

# **Maîtrise Universitaire en Pharmacie**

## **Travail Personnel de Recherche**

Qualification d'un sas de décontamination à l'acide peracétique et  
validation du transfert de charges types en classe B

présenté à la

Faculté des sciences de  
l'Université de Genève

par

**Marion-Lorraine Poncet**

**Responsable**

**Prof. A. Pannatier**

**Superviseur**

**Dr. M. Voeffray**

Genève  
2009

## RÉSUMÉ

A la pharmacie centrale du CHUV, les préparations devant être stériles (chimiothérapies, nutriments parentéraux et autres préparations injectables, collyres etc.) sont fabriquées en salles propres. Ces salles sont en classe B ou C.

La problématique actuelle est la suivante : les préparations aseptiques **non cytotoxiques** sont fabriquées sous flux laminaire (classe A) dans des locaux de zone B. Jusqu'à maintenant, le matériel nécessaire à ces préparations entrainait dans ces locaux via un sas de transfert après désinfection manuelle à l'alcool isopropylique. Les flacons et autres ampoules sont désinfectés par immersion dans l'alcool et le matériel conditionné dans des emballages papier/plastique est désinfecté avec des lingettes imbibées d'alcool. En effet, il n'est pas possible d'immerger dans l'alcool le matériel conditionné ainsi, car ceci romprait le rôle de barrière de protection de l'emballage. De plus, le passage direct d'une zone D à une zone B ne respecte pas la cascade D-C-B.

Les concentrations en micro-organismes dans ces salles propres n'étant pas conformes aux exigences BPF, il a été décidé de mettre en fonction un sas de décontamination à l'acide peracétique composé d'un isolateur de transfert et d'un stérilisateur Getinge-La Calhène. Cet équipement a pour avantage de permettre d'obtenir, après un cycle de stérilisation, un environnement de classe A à l'intérieur de l'isolateur et de permettre le transfert du matériel en zone B via une double porte sans rupture de stérilité. De plus, l'agent stérilisant utilisé (acide peracétique) a un spectre d'activité beaucoup plus large que l'alcool isopropylique, ce qui est un grand avantage.

L'objectif de ce travail est de qualifier l'isolateur de transfert deux gants et le stérilisateur MAN 230, ainsi que de valider le transfert de charges types en classe B.

Pour ce faire, divers essais d'orientation sont effectués afin de définir les paramètres nécessaires aux validations (détermination des zones critiques, temps de stérilisation, temps d'aération de l'isolateur etc.). Ces tests ont permis la rédaction d'un mode d'emploi, ainsi que d'un protocole de qualification opérationnelle et d'un protocole de qualification de performances.

Les résultats obtenus après les essais de développement ont permis de définir les spécifications des divers essais des validations OQ et PQ. Ils ont également permis la conception de kits de matériel afin de faciliter le transfert de celui-ci d'un côté à l'autre de l'isolateur.

Les résultats des validations sont conformes aux spécifications. Une seule déviation a eu lieu, mais a pu être expliquée après investigation.

L'objectif de ce travail est donc atteint et va permettre la mise en fonction de l'isolateur de transfert.

L'impact microbiologique de cette mise en fonction va être étudié dans le futur. Des prélèvements microbiologiques ont déjà été effectués sur le matériel désinfecté à l'alcool isopropylique et passé dans le sas de transfert. D'autres prélèvements seront effectués sur les kits après passage dans l'isolateur et désinfection à l'acide peracétique. Cependant ces résultats ne pourront être obtenus que lorsque l'équipement sera mis en fonction.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Marc Voeffray, Pharmacien responsable de fabrication et superviseur de ce travail, pour son aide, son soutien et ses conseils tout au long de ce travail.

Je remercie également le Professeur André Pannatier, Pharmacien-Chef du service de pharmacie du CHUV, pour l'intérêt qu'il a montré à l'évolution de mon travail, ainsi que pour ses suggestions et ses questions pertinentes.

Merci à Dragi Trailovic, aide-préparateur, pour son aide précieuse, son humour, ainsi que pour avoir accepté de partager son bureau avec moi durant plus de trois mois.

Je remercie le Docteur Lina Berger, Pharmacienne responsable du Laboratoire d'Analyse de la pharmacie centrale du CHUV, pour ses conseils, ses explications, ainsi que pour son soutien. Merci également à Sheila De Sousa Silva, laborantine, pour son aide et sa bonne humeur.

Merci à Madame Rachele Chianese, Pharmacienne responsable Assurance-Qualité pour son aide dans le traitement de la déviation et dans la codification des documents.

D'une manière générale, je remercie tous les collaborateurs du service de pharmacie du CHUV pour l'accueil et l'aide qu'ils m'ont accordés, et sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Il me faut également remercier chaleureusement Monsieur Camillo Cettuzzi, Pharmacien responsable du secteur cytotatique du Triemli Stadspital de Zürich, pour avoir partagé son expérience des isolateurs et m'avoir orientée lors du choix des critères et du matériel de validation.

Merci à Monsieur Patrick Denny du service technique de Getinge Alpha AG pour ses conseils et pour les réparations effectuées sur l'isolateur.

Merci à Monsieur Urs Meier de Mecolab AG pour ses explications quant au choix des bio-indicateurs.

Merci à Monsieur Frédy Cavin, responsable Stérilisation Centrale au CHUV et à Monsieur Dominique Blanc pour leurs renseignements en matière de microbiologie.

Pour finir, je remercie ma famille, mes amis et mes collègues qui m'ont soutenue tout au long de ce travail et de mes études.

Merci tout spécialement à ma mère pour la relecture et les corrections apportées à ce texte.

Marion-Lorraine Poncet, mai 2009

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>NOTIONS THÉORIQUES</b>	<b>3</b>
2.1	SALLES PROPRES	3
2.1.1	Normes de classification des salles propres (normes ISO)	3
2.1.2	Zones à atmosphère contrôlée (ZAC) (normes BPF)	4
2.1.3	Comptage des particules en suspension dans l'air (normes ISO)	4
2.1.4	Comptage des micro-organismes (normes BPF)	5
2.1.5	Sources de contaminations en salles propres	6
2.1.6	Relations et différences entre ISO et BPF	6
2.2	ISOLATEURS	7
2.3	PROCESSUS DE VALIDATION	8
<b>3</b>	<b>MATÉRIEL</b>	<b>9</b>
3.1	ACIDE PERACÉTIQUE	9
3.1.1	Caractéristiques physico-chimiques	9
3.1.2	Dosage	9
3.1.3	Mécanisme d'action et spectres d'activité	9
3.1.4	Toxicité	10
3.1.5	Décomposition de l'acide peracétique	11
3.1.6	Différences entre acide peracétique et peroxyde d'hydrogène	11
3.2	FONCTIONNEMENT DU STÉRILISATEUR ET DE L'ISOLATEUR	12
3.3	BIO-INDICATEURS	13
<b>4</b>	<b>DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE</b>	<b>14</b>
4.1	DÉTERMINATION DES ZONES CRITIQUES ET COMPTAGE PARTICULAIRE	14
4.2	TESTS D'ÉTANCHÉITÉ	14
4.3	BIO-INDICATEURS ET TEMPS DE STÉRILISATION	15
4.4	MATÉRIEL CHARGÉ DANS L'ISOLATEUR	17
4.5	TEMPS D'AÉRATION DE L'ISOLATEUR ET RÉSIDUS D'ACIDE PERACÉTIQUE	20
4.6	CONCEPTION D'UN MODE D'EMPLOI	22
<b>5</b>	<b>MÉTHODE</b>	<b>23</b>
5.1	OQ	23
5.1.1	Test d'étanchéité de l'enceinte de l'isolateur	23
5.1.2	Localisation des fuites	23
5.1.3	Comptage particulaire	24
5.1.4	Essais de reproductibilité des cycles de stérilisation	24
5.2	PQ	24
5.2.1	Essai microbiologique de stérilisation à vide	24
5.2.2	Essais microbiologiques de stérilisation en charge (worst case)	25
5.2.3	Contrôle du temps d'aération de l'isolateur en mode manuel et automatique	25
5.2.4	Contrôle du taux résiduel d'agent stérilisant dans la charge après aération	26
<b>6</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>27</b>
6.1	OQ	27
6.1.1	Test d'étanchéité de l'enceinte de l'isolateur	27
6.1.2	Localisation des fuites	27
6.1.3	Comptage particulaire	27
6.1.4	Essais de reproductibilité des cycles de stérilisation	27
6.2	PQ	28
6.2.1	Essai microbiologique de stérilisation à vide	28
6.2.2	Essais microbiologiques de stérilisation en charge (worst case)	28
6.2.3	Contrôle du temps d'aération de l'isolateur en mode manuel et automatique	29
6.2.4	Contrôle du taux résiduel d'agent stérilisant dans la charge après aération	29
<b>7</b>	<b>CONCLUSION</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVES</b>	<b>31</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>33</b>
<b>10</b>	<b>ANNEXES</b>	<b>36</b>



## ABRÉVIATIONS

APA	Acide peracétique
ATCC	American Type Culture Collection
BI	Bio-indicateur
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
CHUV	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
CFU	Unité formant une colonie
CIP	Collection de l'institut Pasteur
DPTE	Double Door Transfert Port (double porte de transfert étanche)
DL <sub>50</sub>	Dose de substance causant la mort de 50 % des animaux dans un lot
DQ	Qualification de conception
EVA	Éthyle vinyle acétate
HEPA	Filtre à très haute efficacité
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
GMP	Good Manufacturing Process
IQ	Qualification d'installation
ISO	International Organization for Standardization
LSC	Limite de confiance supérieure
mTSB	Modified Tryptic Soy Broth (bouillon caséine-soja modifié)
NCIMB	National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria
NCTC	National Collection of Type Cultures
OMS	Organisation mondiale de la santé
OQ	Qualification opérationnelle
PH	Peroxyde d'hydrogène
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
PIC	Pharmaceutical Inspection Convention
PICS	Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme
PMMA	Polyméthylméthacrylate
PPM	Partie par million (10 <sup>-6</sup> )
PQ	Qualification de performance
PVC	Polychlorure de vinyle
TPN	Nutrition parentérale totale
USP	United States Pharmacopeia
ZAC	Zone à atmosphère contrôlée

# 1 INTRODUCTION

En 1869, Lord Joseph Lister, chirurgien britannique, est le premier à se rendre compte que les bactéries sont à l'origine des infections de plaies. A partir de là, divers stratagèmes seront mis en place afin de tenter de réduire la concentration de micro-organismes, principalement dans les salles d'opération. Les salles propres ont donc été mises au point en premier lieu dans les hôpitaux et se sont développées à partir du début du 20<sup>ème</sup> siècle. Dès la deuxième guerre mondiale, grâce aux études des problèmes liés aux infections transmises par voies aériennes dans les espaces clos à forte densité de personnes (sous-marins, abris, casernes), l'importance de la ventilation pour la maîtrise des contaminations est mise en évidence. A partir de là se développeront les flux laminaires, ainsi que les textiles à mailles serrées pour empêcher les contaminations particulières et microbiennes véhiculées par les opérateurs. [1]

De nos jours, les salles propres sont utilisées dans de nombreuses industries (électronique, micromécanique, agroalimentaire, biotechnologie, nucléaire etc.) ainsi qu'en hôpital. En effet, celles-ci permettent la fabrication d'objets, de médicaments et de consommables en tous genres nécessitant un environnement à atmosphère contrôlée où la concentration des particules et des micro-organismes est définie et contrôlée.

L'isotechnie est de plus en plus utilisée principalement en industrie pharmaceutique, en sciences de la vie et dans le nucléaire. L'isotechnie fait partie d'un sous-ensemble des technologies des salles propres : c'est le travail en système clos. On utilise pour cela des enceintes de confinement telles que des isolateurs (aussi appelés « bulles ») ou des boîtes à gant. La notion d'isolateur est définie comme étant un volume clos, étanche et stérilisable. L'isolateur joue un rôle de barrière de confinement et marque une séparation physique entre une zone stérile (zone A) et une zone non stérile (zone D). Ceci assure une plus grande sécurité tant pour l'opérateur (protection envers les composés toxiques manipulés) que pour le produit/matériel (contamination particulière et microbiologique). [2, 3, 4]

Au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, toutes les préparations devant être stériles, telles que les chimiothérapies, les nutriments parentéraux, les collyres ou les préparations parentérales d'antibiotique, de morphine ou encore d'adrénaline, sont fabriquées en zone A dans des salles propres. Ces salles propres sont classées en zones B ou C. La fabrication des produits aseptiques non cytotoxiques se faisant sous flux laminaire ouvert (zone A), les locaux environnants sont classés en zone B. Par contre, la manipulation des cytotoxiques se faisant à l'intérieur de cytoebox<sup>1</sup> (zone A) afin de limiter les contaminations environnementales, les locaux environnants sont en classe C. Il faut tout de même souligner que le sas de transfert à l'interface entre le cytoebox et l'environnement C est considéré comme une zone B ; en effet, la cascade D-C-B-A est toujours recherchée.

Comme les exigences en matière de taux de particules et de micro-organismes au sein des salles propres sont strictes, la décontamination du matériel entrant dans ces zones est très importante (passage d'une zone D à une zone B). La méthode de décontamination doit par conséquent être capable de diminuer la charge microbiologique de manière importante et suffisante.

Jusqu'à maintenant le matériel utilisé pour les préparations aseptiques non cytotoxiques était décontaminé manuellement (soit à l'aide de lingettes imbibées d'alcool, soit en le plongeant dans un « bain » d'alcool isopropylique) puis transféré en zone B via un sas de transfert.

Le problème avec cette méthode est que les emballages papier/plastique ne sont pas correctement désinfectés. En effet, le papier empêche l'immersion totale du matériel dans l'alcool car ce dernier pénètre à l'intérieur des emballages, rompant la barrière de protection.

Pour résoudre ce problème, la pharmacie du CHUV a décidé de mettre en fonction un sas de décontamination à l'acide peracétique. Ce dispositif est composé d'un isolateur de transfert deux gants Getinge-La Calhène en PVC souple ainsi que d'un stérilisateur MAN 230 Getinge-La Calhène. L'acide peracétique est un acide faible fortement oxydant qui a l'avantage d'être bactéricide, virucide, fongicide, sporicide et d'avoir également une certaine action sur les prions.

---

<sup>1</sup> Boîte à gant étanche

Le principe de ce sas de décontamination est le suivant : le stérilisateur chauffe l'acide peracétique à 45°C et ses vapeurs sont propulsées par air comprimé à l'intérieur de l'isolateur dans lequel sont déposés les divers matériels à décontaminer. A la fin d'un cycle de stérilisation et d'aération, le matériel est transité sans rupture de stérilité en zone B via une double porte (DPTE) entre l'isolateur et le local de stockage.

Contrairement à la décontamination manuelle à l'alcool isopropylique, la stérilisation à l'acide peracétique en isolateur permet une décontamination de presque tout type de surface. De plus, en comparaison avec l'autre méthode, le risque de recontamination est, en principe, nul.

Il est important de souligner que l'isolateur ne servira que d'interface pour la stérilisation de surface et le transfert de matériel et non pas à la fabrication de TPN ou autres produits. En effet, la fabrication se fait sous flux laminaire dans les locaux de zone B.

Il faut également préciser que l'isolateur de transfert ne servira à décontaminer que le matériel nécessaire à la fabrication de préparations aseptiques non cytotoxiques et non le matériel pour les cytotoxiques.

