

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2016

THESES 2016 TOU3 2084

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par

Pierre OURGAUD

Maitrise des conditions aseptiques des opérations de remplissage
en ZAC conventionnelle :
Application à la fabrication de vaccins

Date de soutenance

Vendredi 28 Octobre 2016

Directeur de thèse : Madame Cécile ARELLANO

JURY

Président : Cécile ARELLANO
1er assesseur : Fabien BROUILLET
2ème assesseur : Pierre CONTRERAS

A ma famille et à ma sœur....

Remerciements

A Mme Cécile Arellano

Directrice de thèse, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa disponibilité, ses conseils avisés, son esprit critique, son soutien et sa confiance au cours de l'année de master. Je voudrais vous remercier sincèrement.

A Mr Philippe Vives

Mon maître de stage, qui m'a donné l'opportunité de réaliser mon stage de fin d'études chez Sanofi Winthrop Industries. J'ai pu découvrir au fil des mois l'environnement stérile, le fonctionnement des zones à atmosphère contrôlée et la production de médicaments injectables. Je le remercie pour sa disponibilité, ses précieux conseils et sa sympathie tout au long de ce stage qui est sans aucun doute le plus formateur que j'ai effectué durant mes études de pharmacie.

A l'ensemble des professeurs de la Faculté de Pharmacie de Toulouse

Pour les connaissances qu'ils m'ont transmises et pour la qualité des enseignements dispensés durant ces six années d'études, me permettant alors d'entrer dans le monde professionnel dans les meilleures conditions.

A mes camarades de la Faculté de Pharmacie de Toulouse

Pour toutes ces années passées à leurs côtés, pour leur présence et leur disponibilité pendant les périodes de révision, pour l'amitié chaleureuse dont ils ont su témoigner, pour toutes les soirées passées en leur compagnie, pour toutes les journées du stage hospitalier au Cancéropôle, pour les week-ends au ski, la petite semaine de vacances passée à Valras et enfin pour tous les week-end d'intégration à Lourdes et où vous avez su vous occuper de moi après mon passage dans le château gonflable.

A mes amis d'Escalquens et des villages environnants

Qui resteront à jamais gravé dans ma mémoire. Merci pour ces dix (et plus pour certains) années passées avec vous, du collège jusqu'à mes études universitaires, dans la joie et dans la bonne humeur. Merci à Thomas, Cécilia, Florine, Hugo, François, Marc, Paul, Natacha, Matthieu, Pauline, Kim, Maxime, Romain, Bérangère, Mathias, Simon, Hélié, Alizée qui ont rendu ma vie aussi chaleureuse qu'elle puisse l'être.

A Laure

Qui m'a appris énormément de choses sur le métier de pharmacien et qui a su m'accorder sa confiance dès les premiers instants. Merci pour ta sympathie, ta générosité et pour ton amitié. Tu resteras à mes yeux une personne exceptionnelle et je te souhaite beaucoup de bonheur avec le petit bout de chou qui fait maintenant parti de ta vie.

Aux stagiaires d'Orléans

De nouvelles connaissances qui ont réussi à rendre mon séjour sur la région un des plus extraordinaire de ma vie. Merci à Sébastien, Maxime, Marie-Sophie, Béatrice, Chloé, Matthieu, Fanny, Flavien, et Gaëlle pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble. Je ne retrouverai sans doute pas une amitié comme la vôtre.

Aux stagiaires/Chef de secteurs de Rouen

Pour ces six mois passés dans le secteur de la production pharmaceutique. Nous avons réussi à mener à bien la campagne de production de vaccins grâce à l'implication de chacun. Nous avons su partager nos connaissances et nos compétences qui ont permis le bon déroulement de cette mission qui nous a été confiée. Merci à Erwan, Vincent, William, Iker, Cristian, les Benjamin, Sébastien, Christy, Candice, Constance, Hicham, Maxime, Marion, Laura, les Maya, Simon, Laurence, Elsa, Damien, Clément, Adrien. Merci aux nombreux afterwork et tous ces moments passés sur Rouen, mais également nos Road trip sur la côte et à Omaha Beach. Et encore merci Maya, pour l'aide que tu m'as apporté, cela m'a été utile bien plus que tu ne le crois.

A Frédérique et Magali

Qui ont su m'accueillir dans leur service et m'apprendre beaucoup chose dans le domaine du réglementaire et dans le monde du travail en général. Pour l'ambiance extraordinaire qu'elles ont su générer et qui ont rendu mes journées de travail très agréables.

A ma famille

Qui a toujours été présente depuis mes premiers pas jusqu'à aujourd'hui. Merci pour tous ces moments de bonheur partagés et ces beaux souvenirs qui font ce que nous devenons. Merci à mon père et à ma mère pour m'avoir enseigné les bonnes et les mauvaises choses de la vie, d'avoir toujours eu un œil bienveillant à mon égard. Merci à mes grands-parents pour l'amour qu'ils ont su me témoigner et leur gentillesse.

A ma sœur

Qui marche dans mes pas et à qui je souhaite de réussir ses études de Pharmacie et je porterai à jamais donc mon cœur.

PERSONNEL ENSEIGNANT

de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier au 1^{er} octobre 2015

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES- GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAU MONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires

M. CESTAC P	Pharmacie Clinique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie
Mme THOMAS F	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C	Biophysique
M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C	Physiologie
Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
Mme COSTE A (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N	Biochimie
Mme DERAEEVE C	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A	Toxicologie
Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
Mme LEFEVRE L	Physiologie
Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
M. LEMARIE A	Biochimie
M. MARTI G	Pharmacognosie
Mme MIREY G (*)	Toxicologie
Mme MONTFERRAN S	Biochimie
M. OLICHON A	Biochimie
M. PERE D	Pharmacognosie
Mme PORTHE G	Immunologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D	Hématologie
Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires

Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2015

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES	1
Remerciements	4
PERSONNEL ENSEIGNANT de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier au 1 ^{er} octobre 2015.....	6
Glossaire et liste des Abréviations	12
Introduction.....	13
Partie 1 : Généralités sur les médicaments stériles et les vaccins, les contaminants, le fonctionnement des ZAC conventionnelles, le remplissage aseptique.	14
A. Les Médicaments stériles	14
1) Définition du médicament.....	14
2) Définition des médicaments stériles	15
3) Les différentes formes de médicaments stériles	16
4) La fabrication des médicaments stériles	17
5) Les différentes méthodes de stérilisation des produits injectables.....	17
a) Stérilisation par la chaleur :	18
b) Stérilisation par irradiation ionisante	18
c) Stérilisation par les gaz	18
d) Filtration.....	18
B. Généralités sur le vaccin contre la grippe	19
1) Le virus de la grippe.....	19
2) Le vaccin antigrippal :	19
C. Contamination et contaminants	21
D. Les Zones à atmosphère contrôlée	23
1) Les différentes classes de ZAC.....	24
2) Les limites particulières et microbiologiques	25
E. Le remplissage aseptique, opérations et validation	26
1) Définition	26
2) Opérations de remplissage aseptique.....	26
3) Validation de la stérilité d'un produit	27
F. Présentation de la ligne de remplissage	28
Partie 2 : Maitrise des différents paramètres validant l'asepsie sur opération de remplissage du vaccin contre la grippe	33
A. Maitrise des contaminations lors de l'entrée en ZAC.....	34
1) La contamination microbiologique.....	34

a)	Les virus.....	34
b)	Les bactéries.....	35
c)	Les champignons microscopiques	35
d)	La croissance et le développement bactérien.	36
e)	Les phases de la croissance.....	37
2)	La contamination particulière de l'air	38
3)	L'homme : source de contamination microbiologique et particulière	40
4)	Les moyens de prévention.....	42
a)	limiter l'entrée de contaminants	42
b)	limiter l'émission et la dispersion des contaminants.....	46
c)	limiter le risque de transfert de contamination manu-portée	47
B.	Nettoyage et décontamination des ZAC	48
1)	Le nettoyage	48
a)	Règles générales de nettoyage	49
b)	Les différentes méthodes	49
c)	Les produits de nettoyage	50
d)	Fréquence de nettoyage	50
e)	Tenues de nettoyage	50
2)	La décontamination par la brumisation	50
C.	Maitrise du procédé de répartition : Filtration du produit.....	54
1)	La filtration stérilisante.....	54
a)	Définition	54
b)	Conduite de la filtration stérilisante	55
2)	Les différents filtres utilisés sur le process vaccin.....	56
a)	Le filtre produit	56
b)	Les filtres Events.....	57
3)	Les paramètres des filtres sur la ligne de répartition.....	58
D.	Préparation aseptique du matériel et des composants entrant en ZAC	59
1)	Stérilisation/désinfection des composants et pièces machine	59
a)	L'autoclavage	60
b)	La décontamination des composants	62
c)	La décontamination par brumisation	64
2)	Stérilisation des tenues ZAC et des gants par rayonnements γ	65

a)	La radio-stérilisation par rayonnement ionisant γ (gamma)	65
b)	Effet de la radio-stérilisation sur les micro-organismes	66
c)	Contrôle microbiologique de la stérilisation	66
E.	Media Fill Test préalable sur la ligne de répartition	68
1)	Prérequis du MFT	68
a)	Air comprimé.	68
b)	Opérateurs :	68
2)	Déroulement du MFT :	69
a)	Types d'interventions à valider par les opérateurs qui travaillent sur la ligne de remplissage.	69
b)	Nombre d'unités à remplir.....	70
c)	Conditions de réalisation des MFT	70
d)	Contrôle des unités produites avant incubation	71
e)	Incubation des unités.....	71
f)	Contrôles microbiologiques et physico-chimiques avant répartition	72
g)	Lecture des unités remplies	72
h)	Contrôle des propriétés nutritives avant et après répartition après incubation ..	73
i)	Critères d'acceptation d'un MFT	74
F.	Monitoring de l'environnement ZAC	76
1)	Définitions (selon norme ISO 14644-1, §3.1.1)	76
a)	Les paramètres de ventilation	77
b)	Le contrôle des paramètres de température, humidité et pression	79
c)	La température et l'humidité.....	79
d)	La pression	80
e)	Les contrôles particuliers de l'air	81
f)	Les contrôles microbiologiques	83
g)	Le Media Fill Test	83
G.	Contrôles en cours de fabrication (In Process Control)	83
1)	Contrôles effectués sur les produits.....	84
2)	Contrôles microbiologiques de l'environnement de la ligne de répartition.....	84
a)	Les prélèvements d'air passif.....	85
b)	Les prélèvements d'air actif.....	85
c)	Les contrôles par gélose de contact	85

d) Les écouvillons	85
3) Contrôles microbiologiques des opérateurs	86
a) Géloses de contact pour la tenue	86
b) Les contrôles de doigts de gants.....	86
c) L'incubation des milieux	87
4) Spécifications des contrôles microbiologiques	87
Conclusion	88
Serment de Galien.....	90
Liste des Figures	91
Liste des Tableaux	91
Liste des photographies	92
Liste des documents Annexes :	92
Bibliographie	93

Glossaire et liste des Abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché

AQP : Assurance Qualité Produit

BPF : Bonne pratiques de fabrication

CIP : Clean in Place

CTD : Common Technical Document

FDA : Food and Drug Administration, autorité américaine équivalente à L'agence Nationale de Sécurité du Médicament pour la France

cGMP : current Good Manufacturing Practice

LSAPC : Light Scattering Airborne Particle Counters

MPPS: Dimension des particules les plus pénétrantes (= dimension des particules pour laquelle l'efficacité du filtre est minimale)

NAS : niveau d'assurance de stérilité

Nest : support des seringues dans le tub

QC : Quality Control

RCS : Rotor Centrifuge Sample = appareil de contrôle permettant de réaliser des prélèvements air actif

RNS : Rigid Needle Shield, = protège aiguille

Rodac : milieu gélosé servant à effectuer les contrôles microbiologiques de surfaces

Tubs : bac en plastique contenant un nombre défini de seringues

UFC : Unité Formant une Colonie (CFU en anglais)

ZAC : Zone à atmosphère contrôlée

Introduction

La fabrication de médicaments injectable stériles est une activité pharmaceutique complexe. Elle requiert beaucoup de maîtrise allant de la formation et l'habilitation du personnel jusqu'au processus de fabrication, tout en assurant les conditions environnementales des salles participant aux opérations de production.

Il faut garder à l'esprit qu'un médicament injectable est directement administré dans le système sanguin du patient et doit être exempt de toute particule ou micro-organisme pouvant être nuisibles et potentiellement grave pour sa santé. Aucun doute ne doit exister sur cette sécurité et donc la stérilité du produit. Pour des enjeux aussi bien réglementaires qu'industriels et financiers, la stérilité est un paramètre critique, qui va influencer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament.

Les industries pharmaceutiques produisant des médicaments injectables stériles en procédé de répartition aseptique intègrent obligatoirement dans la qualification de ce procédé la simulation par Media Fill Test (MFT) qui permet de démontrer la maîtrise du procédé aseptique de fabrication et de son environnement.

L'opération de répartition aseptique d'un produit peut se réaliser dans une Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) conventionnelle ou sous un isolateur. Une ZAC doit garantir un niveau d'assurance de la stérilité satisfaisant ; les interventions sous flux doivent être effectuées dans des conditions particulières afin de minimiser les risques de contamination (microbiologique, particulaire et croisée) et doivent être autorisées suite à leur évaluations et à leurs simulations en MFT. Le personnel doit être en routine formé et habilité à la réalisation de ces interventions.

Les différents paramètres à maîtriser lors du remplissage seront détaillés dans le cas d'une ligne de répartition aseptique, fonctionnant dans une ZAC conventionnelle avec une classe A sous flux, entourée d'un environnement de classe B, destinée à la fabrication de vaccins contre la grippe sous forme de solution injectable en intramusculaire en seringue pré-remplie, pour l'Homme.

Partie 1 : Généralités sur les médicaments stériles et les vaccins, les contaminants, le fonctionnement des ZAC conventionnelles, le remplissage aseptique.

A. Les Médicaments stériles

1) Définition du médicament

Le code de la Santé publique définit ainsi le médicament : « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.* » [1].

Le médicament obéit à une réglementation contraignante et s'inscrit dans un circuit de fabrication et de mise à disposition des professionnels et des patients très encadré et strictement surveillé.

Le médicament contient :

- un principe actif, substance d'origine chimique ou naturelle caractérisée par un mécanisme d'action curatif ou préventif précis dans l'organisme,
- des excipients, substances d'origine chimique ou naturelle qui facilitent l'utilisation du médicament mais ne présentent pas d'effet curatif ou préventif.

Il existe plusieurs catégories de médicaments, parmi lesquelles figurent notamment :

- Les spécialités pharmaceutiques qui sont les médicaments fabriqués industriellement et exploités par les entreprises pharmaceutiques. Pour pouvoir être délivrées aux patients, elles doivent obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM). Une même spécialité peut avoir un nom de marque différent selon les pays et les laboratoires qui les commercialisent. La dénomination commune internationale (DCI) permet de désigner de manière unique la substance active qu'il contient.
- les préparations magistrales, hospitalières ou officinales, qui sont le plus souvent réalisées par une pharmacie pour les besoins spécifiques d'un ou plusieurs patients (officine de ville pour les préparations magistrales et officinales ou pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé pour les préparations magistrales et hospitalières) ;

Ces préparations et spécialités pharmaceutiques peuvent se présenter sous différentes formes pharmaceutiques : comprimé, solution buvable, solution injectable, pommade, crème et gel cutané...

Elles sont accompagnées d'une notice d'utilisation (optionnelle pour les préparations) et d'un étiquetage spécifique afin de donner les informations nécessaires à leur utilisation dans les conditions les plus adaptées possibles. [2]

Pour qu'un médicament soit commercialisé, une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) doit être délivrée par l'autorité Compétente qui est l'Agence Nationale de Sécurité du Médicaments (ANSM) en France. L'autorisation repose sur l'évaluation du dossier « Common Technical Document » (CTD) dans lequel sont décrites toutes les étapes du cycle de vie du médicament ; des étapes de recherche et de développement jusqu'aux études cliniques en passant par l'optimisation du procédé de fabrication et les études de stabilité.

Ainsi, l'évaluation du CTD et l'octroi de l'AMM de tout médicament se basent sur trois critères primordiaux :

- Qualité
- Sécurité
- Efficacité

Les médicaments stériles sont des médicaments à plus haut risque de contamination que les autres médicaments aussi bien en raison de la forme (liquide le plus souvent) que des voies d'administration. Les étapes de production doivent quant à elles répondre à des exigences spécifiques.

Dans le cas des seringues pré-remplies, elles sont considérées comme un médicament et non comme un dispositif médical selon le code de la santé publique (voir COURS).

2) Définition des médicaments stériles

Les médicaments stériles doivent répondre à des exigences supplémentaires par rapport aux médicaments non stériles.

La stérilité [3] est définie comme l'absence de tout organisme vivant ou comme [4] « *l'absence de micro-organismes viables* ». Les médicaments stériles doivent donc être exempts :

- de toute contamination microbienne (bactéries, virus et champignons microscopiques).

Mais aussi

- de toute contamination particulaire
- de toute contamination pyrogène

En effet, les particules peuvent servir de support au développement des micro-organismes. Ainsi en les supprimant, on limite la croissance et la multiplication des bactéries, virus et levures.

3) Les différentes formes de médicaments stériles

On distingue les médicaments stériles qui sont en général des préparations liquides destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal.

- Préparations injectables (petit volume)
- Préparations injectables pour perfusion (grand volume)
- Préparations pour usage parentéral à diluer
- Poudres pour usage parentéral
- Implants

Parmi les préparations injectables, différentes voie d'administration peuvent être utilisées :

- Intraveineuse
- Intramusculaire
- Intradermique
- Sous cutanée
- Intra-artérielle
- Intraoculaire

Dans le cadre de cette thèse, la forme pharmaceutique utilisée est une seringue pré-remplie pour injection intramusculaire et rentrent donc dans la définition des préparations parentérale.

Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal. Les préparations parentérales peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation de la (ou des) substance(s) active(s), assurer une action antimicrobienne.

Les préparations parentérales sont préparées à partir de produits et par des méthodes propres à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes. [5]

4) La fabrication des médicaments stériles

La fabrication de médicaments stériles par un établissement pharmaceutique requiert les mêmes exigences que les autres médicaments :

- Procédé de fabrication clairement défini et revu systématiquement
- Instructions et procédures rédigées clairement et sans ambiguïté et approuvées
- Etablissement de relevés pendant la fabrication
- Dossiers de fabrication de lot établis en vue de retracer l'historique complet d'un lot
- Système de rappel de lots organisé
- Analyse des réclamations et le cas échéant, mesures correctives
- Traitement des anomalies ou déviations
- Validation des étapes critiques (celles qui ont un impact sur la qualité)
- Moyens nécessaires : personnel qualifié et formé, locaux adaptés, matériel et services adéquats...

Pour les médicaments stériles, les deux derniers critères nécessitent une vigilance particulière vis-vis du risque de contamination. La fabrication des stériles est régie par une autorisation spécifique puisque les locaux et le matériel doivent permettre l'absence de contamination et/ou des étapes de stérilisation. La formation des personnels à l'asepsie est donc également un paramètre très important.

5) Les différentes méthodes de stérilisation des produits injectables

L'absence de contamination des médicaments destinés aux voies parentérales peut être effectuée par différentes méthodes de stérilisation ou de remplissage aseptique.

Il est recommandé selon la Pharmacopée Européenne de choisir le procédé qui permet la stérilisation du produit dans son récipient final (la stérilisation terminale).

Si la stérilisation terminale n'est pas possible, il est possible de recourir à la filtration sur filtre antimicrobien ou au traitement aseptique. Dans tous les cas, le récipient et le système de fermeture doivent garantir et maintenir la stérilité du produit durant toute sa durée de conservation.

La Pharmacopée Européenne propose différentes méthodes [6] :

a) Stérilisation par la chaleur :

- **Stérilisation par la chaleur humide** (vapeur) : consiste en un passage en autoclave. C'est la méthode de référence, en particulier pour les solutions aqueuses. Les conditions de référence applicables aux préparations aqueuses sont de 121°C au minimum pendant une durée de 15 minutes. D'autres combinaisons de température et de durée peuvent être utilisées à condition de démontrer que le procédé choisi assure un taux de létalité des micro-organismes adéquat.
- **Stérilisation par la chaleur sèche** : comme pour la stérilisation par autoclave, des conditions de température et de durée sont définies ; la stérilisation s'effectue à une température de 160°C pendant 2 heures.

b) Stérilisation par irradiation ionisante

Elle consiste en l'exposition du produit à un rayonnement ionisant (par exemple : rayonnement gamma provenant d'un radio-isotope de Cobalt 60). La dose de référence (dose absorbée) est de 25 kGy. Cette méthode est principalement utilisée pour la stérilisation d'accessoires et de produits sensibles à la chaleur. « Compte tenu que de nombreux médicaments et certains articles de conditionnement sont sensibles aux radiations, cette méthode n'est acceptable que si l'absence de détérioration a été démontrée expérimentalement. »

c) Stérilisation par les gaz

Le gaz (par exemple : à l'oxyde d'éthylène) pénètre le produit à stériliser. Par la suite, il est indispensable de s'assurer de l'élimination de ce gaz à « une concentration inférieure à celle qui peut provoquer des effets toxiques ». Cette méthode ne doit être employée que lorsqu'aucune autre méthode n'est utilisable.

d) Filtration

Méthode appliquée aux médicaments ne pouvant pas être stérilisés dans leur récipient final, par les méthodes décrites ci-dessus.

Dans le cas de cette thèse, nous nous intéresserons à la filtration stérilisante qui est utilisée pour la fabrication des vaccins. Cette méthode sera détaillée dans la partie II.

B. Généralités sur le vaccin contre la grippe

Les épidémies de grippe touchent chaque année des millions de personnes dans le monde. Si la grippe saisonnière reste la plupart du temps bénigne, elle est cependant à l'origine de centaines de milliers de décès annuels, principalement chez les personnes âgées qui présentent un système immunitaire affaibli [7].

1) Le virus de la grippe

Le syndrome grippal se manifeste au bout d'un temps d'incubation de 3 à 4 jours par une fièvre importante, accompagnée de myalgies, de céphalées et d'une asthénie provoquant une sensation de mal être général. L'infection dure généralement 7 jours. [8]

L'agent étiologique de la grippe est le virus Influenza de la famille Orthomyxoviridae et se décline en trois sous familles taxonomiques : A, B et C. Les virus grippaux, facilement transmissibles et dont le génome évolue rapidement, constituent par ailleurs des candidats potentiels à l'émergence d'épidémies plus sévères et de grande ampleur [9]. Chaque année, le virus de la grippe réorganise son patrimoine génétique notamment en changeant le typage de ses protéines virales : les hémagglutinines et les neuraminidases.

Pour la grippe saisonnière, l'Organisation Mondiale de la Santé est chargée d'identifier les souches de virus susceptibles d'émerger l'année suivante. Aux alentours du mois de février, elle donne aux industriels deux souches du type A et une souche du type B. Ces trois souches seront incluses dans la solution vaccinale qui sera produite et commercialisée sur le marché.

En 2009, le typage des hémagglutinines et des neuraminidases était H1N1 et a conduit à une grippe pandémique de type A.

La vaccination est un moyen de prévention qui va induire une immunité protectrice vis-à-vis des souches virales prévues pour circuler dans les mois qui suivent. Mais il existe des médicaments antiviraux qui peuvent diminuer la durée et l'intensité des symptômes s'ils sont administrés très rapidement dès le début de la maladie. [10]

2) Le vaccin antigrippal :

Le vaccin pour usage humain est une préparation contenant des antigènes dont l'inoculation à un sujet réceptif induit une réponse immunitaire active protectrice, spécifique à un agent infectieux donné, comprenant l'induction des mécanismes innés et adaptatifs du système immunitaire. Le but étant d'induire la réponse immunitaire sans provoquer la maladie infectieuse.

