant systématiquement les limites d'endotoxines spécifiées..
- La validation, conception du procédé de fabrication, et contrôle (niveaux d'alerte et d'action), ainsi que par un examen périodique et des ajustements effectués si nécessaire.
- La justification documentée et le plan d'échantillonnage défini. Il convient d'envisager un plan d'échantillonnage en cas de défaillance, ainsi que les exigences nécessaires pour revenir à un plan alternatif aux essais par lots ou à un plan d'échantillonnage réduit, et de les documenter, le cas échéant.

Les alternatives aux essais par lots peuvent comprendre plusieurs options, notamment la réduction du nombre d'échantillons soumis à essai, la réduction de la fréquence des essais, l'essai sur des représentants de familles de produits ou l'utilisation d'alternatives au

produit fini, par exemple un produit de substitution.

Les cas où des alternatives aux essais par lots peuvent être envisagées sont les suivants :

- Les produits présentant un historique de contrôle réussi des endotoxines du produit fini,
- Les produits présentant un risque de contamination par des endotoxines plus faible en raison de l'absence d'exposition à une eau qui n'a pas été qualifiée pour contrôler les niveaux d'endotoxines,
- Les produits soumis à un procédé de fabrication qui a été validé pour dépyrogénier le dispositif,
- Les produits qui, sur la base de leur contact prévu avec le patient, présentent un risque attendu mineur ou négligeable de réaction pyrogène.

En cas d'utilisation d'un plan d'échantillonnage alternatif aux essais par lots, il convient d'évaluer l'impact d'un résultat hors spécifications sur des lots non soumis à essai ou sur le produit fini, conformément aux procédures établies pour les produits non conformes. Il convient de tenir compte, dans cette évaluation, du risque pour tous les produits représentés par le plan d'échantillonnage. Dans le cadre de l'investigation, il convient d'examiner les lots libérés auparavant et associés à des alternatives aux essais par lots et d'évaluer les risques qu'ils présentent.

Ces résultats hors spécifications peuvent remettre en question le choix de procéder aux alternatives aux essais par lot. C'est pourquoi, il est important de les consigner dans le plan de gestion des risques qui doit être revu régulièrement afin de prendre les décisions qui s'imposent (revenir aux essais par lots ou adopter un plan d'échantillonnage réduit).

## 8. Limites d'Endotoxines applicables

Les limites d'endotoxines des DM recommandées par cette norme sont les mêmes que celles fixées par l'USP <161> : Des études menées chez l'homme ont confirmé qu'une dose de 5 UE/kg-1 constituait un seuil de tolérance approprié pour des endotoxines bactériennes en contact avec le système circulatoire ou le système lymphatique. En prenant une masse corporelle de 70 kg, la quantité maximale d'endotoxine pouvant être administrée en une heure est de 350 UE. La limite fixée à l'origine par la FDA et actuellement utilisée par l'USP a été réduite de 350 UE à 200 UE pour tenir compte des inefficacités potentielles de l'extraction, et a fixé la limite de 20 UE/dispositif sur la base du regroupement des extraits de 10 dispositifs (en supposant dans le pire des cas que les 200 UE pourraient provenir d'un seul dispositif dans l'extrait regroupé de 10 dispositifs).

La limite de 2,15 UE/dispositif a été fixée pour les dispositifs en contact avec le liquide céphalo-rachidien, car l'endotoxine dans l'espace intrathécal (ou intrarachidien) a un pouvoir pyrogène beaucoup plus important que l'endotoxine avec contact intravasculaire.

Pour les dispositifs qui entrent directement ou indirectement en contact avec l'environnement intraoculaire, une limite d'endotoxines inférieure peut s'appliquer.

Des limites d'endotoxines plus élevées que 20 UE/dispositif peuvent être justifiées et nécessitent une acceptation par les autorités réglementaires.

Par exemple, une limite de 35 UE/dispositif ou plus pourrait être appropriée pour les dispositifs médicaux sans exposition systémique, étant donné que la puissance de l'endotoxine pour stimuler une réaction pyrogène est plus faible et qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter une réduction supplémentaire de la limite en raison des inefficacités potentielles d'extraction.

Les produits de santé implantables sous-cutanés sans exposition systémique sont des exemples de produits pour lesquels des limites d'endotoxines plus élevées peuvent être justifiées.

## 9. Recommandations relatives aux résultats de limites hors spécification (OSL) et aux investigations associées

Les OSL, Out of Specifications Limits ou limites hors spécification représentent les échantillons dont le résultat de l'EEB est valide, mais qui dépassent la spécification de limite d'endotoxines du produit.

Les recommandations de l'annexe C de la nouvelle norme spécifient que :

- Si l'essai d'investigation complémentaire révèle une erreur du laboratoire, sous forme d'une contamination qui aurait pu se produire pendant l'extraction ou pendant l'EEB initial, l'essai initial peut être considéré comme non valide (c'est-à-dire un "no-test") et l'EEB peut être répété en utilisant de nouveaux échantillons de produit et la taille d'échantillon initiale,
- Si l'investigation du laboratoire ne permet pas d'identifier la cause profonde de l'OSL, des essais d'investigation supplémentaires (par exemple, un contre-essai de l'extrait) visant à vérifier la validité du résultat initial peuvent être effectués afin d'examiner la possibilité qu'une contamination extrinsèque se soit produite pendant l'essai initial d'endotoxines bactériennes (=contamination provenant de sources autres que les matières premières du produit, les auxiliaires technologiques, le traitement du produit ou l'emballage du produit).

Par ailleurs, un contre-essai de l'extrait doit être réalisé en utilisant les préparations d'extraction originales afin d'examiner la possibilité d'une contamination extrinsèque lors de l'EEB initial.

Il convient de soumettre à essai au moins deux fois (2x) le nombre de réplicats de la préparation d'extraction de l'échantillon original utilisée lors de l'essai initial. Par exemple, dans un essai initialement réalisé en un seul essai en double exemplaire, le contre-essai d'investigation consisterait en deux essais, chacun réalisé en double exemplaire.

Si l'extrait confirme la présence d'endotoxines, un essai répété du produit utilisant de nouveaux échantillons de produit peut être effectué afin d'examiner la possibilité d'une contamination extrinsèque survenue lors de la préparation initiale de l'extraction de l'échantillon. Dans un essai répété de produit, il est recommandé d'augmenter le nombre d'échantillons de produit par rapport au nombre initial soumis à essai. Par exemple, il convient de soumettre à essai au moins deux fois (2x) le nombre d'éléments soumis à essai initialement lors de l'essai répété du produit

## CONCLUSION

L'impact majeur apporté par cette nouvelle norme est l'obligation de réaliser les EEB sur chaque lot de produit finis (Essais par Lots) à moins de recourir aux alternatives aux essais par lots sous réserve de réunir des conditions bien définies, justifiées et documentées.

Il est possible d'utiliser les courbes d'étalonnage archivées lors de la validation des méthodes d'essais pour les méthodes cinétiques et en point final. Il est à souligner que la validation de l'efficacité de l'extraction des endotoxines n'est pas demandée dans cette norme et même non recommandée.

On peut cependant regretter que la version actuelle ne reflète pas l'évolution des réglementations nationales qui régissent les EEB et que des méthodologies alternatives comme le facteur C recombinant (rFc), aient été exclues. La méthode rFc représente en effet la dernière solution de pointe pour tester efficacement les endotoxines bactériennes en réunissant de nombreux avantages : méthode plus spécifique en évitant les faux positifs dus aux  $\beta$ -glucanes, méthode validée selon les critères standards des tests d'endotoxines bactériennes de la PE (Chap. 2.6.32), utilisation de recombinants qui garantissent la cohérence de lot à lot, méthode qui s'affranchit de l'utilisation des Limules et contribue ainsi à la préservation de ces espèces menacées, en concordance avec

la Directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (règle des 3R).

L'enquête publique en France, dont les résultats ont été publiés le 25/03/2022, a d'ailleurs recueilli une majorité d'oppositions au projet actuel en raison de l'exclusion de la méthodologie du rFc.

Cette méthodologie rFc ne sera, à l'heure où cet article est écrit, pas intégrée dans le nouveau projet de norme, en raison du refus des Etats Unis.

## Références

- WEBER, J., RYAN, G., BERLAM, S. Implementation of a rapid endotoxin testing platform. American Pharmaceutical Review, 17 (Endotoxin Detection Part II Supplement): p. 12-15. (2014)
- BRYANS T.D., BRAITHWAITE C., BROAD J., COOPER J.F. et al. Bacterial Endotoxin Testing: A report on the methods, background, data, and regulatory history of extraction recovery efficiency. Biomed. Instrum. Technol. 2004, 37 pp. 73–78
- ANSI/AAMI ST72:2019 : Bacterial endotoxins— Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing
- PE 2.6.14 : Essais des endotoxines bactériennes
- USP <85> : BACTERIAL ENDOTOXINS TEST
- USP <161> MEDICAL DEVICES: BACTERIAL ENDOTOXIN AND PYROGEN TESTS
- ISO 11737-1: 2021 : Stérilisation des produits de santé - Méthodes microbiologiques - Partie 1 : détermination d'une population de micro-organismes sur des produits

## Acronymes & définitions

**AAMI:** American Association of Medical Instrumentation

**DM :** Dispositif Médical

**DMS :** Dilution Maximale Significative ou maximum valid dilution (MVD), dilution maximale pour un échantillon ou volume total d'extraction utilisé par rapport à la sensibilité d'un EEB dans lequel la limite d'endotoxines spécifiée peut être détectée