Le but de ce travail est donc de qualifier l'isolateur de transfert 2 gants et le stérilisateur MAN 230 Getinge-La Calhène et de valider le transfert de charges types en classe B, ceci afin de permettre la mise en activité de l'isolateur de transfert pour la fabrication des préparations aseptiques non cytotoxiques en routine.

Pour ce faire, divers tests d'orientation seront effectués afin de définir les paramètres nécessaires à la validation. Une fois ces paramètres connus, les protocoles des qualifications opérationnelles (OQ) et des qualifications de performances (PQ) seront rédigés, puis les validations seront effectuées à proprement parler. Ceci permettra de démontrer le bon fonctionnement, de manière reproductible et sûre, du sas de transfert à l'acide peracétique.

## 2 NOTIONS THÉORIQUES

### 2.1 SALLES PROPRES

Mises en place durant la deuxième guerre mondiale, les salles propres sont, de nos jours, utilisées en industrie dans les domaines les plus divers tels que l'électronique, les semi-conducteurs, la micromécanique, l'optique, la biotechnologie, la pharmacie, les dispositifs médicaux et l'agroalimentaire.

La norme ISO 14644-1 définit la salle propre comme « une salle dans laquelle la concentration des particules en suspension dans l'air est maîtrisée, et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la génération et la rétention des particules à l'intérieur de la pièce, et dans laquelle d'autres paramètres pertinents, comme la température, l'humidité et la pression sont parfaitement maîtrisés. »

L'intérêt des salles propres est de permettre la maîtrise de la dispersion des contaminants (particulaires et microbiologiques) et ainsi, de garantir un environnement propre pour la production de produits devant être aseptiques ou stériles.

Afin d'obtenir ce résultat, un débit élevé d'air filtré au moyen de filtres à très haute efficacité (HEPA) est introduit dans la salle. Ce débit d'air sert à diluer et à éliminer les particules et les micro-organismes émis par les personnes et les équipements à l'intérieur de la salle. Il sert également à mettre la salle en surpression afin d'éviter les entrées d'air sale de l'extérieur.

Une salle propre est construite avec des matériaux qui n'émettent pas de particules et qui sont facilement nettoyables.

Les opérateurs travaillant dans une salle propre sont vêtus de tenues larges enveloppant tout le corps, de masques, de gants, de chaussons et de coiffes afin de réduire au maximum la dissémination de particules et de micro-organismes. [1]

#### 2.1.1 NORMES DE CLASSIFICATION DES SALLES PROPRES (NORMES ISO)

On classe les salles propres en fonction de la propreté de l'air ambiant. Depuis 1999, la norme internationale régissant cela est l'ISO 14644-1 qui a remplacé la federal standard 200-E.

La classification de la norme ISO est basée sur une formule permettant de calculer la concentration maximale admissible de particules en suspension dans l'air pour une taille donnée:

$$C_n = 10^N \cdot \left[ \frac{0,1}{D} \right]^{2,08} \quad \text{[Équation 1]}$$

où :  $C_n$  = concentration maximale admise, exprimée en nombre de particules par  $m^3$  d'air, ces particules ayant un diamètre égal ou supérieur à une taille considérée

$N$  = numéro de classification ISO, inférieur ou égal à 9

$D$  = taille considérée de particule, exprimée en  $\mu m$

**Tableau 1** : Classes de la norme ISO 14644-1 pour la propreté de l'air des salles propres [1]

Numéro de classe ISO	Limite de concentration maximale admissible de particules [particules/ $m^3$ ] de taille supérieure ou égale à ce qui est indiqué ci-dessous					
	$\geq 0.1 \mu m$	$\geq 0.2 \mu m$	$\geq 0.3 \mu m$	$\geq 0.5 \mu m$	$\geq 1 \mu m$	$\geq 5 \mu m$
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1'000	237	102	35	8	-
ISO 4	10'000	2'370	1'020	352	83	-
ISO 5	100'000	23'700	10'200	3'520	832	29
ISO 6	1'000'000	237'000	102'000	35'200	8'320	293
ISO 7	-	-	-	352'000	83'200	2'930
ISO 8	-	-	-	3'520'000	832'000	29'300
ISO 9	-	-	-	35'200'000	8'320'000	293'000

La norme ISO 14644-1 définit également trois états d'occupation d'une salle propre [1]:

- Après construction : installation terminée avec toutes les servitudes connectées et en fonctionnement, mais sans équipement ni matières de production ou personnel à l'intérieur.
- Au repos : installation terminée, avec l'équipement de production installé et fonctionnant comme convenu entre le client et son fournisseur, mais sans personnel à l'intérieur.
- En activité : installation fonctionnant selon le mode prescrit. Avec l'effectif spécifié travaillant dans les conditions convenues.

### 2.1.2 ZONES À ATMOSPHERE CONTRÔLÉE (ZAC) (NORMES BPF)

Une ZAC est une zone dont le contrôle de la contamination est défini et qui est construite et utilisée de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de substances contaminantes (particules et micro-organismes). Les salles propres pour la production pharmaceutique sont soumises à des normes spécifiques définies, au niveau européen, dans le Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication. Quatre classes sont définies en fonction des particules et du nombre de particules viables, autorisant certaines activités en fonction du risque de contamination. [1]

**Tableau 2 :** Classification des particules en suspension dans l'air du Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication et correspondances ISO [1, 5, 6]

Classe	Nombre maximal de particules/m <sup>3</sup> de taille égale ou supérieure à celle indiquée et correspondances ISO					
	Au repos			En activité		
	≥ 0.5 µm	≥ 5 µm	ISO	≥ 0.5 µm	≥ 5 µm	ISO
A	3'520	20	5	3'520	20	5
B	3'520	29	5	352'000	2'900	7
C	352'000	2'900	7	3'520'000	29'000	8
D	3'520'000	29'000	8	non défini	non défini	non défini

**Tableau 3 :** Exemples de conditions requises en salle propre pour différentes activités [5]

Classe	Exemples d'opérations pour des produits stérilisables
A	Remplissage de produits, en cas de risque inhabituel.
C	Préparation de solutions, en cas de risque inhabituel. Remplissage de produits.
D	Préparation de solutions et de conditionnements en vue de leur remplissage subséquent.
Classe	Exemples d'opérations pour des préparations aseptiques
A	Préparation et remplissage aseptique.
C	Préparation de solutions destinées à être filtrées.
D	Manipulation d'accessoires après nettoyage.

Du fait de la barrière microbiologique que l'isolateur impose entre l'intérieur et l'extérieur, la salle dans laquelle il se trouve doit être au minimum de classe D. [3, 7]

### 2.1.3 COMPTAGE DES PARTICULES EN SUSPENSION DANS L'AIR (NORMES ISO)

L'appareil utilisé est un compteur optique de particules permettant de dénombrer, taille par taille, les particules en suspension dans l'air.

Le nombre de points d'échantillonnage est choisi en fonction de la taille du local et de son niveau de propreté. L'échantillon d'air doit être suffisamment important pour obtenir une confiance statistique.

La norme ISO 14644-1 décrit les méthodes permettant de sélectionner le nombre de points d'échantillonnage et de déterminer le volume minimum d'air. [1]

#### 2.1.3.1 EMBLACEMENT ET NOMBRE DE POINTS D'ÉCHANTILLONNAGE

La formule suivante permet de calculer le nombre minimum de point d'échantillonnage :

$$N_L = \sqrt{A} \quad \text{[Équation 2]}$$

où :  $N_L$  = nombre minimum de points d'échantillonnage arrondi au nombre entier supérieur  
A = surface de la salle ou de la zone propre exprimée en  $m^2$

Les points d'échantillonnage doivent être disposés de manière régulière sur la surface de la salle ou de la zone propre et à hauteur de travail.

### 2.1.3.2 VOLUME DES ÉCHANTILLONS D'AIR

Moins il y a de particules dans une salle propre, plus il faudra prélever un grand volume d'air pour être certain que les résultats obtenus sont en dessous des limites de classe définie dans les normes de référence. Pour ce faire, la formule suivante est utilisée :

$$V = \frac{20}{C} \cdot 1000 \quad \text{[Équation 3]}$$

où : V = volume minimum de l'échantillon par point, exprimé en litres  
C = valeur limite [nombre de particules/ $m^3$ ] pour la taille particulaire la plus importante spécifiée dans la classe considérée  
20 représente le nombre de particules que l'on devrait compter si la concentration particulaire se situe à la limite de la classe

Le volume d'air aspiré à chaque point devrait être d'au moins deux litres et le temps de prélèvement devrait être d'au moins une minute.

### 2.1.3.3 CRITÈRES D'ACCEPTATION

La classe spécifiée est considérée comme atteinte si :

- la concentration moyenne de particules à chaque point de prélèvement est inférieure à la limite prévue pour la classe.
- dans le cas où le nombre total de points de prélèvement est inférieur à 10, la limite de confiance supérieure de 95% (LSC) des concentrations de particules doit être inférieure à la limite de la classe.

### 2.1.4 COMPTAGE DES MICRO-ORGANISMES (NORMES BPF)

Dans les salles propres, il faut non seulement maîtriser les particules inertes, mais également la flore microbienne.

**Tableau 4** : Limites recommandées pour le contrôle microbiologique des salles propres en activité [5]

Classe	Contamination microbienne limite recommandée			
	Échantillon d'air [CFU / $m^3$ ]	Boîte de Pétri ( $\varnothing$ 90 mm) [CFU / 4 heures]	Géloses de contact ( $\varnothing$ 55 mm) [CFU / plaque]	Empreintes de gant [CFU / gant]
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Le terme micro-organismes regroupe les bactéries, les virus, les champignons, les spores et les prions. Ils sont présents dans l'air, l'eau, le sol et sont souvent adsorbés sur des surfaces inertes ou biologiques et forment, par leur prolifération, des dépôts appelés biofilms. Du fait de leur faible masse, ils peuvent facilement être entraînés en suspension dans l'air où ils sont souvent adsorbés sur des particules inertes.

Ces particules viables peuvent être classées en trois catégories :

- pathogènes : qui provoquent des maladies
- commensales : qui vivent au dépend d'un autre sans lui causer de dommages (vs parasite)

- opportunistes : qui provoquent des maladies lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies

### 2.1.5 SOURCES DE CONTAMINATIONS EN SALLES PROPRES

On peut regrouper les sources de contamination en salle propre dans cinq catégories : le personnel, le milieu, les matières, le matériel et les méthodes.

Le **personnel** est la source principale de contamination, étant à la fois émetteur et vecteur de micro-organismes. Les émissions particulières et microbiennes sont cutanées et rhino-pharyngiennes, d'où l'intérêt d'un habillage spécifique et de la bonne formation du personnel.

Le **milieu** comprend l'air ambiant, les surfaces, les zones sales adjacentes aux salles propres. Les sources de contaminations de l'air peuvent être soit d'origine humaine, soit dues aux matières et au matériel. Les particules et micro-organismes présents en suspension dans l'air se déposent ensuite sur les surfaces. C'est pourquoi les matériaux de construction ainsi que l'aménagement des locaux doivent être conçus de manière à limiter au maximum les contaminations.

Les **matières**, tant solides, liquides que gazeuses, peuvent être sources de contamination. Par exemple, l'eau peut être un vecteur et un milieu de prolifération de micro-organismes.

Le **matériel** n'est pas une source directe de contamination, mais il peut être contaminé par un mauvais nettoyage, la présence d'eau stagnante etc.

Les **méthodes** regroupent tout ce qui est production, maintenance, nettoyage, transfert etc. Si ces méthodes ne sont pas adaptées ou pas suivies, elles peuvent être sources de contamination. [1, 8]

### 2.1.6 RELATIONS ET DIFFÉRENCES ENTRE ISO ET BPF

Tant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) que les normes ISO sont des systèmes de qualité et leurs exigences respectives sont de plus en plus similaires. Cependant, ce sont deux systèmes distincts.

Le premier guide GMP (Good Manufacturing Practice) voit le jour au USA dans les années 60 et ne tarde pas à être adopté par l'Europe (BPF).

Les BPF sont des exigences réglementaires : en Suisse, les médicaments, par exemple, doivent être fabriqués conformément aux BPF selon la loi fédérale sur les médicaments et les dispositifs médicaux (RS 812.21 Art. 7). Elles s'appliquent à tout le processus de fabrication de médicaments à usage humain ou vétérinaire.

L'OMS définit les bonnes pratiques de fabrication comme étant « un des éléments de l'assurance de la qualité; elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché ». La qualité doit être un élément intrinsèque du produit et non une simple caractéristique révélée par des tests. Il en résulte que le produit doit non seulement répondre aux spécifications finales, mais également être fabriqué dans les mêmes conditions et en suivant les mêmes procédures à chaque fois. [9,10, 11]

En ce qui concerne les normes ISO, l'organisation internationale de normalisation a été créée en 1947 à Genève dans le but de produire des normes internationales pour les domaines industriels et commerciaux. Ces normes permettent de garantir certaines caractéristiques des produits et services, telles que la qualité, le respect de l'environnement, la sécurité, la fiabilité, l'efficacité et l'interchangeabilité. Elles sont plus tournées vers des considérations marchandes que techniques, au contraire des BPF. Il faut encore souligner que l'ISO est une démarche volontaire de certification obtenue par une entreprise (contrairement aux BPF qui sont des exigences) et que certains pays, dont la communauté européenne, ont accepté la norme ISO 9000 comme standard pour un système de qualité. [10, 11, 12]

## 2.2 ISOLATEURS

Les premiers isolateurs ont fait leur apparition aux USA en 1940 pour l'élevage d'animaux de laboratoire axéniques<sup>1</sup>. C'était des isolateurs rigides en acier inox. A partir de 1950, les isolateurs souples et stérilisables par voie chimique apparaissent. En Europe, la société la Calhène fut pionnière de la construction des isolateurs au début des années 70. [13, 14]

Les isolateurs sont utilisés dans les domaines suivants :

- Sciences de la vie : pour l'élevage d'animaux axéniques, immunodéprimés, transgéniques, gnotoxéniques<sup>2</sup> ou encore intentionnellement contaminés.
- Pharmacie : pour la fabrication, le transfert, les pesées etc. de produits stériles et/ou toxiques.
- Médical : chambres stériles ou de confinement pour les patients immunodéprimés ou contagieux
- Agroalimentaire : pour protéger le produit de contaminations microbiologiques. Les isolateurs sont utilisés pour le transfert aseptique des matières premières et emballages, le confinement des équipements et des installations, le transfert aseptique des produits finis ainsi que leur contrôle-qualité.
- Microélectronique : permet d'éviter que les substances chimiques générées par des micro-organismes ne provoquent de courts-circuits. [13, 15]



**Figure 1 :** Isolateur souple à trois gants (à gauche) et isolateur rigide à deux hémisphères (à droite)

Un isolateur peut être défini comme un volume clos, étanche et stérilisable, limité par deux filtres HEPA dans lequel les opérateurs peuvent intervenir tout en restant biologiquement à l'extérieur de ce volume. [3, 7, 13]

Un isolateur a plusieurs fonctions [4, 13]:

- Barrière de confinement : barrière matérielle qui sépare l'environnement confiné de l'environnement extérieur. Cette barrière peut être souple (PVC) ou rigide (PMMA, verre, acier inoxydable etc.). [14]
- Traitement et stérilisation de l'air et des surfaces : l'isolateur peut être maintenu en surpression (permet la protection de produit) ou en dépression (permet la protection de l'environnement) par un système de ventilation et de filtration permettant une circulation d'air exempt de germes. [16] L'isolateur peut être annexé à un stérilisateur qui nébulisera ou vaporisera un agent chimique (APA, PH etc.) permettant une stérilisation de surface.
- Manipulations : réalisées par l'intermédiaire de gants montés sur des manchettes, d'hémisphère ou de scaphandre
- Transferts