La recherche vaccinale est un processus complexe, coûteux et particulièrement long qui peut durer plus de six mois. Un vaccin est un produit biologique composé de micro-organismes, son cycle de développement est différent de celui d'un produit pharmaceutique [11] :

- **Phase exploratoire** : comprendre la maladie, les données épidémiologiques qui s'y rapportent et identifier les protéines virales à utiliser (qui serviront d'antigènes) pour prévenir ou traiter la maladie
- **Phase préclinique** : évaluer la sécurité de l'antigène et sélectionner le meilleur vaccin candidat
- **Développement clinique** : l'essai clinique inclut entre 10 (phase I) et 1 000 personnes (phase III) et les premiers lots sont produits (lots cliniques et lots industriels pour la conformité)
- **Approbation des autorités réglementaires** : toutes les données recueillies lors des phases précédentes sont soumises aux autorités de Santé compétentes pour obtenir l'homologation du produit
- **Processus de fabrication** : la production d'un seul lot de vaccins peut demander jusqu'à 22 mois
- **Contrôle qualité** : 70% environ du temps de production est consacré au contrôle qualité

Le vaccin antigrippal est un produit à conserver entre 2 et 8°C. Il en est de même pour les étapes de fabrication. Ceci étant, toutes les étapes de fabrication ne peuvent pas s'effectuer entre 2 et 8°C ; un temps hors réfrigération est validé et autorise que la solution reste en dehors de ces limites de températures.

C. Contamination et contaminants

La stérilité d'un produit est donc l'absence de tout organisme vivant. Cette définition amène à la notion de contamination, définie dans les BPF [12] comme une introduction non intentionnelle d'impuretés de nature chimique ou microbiologique, ou de matière étrangère, à l'intérieur ou à la surface d'une matière première, d'un intermédiaire, ou d'une substance active, pendant la production, l'échantillonnage, le conditionnement ou le reconditionnement, le stockage ou le transport.

Les contaminants peuvent être classés en trois catégories [13] :

- les particules inertes comme les fibres, les cendres, les squames de la peau. Elles peuvent avoir une origine naturelle ou humaine.
- les particules viables et micro-organismes (bactéries, virus, levures, moisissures)
- Contaminants chimiques (contamination croisée entre les différents produits).

Une particule [14] est un objet minuscule de matière quelconque qui possède un périmètre physique défini. La taille des particules varie, certaines vont pouvoir être observées à l'œil nu, tandis que d'autres nécessiteront des outils tels que les microscopes optiques ou électroniques.

Le comportement des particules dans l'environnement va dépendre de leur taille :

- Particules ultrafine (< 0.1µm) : suspensions dans l'air et tendance à s'agglomérer
- Particules fines (de 0.1µm à 1µm) : suspensions dans l'air
- Particules grossières (de 2.5 µm à 10µm) : tendance à la sédimentation.

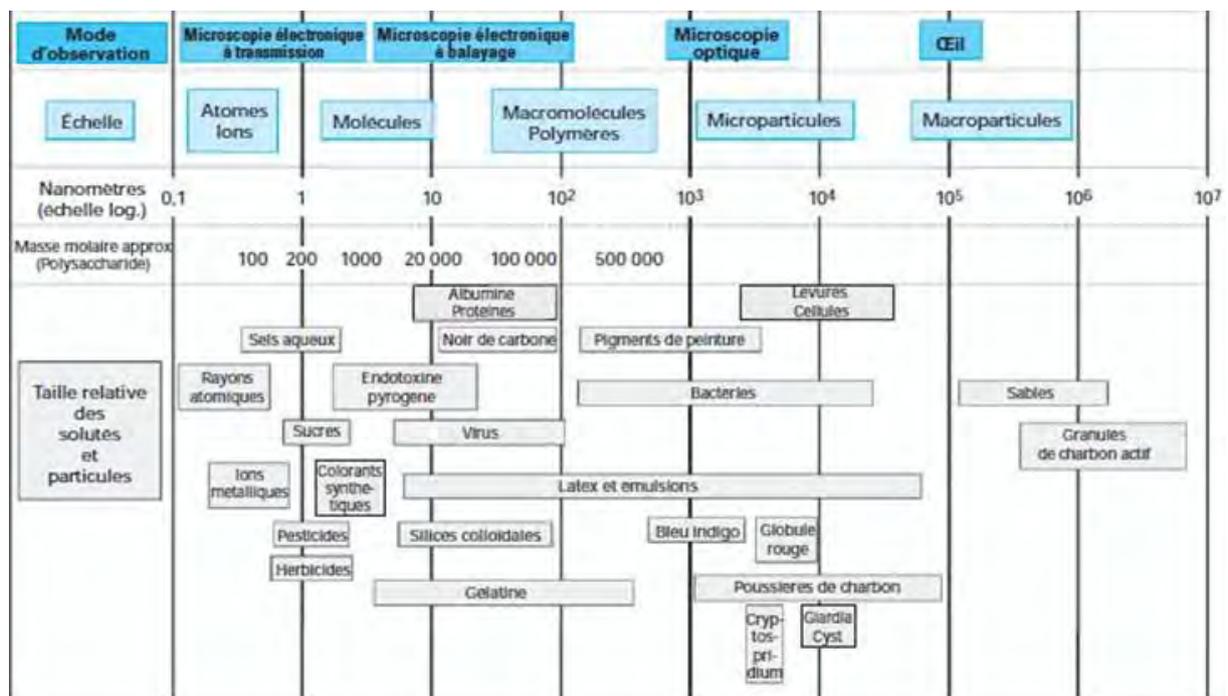


Figure 1 : Distribution de la taille des particules [15]

Les médicaments stériles injectables doivent être exempts de toutes particules, visible ou invisible à l'œil nu, inerte ou viable. Il est donc nécessaire de contrôler l'environnement de fabrication des produits grâce à la mise en place d'isolateurs de répartition ou de zones à atmosphère contrôlée.

D. Les Zones à atmosphère contrôlée

Il existe une ligne directrice spécifique dans les BPF concernant la fabrication de médicaments stériles.

Les BPF des médicaments constituent un des éléments de l'assurance de la qualité ; elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi et requises par l'Autorisation de mise sur le Marché (AMM).

La fabrication des médicaments [16] stériles impose des exigences particulières en vue de réduire au minimum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. La qualité dépend dans une grande mesure du savoir-faire, de la formation et du comportement du personnel impliqué. L'assurance de la qualité revêt ici une importance particulière et ce type de fabrication doit strictement suivre des méthodes de fabrication et des procédures soigneusement mises au point et validées.

La fabrication s'effectue dans des zones à atmosphère contrôlée (ZAC) conventionnelles ou des isolateurs. Une ZAC [17] est une pièce ou un ensemble de pièces d'un bâtiment où le contrôle du taux de particules et de micro-organismes est défini de façon à limiter l'introduction, la multiplication ou la persistance de micro-organismes. Il est donc nécessaire de maintenir des conditions environnementales réglementées pour la production de médicaments stériles.

Le maintien des conditions environnementales de ZAC peut se définir selon trois grands axes :

- Limiter l'entrée de contaminants :

On peut citer le nettoyage renforcé hors ZAC, c'est-à-dire toutes les zones autour qui ne font pas partie de la ZAC à proprement parler, mais par lesquelles le personnel y accède. Cette zone peut prendre le nom de « zoning », le personnel habilité à entrer en ZAC mais aussi toute autre personne du bâtiment est présent dans cette zone non classée, il y a donc beaucoup de passage et donc beaucoup de particules émises. Bien que la ZAC n'entre pas en contact direct avec cette zone, il est tout de même nécessaire de la nettoyer afin de limiter l'entrée de contaminants lors d'une entrée en ZAC.

Le matériel en transit dans l'usine en provenance du magasin par exemple, doit lui aussi subir une décontamination régulière, en particulier celui qui va servir à la production.

Le personnel entrant en zone doit également porter des vêtements de travail adapté et laisser sa tenue « de ville » aux vestiaires.

- Limiter l'émission et la dispersion des contaminants

Les matériaux utilisés en ZAC sont susceptibles comme tout objet d'émettre des particules. Le choix des matériaux doit être judicieux. Par exemple, les chiffonnettes de nettoyage doivent être aparticulaires.

L'activité humaine, même au repos, peut émettre un grand nombre de particules

- Chasser en permanence la contamination présente

L'entrée dans ces zones doit se faire par des sas réservés au personnel habilité. Les ZAC doivent être maintenues à un niveau de propreté approprié et alimentées en air filtré sur des filtres d'efficacité correspondant au niveau de propreté requis. Les ZAC destinées à la fabrication des produits stériles sont classées selon les qualités requises pour leur environnement. Chaque opération de fabrication requiert un niveau approprié de propreté de l'environnement « en activité » de façon à réduire au minimum le risque de contamination particulaire ou microbienne des produits ou des substances manipulés.

1) Les différentes classes de ZAC

Le classement des ZAC se fait en fonction :

- Du nombre maximal de particules de taille de 0.5 et 5 μm par m^3 d'air
- Du nombre maximal de micro-organismes

On distingue quatre classes de ZAC [18] :

- **Classe A** : Les points où sont réalisées des opérations à haut risque, tels que le point de remplissage, les bols de bouchons, les ampoules et flacons ouverts ; les points de raccordements aseptiques. Les postes de travail sous flux d'air laminaire doivent normalement garantir les conditions requises pour ce type d'opérations. Les systèmes de flux d'air laminaire doivent délivrer de l'air circulant à une vitesse homogène de 0,36 – 0,54 m/s (valeur guide) dans les systèmes non clos. Le maintien de la laminarité du flux doit être démontré et validé. Un flux d'air uni- directionnel et des vitesses inférieures peuvent être utilisés dans les isolateurs clos et dans les systèmes clos type « boîte à gants»
- **Classe B** : Pour les opérations de préparation et de remplissage aseptiques, cette classe constitue l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A.
- **Classes C et D** : Zones à atmosphère contrôlée destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles.

Les écarts de pression entre pièces adjacentes relevant de classes différentes doivent être de 10 à 15 pascals (valeurs guides) [19]. Une attention particulière doit être apportée à la protection de la zone de plus haut risque, c'est-à-dire à l'environnement immédiat auquel sont exposés les produits et les accessoires propres destinés à être en contact avec eux.

2) Les limites particulières et microbiologiques

Chacune de ces classes est définie par un taux limite de particules à ne pas dépasser. Les particules sont des vecteurs pour les micro-organismes qui peuvent s'accrocher à ses particules et potentiellement contaminer les produits lors de l'étape de fabrication. Le taux limite est défini selon les BPF :

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particules par m ³ de taille égale ou supérieure aux tailles précisées.			
	0.5 µm (d)	5 µm	0.5 µm (d)	5 µm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	Non défini	Non défini

Tableau 1 : Nombre de particules autorisé en ZAC selon la classe et l'activité [20]

Les BPF donnent aussi des limites concernant la contamination par les micro-organismes

Classe	Limites recommandées de contamination microbiologique			
	Echantillon d'air cfu/m ³	boîtes de Pétri (diam 90 mm), cfu/4heures	géloses de contact (diam 55 mm), cfu/plaque	empreintes de gant (5 doigts) cfu/gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Tableau 2 : Limite des contaminations microbiologiques en ZAC selon la classe [20]

C'est en classe A que la répartition du produit s'effectue, une tolérance zéro s'applique donc pour la contamination microbiologique ; on ne doit retrouver aucun micro-organisme (bactéries, virus ou levure) dans le produit final.

E. Le remplissage aseptique, opérations et validation

1) Définition

La répartition aseptique consiste à maintenir la stérilité d'un produit, dans un environnement contrôlé, à partir de composants préalablement stérilisés par une méthode validée.

La répartition aseptique nécessite des exigences particulières en vue de satisfaire aux conditions requises pour permettre l'administration du médicament au patient sans risque. La maîtrise de la contamination microbiologique est donc primordiale lors des opérations de remplissage en zone de production.

Des tests de stérilité des médicaments injectables référencés à la Pharmacopée sont effectués avant libération des lots produits.

Cette maîtrise s'aborde à différents niveaux et nécessite plusieurs opérations de contrôle et de monitoring :

- Maîtrise des contaminations microbiologiques
- Nettoyage et décontamination de la zone
- Habilitations et formation des opérateurs
- Media Fill Test préalable sur la ligne de répartition
- Monitoring de l'environnement de remplissage
- Stérilisation des composants et introduction aseptique au sein de la ZAC
- Vérifications métrologiques des équipements et des machines
- In Process Control

Ces différents paramètres seront abordés dans la deuxième partie.

2) Opérations de remplissage aseptique

Le traitement aseptique est une activité qui se décompose en nombreuses opérations de base qui doivent être combinées efficacement afin de maintenir la stérilité [21].

Lorsqu'un produit de santé est destiné à être stérile, mais qu'il ne peut subir de stérilisation terminale, le traitement aseptique peut constituer une autre solution. La stérilisation préliminaire du produit, des parties et/ou des composants du produit ainsi que de tous les équipements entrant directement en contact avec le produit traité de façon aseptique est requise.

Le traitement aseptique doit préserver la stérilité :

- des composants (seringues, joint de piston)
- du matériel préalablement stérilisé lors de l'assemblage de la remplisseuse
- du produit à remplir dans les seringues

Il est impératif que le produit en bout de ligne soit stérile dans son conditionnement final. Il est essentiel de contrôler toutes les sources possibles de contamination afin de maintenir la stérilité de chaque composant.

La définition du procédé aseptique doit être révisée à intervalles définis, à la suite d'un événement significatif (par exemple non-stérilité d'un lot) ou chaque fois qu'un changement susceptible d'impacter le produit survient).

Après la répartition, les produits à usage parentéral doivent subir un contrôle individuel destiné à détecter tout corps étranger ou autre défaut [22].

Plusieurs modes de contrôle de la granulométrie sont utilisables mais la pharmacopée en recommande deux [23] :

Les méthodes optiques automatiques qui utilisent des appareils dont le principe de détection repose sur l'interception ou la diffusion de la lumière. Ces méthodes permettent un contrôle rapide et quantitatif du taux de contamination particulaire. Il faut utiliser pour cela un appareil capable de :

- mesurer la lumière interceptée ou diffusée par chacune des particules en suspension dans la solution traversée par le rayon lumineux ;
- d'en déduire la taille équivalente de chacune d'elles ;
- de totaliser les particules supérieures à 10 et 25 μm contenues dans un volume donné de liquide.

La méthode au microscope dont le principe est de recueillir les particules sur un filtre approprié et d'examiner ce dernier à l'aide d'un microscope. Elle ne permet le comptage que des particules d'une dimension égale ou supérieure à 10 μm . Cette méthode est plus longue et demande beaucoup de précautions, mais elle permet l'identification de certaines particules.

Quelle que soit la méthode utilisée, le procédé doit être validé et le bon fonctionnement de l'appareillage contrôlé régulièrement.

3) Validation de la stérilité d'un produit

Il existe des tests inscrits à la Pharmacopée dans le chapitre 2.6.1 Essais de stérilité [24].

Ces essais se définissent comme la validation du processus de stérilisation ou des procédés de fabrication aseptiques. Ils n'assurent pas qu'un produit est stérile ou a été stérilisé, mais qu'aucun germe n'a pu être décelé et donc qu'aucun micro-organisme ne s'est développé dans le produit.

Ces essais de stérilité doivent valider le processus de fabrication aseptique, les tests doivent donc se réaliser dans les mêmes conditions que les opérations de remplissage, c'est-à-dire dans un endroit aseptique afin d'éviter une possible contamination lors de la réalisation du test. Dans le cas de la ZAC, les tests doivent être réalisés sous flux en classe A, entouré d'une classe B.

Les échantillons prélevés pour l'essai de stérilité doivent être représentatifs de l'ensemble du lot, et doivent comporter en particulier des échantillons provenant de certaines parties du lot que l'on considère comme davantage à risque. Pour les produits qui ont été répartis de façon aseptique, des échantillons doivent être prélevés parmi les récipients répartis au début et à la fin de l'opération, ainsi qu'après chaque intervention importante.

L'essai de stérilité selon la Pharmacopée Européenne n°9.0 monographie 2.6.1 peut être réalisé selon deux techniques :

- Filtration sur membrane
- Méthode par ensemencement direct

La filtration sur membrane consiste à filtrer la solution à travers des pores (0.45µm) d'un filtre afin d'y retenir les micro-organismes. Le filtre est ensuite placé au contact d'un milieu de culture (gélose) qui sera ensuite mis à incuber avant la lecture des résultats. Le résultat du test doit être négatif : le nombre de micro-organismes sur la gélose doit être nul.

La **méthode par ensemencement direct** consiste à mélanger directement le milieu de culture avec le produit. Dans le cadre des vaccins, la quantité contenue dans une seringue est de l'ordre de 0.5mL, la totalité de l'échantillon doit donc être versée dans le milieu de culture (tableau 2.6.1-2 Pharmacopée Européenne, *Quantité minimales à utiliser pour chaque milieu*).

Cependant, l'ensemble de ces tests étant destructif, ils ne peuvent être effectués sur l'ensemble de la production. Il s'agit donc d'un contrôle statistique qui impose en parallèle un monitoring environnemental continu lors des phases de production. C'est ce monitoring, associé aux résultats des tests sur les produits finis qui permettront, ensemble, la libération d'un lot de médicament stériles.

F. Présentation de la ligne de remplissage

Dans le cadre de cette thèse, la ligne de fabrication considérée est une ligne de répartition aseptique de produits pharmaceutiques située en ZAC. Des seringues injectables sont pré-remplies selon un volume et une concentration définis. Plusieurs spécialités pharmaceutiques sont produites sur cette ligne ce qui nécessite un changement de format de l'équipement au niveau de la remplisseuse. Les composants (seringues) traversent plusieurs salles de classes différentes avant d'être remplis avec le produit au niveau de la remplisseuse sous flux laminaire. (Figure 2)

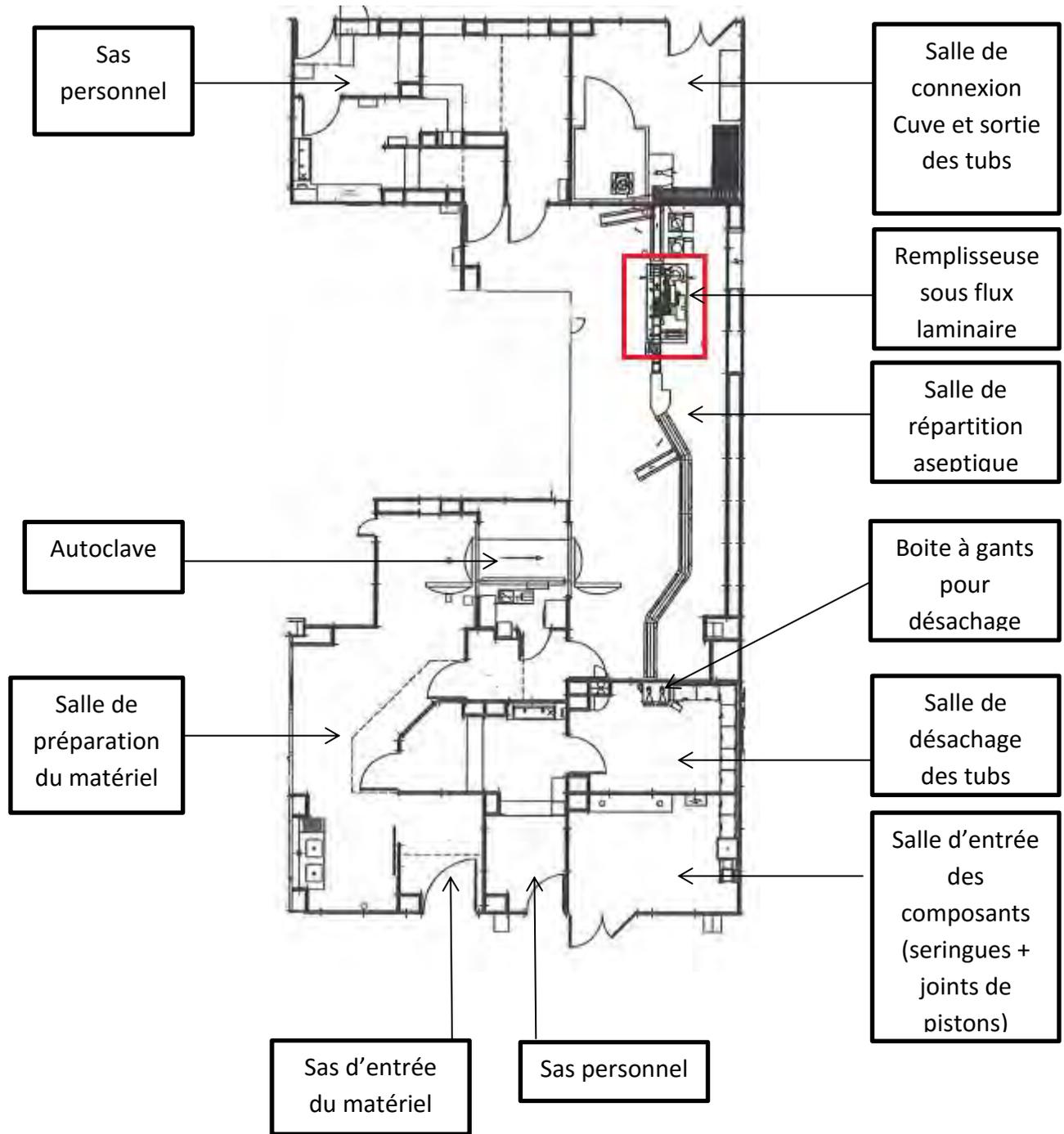


Figure 2 : Plan de la ligne de répartition en ZAC

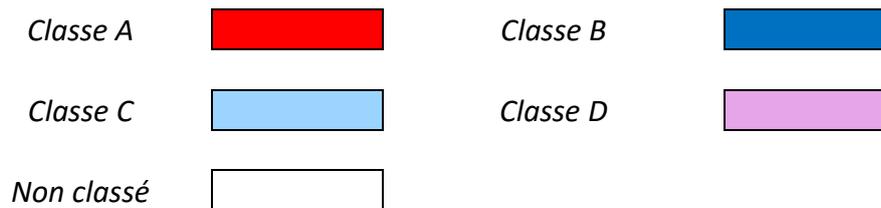
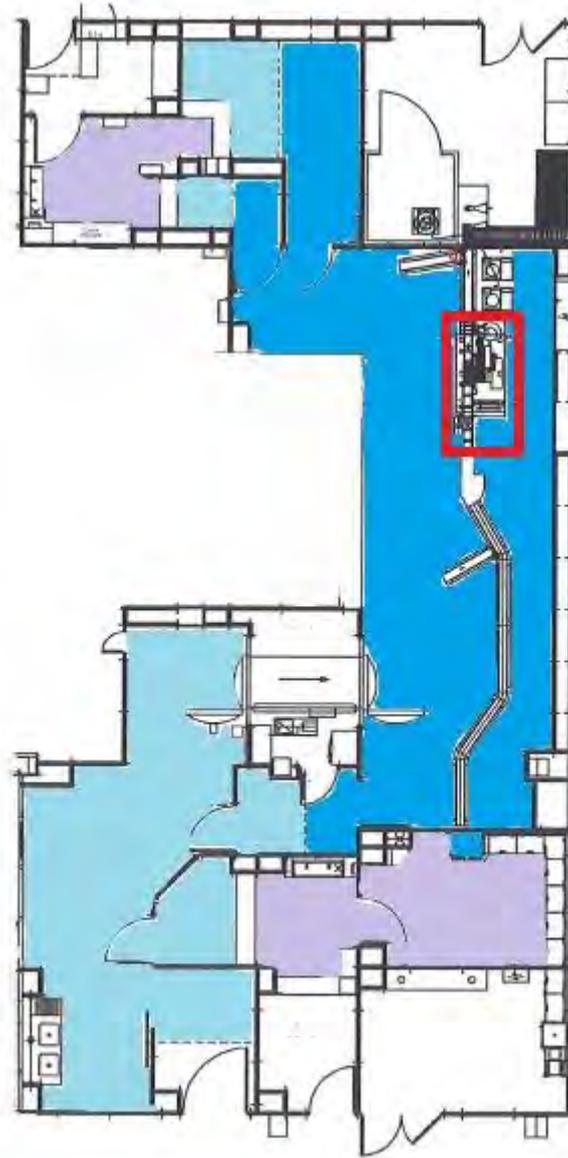
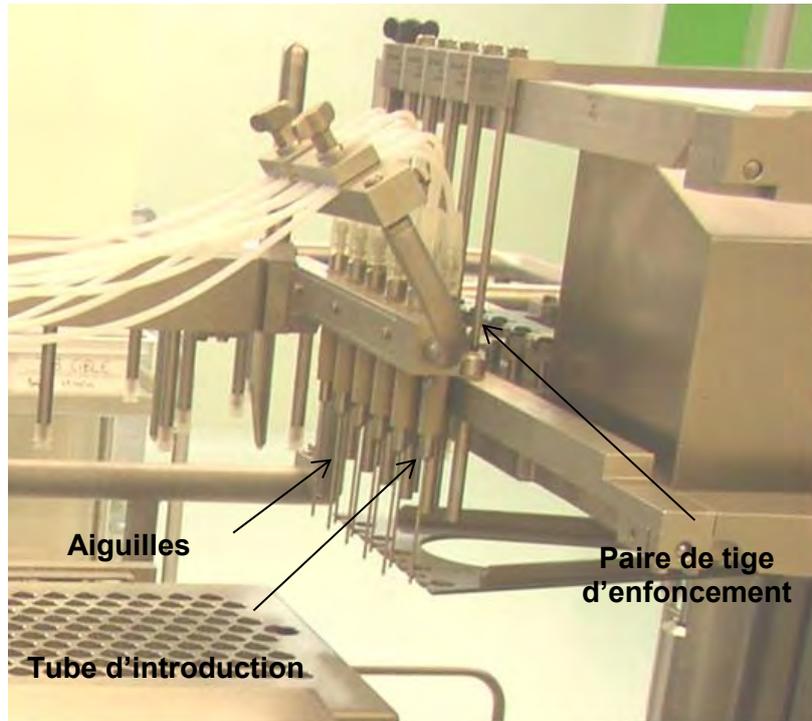


Figure 3 : Les différentes classes de ZAC sur la ligne de répartition

Concernant la remplisseuse, elle est constituée d'une rangée de dix pompes délivrant une quantité en millilitres à introduire dans les seringues via des aiguilles. Dix tiges sont positionnées au-dessus de dix tubes, ils permettront d'introduire le joint de piston une fois le remplissage effectué. La remplisseuse est entourée de carters de protection qui délimitent la zone classée A.