**EEB:** Essais des Endotoxines Bactériennes

**FDA:** Food & Drug Administration

**LAL :** Lysat d'Amébocytes de Limule, réactif extrait d'amébocytes prélevés dans l'hémolymphe de la limule, *Limulus polyphemus*, qui réagit avec l'endotoxine pour former un caillot gélatineux et qui est utilisé pour estimer les niveaux d'endotoxines dans les méthodes d'EEB

**MAT :** Monocyte Activation Test (Essais d'Activation des Monocytes)

**-OSL :** Out of Specifications Limits (limites hors spécifications), échantillon dont le résultat de l'EEB est valide, mais qui dépasse la spécification de limite d'endotoxines du produit

**PE:** Pharmacopée Européenne

**PPC :** Product Positive Control (contrôle positif du produit), échantillon avec surcharge d'une quantité connue d'endotoxine utilisé pour confirmer que le produit soumis à essai ne présente pas de facteurs d'interférence

**rFc:** recombinant Factor C (Facteur C recombinant)

**UE :** unité d'endotoxine

**USP :** United States Pharmacopeia (Pharmacopée Américaine)

*Being First Means Doing Something No One Else Has Ever Done Before... We Do That A Lot.*



*We have a long history of advancing Endotoxin and Glucan testing technologies that make a difference.*



### A History Of Firsts!

**1st To Introduce An Animal Free, Recombinant LAL Reagent**

1st Large Scale IVF Program To Introduce Horseshoe Crabs Into The Wild

1st To Establish BET Contract Testing Services

1st BET Company Licensed By FDA

*Advance your laboratory's Endotoxin and Glucan detection capabilities into 1st place today.*



**Associates of Cape Cod Int'l., Inc.**

*Your Endotoxin & Glucan Experts*

[www.acciuk.co.uk](http://www.acciuk.co.uk) • (+44) 151.547.7444

Associates of Cape Cod, Inc. - a Seikagaku Group Company

MKT#21-076

# Real-time detection of CFU growth with the ScanStation® smart incubator expedites the environmental monitoring process.

Par Lauriane SIBILEAU & Thomas ALEXANDRE - INTERSCIENCE

info@interscience.com

In a time when an increasing number of laboratories are turning to rapid methods for their analysis, the responsibility is often on the end-user to validate an alternative method (eg. PCR, mass spectrometry) against the traditional, manually counted sample-on-agar cultures. INTERSCIENCE developed the ScanStation® (ISS) in the aim of providing advanced results, while still utilizing the traditional method (approved by the European Pharmacopoeia and the FDA).

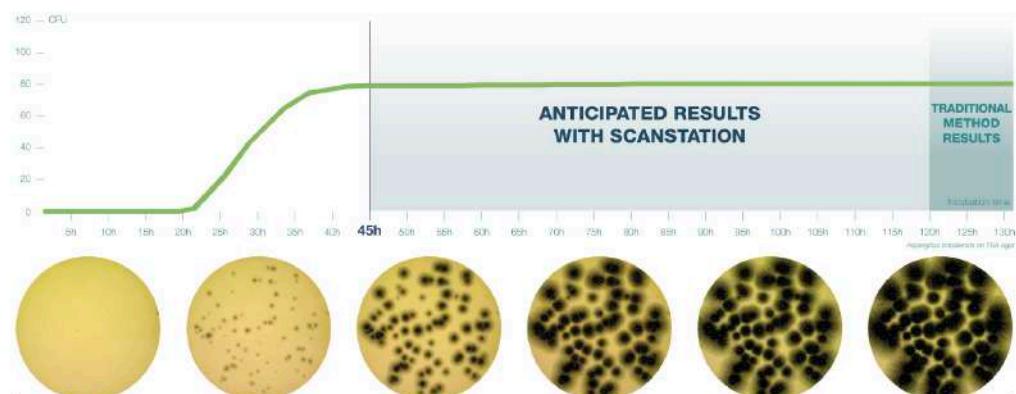


Figure 0: Example of report for *A. brasiliensis* on TCA medium by the ScanStation®. Above - growth curve established by CFU count in real time. Below - six pictures taken at different intervals of the 130-hour incubation period.

This system is an innovation based on the technology of end-point colony counters that have been used in labs for over forty years<sup>1,2</sup>. By placing such a device inside of the incubation chamber, and automating the reading process, the culture growth monitoring in real time is now possible.

The ScanStation® collects images of each sample every 30 or 60 minutes during the whole duration of the incubation period. Those images, once analyzed by the monitoring software, are used to display a curve of the bacterial growth kinetics, available to the user in real-time. An example of this reporting is presented in Figure 0.

Real-time monitoring of bacterial and fungal growth affords a number of advantages beyond the advanced detection of colonies: switching from end-point to real time counting also increases the accuracy of the enumeration. Firstly, the use of a "T0" image captured at the beginning of the incubation and effectively used as a "tare" for all subsequent counts reduces the number of false positives in case of debris/particles in the matrix, or writings on the plate, which are often falsely counted as CFUs during end-point enumeration (manual or automatic). Secondly, the detection and marking of colonies as soon as they appear on the Petri dish means that subsequent overgrowth or confluent growth are less likely to lead to false negatives. The aim of this study is three-fold. First, we wish to assess the performance of the ISS by comparing the real manual with the automatic enumeration of pure cultures of the five organisms commonly tested for environmental monitoring in the pharmaceutical sector (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*). Here it is important to note that, in order to avoid any inter- and intra-operator variation, which is very common with end-point counting<sup>3,4</sup>, we are comparing the automatic ISS counts to a manual count based not on the traditional reading of the plates at the end of the incubation, but rather on the timelapse created by all the images collected during incubation. In a similar fashion as with replay footage in sports, the operator

has access to a "back in time" function that should allow them to avoid any false positives and negatives. We will call this measure "true count".

Second, we also sought to model the "Time to Result" for these five of the pharmacopeial test strains, as defined as the duration of incubation at which the ISS can provide a stable and reliable Colony Forming Unit (CFU) count for 85% of the samples of each strain.

Third, we tested the ISS performance in real condition by performing air environmental monitoring. The correlation of the automatic count and true count, and the "Time to Result" were also analyzed for this purpose.

## 1. Methods

### Context

The following five organisms commonly tested for environmental monitoring in the pharmaceutical sector were selected and studied at the INTERSCIENCE factory site, for a total of 114 samples:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)

### Protocol

#### Inoculation of samples

90 mm TSA plates: 100µL of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *A. brasiliensis* suspension were inoculated on a standard 90mm Petri dishes pre-filled with Tryptic Soy Agar (TSA) with an automatic spread plater and loaded them in the ScanStation® to start incubation.

Contact plates: 100µL of *E. coli* suspension was inoculated on 60 mm contact plates pre-filled with tryptic soy agar with an automatic spread plater and loaded in the ScanStation® to start incubation.

For the air environmental monitoring, 122 Petri dishes from different pharmaceutical industry laboratories were collected after inoculation of microorganisms present in the atmosphere by a passive sedimentation or using air sampler. These plates were incubated in the ScanStation® at 30-35°C for bacterial enumeration and then at 20-25°C for yeasts and molds for a total incubation time of 5 to 7 days.

### Incubation

All the samples for each strain were incubated at the temperature and for the time listed in the table below:

Strain	Temperature (°C)	Time (days)
<i>S. AUREUS</i>	30-35	5
<i>E. COLI</i>	30-35	5
<i>P. AERUGINOSA</i>	30-35	5
<i>C. ALBICANS</i>	20-25	5
<i>A. BRASILIENSIS</i>	20-25	5

During these five days, the Petri dish of each sample was taken in photo every 30 minutes. These images were then processed by the ScanStation® software version v1.30, which detected the apparition time of each colony and yielded a kinetics curve for each sample.

## 2. Results

### 1. Manual vs. ScanStation® enumeration comparison

The following tables show the automatic and true count readings of the five pharmacopeial test strain colonies after growth. The manual readings were performed by manually counting CFUs on the unmarked timelapse of the growth as they appeared, therefore improving upon traditional end-point manual counting. Indeed, possible colonies hidden by an overlap in growth could be missed during classical readings on the Petri dish. This is the reason why the manual readings are qualified as "true count" in this study. All reading values are reported in the counted Colony Forming Unit (CFU) log. The difference between the automatic and real manual readings has been calculated and the average and the standard deviation per strain are given as follows:

Table 1: True count (TC) and automatic (ISS) comparison of *S. aureus*

Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
2258	1.66	1.66	0,00
2259	1.54	1.53	0,01
2260	1.63	1.62	0,01
2261	1.61	1.62	0,01
2262	1.69	1.68	0,01
2263	1.59	1.56	0,03
2264	1.74	1.74	0,00
2265	1.75	1.74	0,01
2266	1.71	1.71	0,00
2267	1.65	1.62	0,03
2282	1.59	1.60	0,01
2283	1.60	1.62	0,02
2294	1.69	1.70	0,01
2295	1.68	1.69	0,01
2300	1.60	1.60	0,00
2301	1.71	1.72	0,01
2302	1.62	1.61	0,01
2303	1.62	1.65	0,03
2373	1.00	1.00	0,00
2374	0.78	0.78	0,00
2375	0.30	0.30	0,00
2376	1.08	1.04	0,04
2377	0.85	0.85	0,00
2378	0.85	0.85	0,00
2380	0.60	0.70	0,10
2381	0.60	0.60	0,00
2393	0.90	0.90	0,00
2394	1.04	1.04	0,00
2395	1.00	1.00	0,00
2396	0.90	0.90	0,00
2397	1.18	1.18	0,00
2398	0.70	0.70	0,00
3334	1.97	1.93	0,04
3335	2.01	1.95	0,05
3336	1.83	1.79	0,05
3337	1.87	1.80	0,07
3545	1.88	1.88	0,00
3546	1.83	1.83	0,01
3547	2.05	2.03	0,02
3548	2.07	2.06	0,00
3549	2.27	2.25	0,01
3562	1.68	1.67	0,01
3563	1.80	1.76	0,04
3564	2.13	2.10	0,04
3565	2.06	2.05	0,02
3566	2.13	2.17	0,03
3567	2.26	2.26	0,00
<b>Average calculated difference</b>			0,02
<b>Standard deviation</b>			0,02