<sup>1</sup> Animal ne présentant aucun micro-organisme

<sup>2</sup> Animal axénique ayant été inoculé par un ou plusieurs micro-organismes vivants parfaitement connus



## 2.3 PROCESSUS DE VALIDATION

La démarche de validation et de qualification est décrite dans l'annexe 15 du Guide des Bonnes Pratiques de Fabrications. Elle permet d'établir par des évidences objectives et documentées que le procédé donne un résultat conforme aux exigences prédéfinies. On peut la résumer en quatre grandes parties: [6, 13, 17]

- 1) Qualification de conception (DQ) : elle permet de déterminer les paramètres essentiels à la mise en marche de l'équipement et des installations. La conception des équipements est évaluée de façon documentée afin de montrer leur aptitude à l'utilisation prévue. Elle doit être en conformité avec les BPF. Dans la qualification de conception figure tous les éléments touchant aux locaux et aux appareils.
- 2) Qualification d'installation (IQ) : c'est la vérification documentée que l'équipement ou le système installé est conforme aux exigences prédéterminées par le constructeur. Il faut pouvoir démontrer que l'équipement est conforme aux exigences spécifiées dans le cahier des charges. On vérifie l'équipement sans le mettre en fonctionnement. L'IQ doit comporter au moins les éléments suivants : manuel d'utilisation, plan de l'équipement, plan d'implantation, schémas électriques, pneumatiques, hydrauliques etc., exigences en matière d'entretien, en matière d'étalonnage ; vérification des matériaux de construction.
- 3) Qualification opérationnelle (OQ) : c'est la vérification documentée, par l'intermédiaire d'une procédure de tests, que l'équipement ou le système installé a les performances fonctionnelles attendues. Il faut pouvoir démontrer que l'équipement fonctionne de manière reproductible. Cette qualification se fait en l'absence de matériel ou de produit, au repos.  
Des tests d'orientation (développement) précèdent souvent l'OQ. Ils permettent de déterminer les paramètres à évaluer et les valeurs limites de l'équipement à ne pas dépasser.  
En fin d'OQ, il est important de formaliser les paramètres d'utilisation (procédure, mode opératoire), de former le personnel à l'utilisation de l'équipement et de définir son plan de maintenance.
- 4) Qualification de performance (PQ) : c'est la vérification documentée que l'équipement fonctionne de façon effective et reproductible selon les exigences prédéterminées et approuvées. On vérifie que l'équipement fonctionne de manière reproductible et efficace en situation normale et en « worst case ». Le « worst case » est l'ensemble des conditions comportant le plus grand risque de défaillance du produit ou du procédé comparé aux conditions idéales.

Il existe trois types de validation : les validations prospectives (préalables à la mise sur le marché du produit), concomitantes (le produit est déjà sur le marché) et les validations rétrospectives (utilisation des données historiques de routine pour la validation). Cette dernière est plus rare.

Pour toute modification importante du procédé, des produits ou de l'équipement, il faut en évaluer l'impact. Si celui-ci est important, il faudra effectuer une revalidation.

Une revalidation est nécessaire périodiquement.

## 3 MATÉRIEL

### 3.1 ACIDE PERACÉTIQUE

L'acide peracétique est connu depuis 1902. Il est principalement utilisé pour la désinfection d'endoscopes et de matériels thermosensibles, la stérilisation (isolateur), comme agent de blanchissement, pour le traitement des eaux usées et comme agent de réticulation et de polymérisation. [18, 19]

#### 3.1.1 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

L'acide peracétique est un agent oxydant qui se présente sous la forme d'un liquide incolore à l'odeur piquante et désagréable. Il n'existe pas à l'état pur et doit être synthétisé.

L'APA réagit de façon violente et explosive avec l'anhydride acétique, les solvants éthers, les oléfines, les sels de type chlorure de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$  et les matières organiques (bois etc.). [19] Il peut aussi exploser violemment s'il est chauffé à plus de  $110^\circ\text{C}$ . Il faut donc prendre garde aux conditions de stockage et d'utilisation : le réservoir du stérilisateur doit être suffisamment rempli afin qu'il ne soit jamais être totalement vide lors d'une stérilisation. En effet, ceci pourrait provoquer une explosion.

L'acide peracétique a un effet corrosif sur les métaux (fer, cuivre, laiton, titane) et provoque la dénaturation et polymérisation de certains polymères (polyamide, néoprène, nitrile, polyuréthane, polycarbonate etc.). Par contre, il est compatible avec l'acier inoxydable, le viton, le téflon, le polychlorure de vinyle, le polypropylène, le polyméthylpentène, le polyméthylméthacrylate et le silicone. [18]

#### 3.1.2 DOSAGE

Lors de ce travail, le dosage des résidus gazeux d'acide peracétique dans les emballages est effectué à l'aide de bandelettes réactives à l'acide peracétique. Ces bandelettes ont été conçues pour doser de manière semi-quantitative l'APA en phase liquide. Cependant dans notre cas, ce sont les résidus gazeux qui nous intéressent. Une méthode a donc été développée à partir de ces bandelettes. Les bandelettes sont préalablement humidifiées avec de l'eau déminéralisée puis sont placées dans un conteneur étanche (ici une bouteille en verre). Les bouteilles sont ouvertes à intervalles définis afin de déterminer le temps minimum d'aération de l'isolateur pour permettre l'évacuation presque totale des vapeurs d'acide peracétique. [20] Le seuil de détection a été placé à 5 mg/L. Le principe de fonctionnement des bandelettes Merkoquant<sup>®</sup> de Merck est le suivant : l'acide peracétique réagit avec une amine aromatique pour donner un colorant bleu. La détermination de la concentration en APA est semi-quantitative par comparaison visuelle de la zone réactionnelle de la bandelette avec les zones d'une échelle colorimétrique. [21]

La littérature regorge de méthodes analytiques permettant de doser tant l'acide peracétique que les peroxydes d'hydrogène. En voici quelques unes : bandelettes réactives [22, 23], HPLC [24, 25], HPLC-UV [26, 27, 28], spectrométrie [29, 30], titrimétrie [20, 24, 26], électrochimie (potentiométrie, ampérométrie) [31, 32], méthodes réflectométriques [21, 22, 23] etc.

#### 3.1.3 MÉCANISME D'ACTION ET SPECTRES D'ACTIVITÉ

L'acide peracétique est un oxydant puissant et un acide faible actif tant en solution que sous forme de vapeur. Il est plus actif en milieu acide qu'en milieu alcalin. [33]

Il agit rapidement et n'est pas inactivé par la présence de matières organiques contrairement à d'autres désinfectants. La température affecte également son activité : l'augmentation de la température potentialise l'effet de l'acide peracétique. [34]

L'acide peracétique a une activité bactéricide, fongicide, sporicide, virucide et est partiellement actif sur les prions. [18]

### **3.1.3.1 BACTÉRICIDIE**

L'action létale de l'acide peracétique est exercée par son radical hydroxyle. [35] Son action est rapide tant sur les bactéries gram + que les bactéries gram - et également sur les mycobactéries. [18]

### **3.1.3.2 FONGICIDIE ET SPORICIDIE**

La fongicidie de l'APA a été démontrée sur les levures et les champignons (*Aspergillus*, *Candida* etc.). [36]

L'APA est actif sur une grande variété de souches de spores et est plus rapide et plus actif que bon nombre d'autres désinfectants.

Les peroxydes d'hydrogène contenus dans le Soproper<sup>®</sup> et synthétisés par dégradation de l'APA en présence d'ions métalliques (cf. point 3.1.5, page 11) sensibilisent les spores à l'action de la vapeur et provoquent des lésions des membranes, des enveloppes et du cytoplasme. [37]

Il est à noter que l'APA a une activité sporicide tant sous forme liquide que sous forme de vapeur. [38]

### **3.1.3.3 VIRUCIDIE**

L'APA agit au niveau du génome des virus. Il est actif tant sur les virus enveloppés que sur les virus nus : phages, poliovirus, virus entériques, VIH-1, virus de l'hépatite B etc. [18, 39]

### **3.1.3.4 INACTIVATION DES PRIONS**

Les prions sont des protéines pathologiques responsables d'une maladie dégénérative du système nerveux central appelée encéphalopathie subaiguë transmissible (par exemple, la maladie de Creutzfeldt Jakob). Les prions ont la caractéristique d'être très résistants à la chaleur et aux agents microbicides classiques. On vise surtout leur inactivation et non leur destruction.

L'APA a l'avantage, par rapport à beaucoup d'autres désinfectants classiques, d'inactiver les prions sans fixer leur infectiosité. Cependant, son action reste modérée. [40, 41]

## **3.1.4 TOXICITÉ**

### **3.1.4.1 TOXICITÉ CHEZ L'ANIMAL**

- Toxicité aiguë : fortement irritant voire corrosif pour la peau, les yeux et les voies respiratoires. Irritant gastro-intestinal et respiratoire puissant.  $DL_{50rat} = 1.5 \text{ mg/kg}$  [20]
- Toxicité chronique : irritant cutané, gastrique et respiratoire
- Effet génotoxique : possible effet mutagène chez la souris
- Effet cancérigène : non cancérigène chez le lapin, mais promoteur de cancer cutané chez la souris
- Effet tératogène : aucune modification des capacités reproductrices [18]

### **3.1.4.2 TOXICITÉ CHEZ L'HOMME**

Très peu de données sont disponibles chez l'homme. Cependant le caractère corrosif du produit fait craindre des effets sur la peau, les yeux, le tractus respiratoire et le tractus digestif. Des irritations des yeux et des voies aériennes supérieures ont été notées à des concentration de 3-8  $\text{mg/m}^3$  de produit dilué (0.2%).

Il n'existe aucune donnée concernant le potentiel allergisant de l'APA. [18, 19]

### **3.1.4.3 PRÉCAUTIONS D'EMPLOI**

En Suisse, dans l'ordonnance 822.113 du 18 août 1993 relative à la loi sur le travail (Hygiène, OLT 3), il est uniquement spécifié que les locaux doivent être aérés en fonction de la nature du travail qui y est effectué ; aucune valeur de débit de ventilation ou de renouvellement horaire du local n'est précisé. Le Code du Travail français, quant à lui, demande que la ventilation des locaux à pollution non spécifique permettent l'introduction d'air neuf compensant l'air extrait, avec un débit par personne d'au moins 60  $\text{m}^3/\text{h}$  (Art. R. 232-5-3). Le débit d'air du local où se trouve l'isolateur étant de 274  $\text{m}^3/\text{h}$

et sachant qu'il n'y a, au maximum, que deux personnes à la fois dans le local, les normes sont respectées.

Le Soproper<sup>®</sup> doit être stocké dans un local frais (voire au frigo), bien aéré, à l'abri de toute source d'ignition et à l'écart de produits incompatibles. [18]

En raison de sa toxicité, il est conseillé de porter un masque avec filtre B1P1, des gants en nitrile ou en latex et des lunettes lors de sa manipulation.

### 3.1.5 DÉCOMPOSITION DE L'ACIDE PERACÉTIQUE

L'acide peracétique est un composé relativement instable. Il se décompose de manière majoritaire selon trois réactions [18] :

- Réaction spontanée :  $2\text{CH}_3\text{COOOH} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{O}_2$
- Réaction d'hydrolyse :  $2\text{CH}_3\text{COOOH} + [\text{M}] \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{O}_2 + [\text{M}]$
- Réaction catalysées par les ions métalliques :  $2\text{CH}_3\text{COOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}_2$

#### 3.1.5.1 ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Comme il est possible de le constater à partir des produits de réaction de décomposition, l'APA est un biocide<sup>1</sup> sans résidu toxique. Il peut donc être rejeté à l'égout après dilution au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau.

### 3.1.6 DIFFÉRENCES ENTRE ACIDE PERACÉTIQUE ET PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Les deux principaux produits utilisés pour la stérilisation chimique de surface en isolateur sont l'acide peracétique et le peroxyde d'hydrogène. [42] Pourquoi avoir choisi l'acide peracétique plutôt que le peroxyde d'hydrogène ?

Le PH est un décontaminant de surface efficace qui convient bien aux isolateurs. Le temps de contact augmente avec la quantité de matériel devant être stérilisé. Le PH est particulièrement efficace pour la stérilisation de surfaces lisses comme le métal et le verre. [43]

Le PH est un liquide incolore miscible à l'eau. C'est un acide faible, qui, sous forme pure, est stable à température et pression normale. Cependant, les solutions aqueuses de peroxyde se décomposent facilement en libérant de l'oxygène. Cette décomposition est provoquée par diverses substances (métaux lourds, impuretés etc.), le pH (diminution de la stabilité si le pH augmente), la température (accélération de la décomposition lorsque la température augmente) et les radiations. Il agit en se décomposant en radicaux hydroxyles. [44]

Le PH est un oxydant puissant pouvant réagir fortement (combustion spontanée, détonation) avec certains produits organiques (acétone, acétaldéhyde, alcools etc.). Les solutions concentrées peuvent provoquer l'inflammation spontanée de matériaux tels que le bois, le coton, la paille etc.

Le PH est irritant pour les yeux, les muqueuses et la peau. De profondes inhalations de PH peuvent provoquer des œdèmes pulmonaires aigus et une forte irritation de la gorge et du nez. Un empoisonnement aigu provoque maux de têtes, tremblements, vomissements, diarrhées, convulsions, confusion, œdème pulmonaire et inconscience.

La toxicité du PH et de l'APA est relativement proche, bien que l'acide peracétique ait montré une mutagénicité moins élevée que le PH.

Cependant d'un point de vue environnemental, le PH est plus sûr car il se décompose en eau et en oxygène et non pas en résidus acides.

Il semblerait que le PH n'ait qu'un effet bactériostatique contrairement à APA qui serait également bactéricide. [36]

L'acide peracétique présente une meilleure diffusion et le temps de stérilisation est plus court qu'avec le PH.

---

<sup>1</sup> Produit détruisant les micro-organismes

Il est important de noter que le peroxyde d'hydrogène n'a pas d'odeur et nécessite donc un détecteur chimique pour déceler une fuite. L'acide peracétique ayant une forte odeur vinaigrée, il est très vite détectable en cas de fuite (le nez est sensible à l'odeur de l'acide acétique au ppm). [43]

En ce qui concerne les paramètres à maîtriser lors de la stérilisation, l'acide peracétique possède beaucoup moins de facteurs limitants que le peroxyde d'hydrogène. En effet, le taux d'humidité ainsi que la température de l'isolateur ne sont pas très importants, bien que la présence de zones froides au sein de l'isolateur pourrait provoquer la condensation de la vapeur de Soproper<sup>®</sup> et le temps de séchage serait donc rallongé l'efficacité de l'APA n'est cependant pas diminuée. [17]

Il a été démontré que la combinaison d'APA et de PH est synergique. Ce synergisme augmente avec le temps de contact. Il est très certainement dû à une action sporicide complémentaire et à la production d'APA supplémentaire par réaction entre le PH et l'acide acétique (produit de dégradation de l'acide peracétique). Ce synergisme permet de diminuer la concentration en APA et en PH de deux à huit fois par rapport à une utilisation séparée. [45] Cette synergie est mise à profit dans le Soproper<sup>®</sup> qui contient de l'acide peracétique (3.5%), du peroxyde d'hydrogène (~30%) et de l'acide acétique.