Photographie n°1 : partie d'une remplisseuse de répartition aseptique

La maîtrise de l'asepsie en ZAC se fait par l'agencement adéquat de salles qui sont classées selon leur niveau de propreté. C'est un sens unique de composants utilisés pour la production d'un lot dans le but de garantir la stérilité du produit. De plus, la salle stérile de remplissage (Figure 3) est constituée de deux classes : l'environnement de travail est une classe B alors que la machine se situe dans une classe A accompagnée d'un flux laminaire couvrant toute la surface de la machine. Son rôle est de filtrer l'air qui est en contact avec le produit.

Ce flux laminaire se compose de 3 types de filtres : préfiltres, filtres à haute efficacité et filtres à très haute efficacité (HEPA). Les salles stériles (classes A et B) sont maintenues en surpression par rapport aux autres salles à activités moins critiques. Ce paramètre permet de limiter l'entrée des contaminants véhiculés par l'air ambiant.

La ZAC permet la production des médicaments exempts de particules : stériles. Pour ce faire, la réglementation exige une maîtrise sur :

- le milieu : environnement de travail adapté, propre (les locaux, le traitement d'air)
- le matériel : l'équipement, tout ce qui fait fonctionner la machine (logiciel informatique par exemple)
- la matière : les composants, la solution, les nécessités primaires pour produire le lot.
- la main d'œuvre : le personnel passe une formation structurée dans le but d'être habilité c'est-à-dire être capable de manière autonome de réaliser les tâches demandées
- les méthodes : procédures, formulaires, la logique du procédé de fabrication

Concernant le milieu, le contrôle de l'environnement permet de classer les zones de production, de la zone à activité moins critique vers la plus forte. Par conséquent, deux critères sont employés pour caractériser les zones de production :

- le nombre de particules ayant une taille de $0.5\mu\text{m}$ et $5\mu\text{m}$ par m^3 d'air
- le nombre de micro-organismes

Cela permet de distinguer 4 classes de propreté :

- zones propres, ayant des activités à faible risque : classes D et C
- zone de travail de la classe A : classe B
- zone à activité à fort risque : classe A.

Partie 2 : Maitrise des différents paramètres validant l'asepsie sur opération de remplissage du vaccin contre la grippe

Plusieurs aspects et paramètres sont à maîtriser lors de la fabrication de médicaments stériles si l'on veut assurer l'asepsie d'un procédé de fabrication. Dans le cadre de la production de vaccins antigrippaux, les opérations de remplissage s'effectuent dans une zone à atmosphère contrôlée dans laquelle il est impératif de traiter en continu l'environnement :

- la qualité de l'air doit être monitorée afin d'éviter les contaminations particulières ou microbiologiques
- Le nettoyage des zones de production est une opération importante et doit être effectué fréquemment, il permet également d'effectuer des vides lignes afin d'éviter les contaminations croisées
- Le procédé de répartition aseptique doit être testé et validé (MFT) avant les opérations de production en routine
- Les composants ainsi que les tenues d'habillement doivent être décontaminés/stérilisés avant d'entrer dans les zones de production
- Différents contrôles doivent être effectués en cours de production, sur les produits, les opérateurs et sur l'environnement

Ces différents aspects et paramètres seront abordés dans cette partie.

Il faut garder à l'esprit que la maîtrise des contaminations et la gestion documentaire constituent deux éléments importants du système d'assurance qualité. La maîtrise des contaminations passera obligatoirement par une analyse de risques sur le produit ainsi qu'une gestion correcte des flux de matière et composants et du personnel.

A. Maitrise des contaminations lors de l'entrée en ZAC

La maitrise des contaminations par les micro-organismes et les particules inertes est le paramètre le plus critique lors de la fabrication de médicaments stériles, en particulier si les opérations de production sont réalisées en ZAC (en comparaison avec un isolateur). La source de contamination la plus importante est celle émanant de l'Homme.

La maitrise de la contamination a pour objectif de protéger [25] :

- Le produit fabriqué
- L'opérateur, lors des manipulations de produits potentiellement toxiques
- L'environnement

1) La contamination microbiologique

Il existe différents micro-organismes [26] susceptibles de contaminer les produits lors des opérations de fabrication.

- Les virus
- Les bactéries
- Les champignons microscopiques : levures et moisissures

a) Les virus

Les virus sont des agents biologiques et infectieux de très petite taille, parasites obligatoires des cellules vivantes. Libres à l'extérieur d'une cellule, ils sont inertes, ont une structure propre appelée virion (ou particule virale). A l'intérieur d'une cellule ils peuvent, à partir de leur génome, se multiplier, persister et parfois induire des perturbations responsables de maladies. Ils contiennent du matériel génétique sous la forme d'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), se multiplient à partir de ce génome par réplication, sont des parasites intracellulaires obligatoires et ont chacun une structure propre. Il existe de multiples espèces de virus capables d'infecter les cellules humaines, animales, végétales ou les procaryotes (archées et bactéries).

De manière classique les virus sont définis comme des agents infectieux possédant les caractéristiques suivantes :

- les virus sont de taille inférieure aux bactéries (25 à 300 nm),
- leurs génomes ne contiennent qu'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN).
- Ils ont des structures spécifiques et ne possèdent pas de métabolisme ni de croissance.
- Leur multiplication se fait par réplication de leur génome.

On peut citer plusieurs virus à titre d'exemple :

- Influenza Virus qui est responsable de la grippe
- Herpes Virus Simplex qui peut provoquer des poussées d'herpès chez certaines personnes
- Papilloma Virus dont certains sous-types peuvent favoriser le développement de cancer de l'utérus
- VIH, Virus de l'Immunodéficience Humaine, responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquis (SIDA).

b) Les bactéries

Les bactéries font partie du groupe des unicellulaires : ce sont des cellules procaryotes. Grâce à leurs importantes capacités de multiplication et d'évolution, les bactéries ont colonisé tous les milieux terrestres contenant de l'eau sous forme liquide. On estime qu'elles représentent une biomasse (masse de matière vivante), supérieure à celle des végétaux. La très grande majorité des espèces bactériennes sont non pathogènes.

Cas des spores :

Les endospores ou spores sont des formes de survie pour certaines bactéries, dites sporulées. Ces structures sont produites lorsque la bactérie se trouve dans des conditions environnementales difficiles pour elle. Elle produit alors cette structure reproductive très résistante lui permettant de survivre à ces conditions et de produire de nouveau une forme végétative par germination quand la situation redevient meilleure. Contrairement à la forme végétative, la spore est non pathogène et n'a pas de métabolisme. Les spores sont résistantes à la chaleur, aux rayonnements ultraviolets, au froid, aux désinfectants, à la dessiccation et au vide. Elles sont visibles en microscopie optique et lorsqu'elles sont de taille importante vont déformer le corps bactérien (spore déformante terminale ou sub-terminale).

Les spores sont très difficiles à éliminer, il est donc primordial de prévenir leur développement au sein de la ZAC.

c) Les champignons microscopiques

Les micromycètes font partie du règne des fungi (champignons). Un grand nombre de micromycètes sont utilisés par l'Homme à des fins industrielles (levure de bière, *Aspergillus*, etc.). Parmi les micromycètes d'intérêt médical sont regroupés quelques centaines d'espèces plus ou moins pathogènes et plus ou moins fréquentes.

Une des caractéristiques des fungi est qu'ils se développent sur des substrats dont les défenses sont diminuées ou absentes, on les retrouvera donc essentiellement chez des patients dont certains organes ou tissus sont affaiblis (prématurés, personnes âgées, immunodéprimés).

d) La croissance et le développement bactérien.

Nous nous intéresserons plus particulièrement au développement des bactéries qui sont les micro-organismes les plus susceptibles d'être retrouvés lors des opérations de fabrication.

Les bactéries, pour se reproduire vont avoir besoins de nutriments et de conditions favorables.

- Les nutriments sont des composés biochimiques directement assimilables par les bactéries (oses, acides aminés, ...). Ils sont nécessaires à l'entretien de la cellule bactérienne et à sa croissance. Ils doivent couvrir les besoins élémentaires en C, H, N, O, Fe, Ca, S, P, ... Certaines bactéries ont en plus besoin de facteurs de croissance (acides aminés particuliers, vitamines, bases, ...). Les besoins énergétiques des bactéries sont couverts par l'énergie lumineuse lors de la photosynthèse ou par oxydoréduction de substrats organiques ou minéraux.

- La température.

En fonction de l'optimum thermique (température permettant la meilleure croissance bactérienne), on distingue des bactéries hyper thermophiles (> 80°C), thermophiles (45-70°C), mésophiles (20- 40°C), psychrophiles (10-20°C) et cryophiles. (< 10°C). Les bactéries pathogènes pour l'homme sont principalement des mésophiles (37°C) puisque la chaleur du corps humain est autour de 37,7°C. La température est également utilisée pour détruire les bactéries et donc stériliser des produits. L'ébullition détruit la plupart des bactéries présentes dans l'eau mais pas les endospores. La pasteurisation (72°C, 15s) et les ultra hautes températures (UHT – >135°C, < 5s) permettent d'améliorer la conservation. La référence pour la stérilisation de milieux ou de matériel est l'autoclavage (>120°C, > 1 atmosphère, > 20 min).

- Le pH de l'environnement varie entre 0,5 (sols acides) et 10,5 (eaux alcalines). Les bactéries pathogènes se développent dans les milieux neutres ou légèrement alcalins.

- La pression osmotique (concentration en NaCl ou en sucres dans l'eau) et la disponibilité en eau sont inversement proportionnelles. Les bactéries halophiles survivent en présence de fortes concentrations en sel (>5%, jusqu'à 30% pour les hyper halophiles). Les bactéries osmophiles nécessitent de fortes concentrations en sucres.

- La pression partielle en oxygène. L'oxygène est une molécule réactive, potentiellement toxique, qui peut intervenir dans le métabolisme énergétique des bactéries. On peut distinguer 5 comportements différents vis-à-vis de la pression partielle en oxygène :

- Bactéries aérobies strictes : la croissance bactérienne n'a lieu qu'en présence de forte concentration en oxygène.
- Bactéries anaérobies facultatives : la croissance est maximale au contact de l'oxygène mais a lieu sur toute la longueur du tube.

- Bactéries anaérobies strictes : la croissance a lieu seulement en absence d'oxygène, au fond du tube.
- Bactéries aéro-tolérantes : la croissance est maximale au fond du tube mais a lieu également en surface.
- Bactéries micro-aérophiles : la croissance n'a lieu qu'en présence d'une quantité limitée d'oxygène.

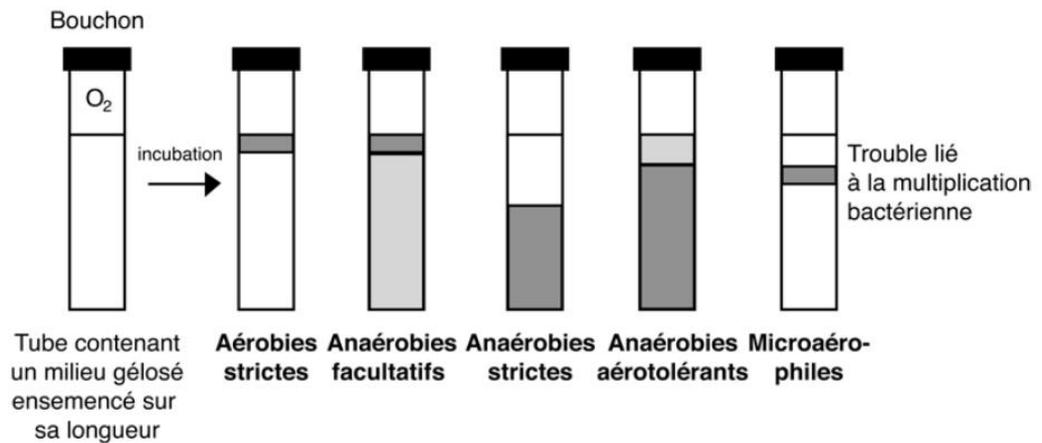


Figure 4 : Les différents types de comportements bactériens vis-à-vis de l'oxygène. La croissance bactérienne est observée après inoculation sur toute la longueur du tube d'une souche bactérienne et incubation. [26]

e) Les phases de la croissance

La culture des bactéries en milieu liquide fermé passe par différentes phases :

- Phase de latence : un inoculum bactérien introduit dans un nouveau milieu ne commence à se diviser qu'après synthèse de l'ADN bactérien et production des enzymes nécessaires.
- Phase croissance exponentielle : la production cellulaire débute et devient très intense. Le nombre de bactéries croît selon la règle « 2^n ».
- Phase stationnaire : Le nombre de cellules est très élevé, les nutriments restants sont en quantité limitée (division cellulaire moindre) et les métabolites cellulaires toxiques s'accumulent dans le milieu (augmentation de la mort cellulaire). L'ensemble de ces phénomènes en équilibre conduit à une stagnation du nombre de bactéries.
- Phase de décroissance ou de déclin : l'équilibre précédent est rompu et le nombre de bactéries qui meurent augmente exponentiellement.

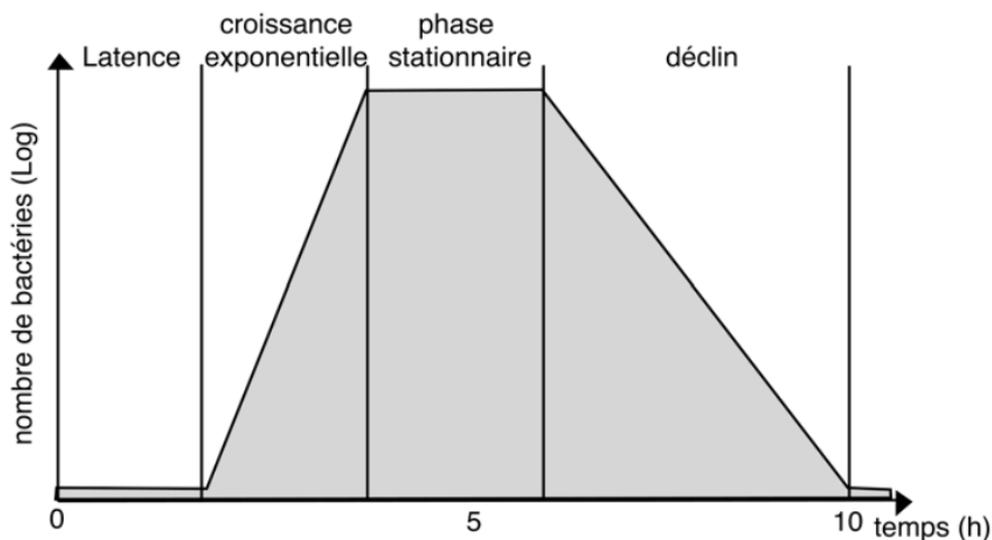


Figure 5 : Courbe de croissance des bactéries en milieu liquide fermé [26]

Une fois qu'une bactérie est installée dans un milieu, le développement et la croissance deviennent rapidement incontrôlables, d'où la nécessité d'entretenir et de nettoyer le milieu fréquemment et de mettre en place des moyens de prévention.

2) La contamination particulière de l'air

Les particules présentes dans l'air que nous respirons au quotidien peuvent avoir plusieurs origines [27] :

- Particules émanant de la pollution industrielle, automobile
- Particules émanant de la pollution liées à l'activité humaine (chauffage individuel, collectif...)
- Particules émanant de la flore présente sur Terre comme le pollen

Les particules aéroportées sont présentes partout dans notre environnement, sous de nombreuses formes différentes telles que la poussière, la fumée, le brouillard. La quantité de particules va dépendre de la localisation : on retrouvera plus de particules près des usines et en environnement urbain que dans une région rurale.

Ambiance extérieure	Ambiance intérieure	Nombre de particules par m3 d'air (diamètre < 0.5µm)
Site industriel Lourd		400 000 000
Centre Urbain, forte activité		200 000 000
	Bureaux fumeurs	150 000 000
	Atelier de mécanique	100 000 000
	Bureaux	25 000 000
Petite ville par temps calme		20 000 000
Campagne par temps calme		10 000 000
	Salle propre micro-électronique	40 à 4 000

Tableau n°3 : Exemple du nombre de particules retrouvées en fonction de la localisation [27]

Ces particules rencontrées dans l'environnement extérieur sont différentes des particules que l'on peut trouver sur un site de production pharmaceutique. En effet, la contamination particulaire des préparations injectables est composée des particules étrangères, non dissoutes et mobiles, autres que des bulles de gaz, qui ont été involontairement introduites dans ces préparations.

Ces contaminants en environnement pharmaceutique ont plusieurs origines :

- tellurique,
- usure des équipements et des machines,
- vêtements (fibres...),
- renouvellement de la peau,
- procédés de fabrication (opérations mécaniques, chimiques...).

Les particules sont caractérisées par leur diamètre exprimé en micromètre (μm). L'environnement de production doit être équipé de compteurs particulaires afin d'être alerté si le taux de particules présentes dans la ZAC dépasse le seuil fixé par les BPF (voir partie I, les limites particulaires).

3) L'homme : source de contamination microbiologique et particulaire

Pour une industrie pharmaceutique fabriquant des médicaments stériles, l'une des principales sources de contamination à maîtriser est celle émanant de l'Homme.

Les organismes supérieurs, dont l'Homme, sont colonisés par les bactéries. Ces relations sont en général bénéfiques aux 2 partenaires (symbiose). Les bactéries sont parfois indifférentes à leur hôte (commensalisme). On estime que 15% du poids d'un être humain est composé de bactéries ce qui correspond à 10^{17} bactéries (10^{14} dans l'appareil digestif, 10^{12} sur la peau, 10^{10} dans la bouche, ...) pour seulement 10^{16} cellules eucaryotes humaines [26]. Les bactéries sont indispensables à l'Homme en particulier pour sa digestion et la production de vitamines. Elles sont également fort utiles dans l'industrie alimentaire (fermentations) et dans le recyclage de la matière organique dans l'environnement

Bien que la fabrication de produits stériles est aujourd'hui industrialisée et automatique, l'action de l'Homme sur les opérations de remplissage est nécessaire en ZAC. En effet, lors de dysfonctionnement de l'équipement, le personnel doit intervenir et effectuer des opérations de maintenance directement sur l'équipement. Lors d'opérations en cours de remplissage, le personnel va manipuler des outils se trouvant à proximité des produits dont il doit éviter tout contact.

L'Homme émet des particules en continu pendant la journée. Le nombre de particules va varier en fonction de son activité. Il faut garder à l'esprit que même au « repos », environ 1.5g/jour de particules provenant des squames de la peau et du cuir chevelu se retrouvent dans l'environnement.

Dans des gouttelettes de salive liées à la parole, la toux ou un éternuement, le nombre de particules libérées dans l'environnement est croissant :

Origine	Nombre de particules émises (>0,5um)
1 minute de parole	15 000 à 20 000
Toux	700 000
Eternuement	$1.4 \cdot 10^6$

Tableau 4 : Exemples du nombre de particules émises selon différentes actions [28]

Lors d'activités physiques ou lorsque l'Homme est au repos, le nombre de particules émises varie :

Activité	Emission de particules de 0,5µm/min
Exercice Physique	> 30 000 000
Monter un escalier	10 000 000
Marcher	5 000 000
S'asseoir sur une chaise	2 500 000
Sans activité (debout ou assis)	100 000

Tableau 5 : Exemples du nombre de particules émises pendant une activité physique [28]

Les micro-organismes se retrouvent sur les particules qui leur servent de support.

Localisation	Nombre de bactéries retrouvées
Front	de 10 000 à 100 000 bactéries /cm ²
Salive	100 millions de bactéries /g
Mains	de 100 à 1000 bactéries /cm ²
Aisselles	de 1 à 10 millions de bactéries /cm ²

Tableau 6 : Exemple du nombre de bactéries retrouvées sur différentes localisations sur le corps humain [28].

On va distinguer deux types de flore chez l'Homme : la flore résidente et la flore transitoire.

Les bactéries résidentes constituent la flore « normale » d'un organe, tel que la peau et les muqueuses, les voies respiratoires supérieures, les intestins... Concernant la flore cutanée résidente, elle est constituée de bactéries telles que les staphylocoques dits non pathogènes :

- Staphylococcus hominis
- Staphylococcus epidermidis
- Staphylococcus saprophyticus
- Corynébactéries qui sont de petits bacilles renflés à une extrémité.

La présence de Corynébactéries est constante à la surface du revêtement cutané (sauf chez le nourrisson). Leur localisation profonde permet un renouvellement constant de la flore de surface et constitue une barrière s'opposant à l'arrivée des bactéries opportunistes ou pathogènes.

La flore transitoire est collectée au fur et à mesure des contacts avec l'environnement, c'est donc une flore non permanente. Elle est transmissible d'un individu à un autre, de l'animal à l'Homme... Superficielle, elle est constituée de bactéries qui ne se multiplient pas sur la peau. Elles sont opportunistes ou pathogènes et peuvent être à l'origine d'infections. Sur une peau saine, cette flore est très réduite et est composée essentiellement de *Pseudomonas* et de Staphylocoques pathogènes

4) Les moyens de prévention

Il existe plusieurs moyens de prévention contre la contamination d'origine humaine. Le personnel doit être formé à la gestuelle en ZAC et doit respecter des règles d'hygiène et les BPF.