Table 2: True count (TC) and automatic (ISS) comparison of *E. coli*

Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
3460	2.28	2.06	0.22
3461	2.23	2.12	0.10
3462	2.00	1.88	0.12
3463	1.93	1.83	0.10
3556	1.94	1.81	0.13
3557	1.79	1.88	0.08
3559	2.29	2.09	0.21
3560	2.5	2.27	0.23
3561	2.48	2.24	0.24
8218	1.00	1.00	0.00
8219	0.95	1.00	0.05
8220	0.95	0.95	0.00
8221	1.04	1.04	0.00
8222	0.85	0.85	0.00
8223	1.00	1.00	0.00
8224	0.9	0.9	0.00
8225	0.78	0.7	0.08
8226	1.18	1.00	0.18
8227	0.9	0.85	0.06
8228	0.9	0.85	0.06
8229	0.95	0.95	0.00
8230	1.08	0.95	0.12
8231	1.11	1.00	0.11
<b>Average calculated difference</b>		0.09	
<b>Standard deviation</b>		0.08	

Table 3: True count (TC) and automatic (ISS) comparison of *P. aeruginosa*

Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
2248	1.43	1.43	0.00
2249	1.52	1.52	0.00
2250	1.76	1.73	0.02
2251	1.65	1.65	0.00
2252	1.60	1.57	0.03
2253	1.76	1.76	0.01
2254	1.70	1.68	0.02
2255	1.69	1.69	0.00
2256	1.48	1.46	0.01
2257	1.67	1.64	0.03
3472	2.23	2.20	0.03
3473	2.20	2.16	0.03
<b>Average calculated difference</b>		0.02	
<b>Standard deviation</b>		0.01	

Table 4: True count (TC) and automatic (ISS) comparison of *C. albicans*

Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
3410	2.20	2.18	0.02
3411	2.38	2.33	0.05
3412	2.17	2.11	0.05
3413	2.12	1.99	0.13
8238	1.11	1.11	0.00
8239	0.78	0.78	0.00
8240	1.08	1.08	0.00
8241	1.15	1.15	0.00
8242	1.00	1.00	0.00
8243	1.08	1.08	0.00
8244	1.04	1.04	0.00
8245	1.04	1.04	0.00
8246	0.95	1.00	0.05
8247	1.00	0.95	0.05
8248	1.04	1.08	0.04
8249	0.78	0.85	0.07
8250	1.04	1.00	0.04
8251	1.00	1.00	0.00
<b>Average calculated difference</b>		0.03	
<b>Standard deviation</b>		0.03	

Table 5: True count (TC) and automatic (ISS) comparison of *A. brasiliensis*

Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
8258	1.00	1.00	0,00
8259	1.04	1.11	0,07
8260	0.78	0.78	0,00
8261	0.78	0.78	0,00
8262	1.11	1.11	0,00
8263	1.04	1.08	0,04
8264	1.18	1.18	0,00
8265	0.90	0.90	0,00
8266	0.78	0.78	0,00
8267	0.60	0.70	0,10
8268	0.78	0.90	0,12
8269	0.95	1.00	0,05
8270	0.48	0.30	0,18
8271	1.00	1.04	0,04
<b>Average calculated difference</b>		0.04	
<b>Standard deviation</b>		0.06	

The calculated difference for all of the samples is close to 0 with a maximum of 0.24 and with a total average of all calculated differences equal to 0.04 and a standard deviation equal to 0.05. These results do not show a significant difference between the two enumeration modes. Furthermore, the following graph shows the correlation summarizing all manual and ScanStation® enumerations performed with these five pharmacopeial test strains.

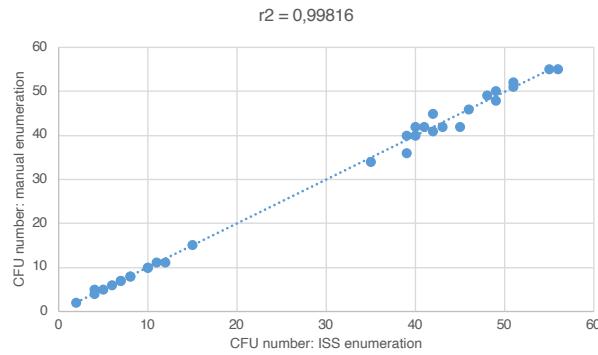


Figure 1: correlation graph of *S. aureus* manual and automatic enumeration

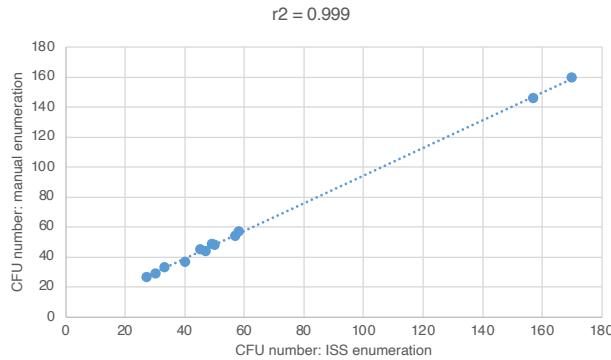


Figure 2: correlation graph of *E. coli* manual and automatic enumeration

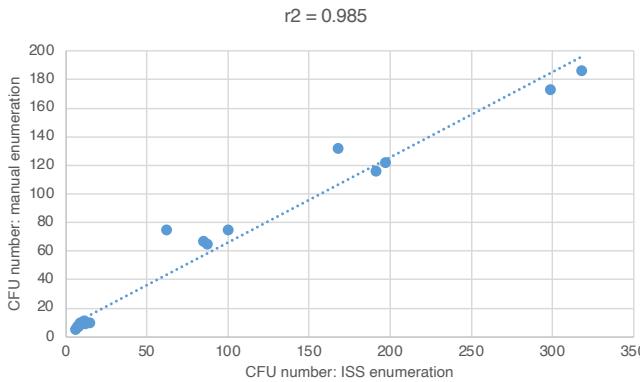


Figure 3: correlation graph of *P. aeruginosa* manual and automatic enumeration

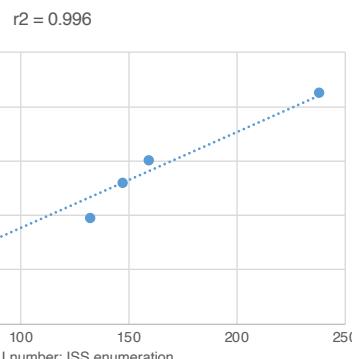


Figure 4: correlation graph of *C. albicans* manual and automatic enumeration

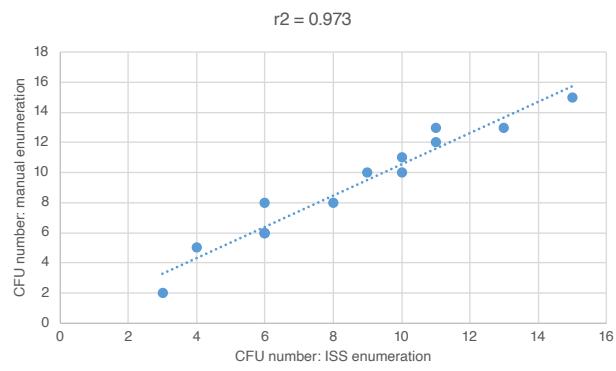


Figure 5: correlation graph of *A. brasiliensis* manual and automatic enumeration

The correlation coefficients R2 are between 0.973 and 0.999, meaning there is not significant variation between true count and ScanStation® enumeration.

## 2. Time to Result

The ScanStation® captured an image of each sample every 30 minutes. These images were then processed by the ScanStation® counting software version v1.30, which detected the apparition time of each colony and yielded a kinetics curve for each sample. We aggregated those growth curves for each strain using Excel. Figures 6 to 10 below show the aggregated growth curves for each of the five organisms tested in this study. The curves were normalized as a percentage of the total count for each sample for comparison purposes.

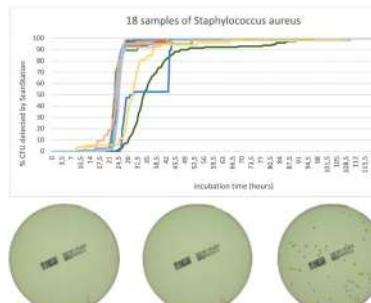


Figure 6: Aggregated growth curves of 18 samples of *S. aureus* and representative photos of real time growth of the sample #2264 at  $t = 0$ ,  $t = 12.5\text{ h}$  and  $t = 21\text{ h}$ .

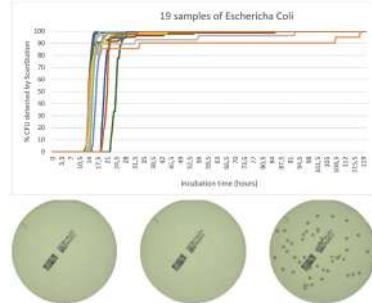


Figure 7: Aggregated growth curves of 19 samples of *E. coli* and representative photos of real time growth of the sample #2255 at  $t = 0$ ,  $t = 8\text{ h}$  and  $t = 15.5\text{ h}$ .