Le choix du Soproper<sup>®</sup> est donc justifié, bien que son prix soit plus de 3 fois supérieur à celui du peroxyde d'hydrogène.

### 3.2 FONCTIONNEMENT DU STÉRILISATEUR ET DE L'ISOLATEUR

Le stérilisateur MAN 230 de Getinge-La Calhène est composé d'un corps en acier inoxydable comprenant un réservoir d'évaporation, un débit-mètre, un régulateur de température, une condensateur et un équipement électrique.

L'isolateur de transfert deux gants Getinge-La Calhène est formé d'une enveloppe souple en PVC transparent d'un volume de 0.95 m<sup>3</sup>. Il comporte deux manchettes montées de gants.

La ventilation et la filtration de l'air se font via des filtres HEPA.

Le stérilisateur chauffe l'acide peracétique à 45°C et ses vapeurs sont propulsées par air comprimé à l'intérieur de l'isolateur. A la fin du cycle de stérilisation, un cycle d'aération a lieu afin d'évacuer les vapeurs résiduelles d'acide peracétique.

Il est à noter que les vapeurs d'acide peracétique ne se condensent pas sur le matériel et que ce dernier n'est par conséquent pas mouillé par l'agent stérilisant.

Cf. Mode d'emploi (annexe 1).

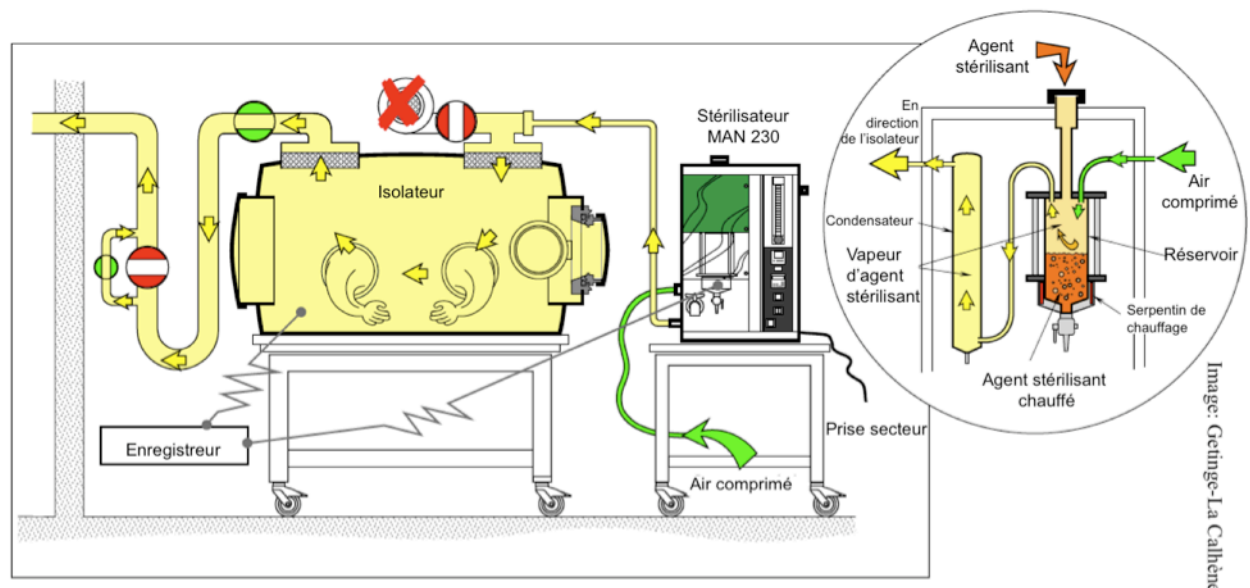


Figure 2 : Fonctionnement du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert deux gants Getinge-La Calhène

### 3.3 BIO-INDICATEURS

La Ph. Eur 6 et l'USP 31 recommandent l'utilisation de *Geobacillus stearothermophilus* (anciennement *Bacillus stearothermophilus*) pour la validation de la méthode de stérilisation, car c'est la souche la plus résistante au PH et à l'APA. Elle est plus résistante que les spores de *Bacillus subtilis*. [43] Les *Bacillus* sont des bactéries gram+ aérobies qui produisent des endospores connues pour leur grande résistance à la chaleur, aux produits chimiques, à la sécheresse et leur viabilité dans des milieux pauvres en nutriments. [45] Les souches de *Geobacillus stearothermophilus* recommandées par la Ph. Eur 6 sont ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 ou CIP 52.81.

Pour les essais de stérilité lors de stérilisation à l'acide peracétique, il est recommandé d'utiliser des petits disques en acier inox comme support. En effet, la stérilisation à l'acide peracétique est utilisée dans le but de décontaminer les surfaces exposées et non pas de stériliser des surfaces critiques en contact avec le produit (contrairement à la stérilisation à la vapeur sèche ou à l'oxyde d'éthylène). L'utilisation de bandelettes de papier comme support aux micro-organismes n'est pas recommandée car il y a des risques de faux-positifs (inclusions de spores entre les fibres de papier) et de faux-négatifs (par absorption de l'acide peracétique sur le papier). Ces risques ne sont pas présents avec les supports en acier inox. [46]

Il est important de connaître la biocharge (c'est à dire le nombre et le type de micro-organismes présent sur une surface définie) du matériel introduit dans l'isolateur avant de procéder à une stérilisation car tout procédé dépend du degré initial de contamination. La connaissance de la biocharge initiale permet par conséquent de déterminer quels bio-indicateurs seront utilisés. Par manque de temps, l'évaluation de la biocharge du matériel entrant en zone B, n'est basée que sur les données de la littérature, ainsi que sur les recommandations faites par l'USP 31, la Ph. Eur 6 et les BPF.

L'USP 31 préconise, dans le cas d'un processus de stérilisation où l'on veut exterminer tous les germes (overkill), d'utiliser des bio-indicateurs possédant  $10^6$  spores, en se basant sur la supposition que la biocharge est égale à un million d'organismes hautement résistants. La Ph. Eur. 6 quant à elle, recommande d'utiliser des BI comportant  $5 \cdot 10^5$  spores par support (ce qui revient à utiliser une biocharge de  $10^6$  par support).

Le Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication ne préconise rien, mais mentionne seulement que des bio-indicateurs de  $10^6$  sont habituellement utilisés dans le cas de validation d'isolateurs. [7]

Diverses études de la biocharge des dispositifs et autres matériels médicaux ont été menées et il en ressort que la charge microbiologique moyenne est inférieure à  $10^3$  [47, 48], voire à  $10^4$  [49]. Par conséquent, en utilisant des BI contenant  $10^6$  spores, une grande marge de sécurité est prise.

Les bio-indicateurs suivants ont donc été utilisés pour la validation de l'isolateur : Raven Stainless Steel Spore Discs  $10^6$  *Geobacillus stearothermophilus* ATCC n° 7953, lot n° 3369442.

Le milieu de culture recommandé par la Ph. Eur 6 et l'USP 31 pour la réalisation des tests de stérilité est le Modified Tryptic Soy Broth (mTSB), en français bouillon caséine-soja modifié. Ce milieu est principalement utilisé pour la recherche de germes aérobies, de levures et de moisissures, contrairement aux milieux à base de thioglycolate qui sont destinés à la recherche de bactéries anaérobies.

Les milieux de culture suivants ont été utilisés lors de la validation de l'isolateur : Raven Modified Tryptic Soy Broth, lot n° 090471. Ils virent du violet au jaune lorsqu'il y a croissance.

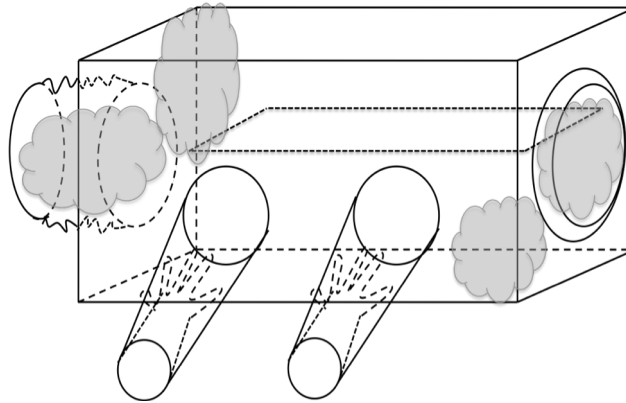
## 4 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE

Des tests d'orientation ont été effectués en premier lieu afin de définir divers paramètres nécessaires à la validation, tels que la détermination des zones critiques de l'isolateur, l'emplacement des BI, l'emplacement et l'utilisation des bandelettes réactives à l'acide peracétique, le temps minimal de stérilisation, le temps minimal d'aération de l'isolateur etc.

Cf. Rapport de développement (annexe 2).

### 4.1 DÉTERMINATION DES ZONES CRITIQUES ET COMPTAGE PARTICULAIRE

Un test au moyen de fumigènes a été tout d'abord effectué afin de déterminer les zones « sales » de l'isolateur (zones étant aérées moins rapidement). Sachant où se trouvent les zones critiques, il est possible de choisir plus facilement l'emplacement du compteur à particules et des bio-indicateurs. [17] Le test consiste à générer de la fumée au moyen d'une ampoule fumigène Dräger CH 25301 dans l'isolateur fermé et ventilé. La fumée permet ainsi de visualiser les zones les moins aérées et donc, les plus « sales ».



**Figure 3 :** Emplacement des zones critiques de l'isolateur

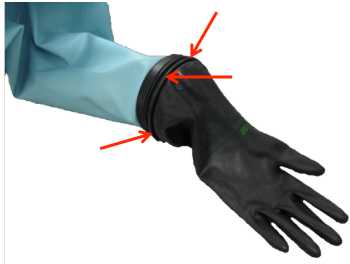
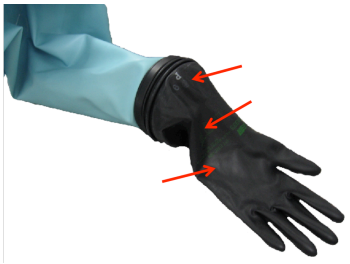
Un test d'orientation a été réalisé avec le compteur à particules afin de se familiariser avec l'appareil et également pour mesurer la classe de propreté de l'isolateur lors qu'il est ouvert. Ceci nous a permis de constater que l'isolateur se trouve en classe ISO 7 lorsqu'il n'est pas fermé et ventilé.

Il a fallu nettoyer l'intérieur de l'isolateur avant de commencer les mesures car la poussière accumulée empêchait d'atteindre une classe ISO 5 en moins de 45 minutes. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'importance d'un nettoyage mensuel de l'isolateur.

### 4.2 TESTS D'ÉTANCHÉITÉ

Afin de s'assurer de la sensibilité du manomètre à disposition, le test d'étanchéité a été effectué à plusieurs reprises, d'abord avec des gants étanches, puis en perçant un gant à divers endroits. Pour ce faire, un gant en néoprène de l'isolateur a été remplacé par un gant en latex (pour des raisons de coûts) percé à divers endroits. Les trous sont d'environ 1 mm de diamètre. A chaque fois, le  $\Delta P/\text{min}$  et le taux de fuite ont été calculés (pour le procédé de mesure et les équations, se reporter au point 5.1.1 page 23).

**Tableau 5 :** Résultats obtenus lors de tests d'étanchéité avec gants troués ou non

	Gant non troué	Gant troué : cas n°1	Gant troué : cas n°2
Emplacement des trous	/		
Pression de départ [Pa]	100	113	120
Pression après 10 minutes [Pa]	96	107	44
$\Delta P$ [Pa]	4	6	76
$\Delta P/\text{min}$ [Pa/min]	0.4	0.6	7.6
Température à l'intérieur de l'isolateur [°C]	20	20.5	21
Taux de fuite [% vol/heure]	0.024	0.036	0.45

Lors de ces tests, il a tout d'abord été possible de confirmer l'étanchéité de l'isolateur de transfert, le  $\Delta P/\text{min}$  et le taux de fuite respectant les spécifications (respectivement  $\leq 1.6$  Pa/min et  $\leq 0.1\%$ ). En trouant les gants de diverses façons, il a été également possible de mettre en évidence qu'une fuite est engendrée uniquement lorsqu'il y a un trou comme dans le cas n°2. En effet, les emplacements des trous du cas n°1 ne péjorent pas l'étanchéité de l'isolateur.

De toute façon, en cas de fuite, l'opérateur s'en rendra vite compte, l'odeur de l'acide peracétique étant détectable à une très faible concentration (de l'ordre du ppm).

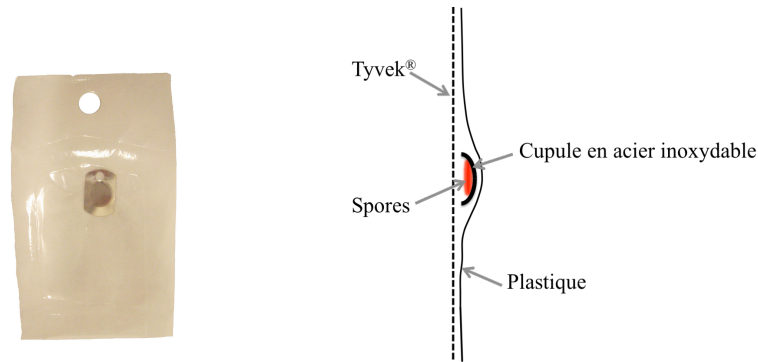
### 4.3 BIO-INDICATEURS ET TEMPS DE STÉRILISATION

Nous étions tout d'abord partis dans l'optique de valider l'isolateur à vide (lors du OQ) et en worst case (lors de PQ). Les premiers tests d'orientation ont été effectués à vide et les bio-indicateurs utilisés étaient des bandelettes de papier et non pas des disques en acier inoxydable comme le conseillaient le fabricant et divers articles. Nous avons procédé ainsi pour une question financière (les bandelettes étant 5 fois moins chères que les disques inox) et la pharmacie possédant encore un lot de bio-indicateurs proches de la date d'expiration.

Après la visite de l'unité de fabrication des cytostatiques au Triemli Stadtsptal de Zürich et l'entretien avec son responsable, le pharmacien Camillo Cettuzzi, nous avons décidé de revoir entièrement le déroulement de la validation.

Des bio-indicateurs sous forme de disque en acier inoxydable ont été finalement choisis, pour des raisons de facilité d'utilisation et également pour suivre les recommandations des divers fabricants [20, Mecolab, Getinge-La Calhène etc.]. Ces disques sont emballés dans du Tyvek® (matériau synthétique non tissé fabriqué à partir de fibres de polyéthylène) perméable aux vapeurs d'acide peracétique. Ceci permet de les utiliser sans devoir les sortir de leur emballage, diminuant ainsi le risque de contamination de l'isolateur et de l'opérateur. De plus, cette méthode permet d'effectuer une validation réellement « worst case » : non seulement la biocharge des BI est de  $10^6$ , mais en plus l'emballage fait office de barrière que l'acide peracétique va devoir passer. [50]



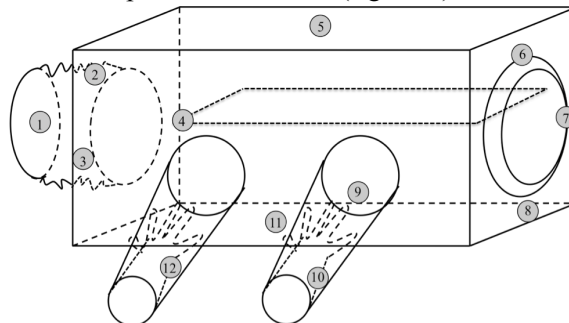


**Figure 4 :** Bio-indicateur Raven Stainless Steel Spore Discs 10<sup>6</sup> *Geobacillus stearothermophilus* ATCC n° 7953

Il a été également décidé de ne valider l'isolateur qu'en mode « worst case ». En effet, il est superflu de valider la capacité de stérilisation de l'isolateur à vide s'il est possible de prouver l'efficacité de la stérilisation dans les pires conditions possibles. Cependant, un cycle de stérilisation à vide a tout de même été effectué afin de prouver que la stérilisation est reproductible, tant lorsque l'isolateur est plein que lorsqu'il est vide.