Toutes les personnes (y compris le personnel de nettoyage et d'entretien) employées dans ces zones doivent recevoir une formation continue portant sur les bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles. Cette formation doit comporter des modules relatifs à l'hygiène et aux éléments de base en microbiologie. Quand du personnel extérieur qui n'a pas bénéficié d'une telle formation est amené à pénétrer dans ces locaux (par exemple du personnel de sociétés d'entretien ou de construction), il convient d'assurer leur information et leur supervision [29].

Des habilitations doivent être validées pour chaque opérateur et pour chaque tâche qu'ils effectuent lorsqu'ils sont en zone de production. Des re-sensibilisations ou des suspensions d'habilitation doivent être mises en place si le personnel ne respecte pas les procédures ou si des anomalies dans leur gestuelle sont découvertes.

On définit trois objectifs concernant le personnel :

- Limiter l'entrée de contaminants : règles d'hygiène et d'habillement
- Limiter l'émission et la dispersion des contaminants : port d'équipement et comportement
- Limiter le risque de transfert de contamination manu-portée : décontamination des gants

a) Limiter l'entrée de contaminants

Les règles d'hygiène

Une propreté et une hygiène personnelle de haut niveau sont essentielles [30].

L'hygiène est la règle de base que toute personne entrant sur le site (pas seulement en ZAC) doit respecter. Nous allons distinguer :

- L'hygiène corporelle
- L'hygiène bucco-dentaire
- L'hygiène nasale
- L'hygiène des mains

L'hygiène corporelle permet de limiter le développement microbien. Il est nécessaire de laver au savon au minimum une fois par jour, de changer de vêtements au quotidien, de porter des vêtements propres et de se laver les cheveux au moins une fois par semaine.

L'hygiène bucco-dentaire est très importante. Le nombre de bactéries retrouvées dans la bouche atteint les 100 millions par gramme de salive. Le brossage de dents doit être réalisé au moins deux fois par jour car il permet d'éliminer des résidus des repas qui favorisent le développement bactérien.

Concernant l'hygiène nasale, il est préférable d'utiliser des mouchoirs en papier jetable et de le jeter après utilisation. Une bonne hygiène nasale permet de limiter la dissémination des microbes présents dans les sécrétions nasales.

L'hygiène des mains est très importante et c'est la partie du corps la plus contaminante. Le lavage des mains doit se faire après être allé aux toilettes, avant et après les repas et surtout avant de rentrer en zone de production. Il est à noter que toute personne présentant une plaie, une infection cutanée ou étant souffrante doit informer immédiatement sa hiérarchie. Un poste hors ZAC pourra alors être aménagé.

Le lavage simple des mains permet l'élimination des souillures macroscopiques et la diminution de la flore transitoire. Ce lavage est à différencier du lavage hygiénique qui permet l'élimination de la flore transitoire et la diminution de la flore commensale. La méthode du lavage simple des mains avant d'entrer en zone est décrite en annexe (document annexe n°2 : lavage simple des mains)

L'habillement et l'entrée en ZAC

Toutes les personnes (y compris le personnel de nettoyage et d'entretien) employées dans ces zones doivent recevoir une formation continue portant sur les bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles.

Les vestiaires doivent être conçus et utilisés comme des sas en vue de fractionner physiquement les différentes phases de l'habillement et de diminuer ainsi la contamination microbienne et particulaire des vêtements protecteurs [31].

Dans une ZAC, le port de bijoux, montre, piercing, maquillage et vernis est interdit. En effet, ce sont des supports pour le développement des micro-organismes. Concernant les vêtements de « ville », ils ne doivent pas être introduits dans les sas menant aux locaux classés B et C [32]. Toute personne devant accéder aux ZAC classe B et C doit donc revêtir une tenue usine complète comprenant un pantalon et un Tee-shirt sous sa blouse de zoning.

Le lavage hygiénique des mains est différent du lavage simple.

La méthodologie :

- 1) Se laver les mains avec de la solution de désinfectant pendant au moins 2 minutes.
- 2) Rincer à l'eau filtrée en maintenant les mains au-dessus des coudes afin que l'écoulement de l'eau n'amène pas les impuretés des avant-bras sur les mains.
- 3) Fermer le robinet avec le coude

4) Sécher les mains et les poignées sous jet d'air chaud.

La tenue vestimentaire doit être constituée de fibres ne libérant pas de particules et elle doit être adaptée à la classe de propreté de la zone [33] :

- **Classe D** : les cheveux et, le cas échéant, la barbe doivent être couverts. Un vêtement protecteur normal et des chaussures ou des couvre-chaussures adaptés doivent être portés. Des mesures appropriées doivent être prises en vue d'éviter toute contamination provenant de l'extérieur de la zone d'atmosphère contrôlée.
- **Classe C** : les cheveux et, le cas échéant, la barbe et la moustache doivent être couverts. Un vêtement constitué d'une veste et d'un pantalon ou d'une combinaison, serré aux poignets et muni d'un col montant, ainsi que des chaussures ou couvre-chaussures adaptés doivent être portés. Le tissu ne doit pratiquement pas libérer ni fibres ni particules.
- **Classe A/B** : une cagoule doit totalement enfermer les cheveux et, le cas échéant, la barbe et la moustache ; cette cagoule doit être reprise dans le col de la veste ; un masque doit couvrir le visage pour éviter l'émission de gouttelettes ; des gants de caoutchouc ou de plastique, stérilisés et non poudrés, ainsi que des bottes stérilisées ou désinfectées doivent être portés. Le bas du pantalon doit être enserré dans les bottes, de même que les manches dans les gants. Ce vêtement protecteur ne doit pratiquement libérer ni fibres ni particules et doit retenir les particules émises par l'opérateur.

La tenue vestimentaire utilisée dans la salle de répartition aseptique classée A/B est donc une combinaison intégrale. La maîtrise de l'habillement de cette tenue est indispensable pour chaque opérateur afin de limiter au maximum l'entrée de contaminants dans la zone. Lors des formations d'entrée en ZAC, des contrôles microbiologiques (contrôle de surface par gélose de contact) sont appliqués sur la tenue et les gants des opérateurs ; en fonction des résultats, si aucun micro-organisme ne s'est développé, l'opérateur sera habilité à entrer en zone stérile.

Selon la norme ISO 13408_1, des modes opératoires documentés doivent être mis en place pour garantir que l'environnement de traitement aseptique n'est pas compromis par le personnel. Les modes opératoires doivent aborder :

- le retrait des vêtements extérieurs, des montres bracelets, des bijoux, du maquillage et des chaussures,
- le lavage et/ou la désinfection des mains,
- la spécification de l'ensemble complet des vêtements nécessaires pour la chambre stérile,
- l'enjambement des barrières conforme au concept de séparation,
- l'ordre dans lequel les vêtements doivent être mis en place lors de l'entrée en zone stérile,
- les techniques d'habillage et de déshabillage,
- les modes opératoires validés relatifs au lavage et à la stérilisation des vêtements.

Concernant la méthode/technique d'habillage :

- Il convient de couvrir les cheveux, la barbe et la moustache et de porter une combinaison ou un ensemble deux pièces, resserré au niveau des poignets, avec un col montant et des chaussures appropriées ou des sur-chaussures.
- Les vêtements stérilisés prévus pour la zone critique de traitement et la zone d'appoint direct doivent couvrir tout le corps.
- Aucune partie du visage ne doit être exposée.
- Les vêtements doivent retenir les particules tout en laissant s'échapper l'humidité pour un plus grand confort.
- Le tissu doit réduire le plus possible la dissémination de particules.
- Chaque personne entrant dans ces zones doit porter des vêtements propres.
- Les vêtements doivent être à la taille de la personne
- Avant d'entrer dans les zones propres, vérifier que les vêtements et les gants sont bien mis, et qu'ils ne comportent pas de perforations ou de déchirures

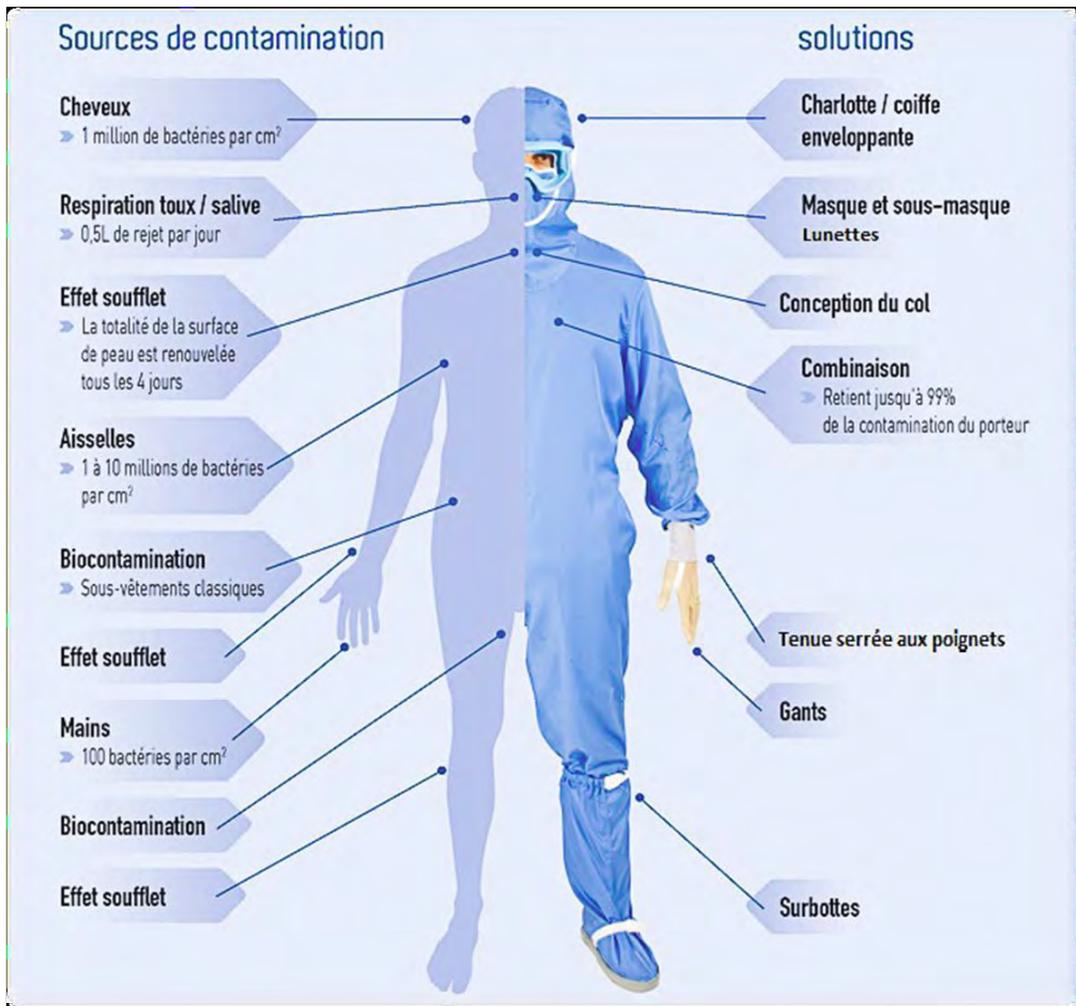


Figure 6 : Représentation des sources de contaminations et d'une tenue classe A ou B [34]

b) Limiter l'émission et la dispersion des contaminants

En adoptant une gestuelle et un comportement appropriés, le nombre de particules émises et donc la dispersion des contaminants vont être limités.

Des règles de comportement sont recommandées en ZAC :

- Se déplacer normalement
- Ne pas faire de gestes brusques
- Ne pas toucher sa tenue ou son visage
- Ne pas toucher la tenue d'un collègue
- Ne pas ramasser un objet tombé au sol
- Ne pas rire, siffler, chanter
- Parler le moins possible

c) Limiter le risque de transfert de contamination manu-portée

Décontamination des gants

La décontamination à l'alcool des mains gantées à fréquence régulière et avant d'intervenir sous flux permet d'éliminer la contamination pouvant être présente sur les gants et ainsi prévenir les risques de contamination manu-portée. La méthode consiste à effectuer une pulvérisation d'alcool dans la paume de chaque main et de le répartir sur les faces sans frotter.

B. Nettoyage et décontamination des ZAC

La désinfection des zones à atmosphère contrôlée est particulièrement importante. Elles doivent être minutieusement nettoyées, conformément à un programme écrit. Lorsque des désinfectants sont utilisés, il convient d'en employer plusieurs et de différents types. Une surveillance microbiologique régulière est nécessaire en vue de détecter tout développement de souches résistantes [35].

Il existe deux méthodes pour garder une zone dans un état propre, elles sont complémentaires et indissociables : le nettoyage et la décontamination par brumisation.

1) Le nettoyage

Le nettoyage est un processus d'élimination des déchets particuliers, chimiques et microbiologiques déposés sur des surfaces et potentiellement contaminants pour l'activité de production.

Le nettoyage des zones est une opération critique de production. Pour chaque classe, le niveau de contamination est défini dans la ligne directrice n°1 des BPF (Voir tableaux n°1 et 2, partie I). Un programme de nettoyage et de désinfection doit être établi.

Le nettoyage régulier des ZAC a pour objectif d'éliminer la contamination particulaire et microbiologique pour maintenir l'environnement de ces zones dans un état de propreté compatible avec leur classe. C'est un des moyens pour protéger les produits de la contamination.

Les locaux et le matériel doivent être situés, conçus, construits, adaptés et entretenus de façon à convenir au mieux aux opérations à effectuer. Leur plan, leur agencement, leur conception et leur utilisation doivent tendre à minimiser les risques d'erreurs et à permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'éviter les contaminations, dont les contaminations croisées, le dépôt de poussières ou de saletés et, de façon générale, toute atteinte à la qualité des produits.

Dans les zones à atmosphère contrôlée plus spécifiquement, toutes les surfaces apparentes doivent être lisses, imperméables et sans fissure afin de réduire la libération ou l'accumulation de particules ou de micro-organismes et de permettre l'usage répété de produits de nettoyage et, le cas échéant, de désinfectants.

a) Règles générales de nettoyage

Il existe des règles générales applicables quels que soient soit la zone ou matériel à nettoyer :

- Tout nettoyage doit être commencé de la partie la plus propre vers la partie la moins propre
- Les sas vestiaires doivent toujours être nettoyés en dernier lors d'une campagne de nettoyage de plusieurs salles. Les parties dites « blanches » sont nettoyées avant les parties dites « grises », excepté les éviers à faire en premier.
- Le nettoyage des salles de remplissage de classe A et B, de filtration (et préparatoire) doit être suivi d'une régénération de la salle ou du poste de travail d'au moins 20 min. La régénération permet de renouveler l'air de la salle afin d'éviter que des particules du désinfectant utilisé pour le nettoyage se retrouve en contact avec le produit.
- Le nettoyage de l'encadrement de portes se fait à l'aide d'une chiffonnette imprégnée de désinfectant en insistant bien sur les contours de la porte et sur les charnières.
- En cas de déversement d'eau ou de liquide en ZAC lors d'opération de production, la zone doit être immédiatement nettoyée afin d'éviter toute contamination.

b) Les différentes méthodes

Pour le nettoyage des ZAC, on distingue quatre méthodes :

1) Le balayage humide :

A l'aide d'un balai trapèze, de chiffonnettes aparticulaires et d'un vaporisateur contenant un désinfectant. Cette méthode est utilisée pour le nettoyage des sols, des murs, du plafond, et des grilles de soufflage d'air (sauf classes A et B)

2) L'essuyage humide :

A l'aide de chiffonnettes aparticulaires et d'un vaporisateur désinfectant seulement. L'essuyage humide concerne le nettoyage du petit matériel et de l'équipement qui demeure dans la zone (poignées de portes, chariot, pinces, ciseaux...). La machine de remplissage, les grilles d'air et l'encadrement des portes sont également concernés par cette méthode.

3) Le lavage :

Avec un balai éponge, de plusieurs éponges et d'un seau. Cette méthode est utilisée uniquement pour le nettoyage des sols.

4) L'essuyage sec :

Avec des chiffonnettes aparticulaires seulement pour le nettoyage des postes informatiques.

Avant et après utilisation, les balais et les vaporisateurs subissent un essuyage humide avec la solution de désinfectant de quinzaine. Afin de se prémunir des phénomènes de résistance bactérienne, il convient d'alterner tous les 15 jours le désinfectant utilisé pour le nettoyage des zones.

c) Les produits de nettoyage

Plusieurs produits de nettoyage disponibles sur le marché peuvent être utilisés. Il est nécessaire de vérifier l'action antimicrobienne (bactéricide, fongicide et/ou sporicide) de chacun avant l'utilisation en routine. Une alternance d'utilisation des produits désinfectants doit être mise en place afin d'éviter les phénomènes de résistance des bactéries.

d) Fréquence de nettoyage

La fréquence et la méthode de nettoyage vont dépendre de la classe de la zone à nettoyer. Les classes A et B vont subir un nettoyage renforcé très régulièrement afin de diminuer au maximum les risques de contamination des produits.

e) Tenues de nettoyage

Les tenues des opérateurs pendant les opérations de nettoyage correspondent aux tenues habituelles portées lors des entrées dans les zones. Le port de sur-lunettes est obligatoire.

2) La décontamination par la brumisation

La décontamination des surfaces de la ZAC permet d'éliminer la présence de micro-organismes dans l'environnement de production ; elle peut être réalisée à travers l'utilisation d'un brumisateur ou « Dry Fog ».

L'équipement « Dry Fog » vaporise un aérosol de microgouttelettes de désinfectant, ce qui permet une évaporation rapide et réduit les risques de condensation. Le liquide est propulsé par de l'air comprimé.

Les microgouttelettes sont produites par un diffuseur qui contient deux gicleurs (buses) dont les jets se télescopent. Les microgouttelettes restent en suspension dans l'air, rebondissent sur les surfaces ou se vaporisent et génèrent un brouillard sec.

Le produit désinfectant utilisé à froid est une solution d'acide per acétique (4.5%) et de peroxyde d'hydrogène (22%) diluée extemporanément avec de l'eau distillée. Les effets biocides, fongicides, virucides et sporicides sont connus et efficaces sur les micro-organismes.

Espèce	Nombre / mL	Temps en min pour tuer 100% des bactéries
Bac. subtilis	6 x 10 ⁶	2.5
Bac. stearothermophilus	6 x 10 ⁶	2.5
Bac. Subtilis NCTC 3610	2.4 x 10 ⁹	5.0
Bac. mesentericus	1.6 x 10 ⁹	5.0
Clostr. perfringens	1 x 10 ⁷	10.0
Clastr. tyrobutyricum	1 x 10 ⁷	5.0
Saccchar. cereisiae	6 x 10 ⁷	0.5
Cand. mycoderma	1.4 x 10 ⁸	0.5
Hansenula anomala	6.4 x 10 ⁸	0.5
Pichia. membronaefaciens	4.8 x 10 ⁸	0.5
Pen. camerunense	1.7 x 10 ⁸	2.5
Mucor. plumbeus	3 x 10 ⁶	2.5
Geotrichium candidum	2 x 10 ⁷	0.5
Bysochlamys nivea	6 x 10 ⁷	0.5
Staph. aureus	2.6 x 10 ⁹	0.5
Strept. faecalis	4.6 x 10 ⁹	0.5
Kleb. aerogenes	2.3 x 10 ⁹	0.5
Ps. fluorescens	4.6 x 10 ⁹	0.5
Ps. aeruginosa	2 x 10 ⁹	0.5
Salm. thyphimurium	2.8 x 10 ⁹	0.5
Coryneb. rubrum	1 x 10 ⁷	1.0
Leuconostoc. spec.	5.3 x 10 ⁸	0.5

Tableau 7 : Temps en minutes pour éliminer 100% d'une espèce bactérienne avec une solution de d'acide per acétique et de peroxyde d'hydrogène diluée à 5% disponible dans le commerce [36]

Pour que le produit soit actif, il est nécessaire de maintenir l'humidité relative des pièces à décontaminer au-delà de 70% pendant un temps minimum validé : c'est un des paramètres de contrôle qui permettra de valider ou non le cycle de brumisation.

SCHEMA DE PRINCIPE

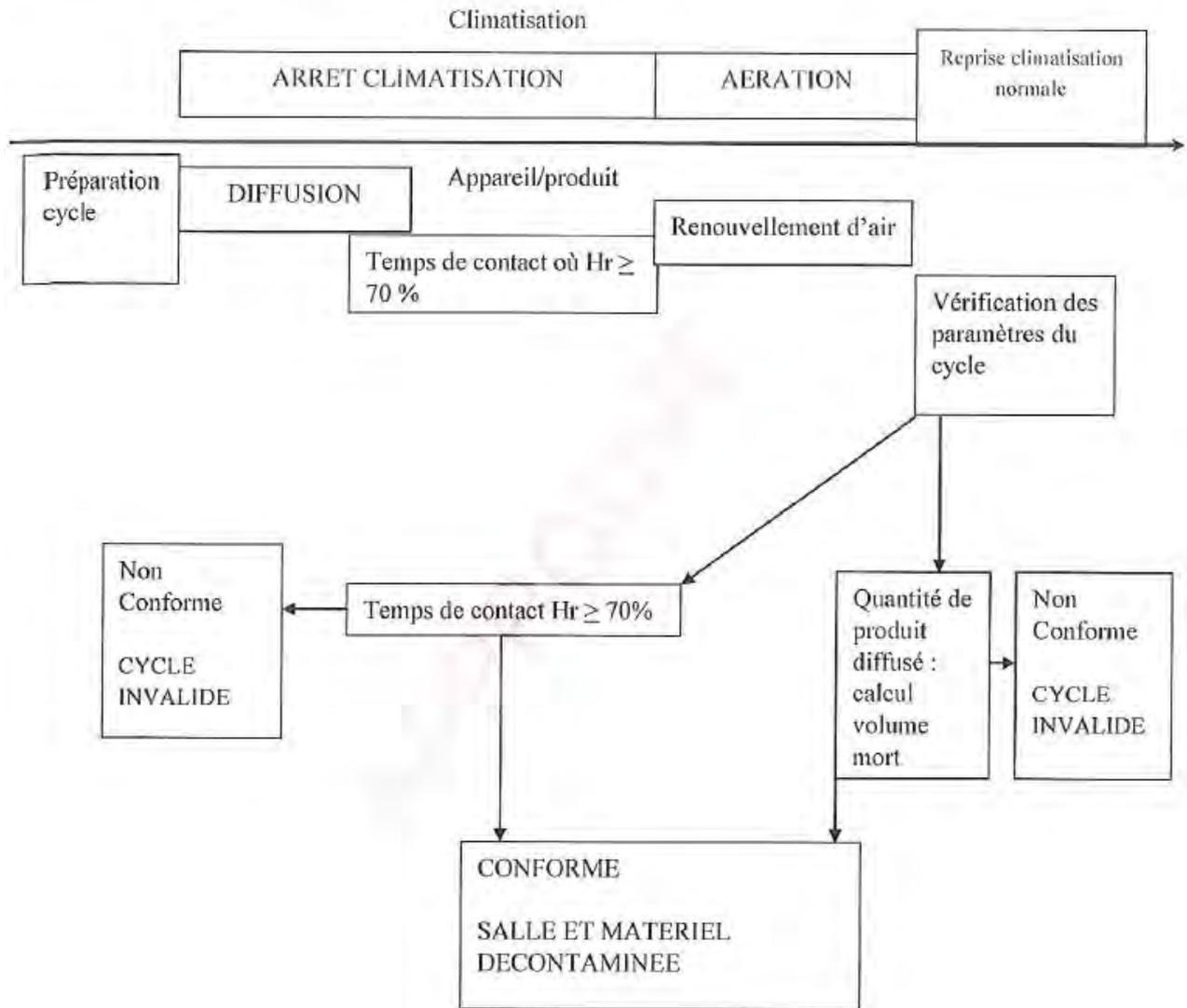


Figure 7 : Schéma du principe de brumisation

Conditions opératoire initiales :

Conditions	Critères
Humidité relative initiale	Entre 40 et 55%
Temps arrêt climatisation	2h
Temps de renouvellement aération	2h
Placer le matériel à décontaminer dans la salle	Selon un plan de charge
Vérification préalable du nettoyage de l'appareil	A effectuer

Tableau 8 : Conditions opératoire initiales avant début de cycle de brumisation

Un cycle de brumisation est validé avec ces conditions initiales, il convient donc de les vérifier au préalable.