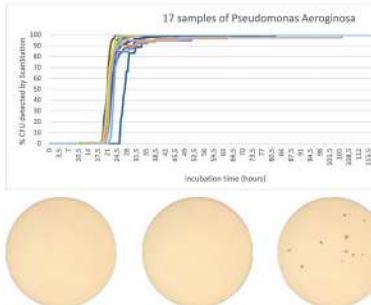


Figure 8: Aggregated growth curves of 17 samples of *P. aeruginosa* and representative photos of real time growth of the sample #8221 at  $t = 0$ ,  $t = 6\text{ h}$  and  $t = 12\text{ h}$ .

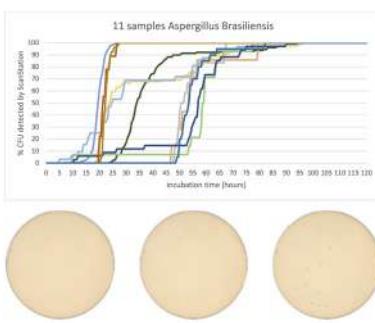


Figure 9: Aggregated growth curves of 16 samples of *C. albicans* and representative photos of real time growth of the sample #8241 at  $t = 0$ ,  $t = 9\text{ h}$  and  $t = 12\text{ h}$ .

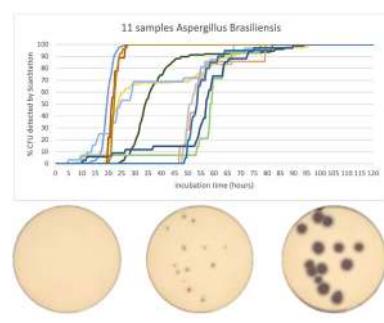


Figure 10: Aggregated growth curves of 11 samples of *A. brasiliensis* and representative photos of real time growth of the sample #8264 at  $t = 0$ ,  $t = 16.5\text{ h}$  and  $t = 22.5\text{ h}$ .

Switching to real-time analysis of bacterial growth means that the user can anticipate the total number of Colony Forming Units (CFUs) on a Petri dish as soon as the growth curve has reached a plateau. In our study, we compared the early detection mean (defined as the incubation time when 85% of samples give a stable and accurate CFU count) to the classical 3 to 5 days (72 - 120 hours) recommended for environmental monitoring in the pharmaceutical industry<sup>5</sup>, where the CFU number is recorded at the end of the incubation. We conservatively compared each of these early detection means to a 3-day and a 5-day incubation and found that real-time analysis with the ScanStation® could save 67% to 88% of incubation time compared to end-point reading. These results are detailed in Figure 11.

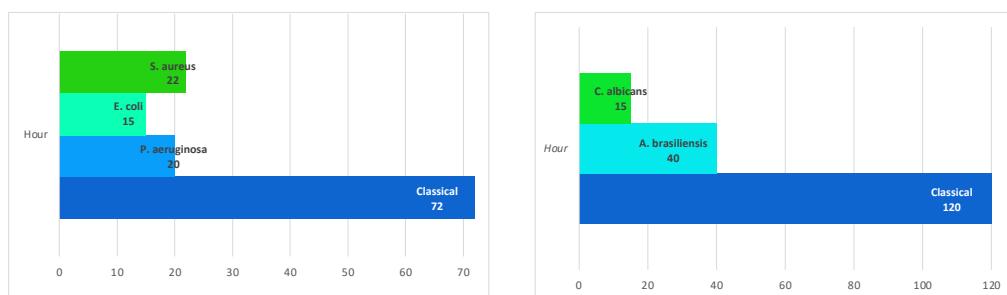


Figure 11: Early detection means (85% of samples at 100% of total CFU count) compared to end point reading at 72 hours (3 days) for the bacteria and at 120 hours (5 days) for the yeast and mold. Incubation time savings range from 67% for *A. brasiliensis* to 88% for *C. albicans*.

### 3. ScanStation® performance evaluation in real environmental monitoring condition

#### 3.1. Manual vs. ScanStation® enumeration comparison

The same method than for the pure culture enumerations presented in paragraph 1 was used for the enumeration comparison of the environmental monitoring by air sedimentation or by air sampler on Petri dishes. The following table shows the automatic and true count readings of the 122 Petri dishes after microbial growth. The difference between the automatic and real manual readings has been calculated and the average and the standard deviation are given as follows:

The calculated difference for all of the samples is close to 0 with a maximum of 0.30 and with a total average of all calculated differences equal to 0.03 and a standard deviation equal to 0.04. These results do not show a significant difference between the two enumeration modes. Furthermore, the following graph shows the correlation summarizing all manual and ScanStation® enumerations performed with these 122 Petri dishes:

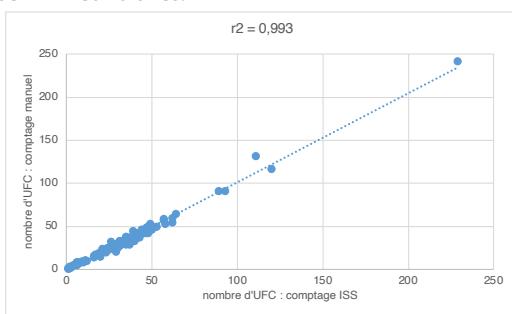


Figure 12: correlation graph of the air monitoring 122 Petri dishes manual and automatic enumeration.

The correlation coefficient R<sup>2</sup> is equal to 0.993, meaning there is not significant variation between true count and ScanStation® enumeration.

#### 3.2. Time to result

The graphs of real time growth have also been performed for each sample. A time to result (TTR) has been implemented when the CFU value reached 85% of the final result.

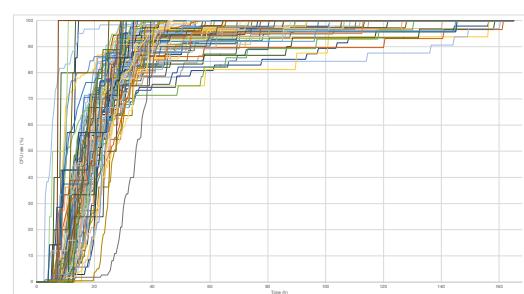


Figure 13: Aggregated growth curves of the 122 Petri dishes air monitoring. The time of first detection varies from 3h to 16h with an average equal to  $8.3\text{ h} \pm 1.9$ . Furthermore, 85% of result is reached after an average time of  $35.2\text{ h} \pm 10.1$ . This large range of values is explained by the intrinsic conditions of the plated samples. Indeed, these samples were analyzed following real laboratory conditions and therefore suffered from different stress conditions with a different impact on microbial growth. However, TTR reading still allows a result anticipation and therefore it gives the possibility to the user to define in advance a corrective action, if necessary.

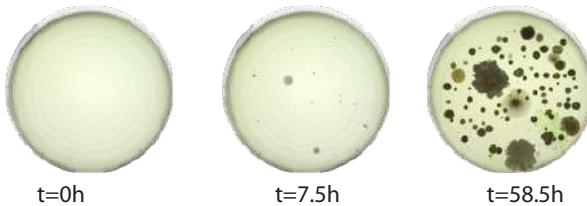
Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
3170	1.38	1.38	0.00
3171	1.30	1.18	0.12
3172	1.59	1.57	0.02
3173	1.49	1.46	0.03
3174	1.59	1.54	0.05
3175	1.41	1.41	0.00
3176	1.45	1.45	0.00
3177	1.67	1.69	0.02
3178	1.79	1.74	0.05
3179	1.64	1.66	0.02
3180	1.76	1.72	0.04
3181	1.72	1.70	0.03
3183	1.52	1.51	0.01
3184	1.63	1.57	0.07
3191	1.32	1.38	0.06
3192	1.48	1.48	0.00
3193	1.32	1.36	0.04
3194	1.48	1.48	0.00
3195	1.57	1.46	0.11
3196	1.67	1.64	0.03
3198	1.46	1.41	0.05
3200	1.67	1.67	0.00
3201	1.61	1.59	0.02
3202	1.71	1.69	0.02
3204	1.66	1.62	0.04
3207	1.70	1.66	0.04
3208	1.20	1.20	0.00
3209	1.54	1.58	0.04
3210	1.48	1.40	0.08
3211	1.46	1.40	0.06
3212	1.48	1.46	0.01
3213	1.51	1.48	0.03
3218	1.66	1.67	0.01
3219	1.59	1.65	0.06
3223	1.70	1.66	0.04
3224	1.53	1.51	0.03
3226	1.54	1.51	0.04
3227	1.62	1.61	0.01
3228	1.63	1.61	0.02
3230	1.38	1.40	0.02
3231	1.40	1.36	0.04
3232	1.62	1.57	0.06
3233	1.60	1.52	0.08
3234	1.58	1.54	0.04
3235	1.43	1.40	0.03
3236	1.43	1.48	0.05
3238	1.49	1.43	0.06
3239	1.45	1.45	0.00
3240	1.49	1.52	0.03
3241	1.20	1.15	0.06
3242	1.46	1.32	0.14
3243	1.54	1.46	0.08
3244	1.61	1.62	0.01
3245	1.51	1.52	0.01
3246	1.52	1.48	0.04
3249	1.68	1.62	0.06
3250	1.52	1.51	0.01
3251	1.56	1.54	0.01
3252	1.41	1.40	0.02
3253	1.58	1.51	0.07