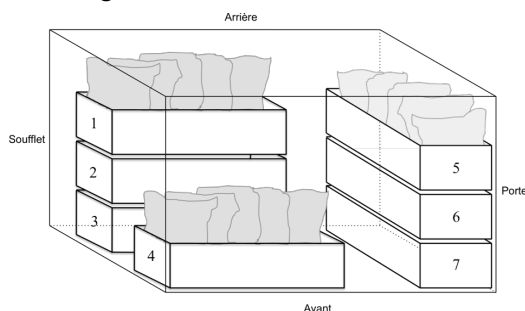
En ce qui concerne la durée de stérilisation, les fabricants du Sopropo<sup>®</sup> et Getinge-La Cahlène conseillent une heure de stérilisation par gant ou deux heures pour un isolateur de quelques mètres cubes. L'isolateur considéré possédant deux gants et ayant un volume d'environ 1 m<sup>3</sup>, nous avons fixé le temps de stérilisation à deux heures. Les résultats microbiologiques obtenus sont négatifs (absence de croissance) ce qui signifie que le temps de contact de l'agent stérilisant est suffisant.

L'emplacement des BI a dû être déterminé. Dans le cas de l'isolateur vide, douze BI ont été placés majoritairement dans les endroits les plus défavorables (figure 5).



**Figure 5 :** Emplacement des BI dans l'isolateur vide

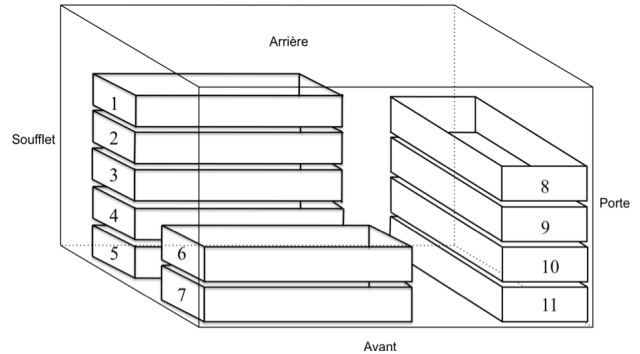
Dans le cas de l'isolateur chargé, les paniers avaient, dans un premier temps, été placés de manière à permettre de disposer les emballages verticalement pour gagner de la place (cf. point 4.4). Les emballages se touchant entre eux, des bio-indicateurs ont été placés entre les emballages afin de vérifier si la stérilisation était totale à ces endroits aussi. Ceci a permis de mettre en évidence le fait qu'il ne faut pas que deux objets se touchent dans l'isolateur pour permettre la stérilisation de toutes les surfaces. En effet, les spores présentes sur les BI entre les emballages qui étaient en contact l'un avec l'autre ont germé lors de l'incubation.



**Figure 6 :** Positionnement des emballages dans les paniers du haut (à gauche) et emplacement des BI entre deux emballages (à droite)

C'est pourquoi l'emplacement des paniers dans l'isolateur a été revu ainsi que l'emplacement des BI (figure 7) et c'est cette configuration qui a été retenue pour la validation PQ.

- ① Au fond du soufflet (cf. emplacement 1 de la figure 5)
- ② Dans le gant de gauche (cf. emplacement 12 de la figure 5)
- ③ Dans le gant de droite (cf. emplacement 10 de la figure 5)
- ④ Dans la porte (cf. emplacement 6 de la figure 5)
- ⑤ Sous le panier n°1
- ⑥ Sous le panier n°3
- ⑦ Sous le panier n°5
- ⑧ Sous le panier n°6
- ⑨ Sous le panier n°7
- ⑩ Sous le panier n°8
- ⑪ Sous le panier n°10
- ⑫ Sous le panier n°11



**Figure 7 :** Emplacements des BI dans l'isolateur chargé (les BI ne sont pas représentés sur le schéma)

Lors de chaque essai microbiologique, deux témoins sont mis en culture en même temps que les BI ayant subi le cycle de stérilisation :

- Témoin négatif du milieu de culture : le témoin milieu est incubé dans les mêmes conditions que les bio-indicateurs inoculés. Ce témoin a subi un cycle de stérilisation, mais ne contient pas de spores. Il ne doit pas donner lieu à une croissance de spores (le milieu ne change pas de couleur (violet)).
- Témoin positif : témoin de viabilité du milieu de culture : le témoin milieu est incubé dans les mêmes conditions que les bio-indicateurs inoculés. Ce témoin a subi un cycle de stérilisation mais contient des spores qui n'ont pas subi de stérilisation. Il doit donner lieu à une croissance des spores (mise en évidence par un changement de coloration du milieu (jaune)).



**Figure 8 :** Témoin positif (à gauche) et témoin négatif (à droite)

#### 4.4 MATÉRIEL CHARGÉ DANS L'ISOLATEUR

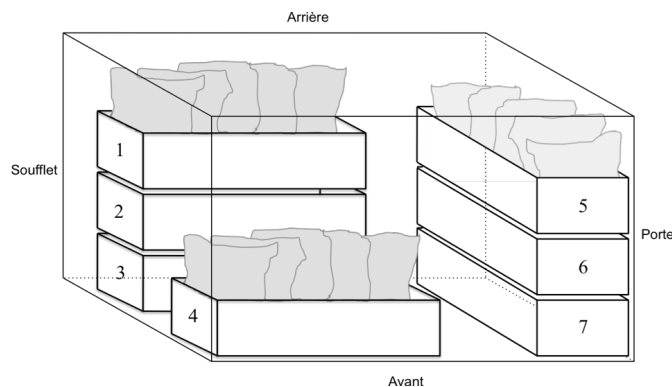
La validation d'un isolateur étant liée à ce qu'il contient, il a fallu définir le type de charges validées. Une charge maximale (worst case) a été définie, De cette manière, lors de l'utilisation de routine, toute charge n'excédant pas la charge maximale peut être stérilisée. Cette charge est mixte et est composée de poches, de seringues, d'aiguilles etc. emballées dans des emballages papier/plastique. Il est à noter que les principes actifs et les excipients ne seront pas, du moins dans un premier temps, stérilisés dans l'isolateur, mais seront toujours désinfectés à l'alcool avant de passer en zone B par un sas de transfert. En effet, la plupart de ces produits doivent être gardés au frigo ou à l'abri de la lumière et leur quantité est très variable d'une semaine à l'autre, car elle dépend de la demande hospitalière qui varie tout le temps.

Le postulat de départ était que les matériels emballés dans du papier/plastique étaient plus difficile à décontaminer, ne pouvant pas être plongé dans l'alcool, contrairement au matériel de type ampoule ou flacon. C'est la raison pour laquelle le matériel emballé dans du papier/plastique a été choisi comme matériel pour la validation worst case. Ce postulat a cependant été démenti par des prélèvements microbiologiques effectués ultérieurement (cf. Perspectives p. 31-32).

Le volume de la charge ne peut pas excéder 80% du volume de l'isolateur. Il faut également penser à respecter un espace minimum entre les éléments à stériliser de manière à permettre la circulation de l'agent stérilisant. [17]

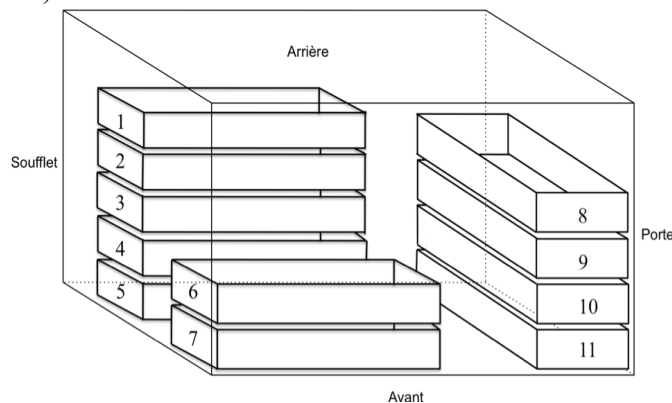
Pour faciliter le chargement et le déchargement de l'isolateur, le matériel à stériliser est introduit dans de grands paniers empilables en inox (59 x 29 x 18 cm). Il a fallu déterminer le nombre de paniers qu'il est possible de placer dans l'isolateur tout en permettant toujours leur manipulation.

Nous avons tout d'abord pensé à ne mettre que 7 paniers ce qui permettait de mettre plus d'emballages dans les paniers supérieurs en les positionnant verticalement (figure 9).



**Figure 9 :** Chargement de l'isolateur (première version)

Cependant nous craignons que le contact entre les divers emballages ne permette pas une bonne stérilisation. Pour vérifier ceci, des bio-indicateurs ont été placés à l'interface entre deux emballages. Les résultats ont montré que la stérilisation n'est pas complète aux endroits où le matériel est en contact. L'arrangement des paniers a donc été revu et il a été décidé de placer 11 paniers (57 x 28 x 12 cm) dans l'isolateur, mais de remplir chaque panier de manière à ce qu'aucun objet de la charge n'en touche un autre (figure 10).



**Figure 10 :** Chargement de l'isolateur (seconde version)

Nous avons décidé de suremballer le matériel dans un emballage papier/plastique et de former ainsi des « kits », pour deux raisons principales : premièrement, afin de faciliter l'introduction et la sortie du matériel dans l'isolateur. Deuxièmement, pour pouvoir effectuer une première stérilisation à l'oxyde d'éthylène. Le papier étant perméable à l'oxyde d'éthylène, cette première stérilisation permet de décontaminer l'extérieur des emballages primaires du matériel. La phase de stérilisation à l'acide peracétique dans l'isolateur sert donc à décontaminer l'extérieur des emballages des kits avant leur entrée dans les locaux de zone B.

Il a fallu évaluer la quantité et le type de matériel utilisé hebdomadairement pour la fabrication des TPN afin de pouvoir confectionner des « kits » à faire stériliser par la Stérilisation Centrale du CHUV. Cette estimation a été obtenue en multipliant la quantité et le type de matériel utilisé le jour le plus « rempli » de la semaine par 5.

A partir de cette estimation hebdomadaire, nous avons confectionné des kits de manière à ce que l'on puisse en mettre un (voire deux) par panier. Pour les objets de petite taille, les kits contiennent la quantité de matériel nécessaire à deux semaines de production.

Cf. Instructions pour la préparation des kits (annexe 3).

**Tableau 6 :** Consommation moyenne hebdomadaire de matériel pour la fabrication de TPN et composition des kits.

Matériel	Quantité hebdomadaire	Nombre d'unités par « kit »	Nombre de kits
Champ stérile adhésif	40	10	4
Poche Di mix <sup>®</sup> EVA pour l'alimentation parentérale 3000 mL	30	5	6
Poche Di mix <sup>®</sup> EVA pour l'alimentation parentérale 1000 mL	50	5	10
Poche de mélange Freka <sup>®</sup> mix en EVA 150 mL	40	5	9
Cassette <sup>5</sup> CADD <sup>™</sup> 100 mL	20	5	4
Seringue pour perfusion avec aiguille 50 mL	50	10	5
Seringue 20 mL	10	10	1
Seringue 10 mL	20	20	1
Seringue 5 mL	10	20	1
Seringue 3 mL	5	10	1
Seringue 1 mL	5	10	1
Bouchon Baxa Codan Combi-Lock	20	40	1
Prolongateur de pousse-seringue 150 cm	15	30	1
Aiguille 1.1x40 mm	100	100	1
<b>Nombre total de kits par semaine</b>			<b>46</b>



**Figure 11 :** Consommation moyenne hebdomadaire de matériel pour la fabrication de TPN

Connaissant le nombre de kit à stériliser chaque semaine, nous avons pu en déduire le nombre de cycles de stérilisation nécessaires chaque semaine. Les kits ont été placés dans les 11 paniers de l'isolateur de manière optimale. Les petits emballages (aiguilles, bouchons Baxa<sup>®</sup>, seringues de petite

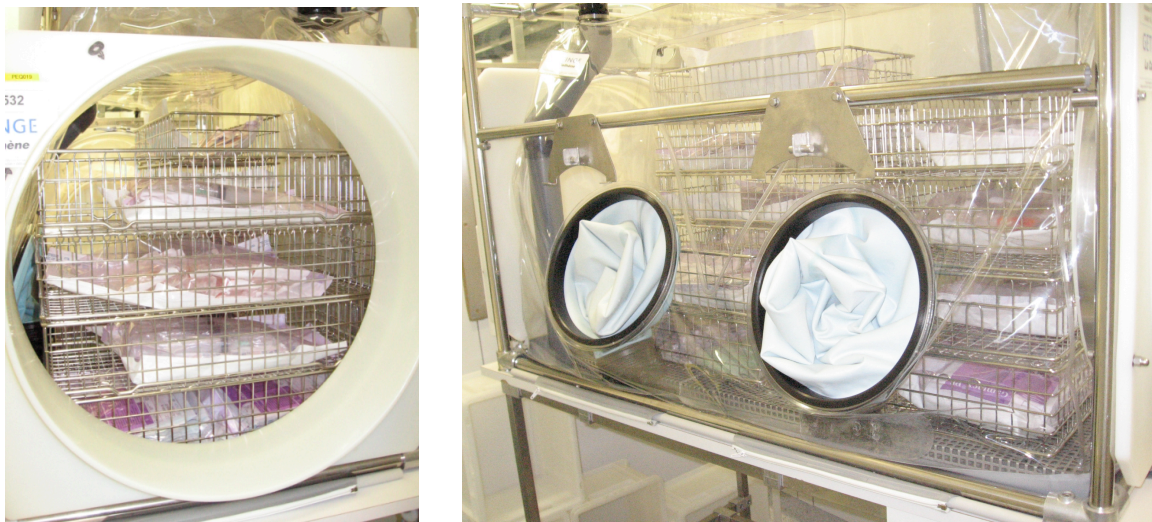
<sup>5</sup> Réservoir pour pompe à perfusion ambulatoire programmable



capacité et cassettes) ont trouvé place à plusieurs dans les paniers. Nous sommes arrivés ainsi à une moyenne de 4 stérilisations par semaine.



**Figure 12 :** Exemple de positionnement des kits dans les paniers avant le chargement de l'isolateur



**Figure 13 :** Isolateur de transfert chargé (worst-case)

#### **4.5 TEMPS D'AÉRATION DE L'ISOLATEUR ET RÉSIDUS D'ACIDE PERACÉTIQUE**

Durant les tests de développement, une technique de dosage des résidus d'acide peracétique a été mise au point (cf. point 3.1.2, page 9). Cette méthode est surtout indicative et ne permet pas d'obtenir un résultat très précis. En effet, le résultat obtenu avec les bandelettes réactives utilisées est semi-quantitatif. De plus, la lecture du résultat est subjective, car elle se fait par comparaison visuelle de la zone réactive avec une échelle colorimétrique. Finalement, la zone réactionnelle peut continuer à changer de couleur après que le temps de lecture soit passé. Il convient donc d'interpréter les résultats de manière appropriée et de ne pas se baser sur les photocopies des bandelettes, mais sur les bandelettes elles-mêmes 1 minute après ouverture des conteneurs pour en déduire les temps d'aération nécessaires de l'isolateur.