Validation du cycle de brumisation

Deux paramètres sont à vérifier afin de valider le cycle :

- Le temps de contact du produit ou l'humidité relative est $\geq 70\%$ doit être ≥ 90 min
- Le volume mort récupéré (qui est resté dans le vaporisateur et donc non diffusé) doit être inférieur au volume défini lors des étapes de validation.

Afin de s'assurer d'une bonne décontamination de la salle ou du matériel brumisé, des boîtes de Pétri de surface sont appliquées à différents endroits : les murs, le sol ou directement sur les outils. Les boîtes sont ensuite mises à incuber et les résultats sont conformes si le nombre de colonies qui se développent est inférieur aux limites spécifiées. (Voir document annexe page....)

Lors d'un cycle de brumisation, l'environnement (les murs, les sols, les portes...) de la ZAC est décontaminé ; mais l'ensemble des composants se trouvant en zone est aussi décontaminé. C'est le cas pour les tenues ZAC déjà « gamma-stérilisées » qui se trouvent stockées en zone. Ces tenues et les paires de gants sont disposées dans des saches fermées hermétiquement : lors du cycle de décontamination, les saches sont décontaminées ce qui renforce le maintien de l'asepsie dans la zone.

C. Maitrise du procédé de répartition : Filtration du produit

Le procédé de remplissage et l'environnement de production sont choisis de façon à limiter les risques de contamination microbienne, ils doivent faire l'objet de contrôles réguliers : l'absence ou la présence de micro-organismes doit être contrôlée en continu en classe A sous flux.

La filtration stérilisante est un procédé applicable aux solutions qui ne supportent pas l'action de la chaleur. Cette méthode est fréquemment utilisée en raison des principes actifs qui sont de plus en plus fragiles.

Lors des opérations de remplissage des seringues, le vaccin est contenu dans une cuve de stockage sous forme liquide, préalablement filtré lors de la préparation. Afin de maintenir les conditions aseptiques optimales, la durée maximale de stockage de la solution avant mise en récipient final doit être définie et validée.

La filtration comporte plus de risques que les autres méthodes de stérilisation (par la chaleur, par irradiation, par les gaz), une seconde filtration sur filtre antimicrobien stérile, immédiatement avant la répartition, peut être recommandée. La filtration stérilisante finale doit être effectuée aussi près que possible du point de répartition, sous flux en classe A. (Voir document annexe n°1 : schéma de procédé de répartition)

Lors du transfert de la solution de la cuve à la remplisseuse, une filtration stérilisante est appliquée au travers d'un filtre « produit ». Cette filtration va permettre de retenir les particules et les micro-organismes pouvant être potentiellement présents dans la solution.

1) La filtration stérilisante

a) Définition

Selon la norme ISO 13408_2, la filtration est définie comme processus d'élimination de particules viables et/ou non viables des liquides et/ou gaz par passage à travers un matériau poreux.

Si le produit ne peut pas être stérilisé dans son récipient final, les solutions ou les liquides peuvent être filtrés sur un filtre stérile à pores de diamètre nominal de 0,22 µm (ou moins) ou sur un filtre possédant des propriétés de rétention microbienne au moins équivalentes, puis, recueillis dans un récipient stérilisé. Les seringues doivent donc être stériles et enfermées hermétiquement dans des sachets qui ne doivent être ouverts uniquement en zone classée A afin de limiter au maximum la contamination.

Ces filtres produits peuvent retenir les bactéries et les moisissures, mais pas tous les virus ni les mycoplasmes qui sont de l'ordre du nanomètre. Les caractéristiques des filtres doivent être telles que le relargage de fibres soit minimal.

On distingue deux types de filtres :

- Les filtres en profondeur
- Les filtres membranes

Les filtres en profondeur permettent de retenir les micro-organismes soit par criblage, soit par attraction électrostatique. La nature, la viscosité et le débit sont des paramètres qui interviennent dans le phénomène de rétention.

Les filtres membranes sont les filtres les plus utilisés : les membranes sont très fines et forment un écran qui permet d'arrêter les particules viables et non viables dont le diamètre est supérieur à celui des pores. Ces filtres peuvent être stérilisés à l'autoclave à 121°C.

L'intégrité des filtres stérilisés doit être contrôlée avant et après les opérations de remplissage. La durée de filtration d'un volume connu de solution et la différence de pression entre l'entrée et la sortie du filtre doivent être déterminées pendant la validation et toute divergence significative durant le processus habituel de fabrication notée et examinée. Les résultats de ces contrôles doivent faire partie du dossier de lot. L'intégrité des filtres événements et des filtres à gaz situés aux points critiques doit être confirmée après usage.

Le filtre ne doit pas altérer le produit, ni en absorbant ses constituants, ni en re-larguant d'autres substances.

b) Conduite de la filtration stérilisante

La solution qui traverse le filtre doit être recueillie et répartie aseptiquement. Pour ce faire, les locaux ZAC où se déroulent les opérations de production doivent être stériles.

L'opération de filtration stérilisante doit se dérouler au plus près du point de remplissage, généralement juste avant la remplisseuse qui se trouve sous flux en classe A.

Des précautions pour garantir l'asepsie du procédé sont à prendre :

- Le matériel de filtration, les pièces pour le montage de la machine et les composants (seringues et joints de piston) doivent être stérilisés au préalable par des moyens appropriés et validés
- Le débit de solution doit être régulier afin d'éviter une surpression et ne pas prolonger la filtration
- Les propriétés stérilisantes du filtre doivent être maintenues durant son utilisation, il ne doit pas être déconnecté lors du remplissage
- Si un filtre est réutilisable, il doit être contrôlé avant chaque utilisation afin de vérifier le diamètre des pores qui peut varier avec l'usure

2) Les différents filtres utilisés sur le process vaccin

a) *Le filtre produit*

Le filtre produit constitue un élément critique des opérations de remplissage. Ce sont des filtres à usage unique qui doivent être autoclavés pour être stérilisés. Le diamètre des pores doit être au maximum de 0.22 μm pour retenir les bactéries et les moisissures. La FDA caractérise un filtre « stérilisant » comme ayant la capacité de retenir 10^7 bactéries par cm^2 de surface filtrante, pour des pores de 0.2 μm .

Les filtres produits doivent être testés avant et après remplissage, afin de prouver qu'il n'existe pas d'anomalies avant et après, garantissant ainsi la qualité et la sécurité des seringues. Un lot ne peut être libéré sur le marché si les tests d'intégrité des filtres ne sont pas conformes.

Un contrôle d'intégrité nécessite au préalable [37] :

- le bon mouillage des cartouches
- la bonne étanchéité du système de connexion entre le filtre et le carter
- le bon état des joints
- une bonne maîtrise de la température pendant la durée du test

Différents tests d'intégrité doivent être appliqués lors de la production :

- Test de diffusion : basé sur le principe de la diffusion, le test est réalisé sous forme d'un test de maintien de pression. Cette pression d'air est présélectionnée, appliquée sur une cartouche ou un disque mouillé se trouvant dans un carter. Après une période de stabilisation, l'équipement mesure une chute de pression, résultant d'une diffusion d'air au travers de la membrane mouillée pendant un temps défini exprimé en ml/min
- Test de diffusion avec pressurisation variable : ce type de test est conçu pour les filtres qui retiennent les virus (ce qui n'est pas le cas pour les vaccins). C'est une adaptation du test de diffusion avec au préalable une période de stabilisation.
- Test du point de bulle : on détermine la transition entre débit d'air résultant de la diffusion du liquide de mouillage et celui résultant d'un passage libre d'air à travers des pores vides du liquide de mouillage ayant séché. Le point de bulle est déterminé au moyen d'une augmentation progressive de la pression appliquée sur une membrane
- Test d'intrusion d'eau : c'est un test réalisé uniquement sur les filtres hydrophobes. Il consiste à mouiller superficiellement les pores du filtre et de mesurer le débit d'intrusion de l'eau sous une faible pression d'air comprimé. Le débit d'intrusion

provient (si le filtre est bien intègre) de l'intrusion de l'eau dans la structure de la membrane (phase initiale de pressurisation) et de la compression des plis de la membrane (due à la pression différentielle appliquée). Si le filtre est intègre, l'eau ne pénètre pas à travers les pores de la membrane

- Test de maintien de pression : ce test consiste à mesurer à l'aide d'un manomètre hautement précis, en amont du filtre, les variations de pressions causées par des fuites ou la diffusion de gaz à travers le filtre. On trouve deux applications pour ce test : la vérification de l'intégrité d'un carter ou d'un système clôt, et la vérification de l'intégrité d'un filtre.

b) Les filtres Events

Un **évent** (ou filtre de ventilation) est utilisé pour empêcher la poussière et les micro-organismes de l'environnement (bactéries, virus, champignons, levures, etc.) de s'introduire dans une **cuve** ou un **réacteur** [38].

En fonction de l'application, l'**évent** peut être :

- stérile, s'il est utilisé sur des applications alimentaires ou pharmaceutiques, sur une cuve de fermentation ou pour une unité de stérilisation.
- inclure un absorbeur d'humidité, pour empêcher la formation de condensation dans la cuve.

Les filtres événements peuvent faire office de barrière stérile pour l'air et les gaz entrant ou sortant de réceptacles comme les bioréacteurs, les réservoirs de fermentation et les bombonnes. Ces filtres préservent la stérilité de l'environnement intérieur et protègent l'atmosphère intérieure des réceptacles des contaminants [39].

Les événements sont munis de membranes hydrophobes qui empêchent l'entrée d'eau et d'aérosols dans le matériel sensible.

Les facteurs les plus importants à prendre en compte lors du choix d'un filtre à air ou à gaz sont le débit d'air et la capacité de rétention des particules ou des microorganismes. Le matériau de la membrane du filtre doit offrir suffisamment de surface ou d'espace ouvert pour laisser passer le flux d'air nécessaire au système.

3) Les paramètres des filtres sur la ligne de répartition

Chaque filtre va requérir des conditions ou des paramètres bien précis pour son bon fonctionnement lors des opérations de remplissage aseptique. Ces conditions doivent être testées lors des étapes de validation.

La qualification des filtres stérilisants est complexe, elle comprend :

- Des tests de rétention microbienne
- Des tests biologiques, innocuité et relargage des pyrogènes et endotoxines
- Des tests chimiques, dosage de substances extractibles
- Des tests physiques, intégrité et résistances aux conditions opératoires

La validation des conditions opératoires peut être réalisée grâce à un milieu de culture approprié, stérilisé au préalable puis réparti selon les mêmes conditions que lors des opérations de routine. Ce milieu sera ensuite analysé afin de déceler la présence d'éventuels micro-organismes.

Conditions du processus de filtration :

- temps de maintien et effet sur la charge biologique de la filtration préalable du fluide
- conditionnement du filtre, avec le fluide, le cas échéant
- durée de filtration/durée totale pendant laquelle le filtre est en contact avec le fluide
- nombre maximal de filtrations répétées
- débit maximal
- volume de filtration
- température
- pression différentielle

D. Préparation aseptique du matériel et des composants entrant en ZAC

Afin de maintenir la stérilité de la ZAC, tout le matériel ainsi que les composants doivent être lavés et stérilisés afin de limiter l'entrée de contaminants dans les différentes zones de production.

La stérilité est définie dans la pharmacopée européenne comme l'absence de micro-organismes viables. On ne doit retrouver aucune particule ou aucun micro-organisme sur les joints de pistons ou seringues destinés au remplissage car ils peuvent potentiellement se retrouver dans le système sanguin lors de l'administration au patient. Les tenues pour l'entrée en ZAC, le matériel de montage de la remplisseuse, les composants (seringues et joints de piston) ou tout autre objet doivent être stérile.

La manipulation des matières premières et accessoires stériles qui ne seront pas soumis ultérieurement à stérilisation ou filtration stérilisante doit être réalisée dans un poste de travail de classe A ou un local de classe B. Afin de garantir la stérilité du matériel entrant en ZAC (boîte de Pétri, seringues, joints de piston) l'utilisation de sachets hermétiques peut être utilisée et leur ouverture doit être effectuée au plus près des opérations de remplissage, soit directement en classe A, ou en classe B.

Dans cette partie, plusieurs méthodes d'entrée du matériel en ZAC seront décrites en fonction de la nature du matériel.

1) Stérilisation/désinfection des composants et pièces machine

Dans le cas où le matériel est stérilisé par un prestataire externe, une décontamination doit avoir lieu sur l'enveloppe de protection et l'ouverture de celle-ci doit se faire en zone stérile.

Les méthodes de stérilisation doivent être validées au préalable, mais la réalisation des essais de validation ne suffit pas à garantir la stérilité. Quelle que soit la méthode de stérilisation utilisée, les paramètres critiques doivent être monitorés, des contrôles doivent être mis en place afin de confirmer que les produits stérilisés sont soumis aux conditions de validations préalablement définies.

Le procédé de stérilisation ne peut garantir dans l'absolu la stérilité de tous les articles contenu dans une population, il existe toujours une certaine probabilité statistique qu'un micro-organisme puisse survivre à la stérilisation. Pour un procédé donné, cette probabilité de survie est fonction du nombre, du type et la résistance des micro-organismes présents ainsi que de l'environnement où se réalise le traitement.

La pharmacopée européenne fait mention du « NAS » (niveau d'assurance de stérilité) [40] qui indique le degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile par

le procédé considéré. Par exemple, un NAS de 10^{-6} correspond à une probabilité d'au plus 1 micro-organisme viable pour $1 \cdot 10^6$ unités stérilisées du produit final.

On va distinguer trois différents types de stérilisation/décontamination en fonction de la nature du matériel :

- l'autoclavage (pièce machines)
- la décontamination pour les composants (seringues et joints de pistons ensachés, déjà stérilisés)
- la brumisation de la salle (tenues ZAC et gants ensachés, déjà stérilisés)

a) L'autoclavage

L'autoclavage est la méthode de référence pour une stérilisation à la vapeur (stérilisation chaleur humide) pour les formes aqueuses. La chaleur humide désigne de l'eau à température élevée. Elle peut se présenter sous forme de vapeur saturée ou être générée in situ par l'application d'énergie thermique à de l'eau déjà présente dans le produit.

L'activité microbicide de la chaleur humide est fondée sur la température et la durée du contact entre les molécules d'eau et les micro-organismes.

Plusieurs combinaisons durée/température reconnues par certaines pharmacopées sont acceptables pour la stérilisation par chaleur humide, et notamment celles qui sont répertoriées dans le tableau suivant. Toutes ces combinaisons sont fondées sur le concept de sur-extermation avec un facteur de sécurité établi pour de la vapeur saturée ou de l'eau en contact avec le micro-organisme. Lors d'un cycle d'autoclavage, il est important de relever les paramètres de température et de pression régnant à l'intérieur de l'autoclave afin de vérifier que les conditions de validation initiales sont respectées.

Température (°C)	Temps (min)
121	15
126	10
134	3

Tableau 9 : Exemples de températures et de durées minimales établies pour des niveaux de létalité microbienne appropriés dans les procédés de stérilisation (ISO 17665-2)

Les méthodes utilisées doivent démontrer qu'elles permettent d'obtenir un NAS d'au moins 10^{-6} .

Les effets sur les matériaux sont généralement limités à la déformation et aux fractures provoquées par les températures et les pressions de l'agent stérilisant.

Il convient qu'un procédé de stérilisation soit spécifié pour chaque famille de produits et/ou configuration de charges présentées pour stérilisation. Tout matériel lavé et stérilisé doit être identifié avec une étiquette indiquant :

- Le matériel concerné
- Date de lavage
- Durée limite de stérilisation (7 jours pour le matériel stérilisé)

Les identifications du matériel sont rangées dans le dossier de lot et permettent de prouver que le matériel a bien été stérilisé grâce à un indicateur de stérilité.

Le matériel utilisé pour le montage de la remplisseuse ainsi que la nourrice de remplissage sont autoclavés et comprennent :

- Les pompes
- Les tubes
- Les tiges d'introduction
- Les tuyaux de transfert en silicone
- Des outils divers (clef plate, pinces...)
- La nourrice qui comprend : un flacon en verre de 20l, des filtres évents, le filtre produit et les tuyaux de raccordement
- Des tuyaux de secours
- Des filtres toupie à placer aux extrémités des tuyaux.

Du matériel de production comprenant les outils nécessaires au nettoyage sont également autoclavés :

- Des seaux
- Des paquets de chiffonnettes
- Des balais
- Des entonnoirs

Enfin, du matériel servant pour les tests microbiologiques sont également stérilisés :

- des têtes RCS

Remarque : les boîtes de Pétri servant aux contrôles microbiologiques ne peuvent pas être autoclavées car les milieux nutritifs seraient détruits. Ces composants sont « gamma irradiés » au préalable et ensachés avant de rentrer en zone de production. Ils ne seront ouverts qu'une fois en ZAC.

L'utilisation d'indicateurs biologiques destinés à la stérilisation par la vapeur est recommandée pour la validation des cycles de stérilisation. L'utilisation de spores de Geobacillus stearothermophilus ou d'autres souches présentant des performances démontrées équivalentes est recommandée [41].

Un cycle standard de stérilisation de matériel comporte les phases suivantes :

- phase d'évacuation de l'air (1)
- phase de chauffage de la charge (2)
- phase de période plateau, phase de stérilisation (3)
- phase d'échappement (4)
- phase de séchage (5)
- phase de suppression du vide (6)

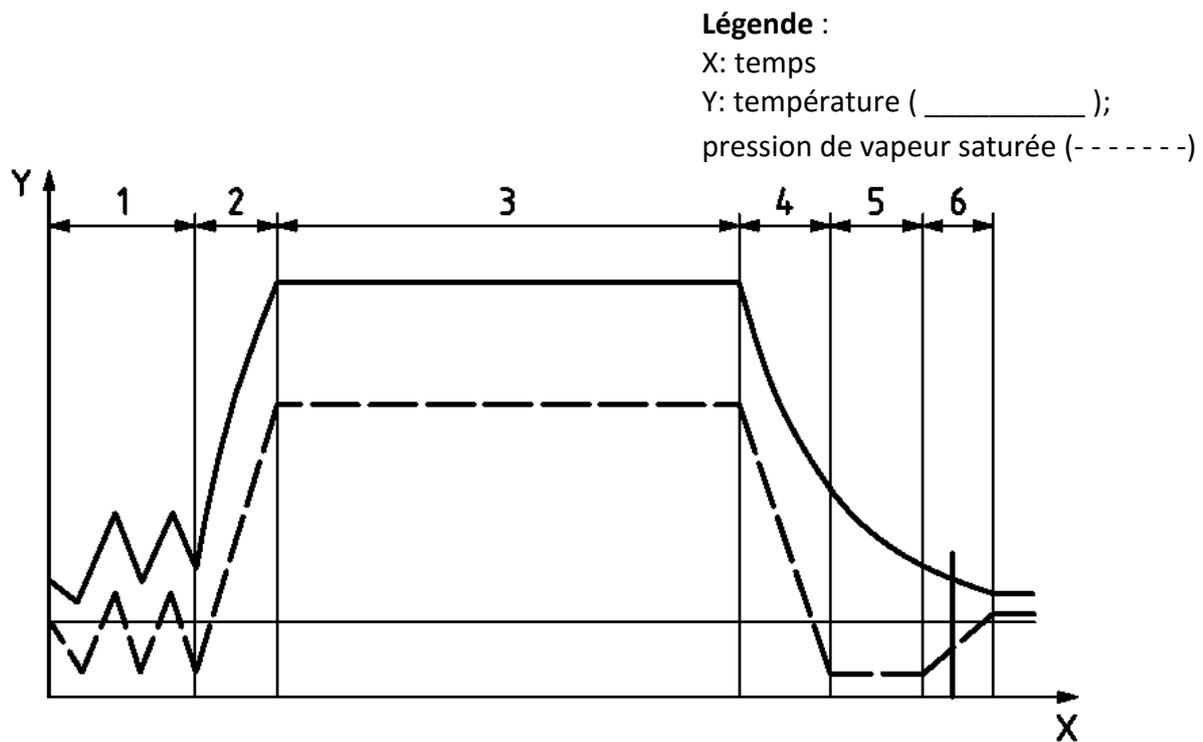
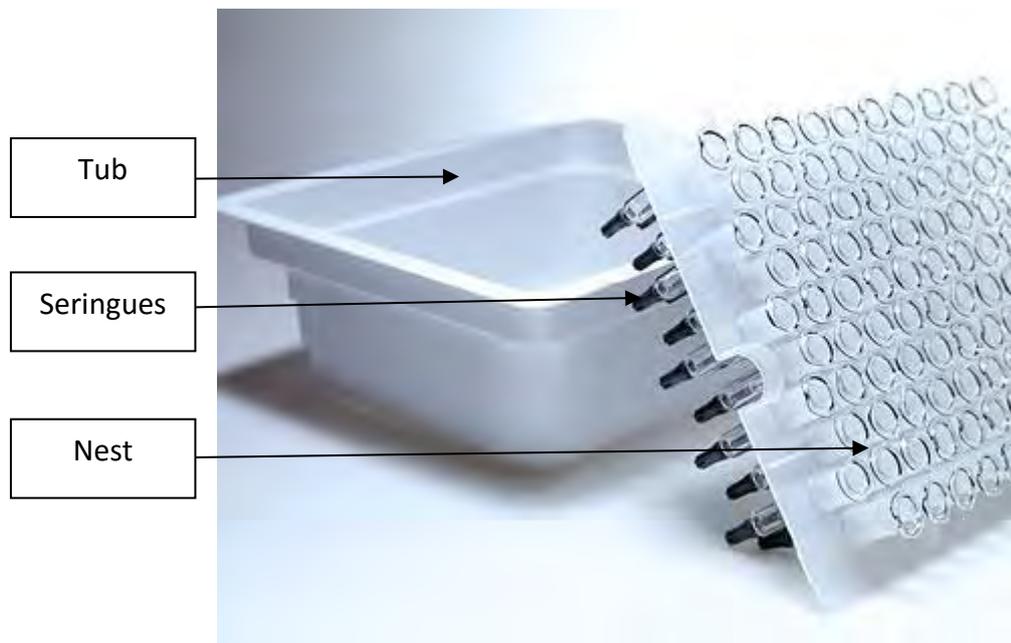


Figure n°8 Profil de température et de pression de la chambre pour un cycle avec évacuation forcée - de l'air/vapeur saturée

b) La décontamination des composants

Les composants utilisés lors de la production de vaccins sont des seringues et des joints de pistons.

Les composants sont livrés par palettes par le fournisseur. Ils sont « gamma-stérilisés », enveloppés dans une sache et protégés par un opercule. Afin de garantir la stérilité des seringues et des joints de pistons, les tubs ne sont ouverts qu'en classe A directement sous flux afin de réduire au maximum les risques de contamination liés à l'environnement. Les tubs doivent être désensachés progressivement : l'extérieur des saches est en contact avec l'environnement, donc non stérile ; les composants vont subir une décontamination sur l'ensemble de leurs surfaces avec un désinfectant (mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique) afin d'éliminer les contaminants présents sur l'extérieur de la sache.



Photographie n°2 : tub (sans saché de protection) contenant des seringues disposées sur un nest pouvant être utilisé lors des opérations de remplissage [42].