Sample number	Enumeration (CFU log)		Difference (absolute value)
	TC	ISS	
3254	1.57	1.57	0.00
3256	1.46	1.43	0.03
3258	1.41	1.51	0.09
3259	1.56	1.51	0.05
3260	1.41	1.40	0.02
3261	1.36	1.30	0.06
3262	1.28	1.28	0.00
3264	1.49	1.45	0.04
3265	1.23	1.23	0.00
3266	1.49	1.45	0.04
3267	1.60	1.59	0.01
3268	1.68	1.70	0.02
3269	1.63	1.60	0.03
3895	1.62	1.61	0.01
3896	2.36	2.38	0.02
3897	1.70	1.70	0.00
3898	1.95	1.96	0.01
3899	1.81	1.81	0.01
3900	2.05	2.12	0.08
3902	1.76	1.77	0.01
3906	1.76	1.76	0.00
3907	1.97	1.96	0.01
3908	1.61	1.61	0.00
3909	1.69	1.72	0.03
3912	1.79	1.78	0.01
3913	1.69	1.68	0.01
3914	1.56	1.56	0.00
3915	1.53	1.51	0.03
3916	1.64	1.65	0.01
4158	0.48	0.48	0.00
4166	0.3	0.30	0.00
4168	0.00	0.00	0.00
4170	0.78	0.78	0.00
4172	0.30	0.48	0.18
4173	0.48	0.48	0.00
4176	0.78	0.78	0.00
4177	0.30	0.30	0.00
4178	1.04	1.00	0.04
4179	0.78	0.90	0.12
4180	0.78	0.70	0.08
4181	0.00	0.30	0.30
4182	0.30	0.30	0.00
4402	0.60	0.70	0.10
4403	1.08	1.00	0.08
4404	0.78	0.90	0.12
9072	1.00	0.95	0.05
9073	1.00	0.90	0.10
9074	0.30	0.30	0.00
9075	0.85	0.90	0.06
9076	0.78	0.78	0.00
9077	1.52	1.52	0.00
9078	0.48	0.48	0.00
9079	0.95	0.95	0.00
9080	1.04	1.04	0.00
9081	1.38	1.40	0.02
9082	2.08	2.07	0.01
9083	1.54	1.54	0.00
9084	1.45	1.43	0.02
9086	0.90	0.90	0.00
9087	1.28	1.26	0.02
9090	0.85	0.85	0.00
9091	0.95	0.95	0.00
<b>Average calculated difference</b>			0.03
<b>Standard deviation</b>			0.04

Table 6: True count (TC) and automatic (ISS) comparison of the air monitoring 122 Petri dishes.

### **3.3. Representative photos of a real time air monitoring on TSA medium**

Example of the sample 3900



## **Discussion**

The ScanStation® performs the enumeration of a sample by detecting the dynamic formation of each colony. This method yields counts that are as close as possible to the real number of colonies on the plate. Indeed, the possibility to monitor the colony growth in real time prevents the missing of overlapped colonies that would have happened with a classical automatic end-point colony counter, or manually (false negative). Furthermore, the T0 picture of the plate taken as it is loaded into the ScanStation® and before any growth starts is used as a tare reference for the analysis. Therefore, this first picture allows the possibility to remove all initial particles (bubbles in agar, solid fragments from sample...) that could be present on the plate, and to take into account only the dynamic apparition of colonies, thus reducing false positives.

In this study, the "true count" was performed by an operator who analyzed the video generated by the ScanStation® software. In a similar manner to the ScanStation® which prevents false positive or false negative counts better than an end point colony counter, this operator provided count results that are closer to the real colony number than a classical plate reading. This is the reason why the true count was selected as the best method in this study for the comparison of the ScanStation® enumeration performance.

The comparison of ScanStation® and true count enumerations of five of the pharmacopeial test strains shows a strong correlation. Indeed, the correlation coefficient R<sup>2</sup> is very close to 1 for all the five tested strains (figures 1 to 5). This result demonstrates that the ScanStation® enumeration method is accurate and reliable. Therefore, the ScanStation® is a relevant equipment which can be integrated in the quality control laboratory of a pharmaceutical production company. Indeed, the raw material and/or the end product control is a critical step of the pharmaceutical production because it ensures the safety and the quality of the medical product as directed by the FDA 21CFR211.84 and ICH Q76,7. The quality control consists in monitoring the eventual microbiological contaminant present in the raw material, and to determine whether the end product falls within a very strict limit for that bacterial load. Thus, the ScanStation® can perform this monitoring in real time and if the threshold is reached, an anticipated alert could be engaged, allowing an accurate stock management.

The real time colony growth monitoring by the ScanStation® highlights the three phases of microorganism growth. The first phase is the lag phase where the colonies are not visible yet, followed by the short log phase where the colony number increases rapidly, and finally the stationary phase where no more colony number variation is observed; after that comes the death phase where the number of colonies decreases exponentially8. These three first phases are modelized in Figure 0. The pharmacopoeia directives9 impose a minimum of five days of incubation to give a conform result of microbiological culture. These five days ensure the possibility to reach the stationary phase without missing any colony. The time to result from study of five of the pharmacopeial test strains and the air environmental monitoring in the ScanStation® shows that the stationary phase is actually

reached a long time before these recommended five days. This result demonstrates that the ScanStation® can be used for environmental monitoring and bioburden analysis to provide, after a validation, an anticipated result confirming that a cleanroom is under a controlled environment and fits for pharmaceutical production. Furthermore, in the case of a contamination, the ScanStation® also provides an early detection of the contaminant, giving the opportunity to engage an anticipated alert. Taking the example of E. coli performed in this study (figure 9, table 6), the early detection average occurs after 40 hours of incubation. It means that a contaminant could be detected 105 hours before the classical method recommended by the pharmacopoeia directives. Therefore, if it is necessary, the production could be stopped significantly earlier, which would in turn reduce manufacturing disruption costs10.

## **Conclusion**

In light of the results discussed in this study, which show a significantly high correlation between the ScanStation® automatic CFU count and the "true count" as verified by a human operator with all the pictures taken during the incubation cycle. Furthermore, the Time to Result study gives us insights into the growth kinetics of each of the five main pharmacopeial strains which can be used, if replicated and validated in the lab where it would be intended to be installed, to shorten the detection time for environmental monitoring and therefore reduce production costs in the pharmaceutical industry.

## **References**

- Evaluation of Electronic Colony Counters. M. G. Fleming and F. O'Connor; Irish Journal of Agricultural Research Vol. 14, No. 1 (Apr., 1975), pp. 21-26. DOI: 10.2307/25555750
- Predictors of bacterial resistance using in vitro dynamic models: area under the concentration-time curve related to either the minimum inhibitory or mutant prevention antibiotic concentration. Elena N. Strukova, Yury A. Portnoy, Stephen H. Zinner, Alexander A. Firsov; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 71, No. 3 (Mar., 2016), pp. 678-684. DOI:10.1093/jac/dkv387
- Current practices and Prospects for Standardization of the Hematopoietic Colony-Forming-Unit (CFU) assay: A Report by the Cellular Therapy Team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Derwood Pamphilos, Eileen Selogie, David McKenna, Jose Cancelas-Peres, Zbigniew M. Szczepiorkowski, Ron Sacher, John McMannis, Hermann Eichler, Henk Garritsen, Minoko Takanashi, Leo van de Watering, David Stroncek, and Jo-Anna Reems; Cytotherapy, Vol. 15, No. 3 (Mar., 2013), pp. 255-262. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.013
- Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: Comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. Basil Jarvis, Alan J. Hedges, Janet E. L. Corry; International Journal of Food Microbiology, Vol. 116, No. 1 (May 2007), pp. 44-51. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.037
5. Pharmaceutical Microbiology Manual, 2015 <https://www.fda.gov/files/about%20fda/publis%20hed/Pharmaceutical-Microbiology-Manual.pdf> accessed 02SEP20
6. FDA Code of Federal Regulations 21CFR211.84, Revised 2019. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfr/CFRSearch.cfm?fr=211.84> accessed 02SEP20
7. ICH Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients, 2016 <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Q7-Good-Manufacturing-Practice-Guidance-for-Active-Pharmaceutical-Ingredients-Guidancefor-Industry.pdf> accessed 02SEP20
8. "Bacterial Growth Curve", revised 2004. Fankhauser, David B. University of Cincinnati Clermont College. [https://web.archive.org/web/2016021321827/http://biology.clc.uc.edu/Fankhauser/Labs/Microbiology/Growth\\_Curve/Growth\\_Curve.htm](https://web.archive.org/web/2016021321827/http://biology.clc.uc.edu/Fankhauser/Labs/Microbiology/Growth_Curve/Growth_Curve.htm) accessed 02SEP20
9. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition 10. Bai, Ge, et al. "THE COST OF MANUFACTURING DISRUPTIONS." Strategic Finance, sfmagazine.com/postentry/december-2015-the-cost-of-manufacturing-disruptions/ accessed 02SEP20

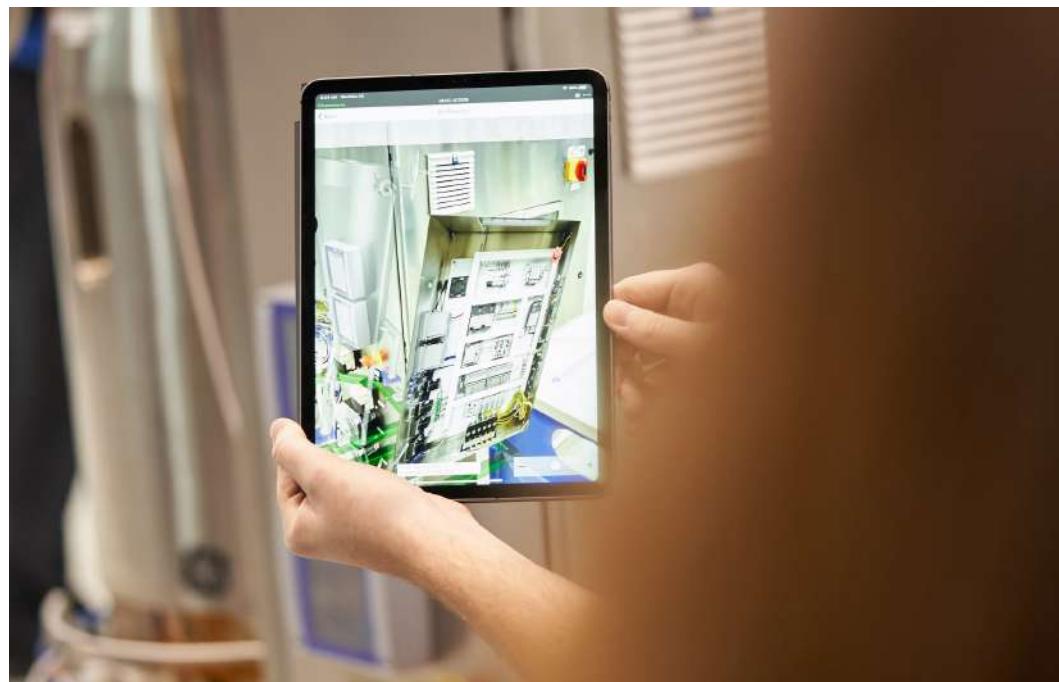
**Acknowledgements** The authors wish to express their gratitude to all of the personnel involved in the drafting, reviewing, and editing of this application note. In particular, we extend our thanks to the customers who have worked with us through many iterations of the software and shared their data to help us make the most efficient version to date. In house, we thank our microbiology experts Sylvie Viboud, Emilie Tran and Manon Laborie, for their guidance, advice, and data processing.