Les bandelettes ont, dans un premier temps, été introduites dans des piluliers en plastique qui étaient placés dans l'isolateur. Un pilulier était ouvert à des intervalles prédéfinis et les bandelettes réactives

étaient alors imbibées d'eau. L'eau utilisée était de l'eau injectable contenue dans des ampoules en plastique de 20 mL (Mini-Plasco®). Cependant, les piluliers n'étaient pas étanches et laissaient entrer l'APA. Par conséquent, les bandelettes viraient durant la phase de stérilisation.

Il a donc été décidé de mettre les bandelettes préalablement humidifiées dans des bouteilles en verre. Le problème a été ainsi résolu, ces conteneurs étant étanches à l'acide peracétique.

Puisqu'il faut également démontrer qu'il n'y a pas de résidus d'acide peracétique à l'intérieur des emballages après stérilisation, des bandelettes ont été introduites dans des emballages papier/plastique refermés par thermosoudure, ainsi que dans des emballages de seringues papier/plastique, eux-mêmes emballés dans un emballage papier/plastique. Après environ 10 minutes de stérilisation, les bandelettes changeaient déjà de couleur... L'acide peracétique pénètre donc facilement le papier, bien que deux couches d'emballage retarde la pénétration d'APA.

Ainsi, il a été décidé de mesurer le temps d'aération nécessaire de l'isolateur pour permettre l'évacuation de l'acide peracétique contenu dans les emballages. Pour ce faire, des bandelettes réactives ont été introduites dans des bouteilles en verre qui ont été emballées dans un emballage papier/plastique de taille suffisante pour permettre de manipuler les bouchons et d'ouvrir les bouteilles sans desceller l'emballage et permettre ainsi la mesure des résidus d'APA dans celui-ci.

**Tableau 7 :** Conteneur et emballage des conteneurs des bandelettes réactives

Bandelettes réactives à l'acide peracétique Merck	Bandelette dans pilulier en plastique	Bandelette dans emballage papier/plastique	Bandelette dans double emballage papier/plastique	Bandelette dans bouteille en verre	Bandelette dans bouteille en verre dans emballage papier/plastique
					

Plusieurs cycles stérilisation-aération en mode manuel et en mode automatique ont été effectués afin de déterminer le temps minimal d'aération permettant une évacuation maximale des vapeurs de Soprop®. Des bandelettes dans des bouteilles en verre et des bandelettes dans des bouteilles emballées étaient à chaque fois introduites dans l'isolateur et les bouteilles étaient ouvertes durant la phase d'aération à des intervalles définis. Ces tests d'orientation ont permis de définir les temps d'aération minimaux suivants :

- aération en mode manuel : 8 heures
- aération en mode automatique : 12 heures

Une dernière question reste encore à étudier : celle de la perméabilité des plastiques à l'acide peracétique. Après des recherches dans la littérature, il été possible de faire une liste non exhaustive des types de plastiques perméables à l'APA et de ceux qui ne le sont pas.

**Tableau 8 :** Perméabilité des plastiques à l'acide peracétique

Plastiques perméables à l'APA	Plastiques non perméables à l'APA
Éthyle vinyle acétate (EVA) [25, 28]	Polyéthylène [25]
Polychlorure de vinyle (PVC) [22, 23, 25]	Polyamide [25]
Latex sans PVC [22]	Polypropylène [25]

Plusieurs articles ont démontré qu'il était préférable de stériliser les poches dans leur emballage d'origine car cela réduisait la perméation de l'acide peracétique. [22, 25]

On pense que la perméation de l'acide peracétique dans les plastiques doit être dépendante de la structure physique du polymère. Le PVC et l'EVA sont connus pour être perméables aux gaz tels que la vapeur d'eau, l'oxygène et le dioxyde de carbone. [25, 51]

Une étude a même montré une augmentation de la concentration en APA dans les poches en EVA au fil du temps, ce qui signifierait que l'EVA absorbe l'acide peracétique et le relâche progressivement. Donc même si une poche en EVA vide est stérilisée à l'acide peracétique, il y a un risque de relargage d'acide peracétique une fois la poche remplie. [28]

Cependant on ne connaît pas la toxicité et les risques encourus par les patients s'il y a présence d'APA dans l'infusion. Le risque principal est dû aux interactions physico-chimiques possibles entre les produits contenus dans le Soprop<sup>®</sup> et le contenu des poches (baisse de pH, oxydation) entraînant une baisse de stabilité ainsi que la formation de nouvelles entités chimiques potentiellement toxiques. [22, 25, 27]

A la pharmacie centrale du CHUV, les poches vides qui devraient être stérilisées dans l'isolateur sont en EVA... Il va donc falloir trouver d'autres poches qui ne soient ni en PVC, ni en EVA.

Les autres types de matériel (seringues, flacons etc.) étant en polyéthylène ou en polypropylène, ils ne posent pas de problème.

#### **4.6 CONCEPTION D'UN MODE D'EMPLOI**

Une fois les essais de développement terminés, une certaine expérience a été acquise et les détails auxquels il faut faire attention ont pu être mis en évidence. Grâce aux tests d'orientation, les temps minimaux de stérilisation et d'aération ont été déterminés.

Toutes ces connaissances ont permis de concevoir un mode d'emploi pour l'utilisation en routine de l'isolateur et du stérilisateur. Ce mode d'emploi regroupe les précautions d'emploi, les instructions d'utilisation, la procédure de chargement de l'isolateur, les tests d'étanchéité à effectuer ainsi que les diverses maintenances.

Cf. Mode d'emploi (annexe 1).

## 5 MÉTHODE

En nous basant sur les tests de développement et sur la littérature, nous avons pu rédiger un protocole de qualification opérationnelle et un protocole de qualification de performances. [6, 7, 13, 17, USP 31] Ces deux protocoles ont été approuvés par le Pharmacien responsable de fabrication, la Pharmacienne responsable du contrôle-qualité et la Pharmacienne responsable de l'assurance-qualité de la pharmacie du CHUV.

### 5.1 OQ

La validation de qualification opérationnelle a pour but de :

- démontrer l'étanchéité de l'enceinte de l'isolateur de transfert 2 gants ;
- localiser les éventuelles fuites ;
- assurer l'atteinte d'une classe ISO 5 (à vide);
- démontrer la reproductibilité de la répartition de vapeur stérilisante à l'intérieur de l'isolateur.

Pour ce faire divers tests sont effectués : test d'étanchéité, test de localisation des fuites, comptage particulière dans l'isolateur et essais de reproductibilité des cycles du stérilisateur.

Cf. Protocole OQ (annexe 4).

#### 5.1.1 TEST D'ÉTANCHÉITÉ DE L'ENCEINTE DE L'ISOLATEUR

Lors de ce test, on vérifie que l'isolateur de transfert est étanche en déterminant le taux de fuite Tf de l'isolateur par chute de pression; Tf étant le rapport du débit de fuite de l'enceinte de l'isolateur à son volume dans des conditions normales d'utilisation (pression et température). Pour ce faire, un manomètre digital de précision (Metra 345.200.601) est utilisé.

Il faut tout d'abord s'assurer que la pression du local 564 est stabilisée et interdire l'accès au local durant le test, l'ouverture de la porte entraînant des changements de pression. Toutes les ouvertures de l'isolateur (portes et vannes) sont fermées après y avoir inséré un thermomètre. Le manomètre digital est connecté à l'isolateur à la place du manomètre de l'isolateur, puis l'isolateur est gonflé à une pression d'environ 120 Pa à l'aide du ventilateur. On laisse la pression se stabiliser pendant 10 minutes, puis la mesure de la chute de pression est effectuée durant 10 minutes.

Le taux de fuite Tf se calcule d'après la formule suivante :

$$Tf = 1/(\rho \cdot r \cdot T) \cdot (dP/dt) \cdot 100 \quad \text{[Équation 4]}$$

Où :

Tf = taux de fuite en % vol/heure

$\rho$  = masse volumique de l'air (1.19 kg/m<sup>3</sup>)

r = 287 J/kg°K

T = température en °K

dP/dt = variation de pression au cours du temps (Pa/heure)

Les critères d'acceptation sont un taux de fuite inférieur ou égal à 0.1% et une baisse de pression inférieure ou égale à 1.6 Pa.

#### 5.1.2 LOCALISATION DES FUITES

Le but de ce test est de localiser les éventuelles fuites en utilisant la méthode à l'ammoniaque afin de vérifier l'étanchéité de l'isolateur de transfert. Cette méthode est basée sur l'emploi d'un tissu révélateur d'ammoniaque au bleu de bromophénol qui vire du jaune au bleu en présence d'ammoniaque. L'isolateur est gonflé (~ 60 Pa). Après 30 minutes, le tissu révélateur est passé sur toutes les parties de l'isolateur durant 15 à 20 secondes sur chaque point de contrôle. L'absence de changement de couleur signifie que l'isolateur est étanche.



### 5.1.3 COMPTAGE PARTICULAIRE

Lors de ce test, la classe de propreté de l'isolateur au repos et en activité est vérifiée par évaluation des concentrations des particules en suspension dans l'isolateur avec une distribution granulométrique comprise entre 0.5 et 5 µm.

Pour ce faire, un compteur à particules est utilisé. Les mesures sont effectuées en deux points de l'isolateur, en mode d'aération manuelle et en mode d'aération automatique. A chaque emplacement, 3 mesures sont prises.

Les critères d'acceptation sont l'obtention d'une classe ISO 5 (soit 3500 particules de taille égale ou supérieure à 0.5 µm par mètre cube d'air et aucune particule de taille égale ou supérieure à 5 µm par mètre cube d'air et la limite de confiance supérieure de 95% (LSC) des concentrations de particules est inférieure à la limite de la classe) en moins de 45 minutes.

### 5.1.4 ESSAIS DE REPRODUCTIBILITÉ DES CYCLES DE STÉRILISATION

La reproductibilité de la production de vapeur d'agent stérilisant à l'intérieur de l'isolateur est vérifiée par contrôle des paramètres suivants sur trois cycles de stérilisation d'une heure: température de chauffage du Soprop<sup>®</sup>, débit et pression de l'air comprimé et consommation de Soprop<sup>®</sup>.

A la fin de la stérilisation, la consommation moyenne en Soprop<sup>®</sup> est calculée d'après l'équation 5 :

$$C_m \text{ [mL/heure]} = \frac{Q \text{ [mL]} - Q_r \text{ [mL]}}{t \text{ [heure]}} \quad \text{[Équation 5]}$$

où Q = quantité initiale de Soprop<sup>®</sup> introduite  
Q<sub>r</sub> = quantité résiduelle de Soprop<sup>®</sup>  
t = temps de stérilisation  
C<sub>m</sub> = consommation moyenne

Les critères d'acceptation sont les suivants : la variation des paramètres doit être inférieure à 5 % et la consommation en Soprop<sup>®</sup> doit se situer entre 50 et 80 mL/h.

## 5.2 PQ

La validation de qualification de performance a pour but de démontrer:

- l'efficacité d'un cycle de stérilisation de surface avec des bio-indicateurs ;
- que le stérilisateur MAN 230 et l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène effectuent des cycles de stérilisation reproductibles ;
- que le temps d'aération de l'isolateur est suffisant pour assurer la sécurité du personnel.

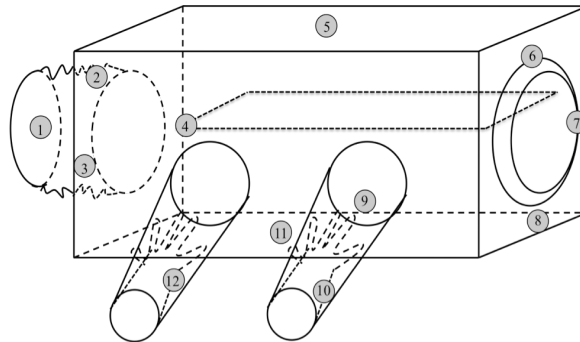
Les tests suivants ont dû être effectués : essais microbiologiques de stérilisation à vide et en worst case, contrôle du temps d'aération de l'isolateur en mode manuel et automatique et contrôle du taux résiduel d'acide peracétique dans les emballages après aération manuelle et automatique.

Cf. Protocole PQ (annexe 5).

### 5.2.1 ESSAI MICROBIOLOGIQUE DE STÉRILISATION À VIDE

Cet essai permet la vérification de l'efficacité d'un cycle de stérilisation de surface à vide en utilisant des bio-indicateurs contenant chacun 10<sup>6</sup> spores de *Geobacillus stearothermophilus* répartis aux emplacements critiques de l'isolateur. L'essai se fait dans l'isolateur vide une seule fois.

Il se déroule de la manière suivante : les BI sont fixés dans l'isolateur selon la figure 14 à l'aide de scotch. Après avoir introduit les milieux de culture et une pince de prélèvement dans l'isolateur, ce dernier est refermé et un cycle de stérilisation de deux heures est lancé. Après le temps requis d'aération en mode manuel (environ 8 heures), les bio-indicateurs sont décrochés, sortis de leur emballage et introduits dans les milieux de culture à l'aide de la pince. Les milieux sont mis à incuber avec les témoins à 55-60°C pendant maximum 48 heures.



**Figure 14 :** Emplacement des BI dans l'isolateur vide

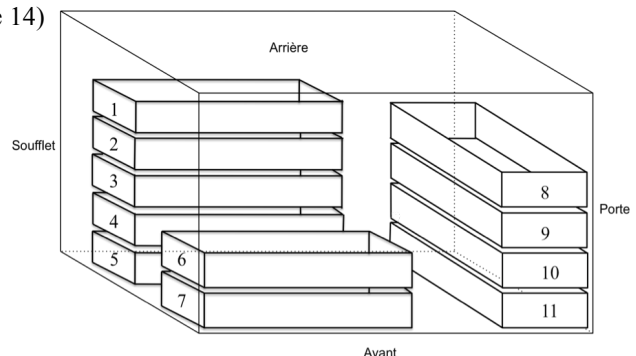
Le critère d'acceptation est l'absence de croissance après 48 heures au maximum (1<sup>ère</sup> lecture à 24h) et réduction de 6 log.

### 5.2.2 ESSAIS MICROBIOLOGIQUES DE STÉRILISATION EN CHARGE (WORST CASE)

Cet essai permet la vérification de l'efficacité des cycles de stérilisation de surface en utilisant des bio-indicateurs contenant chacun  $10^6$  spores de *Geobacillus stearothermophilus* répartis aux emplacements critiques de l'isolateur. L'isolateur est muni de la charge maximale qu'il peut contenir (worst case). L'essai est répété 3 fois.