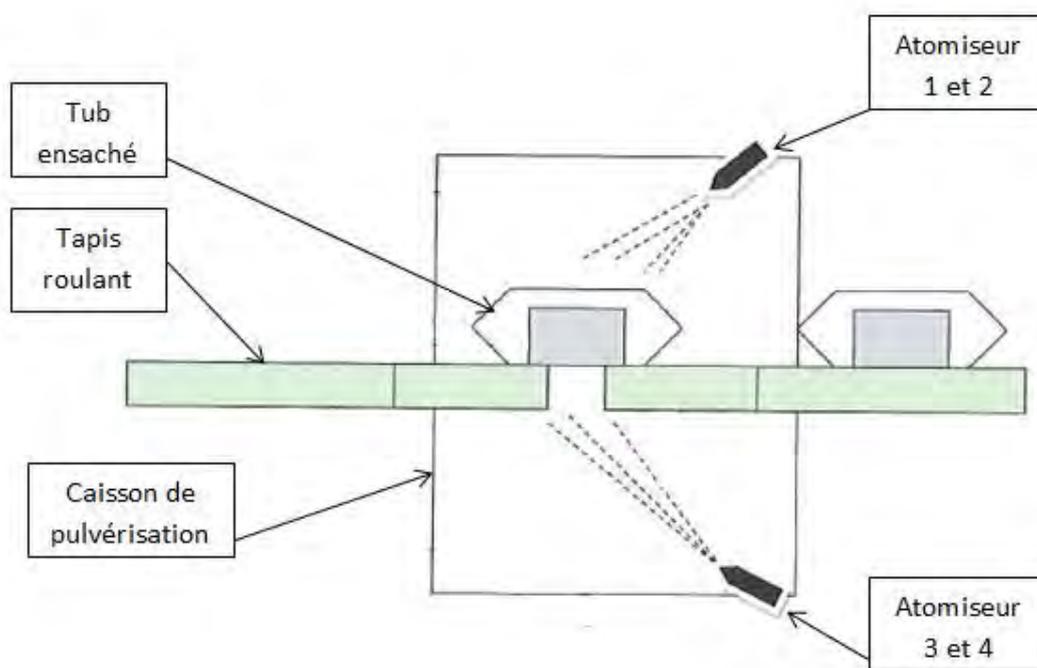


Figure 9 : Schéma du passage des composants dans le flux de décontamination

Une fois le cycle de décontamination terminé, la saché va être découpée manuellement par un opérateur en classe B puis jetée tandis que le tub va être envoyé dans la salle suivante pour l'étape de remplissage. L'opercule, qui est la dernière protection qui garantit la stérilité ne sera retiré que lorsque le tub sera en classe A sous flux au niveau de la remplisseuse.

c) La décontamination par brumisation

Pour les outils et composants qui ne peuvent pas être passés à l'autoclave ou dans le flux de décontamination, il existe un troisième type de décontamination appelé la brumisation ou décontamination par « Dry Fog ». La brumisation permet une décontamination de la ZAC ainsi que de tous les outils se trouvant à l'intérieur. (Voir partie Nettoyage et décontamination des ZAC, page 47).

2) Stérilisation des tenues ZAC et des gants par rayonnements γ

Les tenues d'habillement pour entrer en ZAC ainsi que les gants doivent être stériles pour éviter l'entrée de contaminant en zone de production.

La stérilisation avec cette méthode ne peut être réalisée dans les laboratoires pharmaceutiques, ils doivent avoir recours à des sociétés externes spécialisées.

Lors de la réception des tenues, il est impératif de vérifier la coloration rouge du témoin de « gamma stérilisation » présente sur les saches. Ces saches qui contiennent les tenues doivent être intègres avant de rentrer en zone.

a) La radio-stérilisation par rayonnement ionisant γ (gamma)

La stérilisation des tenues ZAC et des gants peut s'effectuer par radio-stérilisation ionisante qui est couramment utilisée pour le matériel-médico-chirurgical [43]. Elle se fait à travers des emballages hermétiquement clos définitifs. Elle ne laisse aucun résidu toxique dans les matériaux ionisés et permet de ce fait, l'utilisation immédiate du matériel après stérilisation. Il existe plusieurs méthodes de radio-stérilisation des composants, une des plus couramment utilisée est l'ionisation par rayonnement gamma.

La stérilisation γ ionisante fait appel à des rayonnements électromagnétiques de grande énergie (rayons γ , il s'agit de rayonnements fortement ionisants qui possèdent la propriété de pouvoir arracher des électrons aux atomes [44].

En radio-stérilisation, deux sources sont potentiellement utilisables :

- le Cobalt 60
- le Césium 137 (n'est plus utilisé).

Le Cobalt 60 est plus fréquemment utilisé car il émet un rayonnement presque uniquement de γ de 1,27MeV d'énergie, très bactéricide et très pénétrant, ce qui rend son utilisation toute aussi dangereuse. Le Cobalt 60 se transforme en Nickel 60 en émettant deux rayonnements γ et un rayonnement β .

L'interaction du rayonnement γ s'effectue généralement par rencontre avec les électrons périphériques des atomes présents. L'énergie du photon gamma peut être transmise soit intégralement, soit partiellement à des électrons. Dans ce dernier cas, outre l'électron mobilisé au cours de l'interaction, il subsiste un rayon gamma d'énergie plus faible que le rayon gamma d'incident. Ce photon suit une trajectoire différente de celle du photon initial, et pourra interagir à un autre endroit du matériau, ou même traverser celui-ci sans autre perturbation. Les rayonnements ionisent les atomes et forment des radicaux libres responsables de l'activité germicide.

b) Effet de la radio-stérilisation sur les micro-organismes

La γ ionisation entraîne la mort cellulaire des micro-organismes par inhibition de la division cellulaire due à des anomalies sur la chaîne d'ADN. Ces anomalies peuvent être induites par une action directe des rayonnements ionisants ou indirects par radiolyse de l'eau.

La sensibilité aux rayonnements varie considérablement d'un micro-organisme à l'autre. Elle dépend [44] :

- de la nature du germe (espèce, souche)
- du milieu dans lequel il est irradié. Ainsi, les virus sont plus résistants que les levures, elles-mêmes plus résistantes que les bactéries
- l'oxygène augmente la radio-sensibilité alors que les réducteurs et la déshydratation la réduisent.

c) Contrôle microbiologique de la stérilisation

Le processus de stérilisation doit être validé afin de vérifier son efficacité sur les micro-organismes.

Pour cette méthode de stérilisation, la dose de référence (dose absorbée) est de 25kGy. D'autres valeurs peuvent être utilisées à condition qu'il ait été démontré que la dose choisie assure un taux de létalité adéquat et reproductible lorsqu'elle est appliquée en routine dans les limites de tolérance établies. Les méthodes et précautions employées doivent permettre d'obtenir un niveau d'assurance de stérilité d'au moins 10^{-6} [40].

Détermination de la contamination initiale

Comme pour les autres moyens de stérilisation, l'efficacité de cette méthode dépend du nombre initial de germes contaminants.

La contamination doit faire l'objet de déterminations [44] :

- quantitatives : dénombrement des germes sur l'objet et à l'intérieur de son protecteur individuel de stérilité.
- qualitatives : pour s'assurer que les germes appartiennent à des espèces connues comme sensibles aux radiations ionisantes.

Contrôle microbiologique d'efficacité de la stérilisation

Un contrôle microbiologique d'efficacité doit être réalisé pour chaque lot de stérilisation, à l'aide d'indicateurs biologiques placés à l'intérieur ou à la surface des articles à stériliser.

Les indicateurs biologiques sont des préparations normalisées de microorganismes sélectionnés, utilisées pour évaluer l'efficacité d'un procédé de stérilisation. Ils sont généralement constitués par une population de spores bactériennes déposées sur un support inerte approprié. Le supportensemencé est emballé de telle sorte que l'ensemble soit protégé de toute altération ou contamination, tout en permettant à l'agent stérilisant d'entrer en contact avec les microorganismes [41].

Ces indicateurs sont soit des articles volontairement contaminés, soit des supports constitués d'un matériau aussi semblable que possible à celui de l'article à stériliser, ou de son emballage, contaminé par un nombre déterminé de spores bactériennes desséchées, de radiosensibilité connue.

Pour la stérilisation par irradiation, les variétés préconisées par la Pharmacopée Européenne sont l'utilisation de spores de *Bacillus pumilus* [41] ou l'utilisation d'autres souches présentant des performances démontrées équivalentes est recommandée. Il est vérifié qu'il n'y a pas de croissance des microorganismes témoins après exposition des indicateurs biologiques à 25 kGy (dose minimale absorbée).

E. Media Fill Test préalable sur la ligne de répartition

Avant la campagne vaccin, le remplissage aseptique doit être validé, on réalise un test de répartition aseptique : le media fill test (MFT).

Il existe dans la ligne directrice n°1 des BPF des directives concernant le test de répartition aseptique:

Le Media Fill test est une simulation du procédé aseptique où on remplace le produit par un milieu de culture nutritif. Cet exercice permet de mettre en évidence la présence potentielle de germes apportés par le procédé. La validation de ce test doit avoir pour résultat l'absence de micro-organismes dans le milieu de culture.

Le Media Fill Test doit se rapprocher le plus possible des procédés de fabrication aseptique habituels et en comprendre les étapes critiques. Il doit également prendre en compte les diverses interventions susceptibles d'avoir lieu pendant les productions normales ainsi que les situations considérées comme les cas les plus défavorables [45]. (BPF ligne directrice n°1, fabrication des médicaments stériles)

1) Prérequis du MFT

a) Air comprimé.

Pour le format vaccin, le fluide gazeux utilisé est de l'air comprimé, afin de favoriser le développement bactérien éventuel. Il existe des produits injectables où il est nécessaire d'utiliser de l'azote comme fluide gazeux.

Bien qu'il faille reproduire les conditions opératoires de remplissage pour un MFT, l'azote ne permet pas le développement bactérien, il faut donc utiliser de l'air comprimé ; ce n'est pas le cas pour le vaccin puisque lors des opérations de remplissage du produit réel, le fluide gazeux utilisé est de l'air comprimé.

b) Opérateurs :

Chaque opérateur affecté à un équipement utilisé à la filtration ou à la répartition aseptique devra être impliqué au moins une fois par an dans un MFT pour l'équipement considéré. Les opérateurs réaliseront les interventions correspondant à leurs postes selon le scénario du dossier MFT. Dans le cas où un opérateur est affecté à plusieurs lignes de répartition aseptiques identiques ou équivalentes, il pourra n'être impliqué que dans un seul MFT.

Dans le cas où un opérateur n'a pas participé à au moins un MFT dans l'année, un événement (déviation) doit être émis par le secteur concerné afin de documenter les actions correctives entreprises.

Il pourra être proposé :

- Une évaluation de l'opérateur par sa hiérarchie et un suivi sur un lot par une personne habilitée
- Le retrait de l'opérateur des opérations de remplissage jusqu'à participation à un MFT.

Si un opérateur participe aux opérations de remplissage en ZAC et en isolateur de production, cet opérateur devra participer au moins une fois à un MFT en ZAC et un MFT sous isolateur dans l'année. En effet les procédures et la gestuelle ne sont pas les mêmes dans les deux environnements.

Chaque MFT fera intervenir toutes les équipes impliquées selon le rythme de travail pour le procédé de routine et ainsi intégrera leur changement. Le personnel d'encadrement habilité à intervenir sur un équipement de remplissage devra aussi être inclus dans un MFT au moins une fois par an.

2) Déroulement du MFT :

Les dossiers de lot MFT sont constitués d'un scénario regroupant :

- Des interventions réalisées par les opérateurs visant à revalider le process et la ligne de remplissage
- Des interventions d'habilitation visant à valider la gestuelle aseptique des opérateurs

a) Types d'interventions à valider par les opérateurs qui travaillent sur la ligne de remplissage.

Au moins une opération de chaque sous-groupe doit être réalisée par les opérateurs :

1) Connectiques (tuyaux, pompes...)

Exemple : connexion du filtre produit

2) Interventions sur poste de bouchage

Exemple : Changement d'un tube d'introduction de joint de pistons

3) Intervention sur poste de remplissage

Exemple : Montage du poste de remplissage

4) Interventions sur composants

Exemple : charger un sac de joint de piston dans la remplisseuse

5) Prélèvements environnement

Exemple : effectuer un contrôle de surface sous flux en classe A

La catégorie « prélèvements environnement » doit être aussi validée par le personnel de microbiologie qui est amené à réaliser ce type d'intervention en routine.

Les interventions de maintenance sur la remplisseuse doivent être simulées et validées par le personnel de maintenance.

b) Nombre d'unités à remplir

Pour les procédés dont la taille de lot est < 5000 unités, alors les MFT correspondants devront être de la taille maximale des lots de routine.

Pour les procédés dont la taille de lot est > 5000 unités, la taille des MFT devra être au minimum de 5000 unités. Compte tenu des tailles de lots remplis pour les injectables, la taille de lot des MFT sera d'au moins 15 000 unités avec un minimum de 5000 unités par équipe.

Le nombre d'unités remplies devra permettre l'intégration de tous types de manipulation et interventions de routine et être suffisant pour la requalification du personnel. Le nombre exact d'unités à répartir est défini dans le dossier de fabrication MFT correspondant.

c) Conditions de réalisation des MFT

Le remplissage de MFT sera réalisé en intégrant les périodes hors activité, les péremptions et les temps de maintien validés, le nombre maximal de personnes autorisées en ZAC ainsi qu'en respectant les rythmes de fonctionnement routine des lignes.

Intégration des périodes hors-activité

Un arrêt de 48 heures effectué une fois par an par ligne de remplissage démontre l'absence d'impact d'un arrêt prolongé sur l'asepsie du procédé pour chacun des postes de remplissage. Un temps d'arrêt supérieur à 48 heures n'est pas simulé car un contrôle continu du maintien des conditions environnementales (Température, Hygrométrie, Pression et particules) permet un suivi permanent de l'intégrité de l'ambiance de la zone de répartition. Si les unités remplies après un arrêt de 48 heures sont conformes, alors elles le seront après n'importe quelle durée, pour peu que l'environnement soit conforme.

Péremption de stérilité du matériel

La revalidation du Holding time du matériel stérilisé s'applique au :

- Matériel stérilisé hors ligne et ne subissant pas de CIP avant utilisation

- Matériel en contact direct avec le produit filtré

Matériel laisse en place après amorçage (durée de répartition)

En ZAC conventionnelle, le matériel est directement manipulé par les opérateurs (montage machine, changements de pièces..), il existe donc un risque de contamination du matériel et ce risque est d'autant plus important que l'opération de répartition dure plus longtemps. Par conséquent, une durée maximale d'utilisation du matériel est validée et revalidée.

d) Contrôle des unités produites avant incubation

L'ensemble des unités produites sera inspecté en ligne afin d'éliminer les unités présentant des défauts pouvant atteindre l'intégrité des unités produites et par là même la stérilité du milieu réparti. Toutes les autres unités devront être incubées.

e) Incubation des unités

Avant incubation, les contrôles suivants sont réalisés :

- Contrôle de la température des chambres d'incubation, la température des chambres doit être comprise entre 20 – 25 °C et 30 – 35°C sur chacune des voies.
- Le chargement des enceintes doit être réalisé selon le plan de charge maximum et en respectant les éléments suivants :
 - a. La libre circulation d'air entre les éléments stockés et entre les éléments et les parois de l'enceinte
 - b. Les éléments incubés ne peuvent être déposés que sur les étagères et en aucun cas sur le sol
 - c. Un espace libre de 2 cm en dessous du plafond ou de l'étagère supérieure
 - d. Un espace libre devant les humidificateurs

L'incubation à 20 – 25 °C des unités remplies doit être réalisée dans les 48 heures maximum suivant leur remplissage. Le temps d'incubation minimum est de 7 jours à 20 – 25 °C puis de 8 jours à 30 – 35 °C. En fin d'incubation les courbes de températures sont éditées et jointes au dossier correspondant.

f) Contrôles microbiologiques et physico-chimiques avant répartition

Des contrôles microbiologiques et physico-chimiques doivent être effectués sur les milieux « vrac » avant la répartition pendant l'exercice de MFT.

Contrôles	Méthode	Critères d'acceptation
Propriétés nutritives	Voir paragraphe « Contrôle des propriétés nutritives avant et après répartition, après incubation »	Test conforme si croissance de tous les micro-organismes. Test non conforme si défaut de croissance d'au moins un micro-organisme
Stérilité du milieu	Incubation de l'échantillon à 20 - 25 °C pendant 7 jours puis Incubation à 30 - 35°C pendant 8 jours	Absence de prolifération microbienne (milieu limpide)

Tableau n° 10 : Contrôles microbiologiques et physico-chimiques à réaliser sur les milieux « vrac »

g) Lecture des unités remplies

La lecture des unités remplies ne devra pas débuter avant 7 jours à 20-25°C et au minimum 8 jours à 30 – 35 °C et doit être finalisé le 23^{ème} jour d'incubation.

La lecture d'un MFT consiste à recompter les unités présentes dans le tub et à contrôler visuellement la limpidité du milieu réparti, l'absence de voile ou de sédimentation cellulaire. Ce contrôle doit être réalisé par le personnel habilité non impliqué dans le remplissage.

Les échantillons destinés aux propriétés nutritives sont lus en dernier puis transmis au laboratoire pour tests.

Cas de mise en évidence d'unités contaminées :

L'unité devra impérativement être gardée en attendant le résultat des investigations dont il fera l'objet. L'unité incriminée doit être identifiée par son numéro de lot et le numéro de tub dont elle est issue.

Au niveau des seringues, une inspection physique de ou des unité(s) contaminée(s) sera réalisée comme suit :

- Absence ou déplacement significatif du RNS, (pièce tordue ou cassée)
- Présence de liquide dans le joint de piston
- Seringues fêlées
- Aiguilles déformées
- Joint de piston endommagé
- Scellage (aiguille-corps de la seringue)

h) Contrôle des propriétés nutritives avant et après répartition après incubation

L'objectif de ce contrôle est de vérifier que les milieux de culture utilisés pour les analyses microbiologiques possèdent bien les propriétés nutritives et/ou sélectives requises. Ce contrôle est à effectuer avant utilisation sur chaque lot de milieux liquides et solides reçus au laboratoire.

Il existe également un contrôle des milieux nutritifs après utilisation : ce test est utilisé pour vérifier que les propriétés nutritives ne sont pas altérées après utilisation et conservent leur capacité à mettre en évidence les micro-organismes potentiellement présents. Différents micro-organismes connus sont ensemencés sur des milieux nutritifs afin de contrôler leur aptitude à se développer.

Méthodologie sur les seringues après remplissage :

- Une quantité de seringues est sélectionnée et vidée dans un pot stérile. Pour chaque souche, un inoculum compris entre 10 et 100 cfu est ensemencé et le pot est incubé pendant maximum 15 jours.

Etant en milieu liquide, une analyse qualitative sera effectuée : la pureté (visuellement), l'identité macroscopique et le bon développement de la culture seront vérifiés et comparé par rapport à la boîte de référence. Le test est conforme si on obtient la croissance de tous les micro-organismes. Le test sera non conforme si défaut de croissance d'au moins un micro-organisme. Un test non conforme peut remettre en question le MFT.

Stade du MFT	Micro-organisme testé	T°C d'incubation	Durée d'incubation		Conditionnement	Milieu de référence
Vrac, prélevé en début de répartition	Candida Albicans, Aspergillus Brasiliensis	20-25°C	24h	5 jours	répartir le milieu en pots stériles à raison de 3 pots / souches	TSA irradiée ou non
	Microcoques, Staphylococcus epidermidis	30-35°C	24h	3 jours		
	Bacillus subtilis, staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa	30-35°C	24h	3 jours		
Après remplissage seringues	Candida Albicans, Aspergillus Brasiliensis	20-25°C	24h	15 jours	Inoculer 1 pot / souche	
	Microcoques, Staphylococcus epidermidis	30-35°C	24h	15 jours		
	Bacillus subtilis, staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa	30-35°C	24h	15 jours		

Tableau n°11 : Exemples des différentes souches à incuber lors du contrôle des propriétés nutritives des milieux sur un exercice MFT

i) Critères d'acceptation d'un MFT

L'évaluation de la conformité d'un MFT repose sur :

- Le respect de la fréquence de réalisation d'un MFT
- Le respect du scénario décrit dans le dossier de lot et des interventions supplémentaires de la revue initiale.
- Le respect du nombre d'unités remplies
- Une réconciliation à 100% entre le nombre d'unités déclarées à incuber à l'issue de la réconciliation bipartite et le nombre d'unités lues (pour les unités dites « de production » et les unités dites « déchets à incuber »)
- Le contrôle conforme des propriétés nutritives du milieu réparti
- L'absence d'unités contaminées.

Pour tout MFT, que ce soit un procédé sous isolateur ou en ZAC, l'objectif est de zéro unité contaminée. En cas de présence d'une unité contaminée, une investigation devra considérer la possibilité de refaire un MFT. Si on observe plus d'une unité contaminée, une revalidation du procédé par trois MFT après investigation et actions correctives doit être réalisée.

		Routine	Validation
Nombre d'unités contaminées = 1	QUI	AQP en collaboration avec QC microbiologie et production. +Assurance de stérilité + Directeur Qualité + Responsable fabrication	Groupe de qualification sous responsabilité du responsable validation en collaboration avec AQP + assurance de stérilité + directeur qualité + responsable de fabrication
	QUOI	Investigations : Condition de remplissage, contrôles d'environnement, identification des micro-organismes, recherche des causes, identification des actions correctives, évaluation de la nécessité de répéter un MFT	

Tableau n°12 : Tâches à réaliser si présence d'une unité contaminée sur un MFT

		Routine	Validation
Nombre d'unités contaminées > 1	QUI	AQP en collaboration avec QC microbiologie et production. +Assurance de stérilité + Directeur Qualité + Responsable fabrication	Groupe de qualification sous responsabilité du responsable validation en collaboration avec AQP + assurance de stérilité + directeur qualité + responsable de fabrication
	QUOI	Investigations : Condition de remplissage, contrôles d'environnement, identification des micro-organismes, Blocage des lots produits entre le dernier MFT conforme et ce MFT non conforme , recherche des causes, identification des actions correctives, Réalisation de 3 MFT consécutif conformes	

Tableau n°13 : Tâches à réaliser si présence d'unités contaminées sur un MFT

L'invalidité d'un MFT doit rester exceptionnelle et n'est possible qu'en cas de mise en évidence d'un évènement exceptionnel ou ayant perturbé le déroulement du MFT considéré (exemples : arrêt de la climatisation, propriétés nutritives incorrectes...)

F. Monitoring de l'environnement ZAC

Les salles propres et les environnements maîtrisés apparentés fournissent des moyens pour maîtriser la contamination de l'air et, le cas échéant, des surfaces à des niveaux appropriés pour les activités sensibles à la contamination. La maîtrise de la contamination est bénéfique et indispensable pour la protection du produit ou du procédé pour des applications telles que l'industrie aérospatiale, la micro-électronique, l'industrie pharmaceutique, les dispositifs médicaux, la santé, l'industrie alimentaire [46].

La surveillance des données environnementales de la ZAC est un paramètre critique et extrêmement important, les données fournies par les différents appareils de mesures permettent, après une validation préalable, d'affirmer ou d'infirmer le maintien de l'asepsie lors des opérations de production.

Les ZAC doivent être surveillées en continu de façon systématique, les emplacements de prélèvements doivent être définis sur la base d'une analyse de risque et des résultats obtenus pendant les essais de classification des locaux.

1) Définitions (selon norme ISO 14644-1, §3.1.1)

Salle/ Zone propre : salle / espace défini dans laquelle la concentration en nombre des particules en suspension dans l'air est maîtrisée et classée, et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention des particules à l'intérieur de la pièce.

flux d'air unidirectionnel : flux d'air maîtrisé traversant l'ensemble d'un plan de coupe d'une salle propre ou zone propre possédant une vitesse régulière et des filets considérés comme étant parallèles.

Etat d'occupation au repos : condition dans laquelle la salle propre ou la zone propre est achevée, et les équipements sont installés et en fonctionnement selon un mode convenu, mais hors présence des personnes.

Etat d'occupation en activité : condition convenue dans laquelle la salle propre ou la zone propre fonctionne selon le mode prescrit avec les équipements en fonctionnement ainsi qu'avec l'effectif spécifié présent.