# MTP: What It Is, Why It Matters.

## Module type package standard is a major step forward for plug-and-produce manufacturing.

by Derrick TAPSCOTT & TVijayant KAURA - ROCKWELL AUTOMATION  
 samiller1@ra.rockwell.com

In life sciences and the wider automation industry, modular equipment concepts have gained favor in recent years. Although the trend benefits production equipment commissioning, it adds complexity to qualifying a plantwide automation system.



For life sciences manufacturers, horizontal integration (machine-to-machine automation) and vertical integration (machine-to-plant automation) are often the last steps before production. These steps include qualifying programmable logic controller (PLC) code operation on packaged equipment — such as a skid — and commissioning the distributed control system (DCS) responsible for plant wide automation. Plant automation engineers often work in the DCS with function block diagram objects while equipment specialists work with ladder logic in the PLC.

As the interest in modularity grew, so did a potential challenge for manufacturers: one company providing the plantwide distributed control system (DCS), a different company supplying automation components for the production equipment, and even multiple third-party components on other pieces of equipment. As a result, the number of programmable logic controllers (PLCs) entering the plant multiplied.

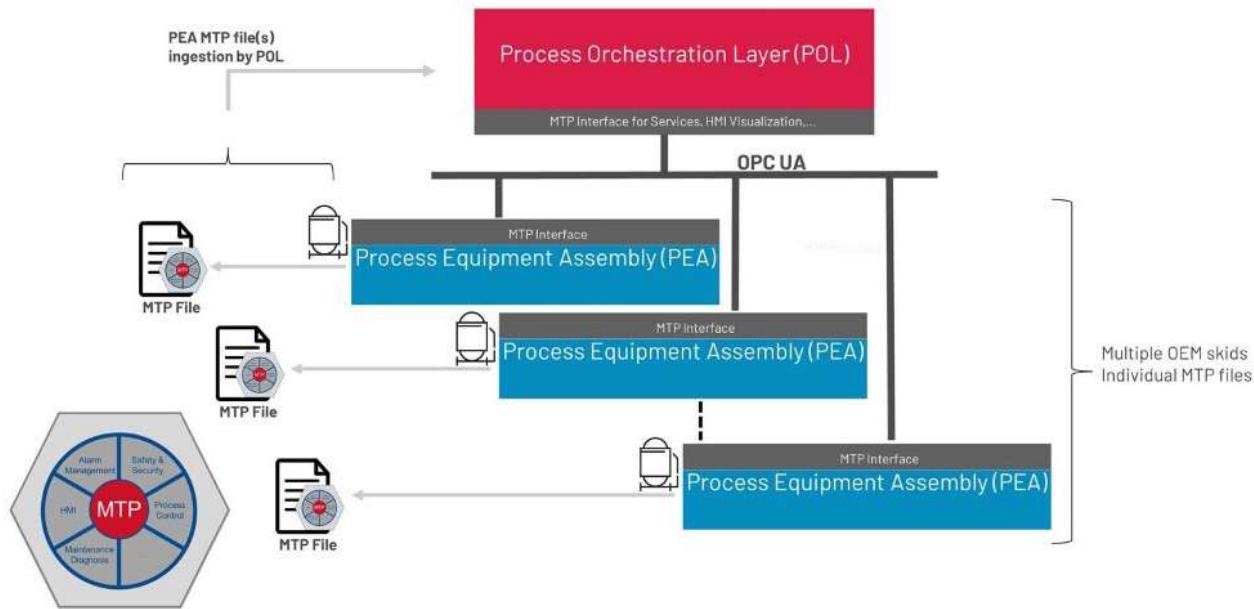
As some groups working in life sciences realized the benefits of ordering a skid out of a catalog vs. building the unit operation on site, the end-user organisations responsible for integrating the products grew more frustrated. Eventually, automation engineers demanded that their automation components have plug-and-produce capabilities, the same as the production equipment.

Member organisations and companies within the industry, including Rockwell Automation, have responded to that call. Their efforts have sought to stabilize and solidify the foundation for plug-and-produce technology.

### 1. The drive for modularity

One of the groups advancing plug-and-produce technology is NAMUR, the User Association of Automation Technology in Process Industries. This international group based in Germany represents users of automation technology, including process control technology specialists.

## Modular Automation System Overview



With more than 150 member companies across the globe, NAMUR and its members know the value of plug-and-produce modules — specifically, making it easier to replace skids of a specific function with another. They also understand how plant operators want to work: standard interfaces with standard data.

The group is helping create a modular-specific standard called modular type package (MTP) (VDI/VDE/NAMUR 2658) that includes various sections covering everything from data aspects to human-machine interfaces (HMI). The standard describes functionality — such as comms, alarms, safety, and so on — using the OPC Unified Architecture (UA).

The MTP standard is written to be compatible with other NAMUR recommendations: NE148 and the Reference Architecture Model for Industry (RAMI) 4.0. MTP has advanced to an IEC standard about the lifecycle of components in a facility. It basically says everything should be modularized so it is easy to upgrade or replace a piece at any time. We'll explore its function after getting familiar with some key terms from VDI 2776 Part 1:

- Process equipment assembly (PEA) — an automated and, from a safety perspective, almost autonomous modular process unit, which consists of one or more functional equipment assemblies and represents a processing step or provides infrastructure within a modular plant
- Process orchestration layer (POL) — an equipment assembly spanning automation and information technology level for the operation of modular systems
- MTP — a formal description of the interfaces and functions of the automation technology of a modular process unit

### 2. How MTP works

The MTP file supplied by the skid/equipment vendor is at the core of the MTP standard and represents the interface to the PEA. This file contains all the necessary information for the POL to set up its communications, tags, services, and HMI so it can monitor/control the PEA.

MTP files use an internationally standardized (IEC 62714) automation-specific XML data format called automation markup language (AML) to define each piece of equipment. For example, a bioreactor with its own control and visualization systems would provide an MTP file that defines various content available from it, including:

- Services — heating, agitation, pH control
- Data —temperatures, pressures, flows
- Visualization — operator graphics pertinent to POL operation
- Alarms
- Events/conditions
- OPC UA connectivity and tag information for obtaining the above items

An MTP-compliant POL imports the MTP files from the various skids within its system and uses the information to develop a plant-level visualization and batch system to monitor and control these skids. Now, the POL allows plant-level operators to monitor and control skids using uniform graphics and objects. The POL also allows the batch system to monitor and control services using standard recipes, regardless of skid functionality or vendor.

### 3. Contributing to plug-and-produce standards

At Rockwell Automation, we felt a responsibility to address the difficulties that accompanied the arrival of modular equipment (easier for the operations department, more difficult for automation engineers). We contribute to the development of automation standards for modular automation and participate in organisations that demonstrate how those standards can benefit industry.

One of those organisations, the BioPhorum Operations Group, outlined the potential impact of plug-and-produce technology on the life sciences industry in a 2019 paper:

- Up to 40% faster time to market
- Up to 40% faster rearrangement of production equipment
- Almost zero automation engineering to copy a production line
- Up to 50% reduction in capital expenditures and operating expenses.

As a member of the BioPhorum Plug and Play workstream, we've conducted six proof-of-concept tests of the released modular automation/MTP standards on both the PEA and POL requirements. Our involvement with that workstream and the NAMUR MTP standards in general has aided our ongoing development of tools and solutions in support of PEA and POL partners across many industries, from life sciences to oil and gas. As they continue to release additional standards involving MTP, we'll stay engaged in the testing process, and enhance our PEA and POL solutions accordingly.



## BIO-DÉCONTAMINATION PAR VAPEUR DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Systèmes mobiles et fixes de bio-décontamination



Solutions intégrées pour les sas de transfert et les équipements de process



Service sur-mesure de bio-décontamination



UTILISEZ LES SYSTÈMES BIOQUELL  
EN TOUTE SÉCURITÉ. PRENEZ  
CONNAISSANCE DES INFORMATIONS  
D'USAGE AVANT TOUTE UTILISATION.