Le test se déroule de la même manière que pour l'essai microbiologique de stérilisation à vide, mais les BI sont placés de la manière suivante :

- ① Au fond du soufflet (cf. emplacement 1 de la figure 14)
- ② Dans le gant de gauche (cf. emplacement 12 de la figure 14)
- ③ Dans le gant de droite (cf. emplacement 10 de la figure 14)
- ④ Dans la porte (cf. emplacement 6 de la figure 14)
- ⑤ Sous le panier n°1
- ⑥ Sous le panier n°3
- ⑦ Sous le panier n°5
- ⑧ Sous le panier n°6
- ⑨ Sous le panier n°7
- ⑩ Sous le panier n°8
- ⑪ Sous le panier n°10
- ⑫ Sous le panier n°11



**Figure 15 :** Emplacement des paniers et des BI dans l'isolateur (les BI ne sont pas représentés sur le schéma)

Les critères d'acceptation sont l'absence de croissance après 48 heures au maximum (1<sup>ère</sup> lecture à 24h) et réduction de 6 log sur trois essais consécutifs. Si l'un des essais n'est pas conforme, il faut rechercher les causes de la non-conformité, puis recommencer les trois essais consécutivement. Ceci est facultatif si, lors des tests d'investigation, l'origine de la déviation peut être expliquée et démontrée et qu'elle ne remet pas en cause le processus de validation.

### 5.2.3 CONTRÔLE DU TEMPS D'AÉRATION DE L'ISOLATEUR EN MODE MANUEL ET AUTOMATIQUE

Lors de ce test, on vérifie qu'après un temps d'aération défini (en mode automatique et en mode manuel), la concentration en agent stérilisant est compatible avec la sécurité des opérateurs et de l'environnement. L'isolateur est muni de la charge maximale qu'il peut contenir (worst case).

Une bandelette réactive préalablement humidifiée est introduite dans une bouteille en verre qui est placée dans l'isolateur. Un cycle de stérilisation de 2 heures est effectué, puis un cycle d'aération est lancé. A la fin du cycle, la bouteille est ouverte et le résultat est lu sur la bandelette après une minute.

Ce test est effectué trois fois en mode aération manuelle et trois fois en mode aération automatique.

Critères d'acceptation :

- mode automatique : concentration résiduelle en acide peracétique inférieur à 5 mg/L après 12 heures
- mode manuel : concentration résiduelle en acide peracétique inférieur à 5 mg/L après 8 heures

#### **5.2.4 CONTRÔLE DU TAUX RÉSIDUEL D'AGENT STÉRILISANT DANS LA CHARGE APRÈS AÉRATION**

On vérifie qu'après un temps d'aération défini (en mode manuel et en mode automatique), la quantité résiduelle d'agent stérilisant présente dans les emballages papier/plastique du matériel est compatible avec la sécurité des opérateurs et de l'environnement. L'isolateur est muni de la charge maximale qu'il peut contenir (worst case).

Une bandelette réactive préalablement humidifiée est introduite dans une bouteille en verre. Cette bouteille est placée dans un emballage papier/plastique puis introduite dans l'isolateur. Un cycle de stérilisation de 2 heures est effectué, puis un cycle d'aération est lancé. A la fin du cycle, la bouteille est ouverte sans ouvrir l'emballage papier/plastique et le résultat est lu sur la bandelette après une minute.

Ce test est effectué trois fois en mode aération manuelle et trois fois en mode aération automatique.

Critères d'acceptation :

- mode automatique : concentration résiduelle en acide peracétique inférieur à 5 mg/L après 12 heures
- mode manuel : concentration résiduelle en acide peracétique inférieur à 5 mg/L après 8 heures

## 6 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des divers tests ont été consignés dans des rapports. Ces rapports OQ et PQ ont été approuvés par le Pharmacien responsable de fabrication, la Pharmacienne responsable du contrôle-qualité et la Pharmacienne responsable de l'assurance-qualité de la pharmacie du CHUV.

### 6.1 OQ

Les résultats des test OQ obtenus sont tous conformes aux spécifications.  
Cf. Rapport OQ (annexe 6).

#### 6.1.1 TEST D'ÉTANCHÉITÉ DE L'ENCEINTE DE L'ISOLATEUR

L'isolateur a été gonflé jusqu'à 125 Pa. Après 10 minutes de stabilisation, la chute de pression a été mesurée pendant 10 minutes. Les résultats suivants ont été obtenus :

Pression de départ : 100 Pa

Pression après 10 minutes : 96 Pa

$\Delta P/\text{min} = 0.4 \text{ Pa}/\text{min}$

Taux de fuite : 0.024 % vol/heure

Le taux de fuite étant inférieur à 0.1% vol/heure et la baisse de pression de l'isolateur étant inférieure à 1.6 Pa/min, le statut d'étanchéité de l'enceinte de l'isolateur est conforme.

#### 6.1.2 LOCALISATION DES FUITES

Lors du test de fuite, aucune baisse de pression à l'intérieur de l'isolateur n'a été observée au cours des 30 minutes durant lesquelles l'ammoniaque diffusait dans l'isolateur.

Aucune coloration bleue n'a été observée lors de l'application du tissu sur toute la surface de l'enveloppe de l'isolateur ainsi que sur tous les joints.

Lorsque l'embout de la tubulure du manomètre a été appliqué sur le tissu révélateur (test positif), il y a eu coloration bleue du tissu, ce qui signifie que le test est valide.

Le statut d'étanchéité de l'isolateur de transfert est donc déclaré conforme.

#### 6.1.3 COMPTAGE PARTICULAIRE

Lors du comptage particulaire pour la détermination de la classe ISO de l'enceinte de l'isolateur, il a été démontré que la classe de propreté ISO 5 était atteinte en mode aération automatique et en mode aération manuelle en 20 minutes.

Le statut particulaire de l'isolateur est par conséquent déclaré conforme, une classe ISO 5 devant être obtenue en moins de 45 minutes.

#### 6.1.4 ESSAIS DE REPRODUCTIBILITÉ DES CYCLES DE STÉRILISATION

La consommation moyenne en Soproper<sup>®</sup> est de 75 mL/h. Elle se situe donc dans les normes (50-80 mL/h).

La variation des paramètres (température, débit d'air et pression d'air) est largement inférieure à 5 % (limite acceptable). La reproductibilité des cycles de stérilisation est donc bonne.

Il est à noter que la pression interne de l'isolateur a été mesurée à titre indicatif durant les cycles de stérilisation bien qu'elle ne fût pas demandée. La pression interne devrait se situer entre 5 et 7 mm H<sub>2</sub>O, mais ce paramètre subit de plus ou moins grandes variations. Ceci est principalement dû au fait que l'enveloppe de l'isolateur est souple et que, par conséquent, la pression extérieure a un grand impact sur la pression interne. Chaque fois que la porte du local est ouverte, la pression externe change, ce qui se répercute sur la pression interne de l'isolateur. Cependant, une pression légèrement supérieure à 7 ou inférieure à 5 est tolérable, n'ayant que peu d'influence sur le processus de stérilisation.

En conclusion, le statut de reproductibilité des cycles de stérilisation est jugé conforme.

## 6.2 PQ

Les résultats des test OQ obtenus sont tous conformes aux spécifications, l'unique déviation ayant pu être expliquée.

Cf. Rapport PQ (annexe 7).

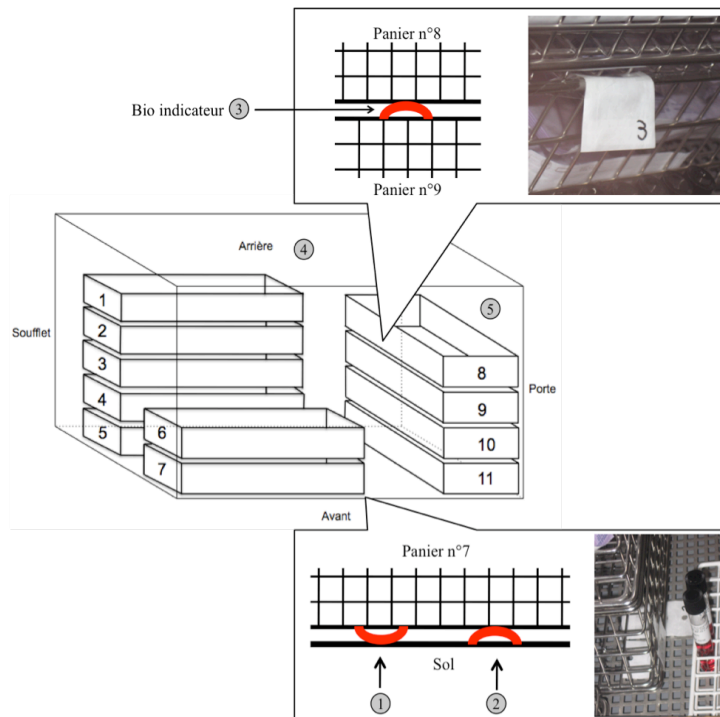
### 6.2.1 ESSAI MICROBIOLOGIQUE DE STÉRILISATION À VIDE

L'essai est conforme. Aucun bio-indicateur n'a donné lieu à une croissance microbienne. Le témoin positif étant positif et le témoin négatif étant négatif, il est possible d'affirmer qu'un cycle de stérilisation de deux heures dans l'isolateur vide permet de diminuer d'un log 6 la population microbienne.

### 6.2.2 ESSAIS MICROBIOLOGIQUES DE STÉRILISATION EN CHARGE (WORST CASE)

Deux des trois validations se sont correctement passées, les 12 bio-indicateurs n'ayant pas présenté de croissance. Cependant, lors de la troisième validation, le BI n°7 a poussé. Cette déviation a fait l'objet d'une investigation afin de rechercher la cause de la croissance du BI.

L'hypothèse était que cette déviation était due à son positionnement défavorable et non pas à un problème de temps de stérilisation ou de positionnement des charges. Afin de la vérifier, trois BI ont été placés dans des situations très défavorables, c'est-à-dire « coincés » entre deux paniers ou entre le panier et la grille du sol de l'isolateur comme expliqué sur la figure 16. Les BI 4 et 5 sont là comme témoins. Le cycle de stérilisation est de deux heures.



**Figure 16 :** Emplacement des BI lors du test d'investigation de la déviation

Les résultats obtenus sont les suivants : croissance du bio-indicateur n°1, mais absence de croissance pour les 4 autres bio-indicateurs. Le témoin positif est positif et le témoin négatif est négatif. Ceci permet de mettre en évidence qu'il y a croissance lorsqu'un BI est positionné de manière à ce que la surface en creux du BI qui contient les spores soit dirigée vers le haut et qu'elle soit « écrasée ». En effet l'agent stérilisant ne peut pas entrer en contact avec la surface contenant les spores du BI. Pourquoi cela n'est-il vrai que lorsque le BI est écrasé comme le BI n°1 et non pas comme les BI n°2

et 3 ? C'est très certainement parce que l'arrondi de la barre d'acier inox du panier épouse mieux la forme du BI et par conséquent, l'écrase plus.

Le cycle de stérilisation de deux heures dans l'isolateur vide permet de diminuer d'un log 6 la population microbienne. L'essai est considéré conforme, la déviation ayant pu être expliquée.

### **6.2.3 CONTRÔLE DU TEMPS D'AÉRATION DE L'ISOLATEUR EN MODE MANUEL ET AUTOMATIQUE**

Les concentrations en acide peracétique dans l'isolateur après 8 heures (aération manuelle) et 12 heures (aération automatique) sont inférieures à 5 mg/mL. Le temps d'aération de l'isolateur est donc suffisant pour évacuer les vapeurs de Soprop<sup>®</sup> de façon à ce que leur concentration soit compatible avec la sécurité des opérateurs et de l'environnement (inférieure à 5 mg/L).

### **6.2.4 CONTRÔLE DU TAUX RÉSIDUEL D'AGENT STÉRILISANT DANS LA CHARGE APRÈS AÉRATION**

Les concentrations en acide peracétique à l'intérieur des emballages après 8 heures (aération manuelle) et 12 heures (aération automatique) sont inférieures à 5 mg/mL. Le temps d'aération de l'isolateur est donc suffisant pour permettre l'évacuation des vapeurs de Soprop<sup>®</sup> à l'intérieur des emballages (concentration inférieure à 5 mg/L).

## 7 CONCLUSION

Après de nombreux tests d'orientation, les paramètres nécessaires à la bonne utilisation et à l'efficacité de l'isolateur de transfert Getinge-La Calhène ont pu être définis. Ils ont permis, ainsi que les diverses normes et recommandations, d'établir les spécifications des divers essais nécessaires à la validation de cet appareil. La rédaction de deux protocoles de validation (OQ et PQ) a pu être effectuée. Les tests d'orientation ont également permis de rédiger un mode d'emploi facile d'utilisation pour les opérateurs. En effet, les modes d'emploi existants étaient nombreux, en plusieurs langues et ne faisaient pas toujours référence au bon modèle d'isolateur ou de stérilisateur.

Après avoir réalisé les essais de validation, les résultats obtenus ont été consignés dans deux rapports (OQ et PQ). Ils sont conformes aux spécifications établies dans les protocoles, et bien que l'un des essais microbiologique ait subi une déviation, cette dernière a pu être expliquée.

Les buts de ce travail sont donc atteints.

Cependant, la déviation microbiologique lors de la validation PQ amène au questionnement suivant: sommes-nous certains que les surfaces en contact avec le grillage des paniers ou avec le sol grillagé sont décontaminées ? En effet, si un BI coincé entre deux paniers n'est pas décontaminé, qu'en est-il du matériel en contact avec d'autres surfaces ? Cette question trouvera une réponse cet été, lors de l'étude de l'impact microbiologique de la mise en fonction de l'isolateur de transfert (cf. Perspectives, pages 31-32). Il est cependant possible de répondre déjà partiellement à cette question : les fabricants d'isolateurs ont étudié le problème et ont élaboré leurs appareils de manière à minimiser ce problème (sols grillagés). De plus, ils insistent bien sur le fait qu'il est important de disposer le matériel à décontaminer de manière à minimiser les surfaces de contact. Finalement, lors des tests d'orientation, nous avons pu mettre en évidence que la décontamination était incomplète lorsque deux emballages se touchaient. Il suffit donc juste de prendre garde à ce que l'agent stérilisant (Soproper<sup>®</sup>) puisse diffuser librement partout.

Les réflexions engendrées par l'étude de l'isolateur ont conduit à la réalisation de kits permettant de faciliter le transfert du matériel, ainsi qu'à une pré-stérilisation de celui par oxyde d'éthylène.

Les recherches dans la littérature ont permis de mettre en évidence le fait que les poches de perfusion en EVA utilisées au CHUV ne sont pas compatibles avec cette méthode de décontamination et qu'il faudra trouver d'autres types de poches en plastique non perméable à l'acide peracétique (en polyéthylène par exemple).

Ce travail a permis d'évaluer le temps et la somme de travail nécessaires à la mise en fonction d'un appareil tel que l'isolateur de transfert. Il a également permis de mettre en évidence l'importance de la validation pour assurer le bon fonctionnement d'un tel équipement et la fiabilité de la stérilisation obtenue.

## 8 PERSPECTIVES

L'impact microbiologique de l'introduction de la méthode de stérilisation du matériel à l'acide peracétique est un élément intéressant, car indicateur du bénéfice environnemental apporté (ou non) par la nouvelle méthode de décontamination. Malheureusement, le temps manque pour permettre l'évaluation de cet impact. En effet, l'isolateur de transfert ne sera mis en fonction qu'après l'achèvement de ce travail. Cependant, avant l'utilisation en routine de l'isolateur de transfert, des prélèvements microbiologiques ont été effectués dans le local attendant à l'isolateur où sont stockés divers matériels. Ce matériel a été introduit dans ce local via un sas et a été désinfecté à l'alcool isopropylique. Il faut savoir que le matériel en verre et en plastique (ampoules, flacons etc.) était trempé dans un bain d'alcool, alors que le matériel emballé dans un emballage papier/plastique (seringues, aiguilles, poches etc.) était désinfecté à l'aide de lingettes imbibées d'alcool, voire non désinfecté. La biocharge de certains matériels devait donc être très élevée.