Les BPF ne donnent pas de précisions concernant la construction et l'agencement des environnements de production des médicaments stériles. Les industriels doivent se référer à d'autres documents (normes ISO n°14644) afin de maîtriser la contamination particulaire et microbiologique dans les ZAC.

Une alimentation en air filtré doit maintenir en toutes circonstances une pression positive et une circulation d'air par rapport aux zones voisines de classe inférieure et doit ventiler efficacement la zone.

Plusieurs paramètres sont à maîtriser pour assurer la qualité des ZAC :

- Les paramètres de ventilation
- Le contrôle de la température, humidité et pression
- Les contrôles particuliers de l'air
- Les contrôles microbiologiques
- Le Média Fill Test

a) Les paramètres de ventilation

Le traitement du flux de l'air a pour objectif de limiter la dispersion de contaminant en ZAC. On peut considérer que dans l'atmosphère, il y a une flore saprophyte de base, en général non pathogène, et une flore accidentelle de germes qui peuvent être pathogènes. Les espèces de base sont gênantes pour l'obtention d'un environnement stérile, certaines d'entre elles peuvent exister sous la forme de spores très résistantes. Les germes pathogènes se trouvent à proximité des être-vivants et ne peuvent survivre que des brefs instants dans l'air [47].

Ces germes peuvent être transportés par des poussières ou des gouttelettes qui favorisent leur multiplication. L'élimination des micro-organismes en suspension dans l'air se fait essentiellement par filtration de l'air.

La salle de remplissage et les salles environnantes sont en permanence ventilées selon un schéma aéraulique en flux laminaire. Il est important d'éviter les obstructions au niveau des reprises d'air car elles peuvent entraîner une modification du schéma aéraulique, ce qui aura pour conséquence une protection non efficace du produit contre la contamination aéroportée.

La remplisseuse, où les opérations de remplissage sont les plus susceptibles d'être contaminées est disposée sous des enceintes stériles qui sont traversées par un flux d'air laminaire. Ce flux d'air est diffusé de manière continue et unidirectionnelle autour d'une vitesse moyenne de 0.45m/s. L'air arrive par le plafond où sont disposés des filtres HEPA, il descend vers le sol constitué d'un grillage doublé d'une paroi poreuse.

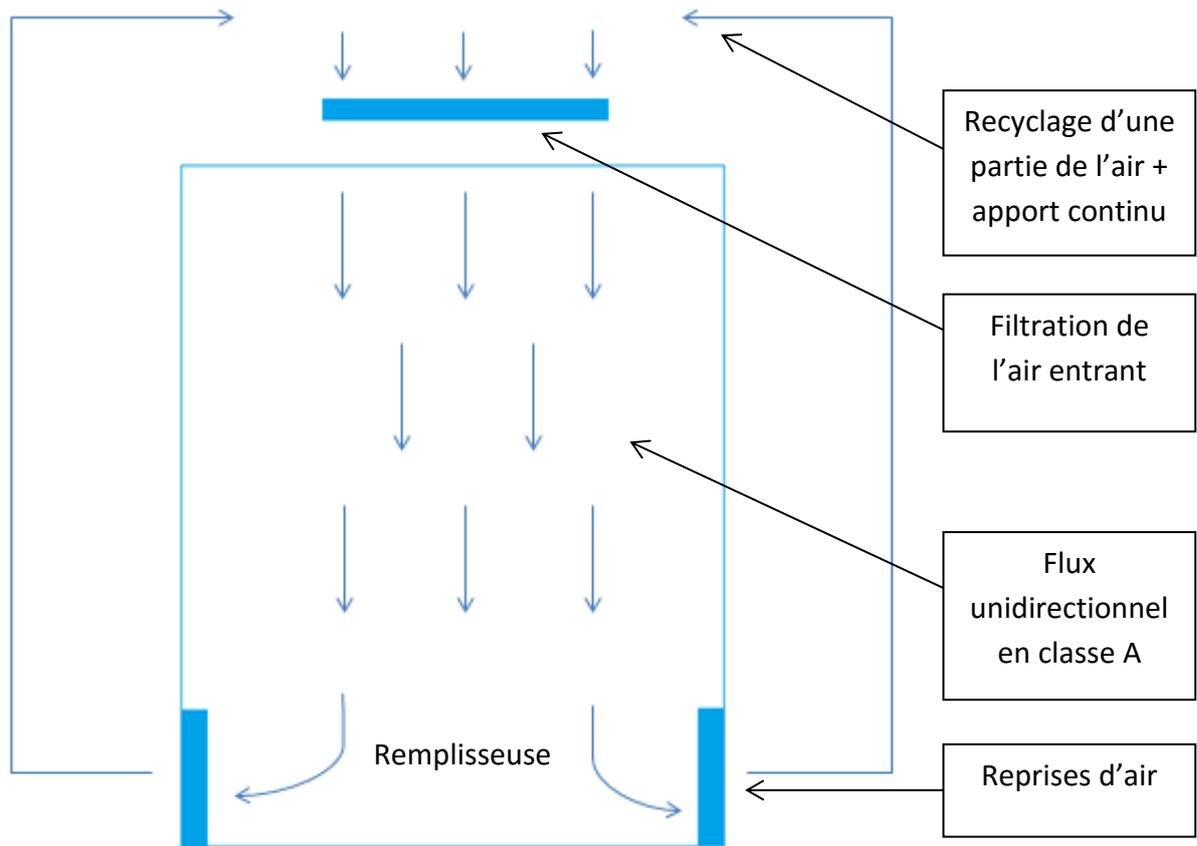


Figure n°10 : schéma du flux d'air pouvant être utilisé en dans une enceinte stérile en ZAC en classe A

Validation des paramètres de ventilation par Smoke Test :

Les objectifs de cette qualification opérationnelle sont de vérifier le schéma aéraulique sur la ligne de remplissage lors de différentes étapes de montage, de remplissage et lors d'interventions simulées au cours du remplissage.

L'aéraulique est vérifiée avec les paramètres de pressions et de débits contrôlés en montrant qu'en mode production, les points critiques sont balayés par les flux.

Le test doit montrer le caractère « unidirectionnel » du flux et qu'il n'existe pas :

- de zones mortes
- de zone de turbulence
- de zones stagnantes.

Lors de la réalisation d'un Smoke Test au niveau de la remplisseuse (classe A), plusieurs conditions doivent être créées afin de vérifier que quelle que soit la situation en routine (montage, remplissage interventions opérateurs), le flux d'air ne sera pas perturbé :

- La fumée doit être injectée sous le flux au niveau de la partie haute de la remplisseuse,
- Activité au repos et en activité,
- les carters de protection de la remplisseuse doivent être ouverts ou fermés.
- le balayage de la zone est effectué du haut vers le bas ; le but est de visualiser les flux d'air de soufflage et de reprise ainsi que le comportement de ces flux.

Le Smoke Test doit être revalidé lorsque une modification ou un ajout (nouvel équipement ou partie d'équipement) est apportée à la remplisseuse.

b) Le contrôle des paramètres de température, humidité et pression

Tous les jours ouvrés et avant le démarrage des activités, une personne dédiée vérifie les événements antérieurs à la journée en consultant l'écran des alarmes en cours et les données sur un logiciel informatique relié aux différentes zones de production. Les pressions sont vérifiées jusqu'à la dernière activité (données de l'équipe de nuit ou du week-end qui précède). Ceci a pour but de vérifier l'état opérationnel des salles avant de démarrer l'activité.

Dès qu'une alarme est déclenchée, même pour un événement mineur, elle doit être analysée et commentée afin d'assurer la traçabilité des données.

c) La température et l'humidité

Les systèmes de traitement d'air n'ont pas uniquement pour objectif de produire une qualité d'air requise, ils sont également utilisés afin de réguler la température et l'humidité dans les zones de production

Les conditions sont définies en fonction :

- des activités et du produit fabriqué dans la zone.
- du confort du personnel
- du matériel utilisé dans la zone

La température ambiante et l'humidité ne doivent pas être trop élevées en raison du type de vêtements portés dans ces zones. En général, les limites de températures sont comprises autour de 20°C et entre 40 et 60% pour l'humidité relative.

d) La pression

Concernant la pressurisation des salles, il est nécessaire de maintenir un gradient de surpression d'une zone par rapport à l'autre. Les écarts de pression entre pièces adjacentes relevant de classes différentes doivent être de 10 à 15 pascals, de manière à ce que le niveau de pression soit toujours plus haut dans la zone à plus haut risque de contamination (classe A).

Pour maintenir ce gradient, plusieurs pratiques doivent être adoptées :

- la limitation des flux de personnel, de matériel ou de machines
- les portes doivent être fermées et l'ouverture doit être synchronisée afin d'éviter que deux portes de zones de classe différente ne soit ouvertes en même temps.
- la discipline du personnel intervenant en salle propre, éviter de laisser une porte ouverte trop longtemps

Le gradient de pression assure l'évacuation des particules d'une salle : plus la pression est importante dans une salle, plus les particules vont avoir tendance à entrer en collision entre elles. Si une porte menant à une salle avec une pression plus basse s'ouvre, les particules vont quitter la salle en surpression pour se diriger vers ce nouvel espace. Les particules se trouvant dans la salle en sous pression ne pourront rentrer dans la salle en surpression. Les zones entre lesquelles il est important de maintenir une différence de pression doivent être équipées d'un indicateur de différentiel de pression et ce différentiel de pression doit être régulièrement relevé ou consigné de toute autre manière.

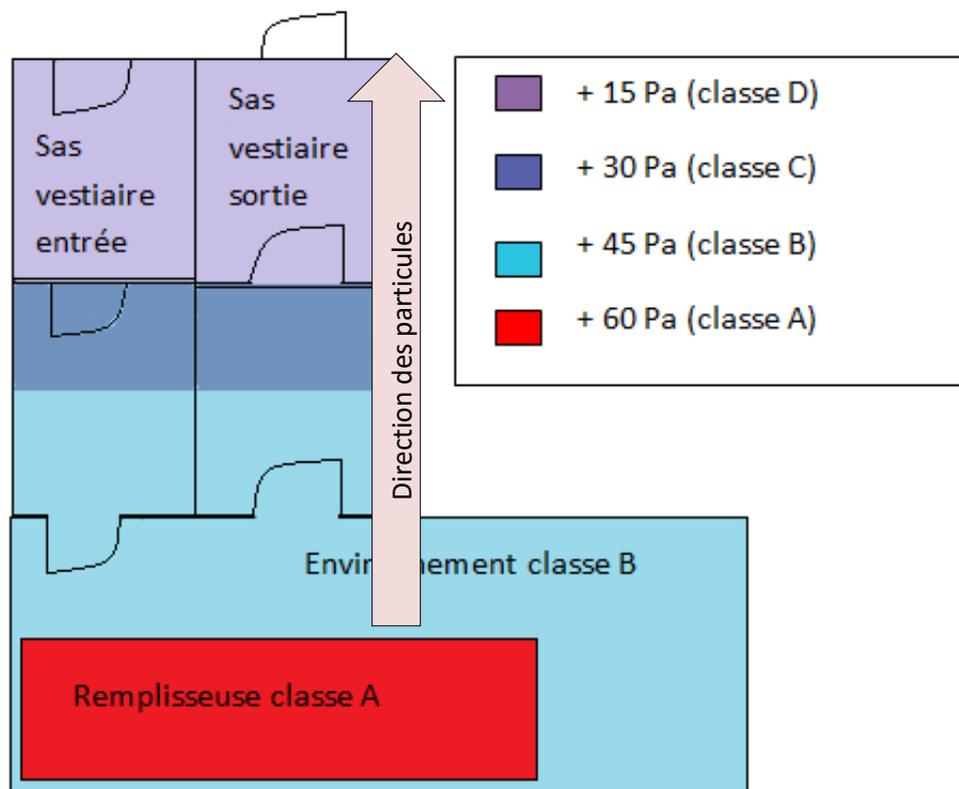


Figure n° 11 : Exemple d'une cascade de pression entre les différentes zones classées.

e) Les contrôles particulières de l'air

La mesure des concentrations particulières de l'air ambiant est un des paramètres les plus importants en production stérile. L'alimentation en air doit être munie d'un système d'alarme détectant toute déficience. Une validation attestant de la conformité du fonctionnement des équipements est nécessaire avant toute opération de fabrication dans la zone.

Pour les zones de classe A, la surveillance particulière doit être conduite pendant toute la durée des étapes critiques y compris pendant le montage des équipements. Une surveillance doit également être réalisée pendant des simulations de procédés de fabrication (MFT). Les zones de classe A doivent être surveillées selon une fréquence et avec des volumes de prélèvements tels que toutes les interventions, événements transitoires et toute défaillance du système puissent être détectés et les alarmes activées si les seuils d'alerte sont dépassés.

Il doit être démontré que le schéma aéraulique ne présente pas de risque de contamination. Il faut, par exemple, éviter que la circulation de l'air n'entraîne les particules provenant d'une personne, d'une opération ou d'une machine, vers une zone de plus haut risque pour le produit.

L'air entrant dans la zone doit être filtré ; selon la norme EN 1822-1, les éléments filtrants sont classés en fonction de leur performance de filtration, on distingue trois types de filtres :

- Groupe E : Filtres EPA (filtre à air à haute densité)
- Groupe H : Filtre HEPA (filtres à air à très haute densité)
- Groupe U : Filtres ULPA (filtres à air à très faible pénétration)

L'efficacité des différents filtres est résumée dans le tableau ci-après ; la performance de filtration est exprimée par l'efficacité ou la pénétration des particules MPPS.

Groupe/ Classe de filtre	Valeur globale	
	Efficacité (%)	Pénétration (%)
E10	≥ 85	≤ 15
E11	≥ 95	≤ 5
E12	≥ 99.5	≤ 0.5
H13	≥ 99.95	≤ 0.05
H14	≥ 99.995	≤ 0.005
U15	≥ 99.999 5	≤ 0.000 5
U16	≥ 99.999 95	≤ 0.000 05
U17	≥ 99.999 995	≤ 0.000 005

Tableau n°14 : classification des filtres EPA, HEPA et ULPA (extrait) (Norme EN_1822-1)

Les ZAC doivent être testées et validées selon la norme ISO 14644-1 qui définit la propreté particulaire de l'air :

- Classe A, la classification particulaire correspond à une classification ISO 4.8 basée sur la limite fixée pour les particules $\geq 5.0 \mu\text{m}$.
- Classe B (au repos), la classification particulaire correspond à une classification ISO 5 pour les deux tailles de particules considérées.
- Classe C (au repos et en activité), la classification particulaire correspond respectivement à une classe ISO 7 et 8.
- Classe D (au repos), la classification particulaire correspond à une classe ISO 8.

(Voir tableau classification ISO de la propreté particulaire de l'air, document annexe n°4).

Afin de mesurer le taux de particules présentes en ZAC, des compteurs particuliers doivent être positionnés à des endroits précis sur la ligne de remplissage. Selon la grandeur de la surface en mètres carré de la zone, un ou plusieurs compteurs particuliers devront être installés afin de garantir la sécurité et la qualité des futurs produits fabriqués.

La méthode de référence pour déterminer la concentration de particules dans l'air d'une taille supérieure ou égale aux tailles spécifiées aux points de prélèvement désignés est l'utilisation de compteurs utilisant les propriétés de diffusion de la lumière (light scattering airborne particle counters – LSAPC) [48]. Ces compteurs sont des instruments capables de compter et de mesurer individuellement les particules en suspension dans l'air et de fournir les données de mesure en termes de diamètre optique équivalent.

La norme ISO 14644-2 (BFP, ligne directrice n°1, §7) indique les différents essais à réaliser lors des opérations de routine afin de déterminer le nombre de particules « en activité » [49].

À la fin des essais effectués conformément à la méthode de référence, la concentration particulaire (exprimée en nombre de particules par mètre cube d'air), ne doit pas dépasser la limite maximale admissible donnée dans le Tableau « classification ISO de la propreté particulaire de l'air », pour la ou les tailles considérées.

Outre les étapes de validation, il est nécessaire d'établir une stratégie de surveillance des zones de production. La surveillance ou le monitoring fournit des données en continu dans le temps et offre une vision détaillée des performances de l'installation.

Les avantages potentiels associés à la surveillance sont les suivants :

- réaction plus rapide aux événements et conditions indésirables
- capacité à développer des tendances dans le temps à partir des données
- intégration des données à partir de plusieurs instruments
- meilleures connaissances de l'installation et du procédé, pour une analyse des risques plus efficace
- meilleure maîtrise des coûts d'exploitation et des pertes de produits.

f) Les contrôles microbiologiques

Ces contrôles permettent le suivi microbiologique de l'environnement de production. Ils sont définis dans des Standard Operating Procedures (SOP) où sont décrits les points de contrôle sur la ligne de répartition, les différents types de contrôles (gélose, écouvillons..) et leur fréquence. (Voir chapitre sur les contrôles en cours de répartition, IPC)

g) Le Media Fill Test

Le média Fill test (ou test de répartition aseptique) est un procédé visant à démontrer les conditions aseptiques du procédé lors des opérations de fabrications. Le chapitre E) ci-dessus est consacré à la description de cet exercice.

G. Contrôles en cours de fabrication (In Process Control)

Le contrôle de la qualité concerne l'échantillonnage, l'établissement de spécifications et l'analyse, ainsi que l'organisation, l'établissement des documents et des procédures de libération qui garantissent que les essais nécessaires et appropriés ont bien été effectués, que les matières premières et articles de conditionnement ne sont pas libérés en vue de leur utilisation, ni les produits libérés en vue de leur vente ou de leur distribution, avant que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante [50].

Les opérations aseptiques doivent être très régulièrement surveillées par des méthodes nécessitant des boîtes de Pétri, des échantillons volumétriques d'air et des prélèvements de surface. Ces prélèvements ne doivent pas interférer avec les opérations de production et risquer de contaminer la zone.

Les résultats doivent être pris en compte lors de la revue des dossiers de fabrication et lors de la libération des lots.

Des contrôles en cours de fabrication doivent être mis en place afin de prévenir, d'anticiper ou de confirmer la présence de contamination sur les produits. On distingue trois types de contrôles :

- Contrôles effectués sur les produits (vaccins)
- Contrôles microbiologiques de l'environnement de la ligne de répartition
- Contrôles microbiologiques des opérateurs

1) Contrôles effectués sur les produits

Lors de procédé de remplissage des seringues, des contrôles sont effectués afin de vérifier le bon fonctionnement de la remplisseuse et sa capacité à produire des seringues conformes. Concernant les seringues pré-remplies, deux contrôles sont effectués sur ligne :

- Les contrôles de masse (volume délivré dans les seringues)
- Le positionnement et l'étanchéité du joint de piston

Ces contrôles ne s'inscrivent pas directement dans la maîtrise des contaminations. Ils relèvent plus de la conformité du produit au niveau des spécifications du produit. Néanmoins, si lors de ces contrôles, l'étanchéité du joint de piston n'est pas conforme (présence d'une bulle dans le joint, diamètre du joint inférieur aux spécifications...), l'asepsie du procédé et des produits n'est pas garantie. Lorsque des anomalies sont détectées, il convient de mener des investigations sur le procédé et la stérilité des produits.

2) Contrôles microbiologiques de l'environnement de la ligne de répartition

La production stérile implique la réalisation de contrôles microbiologiques tout au long des opérations de remplissage. Ces contrôles permettent de suivre l'évolution de la bio-contamination apportée par l'activité des opérateurs, des machines et d'apprécier la qualité microbiologique de l'environnement.

Les contrôles microbiologiques sont effectués dans la totalité de la « zone de production » :

- Les sas personnels, qui permettent l'accès à la zone de répartition
- Les sas matériels, qui permettent l'accès du matériel de l'extérieur vers la zone de lavage matériel
- Les sas transfert de matériel, qui permettent l'accès du matériel lavé vers la zone de remplissage
- La salle de préparation du matériel, qui contient une zone de lavage, une zone d'emballage et de séchage ainsi qu'une zone de stérilisation
- La salle de production, où sont effectuées les opérations de remplissage
- La boîte à gants et les tunnels de décontamination, où sont envoyés les composants emballés (seringues et joints de piston).

Plusieurs types de contrôles sont réalisés :

a) Les prélèvements d'air passif

Ce sont des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé. Ces boîtes sont exposées à l'air ambiant pendant un temps défini (4 heures, *BPF ligne directrice n°1*). Le principe repose sur la sédimentation dans la boîte des particules en suspension dans l'air. Les boîtes sont ensuite incubées et la présence de micro-organismes contrôlée. Plusieurs emplacements sont définis au sein de la zone de production *s*; ces emplacements sont monitorés en continu, les boîtes sont exposées successivement et sont changées à intervalles réguliers afin de refléter l'activité des différents opérateurs

b) Les prélèvements d'air actif

Les prélèvements d'air actif sont utilisés pour évaluer la qualité microbiologique de l'air dans les ZAC. Pour réaliser ces contrôles, des RCS sont utilisés : ce sont des appareils qui vont aspirer une certaine quantité d'air (en m³) et la mettre en contact avec une bandelette contenant des milieux nutritifs. Les micro-organismes potentiellement présents dans l'air ambiant seront aspirés et se déposeront sur ces milieux avant incubation.

Les contrôles par prélèvement d'air actif sont réalisés en classe A sous flux ainsi qu'en classe B à fréquence régulière.

c) Les contrôles par gélose de contact

Ce sont des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif gélosé qui doit être appliqué sur une surface afin de contrôler la présence de microorganismes sur les murs, les tables, le matériel, mais également sur les tenues portées par les opérateurs.

d) Les écouvillons

Les contrôles par écouvillons sont également des contrôles de surface mais leur application est différente par rapport aux géloses de contact. Ils sont utilisés pour les contrôles sur les tubs de seringues. Ces écouvillons stériles sont imbibés avec de l'eau physiologique stérile et sont appliqués sur une surface (en cm²) avec des passages horizontaux et verticaux tout en faisant tourner sur lui-même le bâtonnet. L'écouvillon est ensuite plongé dans un tube contenant un milieu nutritif et mis à incuber.

3) Contrôles microbiologiques des opérateurs

Les contrôles de tenues et de doigts de gants sont considérés comme les plus critiques en ZAC, car les gants des opérateurs sont au plus près du produit. Ils sont réalisés par tout le personnel formé et habilité à entrer en zone stérile. Ces contrôles se font en fin d'activité dans le sas habillage à un emplacement prévu à cet effet.

Les contrôles de tenues permettent de vérifier la bonne gestuelle des opérateurs lors de l'habillage des tenues stériles ; c'est également un paramètre validant leur habilitation à entrer en zone stérile.

Un contrôle doit être réalisé dans chaque zone stérile dans laquelle la personne est intervenue au cours de sa journée de travail. Il est réalisé en fin ou en cours d'activité suivant les interventions réalisées, aussi bien sur les opérateurs de remplissage que les techniciens de microbiologie ou de maintenance. Concernant les visiteurs occasionnels, ce contrôle devra être effectué par une personne habilitée.

a) Géloses de contact pour la tenue

Elles sont à appliquer sur la tenue de l'opérateur sur une localisation bien précise en fin d'activité. Plusieurs géloses sont nécessaires ; une gélose correspond à une seule et unique localisation sur la tenue. Les boîtes sont identifiées pour assurer la traçabilité. Les spécifications sont données dans le tableau en annexe. (Document annexe n°3).

b) Les contrôles de doigts de gants

Une boîte de Pétri sera utilisée pour chaque main. Ces contrôles sont le reflet de l'activité des opérateurs en zone, il est donc primordial de ne pas s'alcooliser les mains juste avant de réaliser le contrôle car les bactéries sensibles à l'alcool potentiellement présentes sur les gants ne pourraient pas se développer sur le milieu.

Les interventions en classe A sous flux sont les plus critiques, aucune contamination microbiologique ne doit être retrouvée sur les contrôles de doigts de gants car cela remettrait directement en cause la qualité du produit destiné à la voie injectable. Lorsqu'un opérateur intervient sous flux, avant de quitter la classe A pour revenir en classe B, il doit impérativement réaliser un contrôle de doigts de gants en indiquant clairement la date, l'heure et quelle action il a réalisé afin d'évaluer l'impact sur la qualité du lot si une contamination est retrouvée.