Isolateur avec système intégré de bio-décontamination

Réduction sporicide de 6-log sur toutes les surfaces exposées

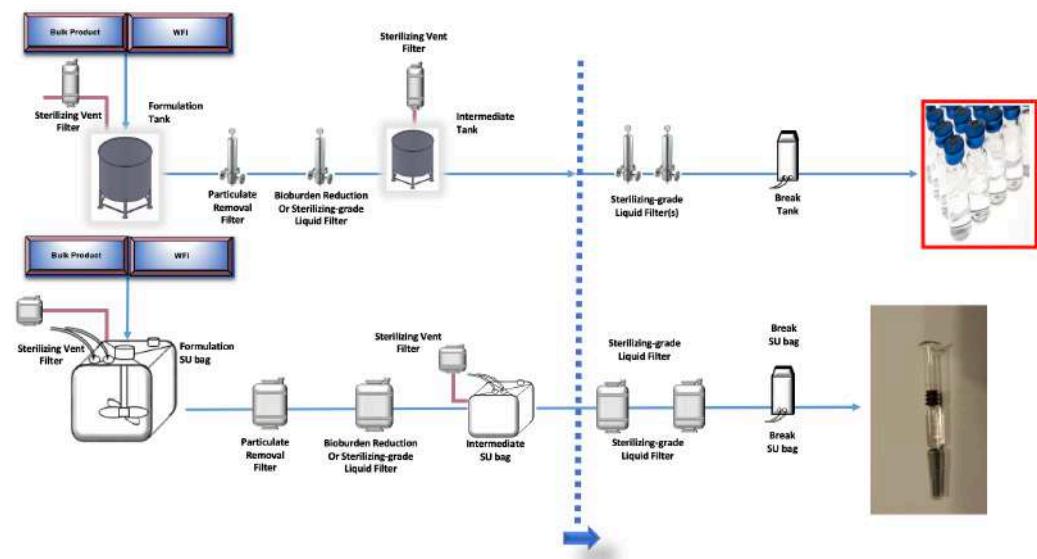
EN SAVOIR PLUS SUR  
[BIOQUELL.COM](http://BIOQUELL.COM)

**ECOLAB®**

# How Pemflow / D.O.C. manage Extractables and Leachables Qualification of the in-process materials and primary packaging.

by Antonio LEGNANI - PEMFLOW

An overview of a possible approach in the qualification from Extractables and Leachables perspective of the materials involved inside pharmaceutical production lines, from upstream to downstream processing, formulation and filling in the final forms.



Extractables and Leachables qualification are becoming in the last decade an important topic of discussion in the pharmaceutical scenario. International standard (ISO, ICH), European and US regulations were in the past mainly focusing on the primary packaging E/L qualification with no dedicated regulatory chapters on the in-process materials. With the increasing use of the Disposable technologies through the whole process stream the need of a basic harmonization in the E/L process assessment from the primary packaging up to the materials used in filling, downstream and upstream processing, is therefore strongly needed. The recent USP chapters on Extractables and Leachables assessment even if are still dedicating to the primary packaging are openly suggesting to extend the design of these studies also to all the other materials present into the specific process of course applying a correct risk-based approach to better identify the level and the criticality of the specific E/L assessment.

In addition to this an important difference is underlined between Extractables assessment performed for materials qualification studies compare to the Extractables (potential Leachables) assessment performed considering product and process parameters introducing the important concept of **SIMULATING STUDY** as an useful tool to predict and sometime, for the in-process materials, avoid a dedicated Leachables quantification.

Basically, the main differences between the two test configurations, as reported in USP <1663>, are as follow:

- Extractables Assessment for Material Characterization
  - one extracting solvent
  - one set of extraction conditions
  - one extraction technique
  - very aggressive extraction condition

...>

- Extractables Assessment for Extractables-Leachables Correlation (Simulation Study)
- Multiple solvents or extracting media with varying extracting power based on the known extracting power of the drug product vehicle
- Multiple and complementary extraction techniques
- Extraction conditions that allow equilibrium to be achieved (worst case but not aggressive)
- Multiple Analytical Techniques/Systematic Process for Identification & Quantitation
- In practice the possible scenario following the USP <1660>, <1663> and <1664> chapters for in-process materials and primary packaging, can be summarized in the following three different step:

**1. Material Screening and Qualification:** Characterization of a packaging system's materials of construction to consider ingredients as probable extractables and potential Leachables. Such step facilitates the identification of materials that are suitable for use in packaging systems as well as the suitability for a glass type and container

- <660> Container: Glass
- <661> Plastic Packaging systems and their materials of construction
- <661.1> Plastic Materials of Construction
- <381> Elastomeric Closures for Injections

**2. Simulating Extraction Study:** Worst Case (vs process/storage) controlled extraction study to determine extractables as potential Leachables.

- <661.2> Plastic Packaging Systems and their materials of construction
- <1663> Assessment of Extractables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery systems
- <1660> Evaluation of inner surface durability of Glass Containers (worst case approach)

**3. Product Assessment:** During Stability (real time) to confirm potential leachables as Leachables

- - <1664> Assessment of Leachables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems
- - <1660> Evaluation of Inner Surface Durability of Glass Containers (Actual Use)

Simulating Study allows for consistent Extractables and Leachables correlation through the whole process stream (Upstream, Downstream, Formulation/Filling and Primary Packaging) between point 2. and 3. using a consistent and reliable approach.

As already underline, although the listed monograph are specific for the primary packaging, container closure and delivery systems, the principles and approaches to the qualification and definition of the chemical safety assessment can be extended to the overall materials and devices (Filter, Tubing, Connectors bags, ...) present in the production line following a specific risk assessment.

Recent USP monograph still in draft like USP<665> and USP <1665>, recently implemented, are proposing an alternative route for the Extractables & Leachables assessment of the in-process components and materials based on the use of generic extractables data supplied by the article vendors (filters, tubing, bags, connectors or a complete single use system) obtained from a testing matrix/protocol well described within the BPOG protocol including a proposal of risk

assessment that can help in the identification of the process area where the extractables data can be applied and help to identify the need of performing a Leachables assessment on the disposable components present within the process stream.

A practical example as a case study considering the Primary Packaging/Delivery System (Final Forms Pre-filled Syringes & Plungers / Vials & stoppers) and transfer lines as in-process materials is reported below. A pharmaceutical company is producing three different final products (product A-B-C) collected into two main primary packaging forms. Production lines for product A and B foresee the use of stainless-steel systems (with the only exception for disposable filters, part of final tubings and 1 connector type). Production line for product C foresee disposable technologies (tanks, filters, tubing, connections).

The planned scope of the validation exercise is to cover the requirements of E/L on primary container only on product C and on primary container and in process material for product A and B following the indication coming from USP monographies <1660>, <1663> and <1664> including in the assessment a complete toxicological evaluation.

The design of the study foresees as **FIRST STEP** the identification of the different type of the component materials and suppliers of the primary packaging: primary packaging includes one type and one supplier of the pre-filled syringes and two different plungers (product A and Product B), while for product C a glass vials container (Type I glass) of different formats is used.

Product A & B are filled using transfer line stainless steel (disposable filters only) while for product C a full disposable line is used.

	Product A	Product B	Product C
<b>Primary Packaging components</b>	- Pre-filled Glass Syringes (Single format) pre treated with Ethylene oxide - Plunger from Supplier 1	- Pre-filled Glass Syringes (Single format) pre treated with Ethylene oxide - Plunger from Supplier 2	Glass Vials (double volume format) with single type of container closure system (Rubber Stopper)
<b>In-Process Materials</b>	Tubing Connectors Filters	Tubing Connectors Filters	Complete Disposable System (Bags, Transfert Line, Filters, Filling)

For primary packaging materials (vial/stopper/syringes and plungers) a total of 4 different suppliers were therefore included in the study design identifying 5 different types of materials to be included into the final assessment .

Product A	Component	Concentration (%)	Class of compound
	Active 1	Confidential	aliphatic alcohols
	Solvent/Compound 1	Confidential	benzyl alcohol
	Solvent/Compound 2	Confidential	aliphatic esters
	Solvent/Compound 3	Confidential	aliphatic alcohols

Product B	Component	Concentration (%)	Class of compound
	Active 1	Confidential	aliphatic alcohols
	Solvent/Compound 1	Confidential	aliphatic alcohols
	Solvent/Compound 2	Confidential	benzyl alcohol
	Solvent/Compound 3	Confidential	aliphatic esters

Product C	Component	Concentration (%)	Class of compound
	Active 2	Confidential	N/A
	Solvent/Compound 1	Confidential	N/A
	Solvent/Compound 2	Confidential	N/A
	Solvent/Compound 3	Confidential	N/A

15% ETHANOL / 10% BENZYL ALCOHOL / 75% ETHYL ACETATE (v/v)

Component	Concentration (%)	Class of compound
Active 1	Confidential	N/A
Solvent/Compound 1	Confidential	N/A
Solvent/Compound 2	Confidential	N/A
Solvent/Compound 3	Confidential	N/A
Solvent/Compound 4	Confidential	aliphatic alcohols
Solvent/Compound 5	Confidential	N/A
Solvent/Compound 6	Confidential	N/A
NaOH or HCl	Confidential	N/A
pH	Confidential	N/A

10% ETHANOL / 90% WATER adjusted to pH 6.5 (v/v).

15% ETHANOL  
10% BENZYL ALCOHOL  
75% ETHYL ACETATE  
(v/v)

10% ETHANOL  
90% WATER adjusted to  
pH 6.5  
(v/v)

The materials include:

- Borosilicate Glass Type I (Syringe Barrel and Vial)
- Elastomers (tip cap)
- Silicon oil/Silicone/ Dimethicone for lubrication coating (on plug only)

Once the list of the materials have been identified, the **SECOND STEP** of the study foresee the definition of the best extraction fluid to use to simulate the process/storage contact of the original drug product into the primary packaging or during the formulation and filling process step (filters, tubing, connectors etc..).