Les recommandations BPF concernant la présence de micro-organisme en zone B précisent qu'il ne doit pas y avoir plus de 5 colonies (5 CFU) par gélose. [5]

A l'aide de petites géloses Tryptic Soy Contact Agar + LTHTh-ICR 2283e (Heipha), des prélèvements ont été effectués sur les divers matériels entreposés. Les géloses sont incubées 2 jours à 30-35°C (croissance bactérienne), puis 3 jours à 20-25°C dans l'obscurité (croissance des moisissures). Le nombre de colonies est compté et exprimé en CFU. Les prélèvements ont été réalisés sur trois jours consécutifs en faisant attention à ne pas effectuer deux prélèvements sur le même objet. Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 9** : Nombre de colonies [CFU] sur les plaques de gélose en fonction du type de matériel sur lequel a été fait les prélèvements. (Cf. annexe 8)

Type de matériel	Emplacement du prélèvement	Nombre de colonies [CFU]		
		Jour 1	Jour 2	Jour 3
Aiguilles 0.9 x 95 mm	Côté papier de l'emballage papier plastique	1	0	0
Prolongateur de pousse-seringue 150 cm	Côté papier de l'emballage papier plastique	2	1	2
Seringue 1 mL	Côté papier de l'emballage papier plastique	2	0	0
Poche de mélange Freka <sup>®</sup> mix en EVA 150 mL	Côté papier de l'emballage papier plastique	1	0	0
Seringue pour perfusion avec aiguille 50 mL	Côté papier de l'emballage papier plastique	1	29	1
Flacon de Glamin <sup>®</sup> 500mL	Paroi du flacon en verre	3	0	0
Flacon de NaCl 0.9% 250mL	Paroi du flacon en polyéthylène de basse densité	2	0	0
Flacon de Lipovenos <sup>®</sup> 20% 100mL	Paroi du flacon en verre	24*	0	0
Poche ClinOleic Baxter <sup>®</sup> 20% 100mL	Emballage plastique	2	0	6
Flacon d'eau injectable Bichsel 100mL	Paroi du flacon en polypropylène	2	0	0

En regard des recommandations du Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication, les résultats sont hors spécifications et donc non conformes. En effet, lors de chaque prélèvement journalier, l'un des prélèvements dépasse les 5 CFU. Bien qu'il n'y ait qu'une gélose non conforme par jour, la mise en

\* Croissance sur le pourtour ininterprétable.



vigueur de la nouvelle méthode de stérilisation est indispensable afin de permettre d'obtenir des résultats microbiologiques conformes aux spécifications.

Il est également intéressant de relever que, contrairement à ce qu'on aurait pu penser, il n'y a pas de différence significative entre les matériels ayant été décontaminés par immersion dans l'alcool isopropylique et les matériels emballés dans du papier et décontaminés avec une lingette.

Lors de ce travail il n'a pas été possible de faire des prélèvements microbiologiques après mise en fonction de l'isolateur. Cependant, une étude sera effectuée dans les mois suivant la fin de ce travail afin de déterminer l'impact microbiologique sur les salles de production en zone B.

Les prélèvements seront effectués de la même façon qu'expliqué ci-dessus, cependant les géloses seront appliquées sur les emballages papier/plastique des kits stérilisés via l'isolateur. Cinq kits seront sélectionnés au hasard dans le local de stockage (zone B) et, pour chacun d'eux, un prélèvement sur la surface papier et un prélèvement sur la surface plastique seront effectués, ceci pendant trois jours consécutifs.

Les résultats obtenus alors permettront de déterminer si l'impact microbiologique de cette nouvelle méthode de décontamination est suffisant et si son utilisation est réellement intéressante pour l'hôpital ; l'impact économique et l'impact écologique de cette méthode devront également être pris en compte.

La pré-stérilisation des kits à l'oxyde d'éthylène devra aussi être investiguée. En effet, aucune étude concernant les résidus d'oxyde d'éthylène ainsi que le temps de désorption n'a été effectuée lors de ce travail. L'oxyde d'éthylène est un composé toxique pour le personnel, l'environnement et les patients ; la stérilisation à l'oxyde d'éthylène est une méthode complexe et la garantie d'un dégazage suffisant est difficile à obtenir. Ce sont les raisons pour lesquelles cette méthode de stérilisation est en voie de disparition. Il serait donc judicieux d'évaluer les alternatives possibles telles que l'irradiation (méthode utilisée au Triemli Stadtspital de Zürich), ceci en collaboration avec le service de Stérilisation Centrale du CHUV. [52, 53, 54]

## 9 BIBLIOGRAPHIE

1. W. Whyte, *Les technologies de salle propre, principes de conception, de qualification et d'exploitation*, 1<sup>ère</sup> édition, SB.COM, Paris, 2003
2. F. Bruneaux. 2002. Préparation de mélange pour nutrition parentérale dans une pharmacie à usage intérieur. Enjeux de l'inspection. Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique, Rennes.
3. P. Touroude, F. Gosso. 1999. Centralisation des préparations de cytostatiques. La technologie des isolateurs. *Revue Européenne de Technologie Biomédicale* **21** : 76-83.
4. D. Bertin. Confinement : quels dispositifs pour quelles applications ? *Salles Propres* n°55 : 17-22.
5. Guide to good practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments (PE 010-3) : <http://www.picscheme.org/publication.php?p=guides> (24.11.09)
6. PIC/S GMP guide : annexes (PE 009-8) : [http://www.picscheme.org/publis/guides/PE\\_009-8\\_GMP\\_Guide%20Annexes.pdf](http://www.picscheme.org/publis/guides/PE_009-8_GMP_Guide%20Annexes.pdf) (20.03.09)
7. PIC/S Recommendations : isolators used for aseptic processing and sterility testing (PI 014-3) : <http://www.picscheme.org/publication.php?p=recomm> (02.03.09)
8. W. Whyte, *Cleanroom Design*, seconde édition, John Wiley and sons, Glasgow, 1991
9. Organisation mondiale de la Santé. 1997. Guide OMS des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF). Partie 2 : Validation. WHO/VSQ/97.02 : [www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www618.pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www618.pdf) (15.04.09)
10. P. Lee. 2005. The difference between ISO and GMP quality systems. <http://www.sekada.com/gmp/isogmpqs.html> (11.05.2009)
11. A. P. Schwartz. 1998. GMP vs ISO. *Journal of GMP Compliance*. [http://www.mdiconsultants.com/Publishing/article\\_published.htm](http://www.mdiconsultants.com/Publishing/article_published.htm) (11.05.2009)
12. Organisation internationale de normalisation : [www.iso.org/fr/home.htm](http://www.iso.org/fr/home.htm) (12.05.09)
13. *Guide de l'Ultra-Propreté 2008-2009*, 6<sup>ème</sup> édition, BCMI, Neuilly-sur-Seine, 2008
14. D. Meyer. Barrières : le confinement souple appliqué aux systèmes de protection rapprochée. *Salles Propres* n°55 : 23-26.
15. P. C. Trexler. 1979. Transfer isolator to protect personnel from exposure to peracetic acid. *Laboratory Animals* **13** : 163-165.
16. S. Crauste-Manciet, P. J. M. Sessink, S. Ferrari, J.-Y. Jomier, D. Brossard. 2005. Environmental contamination with cytotoxic drugs in healthcare using positive air pressure isolators. *Annals of Occupational Hygiene* **49** : 619-628.
17. Association pour la prévention et l'étude de la contamination (ASPEC) : *Les isolateurs, qualifications*, Paris, 2002.
18. Acide peracétique : activités et usages en établissements de santé : <http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/prevention/guides/APAFinal.pdf> (24.02.09)
19. Fiche toxicologique de l'INRS n°239 pour l'acide peracétique (Edition 2001)
20. Fiche technique Sopropei<sup>®</sup> de Seppic (annexe 5 du mode d'emploi du

- stérilisateur MAN 230 de Getinge-La Calhène).
21. Fiche technique des bandelettes réactives à l'acide peracétique Merckoquant® de Merck : <http://www.merck-chemicals.com/industrial-laboratory-chemicals> (02.04.09)
  22. C. Bourguignon, A. Grain, J. Schlatter, N. Vermerie. 2005. Permeation risks with peracetic acid and hydrogen peroxide sterilizing agent inside ambulatory pumps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **59** : 200-205.
  23. J. Schlatter, F. Bertrand, J.-L. Saulnier. 1999. Vaporised peracetic acid and hydrogen peroxide mixture into polyvinylchloride and polyethylene bags. *Journal de Pharmacie Clinique* **18** : 218-221.
  24. Contrôle du marché des désinfectants à base d'acide peracétique pour la désinfection manuelle des dispositifs médicaux thermosensibles : [http://www.afssaps.fr/var/afssaps\\_site/storage/original/application/5ac823197f7836255a820bd006e2e024.pdf](http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/5ac823197f7836255a820bd006e2e024.pdf) (25.02.09)
  25. L. Escalup, S. Crauste- Manciet, L. Richard, D. Brossard. 2001. Chemical sterilization with peracetic acid : permeation risks inside parental infusion fluid. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **55** : 24-32.
  26. U. Pinkernell, S. Effkemann, F. Nitzsche, U. Karst. 1996. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of peroxyacetic acid. *Journal of Chromatography* **730** : 203-208.
  27. L. Harvard, J. Fellous-Jerome, B. Bonan, D. Pradeau, P. Prognon. 2005. Evaluation of peracetic acid permeation during flash sterilization through pharmaceutical plastic polymers used in cytotoxic reconstitution units. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **59** : 258-264.
  28. L. Escalup, J. Hattchouel, A. Guibert, S. Crauste-Manciet, D. Brossard. 1998. Perméabilité à l'acide peracétique des poches en éthyle vinyle acétate. *Pharmacie Hospitalière Française* **NS** : 63-66.
  29. V. Sanz, S. de Marcos, J. Galbàn. 2007. Hydrogen peroxide and peracetic acid determination in waste water using reversible reagentless biosensor. *Analytica Chimica Acta* **583** : 332-339.
  30. N. Higashi, H. Yokota, S. Hiraki, Y. Ozaki. 2005. Direct determination of peracetic acid, hydrogen peroxide, and acetic acid in disinfectant solutions by far-ultraviolet absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry* **77** : 2272-2277.
  31. P. Westbroek, B. Vanhaute, E. Temmerman. 1996. Monitoring of high hydrogen peroxide concentrations by voltammetry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **354** : 405-409.
  32. M. I. Awad, C. Harnood, K. Tokuda, T. Ohsaka. 2001. Simultaneous Electroanalysis of Peroxyacetic Acid and Hydrogen Peroxide. *Analytical Chemistry* **73** : 1839-1843.
  33. J. L. Sagripanti, A. Bonaficio. 1996. Comparative sporocidal effects of liquid chemical agents. *Applied and Environmental Microbiology* **62** : 645-652.
  34. S. N. Hussaini, K. R. Ruby. 1976. Sporocidal activity of peracetic acid against B. anthracis spores. *Veterinary Record* **98** : 257-259.
  35. P. A. Clapp, M. J. Davis, M. S. French et al. 1994. The bactericidal action of peroxides – an EPR spin-trapping study. *Free Radical Research* **21** : 147-123.
  36. M. G. C. Baldry. 1983. The bactericidal, fungicidal and sporocidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology* **54** : 417-423.

37. S. Y. Shin, E. G. Calvisi, T. C. Beaman et al. 1994. Microscopic and thermal characterization of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metals ions, chelators and antioxidants. *Applied and Environmental Microbiology* **60** : 3192-3197.
38. D. M. Portner, R. K. Hoffman. 1968. Sporocidal effects of peracetic acid vapor. *Applied Microbiology* **16** : 1782-1785.
39. L. B. Kline, R. N. Hull. 1960, The virucidal properties of peracetic acid. *American Journal of Clinical Pathology* **33** : 30-33.
40. D. M. Taylor. 1991. Resistance of ME7 scrapie agent to peracetic acid. *Veterinary Microbiology* **27** : 19-24.
41. K. Antloga, J. Meszaros, P. S. Malchesky, G. E. McDonnell. 2000. Prion disease and medical devices. *ASAIO Journal* **46** : S69-S72.
42. B. Cany. Technique des isolateurs, entre maturité et incertitudes. *Salles Propres* n°20 : 14-16.
43. F. Bounoure, H. Fiquet, P. Arnaud. 2006. Comparison of hydrogen peroxide and peracetic acid as isolator sterilization agents in a hospital pharmacy. *American Journal of Health-System Pharmacy* **63** : 451-455.
44. Fiche toxicologique de l'INRS n°123 pour le peroxyde d'hydrogène (Édition 2007)
45. A. Alasri, M. Valverde, C. Rogues et al. 1993. Sporocidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide alone and in combination, in comparison with chlorine and formaldehyde for ultrafiltration membrane disinfection. *Canadian Journal of Microbiology* **39** : 52-60.
46. E. Sansoë-Bourget. 2006. Risk assessment paradigm : an opportunity for rationalizing the choice of biological indicator during the validation of isolator biodecontamination cycles. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **60** : 156-163.
47. E. Agabu. 2007 Validation de la procédure de fabrication des cytostatiques injectables. Travail de Diplôme aux HUG. Université de Genève, faculté des sciences, section sciences pharmaceutiques. Pages 5-14.
48. E. Chassot, F. Cavin. 2008. Les contrôles de l'environnement dans un service de stérilisation. *Forum, Journal de la Société Suisse de Stérilisation* **1** : 23-27.
49. H. Chan-Meyers, D. McAlister, P. Antonoplos. 1997. Natural bioburden levels detected on rigid lumened medical devices before and after cleaning. *American Journal of Infection Control* **25** : 471-476.
50. J. Rauschnabel. 2006. Decontamination of isolator materials. *Cleanroom Technology*.
51. E. Postaire, *Matières plastiques à usage pharmaceutique et médico-chirurgical*, tome 2, APHIF, Éditions EM inter, Paris, 1987, pages 58-62.
52. D. Pittet, S. Harbarth, A. Henry, C. Ruef. 1997. Stérilisation à l'oxyde d'éthylène: utilisation et limites. *Swiss-NOSO* **4**: 3-6.
53. J.-C. Darbord, Désinfection et stérilisation dans les établissements de soins: Guide pratique, Édition 5, Elsevier Masson, 2003, page 107.
54. S. Debreux, F. Posson. 2004. Stérilisation et désinfection : prévention des infections nosocomiales. Projet de Stage de Perfectionnement à l'Ingénierie Hospitalière de l'Université de Technologie de Compiègne : <http://www.utc.fr/tsibh/public/spibh/03-04/Projets/Posson-Debeux/stedes.htm> (19.05.09)

## **10 ANNEXES**

- ANNEXE 1 :** Mode d'emploi du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène
- ANNEXE 2 :** Rapport de développement du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène
- ANNEXE 3 :** Instructions pour la préparation des kits pour la stérilisation du matériel entrant en zone B
- ANNEXE 4 :** Protocole OQ du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène
- ANNEXE 5 :** Protocole PQ du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène
- ANNEXE 6 :** Rapport OQ du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène
- ANNEXE 7 :** Rapport PQ du stérilisateur MAN 230 et de l'isolateur de transfert 2 gants Getinge-La Calhène
- ANNEXE 8 :** Résultats microbiologiques des prélèvements effectués sur le matériel stocké en zone B