Les opérations considérées comme critiques nécessitent un contrôle de doigts de gants immédiats après l'intervention. Il peut s'agir du montage machine, du changement d'un tube d'introduction, du redressement d'une aiguille de remplissage...

Si l'opérateur n'est pas intervenu sous flux en classe A, son contrôle de doigts de gants sera réalisé en fin d'activité en même temps que les contrôles de tenues.

c) L'incubation des milieux

L'incubation des différents contrôles est différente selon le type de prélèvement :

Type de milieu	Conditions d'incubation
Géloses de contact	3 à 5 jours à 30 - 35°C
Bandelettes Air actif	
Boîtes exposées	
Ecouvillons	≥ 7 jours à 30 - 35°C

Tableau n°15 : Conditions d'incubation en fonction du type de contrôle

4) Spécifications des contrôles microbiologiques

Les spécifications vont être différentes selon le type de contrôle et selon la classe de la zone. La zone la plus critique est la salle de remplissage classe A sous flux : c'est à ce niveau que les seringues sont remplies, la présence de particules inertes ou microbiologiques à ce niveau doit être nulle. Aucun micro-organisme ne doit se retrouver dans le système sanguin du patient (dans le cas de seringues pour administration intraveineuse)

En cas de dépassements des seuils d'alerte ou d'action définis par les BPF (voir tableau n° 2), les procédures opérationnelles décrivant des mesures correctives doivent être mises en place. La cause des contaminations doit être recherchée, des investigations doivent être effectuées afin d'écartier tout impact sur la qualité des produits. S'il s'avère que la contamination se retrouve dans la solution ou dans les seringues, le lot ne pourra être libéré sur le marché.

(Voir document annexe n°3)

Conclusion

Ce travail a été réalisé au cours d'un stage de fin d'études pharmaceutiques en milieu de production stérile : j'ai pu appréhender les paramètres critiques et les mesures requises pour la fabrication de médicaments injectables et plus particulièrement le remplissage de seringues au sein d'une ZAC. Ce document détaille la démarche et les méthodologies appliquées dans ce type de fabrication pour s'assurer de la stérilité des produits et donc de la sécurité des patients dans le respect des exigences réglementaires. Les procédés de fabrication stériles y sont rappelés en décrivant plus particulièrement le procédé de remplissage aseptique utilisé pour les vaccins.

Ces produits doivent être exempts de toutes particules visibles ou microscopique : aucun micro-organisme ou particule solide ne doivent être retrouvés dans la solution.

La fabrication de médicaments nécessite le respect d'exigences réglementaires : les entreprises pharmaceutiques doivent suivre en premier lieu les recommandations décrites dans les BPF/cGMP. Elles sont généralement complétées par d'autres documents de référence tels que les normes ISO, qui fournissent plus de détails sur les points abordés dans les BPF. Le respect de l'ensemble de ces mesures autorise la fabrication des médicaments dans des conditions environnementales maîtrisées.

Plus en détail, la maîtrise des contaminations en zone à atmosphère contrôlée nécessite un certain nombre de mesures à mettre en place. Les équipements, le procédé de remplissage ainsi que de la zone de production doivent être préalablement validés ; un exercice de Media Fill Test doit être réalisé régulièrement afin de s'assurer de l'asepsie de la zone et du procédé de répartition. Des contrôles microbiologiques permettent de vérifier que la gestuelle, l'entrée en zone et les techniques d'habillage des opérateurs ne sont pas contaminants pour les produits. La contamination particulaire ou microbiologique est présente partout dans notre environnement ; la mise en place de procédures de nettoyage des zones de production est impérative pour réduire et éliminer cette contamination résiduelle. Les composants entrant en zone doivent être stériles et plus particulièrement les seringues et les joints de piston qui seront en contact direct avec la solution.

Ce n'est qu'en appliquant ces actions que les risques de contaminations seront diminués ; il faut garder à l'esprit que le risque microbiologique « zéro » n'existe pas et que l'ensemble de ces mesures a pour objectif de réduire les risques au maximum. L'ensemble de ses mesures est quotidiennement monitoré et encadré par l'Assurance Qualité, le Contrôle Qualité et la Production ; chaque écart constaté par rapports aux procédures, aux instructions, aux BPF ou aux spécifications microbiologiques est une déviation et engendre des investigations dans le but de trouver la cause et surtout de la corriger avec la mise en place d'actions préventives ou correctives.

Le pharmacien industriel, et notamment si la « libération des lots sur le marché » fait partie de ses attributions, est le garant de la qualité des médicaments. Il doit toujours garder à

l'esprit que chaque produit fabriqué est à destination d'un patient ; aucun doute et aucune anomalie ne doit subsister sur la qualité, la sécurité et l'efficacité d'un médicament.

Serment de Galien

En présence des maitres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque



Liste des Figures

Figure n°1 : Distribution de la taille des particules [15]

Figure n°2 : Plan de la ligne de répartition en ZAC

Figure n°3 : Les différentes classes de ZAC sur la ligne de répartition

Figure n°4 : Les différents types de comportements bactériens vis-à-vis de l'oxygène. La croissance bactérienne est observée après inoculation sur toute la longueur du tube d'une souche bactérienne et incubation. [25]

Figure n°5 : Courbe de croissance des bactéries en milieu liquide fermé [25]

Figure n°6 : Représentation des sources de contaminations et d'une tenue classe A ou B [34]

Figure n°7 : Schéma du principe de brumisation

Figure n°8 Profil de température et de pression de la chambre pour un cycle avec évacuation forcée - de l'air/vapeur saturée

Figure n°9 : Schéma du passage des composants dans le flux de décontamination

Figure n°10 : schéma du flux d'air pouvant être utilisé en dans une enceinte stérile en ZAC en classe A

Figure n° 11 : Exemple d'une cascade de pression entre les différentes zones classées.

Liste des Tableaux

Tableau n° 1 : Nombre de particules autorisé en ZAC selon la classe et l'activité [20]

Tableau n°2 : Limite des contaminations microbiologiques en ZAC selon la classe [20]

Tableau n° 3 : Exemple du nombre de particules retrouvées en fonction de la localisation [26]

Tableau n° 4 : Exemples du nombre de particules émises selon différentes actions [28]

Tableau n°5 : Exemples du nombre de particules émises selon une activité physique [28]

Tableau n°6 : Exemple du nombre de bactéries retrouvées sur différentes localisation sur le corps humain [28].

Tableau n°7 : Temps en minutes pour éliminer 100% d'une espèce bactérienne avec une solution de per acétique et de peroxyde d'hydrogène diluée à 5% disponible dans le commerce [36]

Tableau n°8 : Conditions opératoire initiales avant début de cycle de brumisation

Tableau n°9 : Exemples de températures et de durées minimales établies pour des niveaux de létalité microbienne appropriés dans les procédés de stérilisation (ISO 17665-2)

Tableau n° 10 : Contrôles microbiologiques et physico-chimiques à réaliser sur les milieux « vrac »

Tableau n°11 : Exemples des différentes souches à incuber lors du contrôle des propriétés nutritives des milieux sur un exercice MFT

Tableau n° 12 : Tâches à réaliser si présence d'une unité contaminée sur un MFT

Tableau n° 13 : Tâches à réaliser si présence d'unités contaminées sur un MFT

Tableau n°14 : classification des filtres EPA, HEPA et ULPA (extrait) (Norme EN_1822-1)

Tableau n°15 : Conditions d'incubation en fonction du type de contrôle

Liste des photographies

Photographie n°1 : partie d'une remplisseuse de répartition aseptique

Photographie n°2 : tub (sans sachet de protection) contenant des seringues disposées sur un nest pouvant être utilisé lors des opérations de remplissage

Liste des documents Annexes :

Document annexe n°1 : Schéma du procédé de répartition

Document annexe n°2 : Lavage simple des mains

Document annexe n°3 : spécifications des contrôles microbiologiques selon la classe de ZAC

Document annexe n°3 : Classes ISO de la propreté particulaire de l'air

Bibliographie

- [1] Article L5111.1- Code de la Santé Publique. Partie législative, 5^e Partie, livre I,
Disponible sur :
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689866>
- [2] <http://www.medicaments.social-sante.gouv.fr/definition-d-un-medicament.html>
(consulté le 15/05/2016)
- [3] BPF 2015, Glossaire, (BPF n°2015/12 bis), page 313
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [4] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition, Monographie 5.1.1
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>
- [5] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition Mono préparations parentérales
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>
- [6] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition, Monographie 5.1.1
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>
- [7] <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/grippe> (consulté le 17/04/2016)
- [8] *Le vaccin antigrippal, un vaccin en perpétuelle évolution. UE Pharmacie PACES. S. Chapuy-Regaud, 2010.*
- [9] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/fr/> (consulté le 17/04/2016)
- [10]
http://www.sanofipasteur.com/fr/principes_de_la_vaccination/maladies_evitables_par_la_vaccination/grippe_saisonniere/default.aspx (consulté le 17/04/2016)
- [11]
http://www.sanofipasteur.com/fr/principes_de_la_vaccination/processus/cycle_de_developpement_d_un_vaccin/?v=266 (consulté le 17/04/2016)
- [12] BFP 2015, Glossaire, (BPF n°2015/12 bis), page 112
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [13] M. FRONGIA
Maitrise de la contamination dans un isolateur de répartition aseptique. Expérience menée lors de la qualification initiale d'un nouvel équipement ajouté au sein d'un isolateur de répartition.
TH. D. Nantes, 2013

Disponible sur :

<https://nantilus.univnantes.fr/vufind/Record/PPN176479945/Description#tabnav>

[14] Norme ISO/AFNOR 14644_1, chapitre 3.2.1

[15] <http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0809/bei/beiere/groupe4/node/123> (consulté le 12/05/2016)

[16] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis)
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[17] BPF 2015, Glossaire, (BPF n°2015/12 bis), page 314
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[18] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 170
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[19] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 177
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[20] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 171 et 174
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[21] Norme ISO/AFNOR 13408_1 ; chapitre 5.1.1

[22] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 184, §124
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[23] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition. Monographie 2.9.19
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>

[24] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition. Monographie 2.6.1
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>

[25] Guide de l'ultra-propreté 2008 - 2009, BCMI, 6^{ème} édition,

[26] Introduction aux micro-organismes d'intérêt médical, cours de l'enseignement spécifique Pharmacie PACES, 2011. C. Pasquier, Faculté des sciences pharmaceutiques de Toulouse

[27] Phi41, Pharmacotechnie Industrielle,
YVES ROSSETTO, IMT éditions, 1998, page 14

[28] Formation interne, Initiation à la microbiologie, Sanofi Winthrop Industrie

- [29] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 176, §37
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [30] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 176, §39
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [31] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 177, §51
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [32] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 177, §44
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [33] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 177, §43
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [34] A. Peccavé
Analyse comparative des technologies "isolateur" et "RABS" (Restricted Access Barrier System) dans le cadre de la répartition aseptique.
TH.D, Rouen, 2014
Image prise à partir de l'ouvrage BCMI, 2013
Disponible sur : <http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01108988>
- [35] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 178, §61
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf
- [36] <http://www.mcpur.com/disinfection/disinfectionlibrary>,
Minncare_Research_Data Report n° 50090-129 (consulté le 12/09/2016)
- [37] Phi41, Pharmacotechnie Industrielle,
YVES ROSSETTO, IMT éditions, 1998, page 129
- [38] <http://www.filtration.be/fr/filtration-d-air/filtre-pour-event> (consulté le 27/07/2016)
- [39] <http://www.pall.fr/main/laboratory/venting-and-gas-filtration-53208.page> (consulté le 27/07/2016)
- [40] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition, Monographie 5.1.1
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>
- [41] Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition, Monographie 5.2.1
Disponible sur : <http://online.pheur.org/FR/entry.htm>

[42] <http://www.getinge.com/uk/life-science/products-within/sterilisation-equipment/e-beam-sterilisation-for-syringe-tubs/>

[43] *Pharmacie galénique - Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, ALAIN LE HIR, Edition Broché – 1 juillet 2009, page 210.

[44] http://www.cefh-ceps.com/sterilisation/bd_ste/ste23.htm (consulté le 01/08/2016)

[45] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 179, §67

Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[46] Norme ISO/AFNOR n° 14644_1, introduction

[47] *Pharmacie galénique - Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, ALAIN LE HIR, Edition Broché – 1 juillet 2009, page 215

[48] Norme ISO/AFNOR n° ISO14644_1, chapitre 3.5.1

[49] BPF 2015, Ligne directrice n°1 Fabrication des médicaments stériles (BPF n°2015/12 bis), page 172, §7

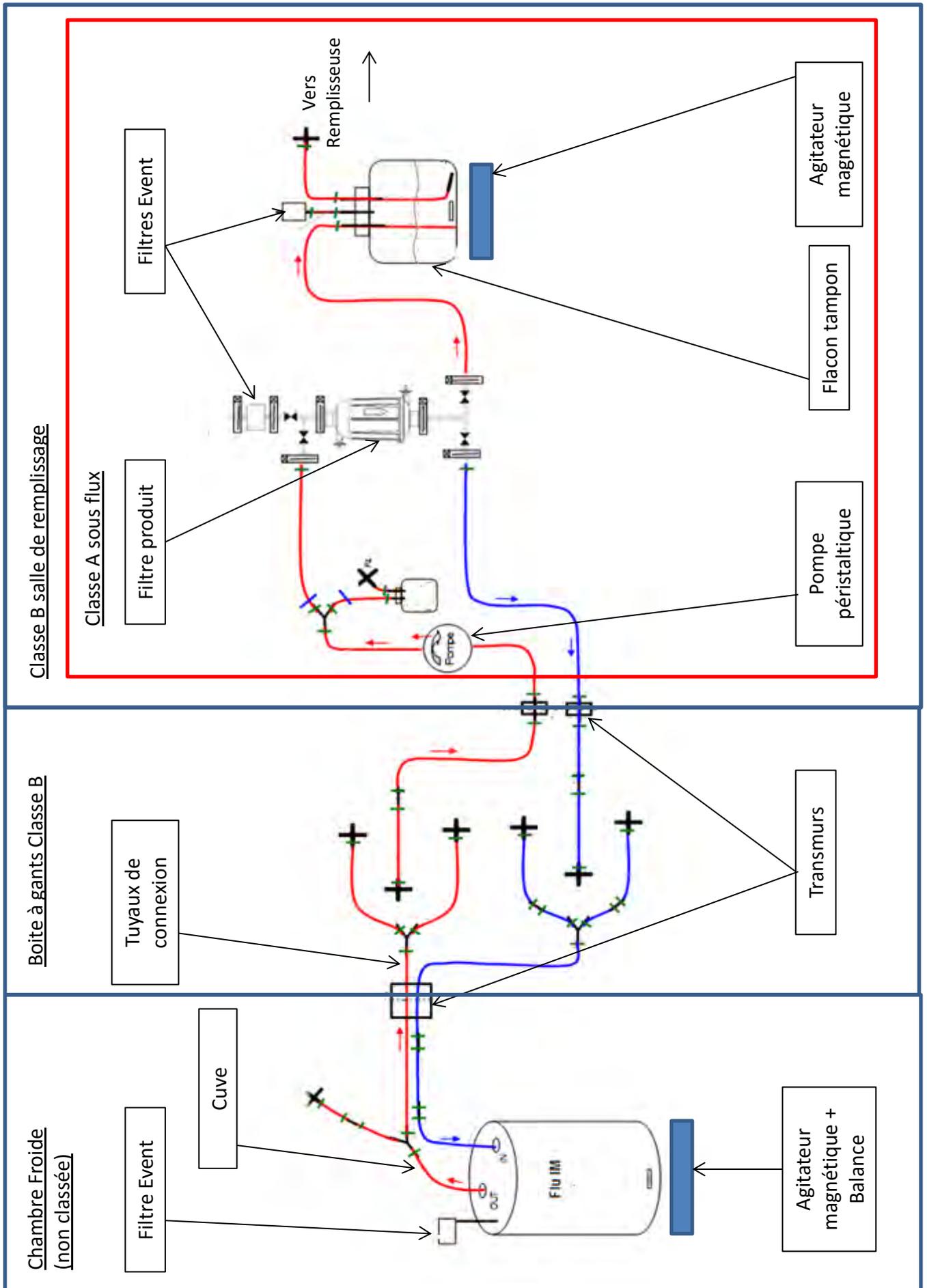
Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[50] BPF 2015, chapitre 6, (BPF n°2015/12 bis), page 43

Disponible sur : social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_20150012_0001_p000.pdf

[51] http://www.who.int/gpsc/5may/tools/training_education/fr/

Hygiène des mains : manuel technique de référence (consulté le 12/09/2016)



Document annexe n°1 : Schéma du procédé de répartition

Le lavage des mains

Comment ?

Laver vos mains au savon et à l'eau lorsqu'elles sont visiblement souillées. Sinon, utiliser la friction hydro-alcoolique pour l'hygiène des mains.

 **Durée de la procédure : 40-60 secondes**

0



Mouiller les mains abondamment ;

1



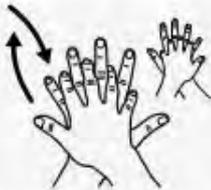
Appliquer suffisamment de savon pour recouvrir toutes les surfaces des mains et frictionner ;

2



Paume contre paume par mouvement de rotation ;

3



Le dos de la main gauche avec un mouvement d'avant en arrière exercé par la paume de la main droite, et vice versa ;

4



Les espaces interdigitaux, paume contre paume et doigts entrelacés, en exerçant un mouvement d'avant en arrière ;

5



Le dos des doigts dans la paume de la main opposée, avec un mouvement d'aller-retour latéral ;

6



Le pouce de la main gauche par rotation dans la main droite, et vice versa ;

7



La pulpe des doigts de la main droite dans la paume de la main gauche, et vice versa ;

8



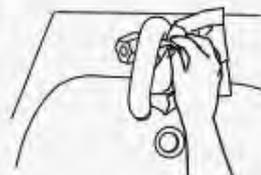
Rincer les mains à l'eau ;

9



Sécher soigneusement les mains à l'aide d'un essuie-mains à usage unique ;

10



Fermer le robinet à l'aide du même essuie-mains ;

11



Vos mains sont propres et prêtes pour le soin.

Document annexe n°2 : Lavage simple des mains [51]

Désignation de la Zone	Classe	contrôle air passif (cfu/4h)		Gélose de contact (cfu/25 cm ²)		Contrôle air actif (cfu/m ³)		Contrôle de doigts de gants (cfu/5 doigts)		Eau physiologique + écouvillons (cfu/sache)	
		Seuil d'alerte	Seuil d'action	Seuil d'alerte	Seuil d'action	Seuil d'alerte	Seuil d'action	Seuil d'alerte	Seuil d'action	Seuil d'alerte	Seuil d'action
Sas Habillage coté "gris"	C	26 - 50	> 50	13 - 25	> 25	51 - 100	> 100	-	-	-	-
Sas Habillage coté "noir"	D	51 - 100	> 100	26 - 50	> 50	-	-	-	-	-	-
Salle de désensachage	D	-	-	26 - 50	> 50	51 - 100	> 100	-	-	-	-
Zone de lavage, emballage, autoclavage	C	11 - 20	> 20	11 - 20	> 20	51 - 87	> 87	-	-	-	-
Salle entrée des composants	Non classé	-	-	-	-	-	-	-	-	-	En monitoring
Boite à gants désensachage	B	3 - 5	> 5	3 - 5	> 5	3 - 5	> 5	3 - 5	> 5	1	> 1
Boite à gants connexion cuve	C			3 - 5	> 5	3 - 5	> 5	-	-	-	-
salle remplissage ambiance	B	3 - 5	> 5	3 - 5	> 5	3 - 5	> 5	-	-	-	-
salle remplissage sous flux	A	-	> 1	-	> 1	-	> 1	-	-	-	Présence de contamination

Tableau 1 — Classes ISO de la propreté particulaire de l'air

Numéro de classe ISO (N)	Concentrations maximales admissibles (particules/m ³) en particules de taille égale ou supérieure à celles données ci-dessous							
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm		
1	10 ^b	d	d	d	d	e		
2	100	24 ^b	10 ^b	d	d	e		
3	1 000	237	102	35 ^b	d	e		
4	10 000	2 370	1 020	352	83 ^b	e		
5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	d, e, f		
6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293		
7	c	c	c	352 000	83 200	2 930		
8	c	c	c	3 520 000	832 000	29 300		
9g	c	c	c	35 200 000	8 320 000	293 000		

a Toutes les concentrations données dans le tableau sont cumulées. Par exemple, pour la classe ISO 5, les 10 200 particules indiquées à 0,3 µm incluent toutes les particules de tailles égales ou supérieures à cette taille.

b Ces concentrations conduiront à prélever des volumes importants aux fins de classification. La procédure de prélèvement séquentiel peut être appliquée, voir l'[Annexe D](#).

c Les concentrations maximales admissibles ne s'appliquent pas dans cette partie du tableau car elles sont très élevées.

d Les limites du prélèvement et les limites statistiques sur ces faibles concentrations rendent la classification inappropriée.

e Les limites des mécanismes de prélèvement, dues à la fois aux faibles concentrations et au prélèvement de particules de tailles supérieures à 1 µm, rendent la classification inappropriée à cause des particules potentiellement non mesurées car retenues à l'intérieur du système de prélèvement.

f Pour réaliser une classification à cette taille de particules, pour la classe ISO 5 on peut adapter le descripteur macroparticules M en l'associant à au moins une autre taille de particules (voir Annexe C.7).

g Cette classe est uniquement applicable pour l'état en activité.

Title: Control of aseptic filling operations in clean areas: application to the manufacture of vaccines

Abstract

The manufacture of sterile injectable drugs is a complex pharmaceutical activity. It requires a lot of masters ranging from training and empowering staff to the manufacturing process, while ensuring the environmental conditions of clean areas where filling operations are performed. An injectable drug is administered directly into the patient's bloodstream and must be free of any particles or microorganisms that can be harmful and potentially severe for his health. No doubt must remain on this security and therefore the sterility of the finished product. For regulatory issues as well as industrial and financial, sterility is the most critical parameter that requires the implementation of different measures such as cleaning, microbiological controls, ventilation control, the Media Fill Test and sterile filtration of the solution which will influence the quality, safety and efficacy of the medication.

RESUME en français

La fabrication de médicaments injectables stériles est une activité pharmaceutique complexe. Elle requiert beaucoup de maîtrise allant de la formation et l'habilitation du personnel jusqu'au processus de fabrication, tout en assurant les conditions environnementales des zones à atmosphère contrôlées participant aux opérations de production. Un médicament injectable est directement administré dans le système sanguin du patient et doit être exempt de toutes particules ou micro-organismes pouvant être nuisibles et avoir un effet potentiellement grave pour sa santé. Aucun doute ne doit exister sur cette sécurité et donc la stérilité du produit. Pour des enjeux aussi bien réglementaires qu'industriels et financiers, la stérilité est le paramètre critique qui nécessite la mise en place de différentes mesures telles que le nettoyage, les contrôles microbiologiques, le contrôle de la ventilation, le Média Fill Test et la filtration stérilisante de la solution qui vont influencer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

Control of aseptic filling operations in clean areas: application to the manufacture of vaccines

DISCIPLINE administrative : Pharmacie Industrielle

MOTS-CLES : BPF – CONTAMINATIONS – DECONTAMINATION – FILTRES – HABILLAGE – ISO - MEDIA FILL TEST – MICROBIOLOGIE – MICROORGANISMES – NETTOYAGE – PARTICULES – PRODUCTION - REMPLISSAGE STERILE – SERINGUES – STERILISATION - ZONE A ATMOSPHERE CONTROLEE

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier – Toulouse 3
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, Chemin des Maraîchers
31062 Toulouse Cedex 9

Directeur de thèse : Madame Cécile ARELLANO