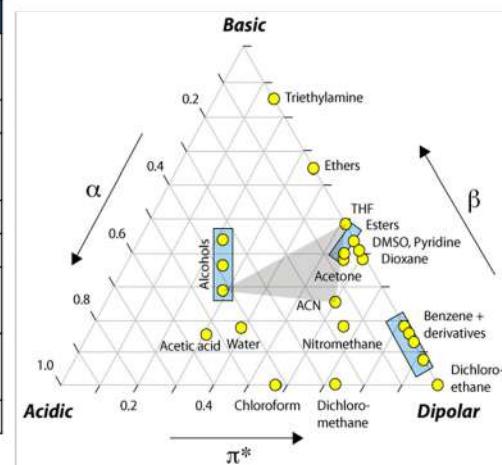
Main goal of this test phase is to create a simulation solvent(s), that can be a pure solvent or a mixture of different solvents, that is able to create extraction conditions worst case compare to the original drug product but NOT in an exaggerated way like the extraction conditions normally followed for material qualification as reported into USP <660>, <661> and <381> : this solvent(s) should be selected in order to mimic the leaching power of the original drug product following, in this case, the modeling rules suggested by Snyder's classification on functional groups and solvents polarity.

Due to very similar composition of product A and product B the simulating solvent mixture obtained from the modeling exercise is identical for both products, while for product C the different product composition and chemical-physical parameters are suggesting the use of a different mixture including water and pH control.

Once the simulating solvents are identified the second step, to complete the approach of **SIMULATING STUDY** is to consider the Process (in-process materials) and Storage/Stability (Primary Packaging) conditions

The **solvent classification** is based on their polarity and their selectivity or relative ability to engage in hydrogen bonding or dipole interactions. According to these factors, common solvents can be classified into eight groups as follows:

Group	Class of solvents
I	aliphatic ethers, tetramethylguanidine, hexamethyl phosphoric acid amide
II	aliphatic alcohols
III	pyridine derivatives, tetrahydrofuran, amides (except formamide), glycol ethers, sulfoxides
IV	glycols, benzyl alcohol, acetic acid, formamide
V	methylene chloride, ethylene chloride
VI	tricresyl phosphate, aliphatic ketones and esters, poly-ethers, dioxane, sulfones, nitriles, propylene carbonate
VII	aromatic hydrocarbons, halo-substituted aromatic hydrocarbons, nitro compounds, aromatic ethers
VIII	fluoroalkanols, m-cresol, water, chloroform



	Parameter	Product	Laboratory
Product A	Process fluid	Active 1	15% ETHANOL / 10% BENZYL ALCOHOL /75% ETHYL ACETATE (v/v)
	Maximum Storage Time	48 months	3 x 24 hours each extraction; totaling 72 hours
	Storage Temperature	2-8 °C	25-30 °C*
Product B	Dosage	500 mg/day/patient	N/A
	Parameter	Product	Laboratory
	Process fluid	Active 1 (2 formulations)	15% ETHANOL / 10% BENZYL ALCOHOL /75% ETHYL ACETATE (v/v)
Product C	Maximum Storage Time	48 months	3 x 24 hours each extraction; totaling 72 hours
	Storage Temperature	2-8 °C	25-30 °C*
	Dosage	500 mg/day/patient	N/A
Parameter	Product	Laboratory	
Process fluid	Active 2	10% ETHANOL / 90% WATER adjusted to pH 6.5 (v/v)	
Maximum Storage Time	24 months	3 x 24 hours each extraction; totaling 72 hours	
Storage Temperature	2-8 °C	25-30 °C*	
Dosage	50 mg/m <sup>2</sup> /day/patient	N/A	

Analytical Method	Target Compounds
Gas Chromatography/Mass Spectrometry – Direct Injection GC/MS	Semi-volatile and Volatile
Gas Chromatography/Mass Spectrometry – Liquid-liquid extraction GC/MS	Semi-volatile
Headspace GC/MS or FID	Volatile
Derivatization GC/MS	Organic acids, especially long chain fatty acids
High Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet/ Mass Spectrometry – HPLC/UV/MS or Ultra Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet/ Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry – UPLC/UV/Q-TOF MS	Non-volatile and Semi-volatile
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – ICP/MS	Metal ions

( + SEM-EDX for Evaluation of Inners Surface of the Glass Ampoules/Syringes)

For primary packaging the process condition can be easily identified considering the storage condition : to generate the «reasonable» worst case a controlled extraction study can foresee the use of higher temperature that can mimic worst case conditions and that could be reached in OOS process parameters (ex. normal storage condition between 2-8°C an extraction temperature close to room temperature can be applied (25-30°C) avoiding in such way a very aggressive conditions normally used in the material qualification studies (e.g. 50° - 70°C).

The efficacy of the extraction step can be easily verified splitting the extractions on the same material in several extraction repetition (3-5) in order to confirm the depletion of the extractables obtained from each extraction step.

Analytical Methods once calculated the AET limit considering the SCT of 1.5µg/day specific for parenteral drug product, will be chosen, as suggested by the USP <1663> chapter, in order to cover the requirements of methods for SCOUTING, DISCOVERY IDENTIFICATION and QUANTITATION of the overall non-volatile, semi-volatile and volatile compounds.

## RESULTS on Primary Packaging/Delivery System

- 14 compounds (9 organics and 5 inorganics) above the AET, identified and quantified (semi-quantitative analysis).
- No "unknown" compounds detected.
- No delamination phenomena detected on glass inner surfaces (SEM Analysis).
- Toxicological Assessment performed on the 14 compounds with specific PDE calculation for each compound.
- Leachables Study on-going focusing on the 14 compounds detected and considering real stability time with intermediate sampling points (ex 48 months: 3-6-12-24-48 ).

## RESULTS on In-Process materials

(Tubing, Filters, Connectors, Single Use disposable System):

- Studies will be done applying the same Simulation Study approach (modeling the products with multiple solvents) and identical analytical techniques.
- 5 compounds identified (4 organic s 1 inorganic) 4 of them already present in the primary packaging scenario.
- No “unknown” compounds detected.
- Toxicological assessment performed on the single compound identified from the materials in process.
- No concern from toxicological point of view and no Leachables assessment required on the in-process Materials analyzed.

These information will complete the validation matrix on materials qualification (primary packaging and in-process materials) that will be an important step of the overall assessment that should include: Biological Safety Tests, Materials Qualification, Simulation Studies, Toxicological Assessment and Leachables Assessment during stability scenario as reported by USP monographs.

## Conclusions

- USP Chapters <1663>, <1664>, <1660> on Extractables/Leachables assessment and Inner Surface Durability of Glass Containers are focusing on the needs of perform such type of tests considering Chemical/Physical Parameters of actual drug product as well as the specific Process (in-process materials) and Storage (primary packaging) parameters. This is the most completed and safe evaluation that can be performed in order to complete a “chemical-safety assessment” of the material in process and in primary packaging.

- Simulation Approach allows to generate extractables data (“potential Leachables”) that can be used for an Extractable/Leachables correlation
- Simulation Approach can be applied to the whole process stream: in-process materials and final forms.
- The Simulation Approach is Product & Process Specific and can be applied to the specific Device (in-process material or primary packaging) following a risk-based approach.
- If the extraction conditions in a controlled and simulated extraction study is able to mimic the “leaching power” of the processed and packaged drug product, the packaged drug product’s conditions of clinical use (including distribution and storage), then the extractables profile of the production line and packaging system will mirror the final Leachables profile of the packaged drug product.



# CONDITIONNEMENT STÉRILISATION DE DISPOSITIFS MÉDICAUX

*Leader français en stérilisation à l'oxyde d'éthylène,  
la société Steriservices a diversifié son offre à travers la stérilisation  
à la vapeur et le conditionnement à façon de dispositifs médicaux.*

*Pour compléter ses offres de stérilisation,  
Steriservices procède dans ses locaux aux dosages de résidus de stérilisation  
à l'oxyde d'éthylène.*

*Afin de pouvoir maîtriser l'ensemble des étapes,  
elle a mis en place des unités de conditionnement à façon,  
de stockage et de logistique.*

Certification  
ISO 13485  
LNE GMED

**S**TERI  
SERVICES



### LE CONSEIL

sur l'environnement réglementaire de la stérilisation à l'oxyde d'éthylène  
grâce à une équipe expérimentée et hautement réactive



### LE CHOIX

d'une enceinte de stérilisation, systématiquement  
en charge réservée, adaptée à vos volumes de routine



### L'EXPÉRIENCE ET LA CONNAISSANCE

pour l'élaboration de cycles de stérilisation adaptés à vos produits



### LA CONFiance

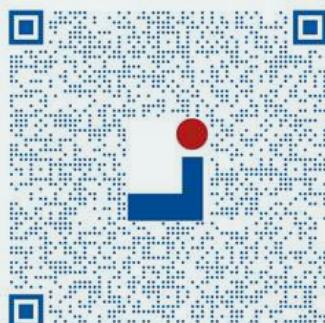
de plus de 150 clients du monde de la santé

- ✓ 300 m<sup>2</sup> de salle ISO 7
- ✓ Packaging sur mesure
- ✓ QI/QO/QP
- ✓ Test de vieillissement
- ✓ 11 autoclaves stérilisation OE
- ✓ 2 autoclaves stérilisation chaleur humide
- ✓ E-learning stérilisation OE



## Avez-vous besoin de garantir l'intégrité (CCI) de vos produits nécessitant un stockage et un transport à très basse température ?

L'analyse laser du headspace est la seule technique rapide et non-destructive pour les tests d'intégrité (CCI), qui peut mesurer les défauts d'intégrité temporaires dans les produits pharmaceutiques stériles dûs au stockage ou au transport à ultra basse température.



scanner  
le code QR  
**TÉLÉCHARGEZ  
L'EBOOK.** 



**TÉLÉCHARGEZ  
L'EBOOK**