

CONTRÔLE MICROBIEN

Garantir la qualité et limiter les interventions dans les installations

L'eau est la matière première la plus utilisée par l'industrie pharmaceutique, jamais utilisée brute, toujours purifiée. Les installations de production d'eaux purifiées sont, dès lors, des équipements stratégiques. Les possibilités techniques présentent chacune des avantages et des inconvénients mais le but recherché est à la fois la plus grande fiabilité tout en limitant au maximum les interventions.



Dominique Leclercq,
sales manager
Europe, Mar Cor
Purification*.



Olivier Retiere,
directeur
commercial,
Sofise



La Pharmacopée européenne décrit quatre qualités d'Eau Purifiée: l'« *Aqua purificata* » ou eau purifiée utilisée à la préparation de médicaments autres que ceux qui doivent être stériles et exempts de pyrogène, l'« *Aqua valde purificata* » ou eau hautement purifiée destinée à la préparation de médicaments nécessitant une eau de qualité biologique élevée tout en ne nécessitant pas une qualité pour injectable, l'« *Aqua ad injectabilia* » ou eau pour injectables (eau PPI) utilisée pour la préparation de solutions parentérales injectables, l'eau pour irrigation ou eau versable destinée à l'usage médical pour l'irrigation de cavités, de lésions ou de surfaces corporelles. Cette qualité est stérile, mais ne peut pas être utilisée pour injection. Les méthodes de traitement disponibles sont variées; l'adoucissement, la désionisation, l'osmose inverse, la filtration, l'ultrafiltration, le rayonnement UV, la distillation... Les unités de pompage, de stockage et de distribution des eaux aux points d'utilisation font entièrement partie de l'installation.

Limiter la contamination microbiologique

Le maintien de la propreté microbiologique d'une installation de production et distribution d'eau purifiée est un challenge. Le problème majeur est d'évaluer le niveau réel de contamination ou développement d'un biofilm sans pouvoir accéder à l'intérieur de l'installation. En effet, l'échantil-

lonnage microbiologique, tel que pratiqué aujourd'hui, ne permet pas de mesurer uniquement la quantité de micro-organismes « pionniers » ou libres au gré du flux. Les micro-organismes (temporairement) fixés sur les parois et constituant un biofilm sont plus nombreux, mais sont invisibles à l'analyse car pas échantillonnés. Le biofilm représente une bombe à retardement potentielle pouvant lâcher à tout moment des paquets de cellules libres, allant se fixer ailleurs pour développer de nouvelles colonies. Prendre toutes les mesures préventives pour empêcher la formation de biofilm est une approche nécessaire pour garantir à long terme la conformité du système à un coût acceptable. Au titre de première mesure préventive, le choix de la qualité de l'installation est déterminant car comme souvent, un investissement minimum risque de coûter plus cher à l'utilisation.

L'acier inox. L'acier inox de qualité est de loin préférable à la plupart des matériaux plastiques à condition de soigner la finition des surfaces, la qualité des soudures, des raccords, des sièges et joints de vannes... Chaque détail de finition est important pour empêcher plus tard les micro-organismes libres de s'implanter sur les surfaces, en profitant d'une aspérité, d'une soudure proéminente, d'une crevasse, d'un raccord, d'un joint, etc. et d'y développer un biofilm.

La bio-décontamination. Concernant la bio-décontamination, il est possible de détruire préventivement en continu les cellules « pionnières » ou libres avant qu'elles ne se fixent sur un support. Les deux méthodes les plus souvent utilisées en continu sont la chaleur et l'ozonation. L'élévation en température ne pose aucun problème de résidu; 60-65 °C suffisent pour détruire les « pionniers » et les empêcher de s'implanter. L'ozone est un agent chimique qui en continu offre une très bonne efficacité à 0,04 ppm, mais ce composé doit être détruit par une lampe UV à 254 nm avant tout point d'utilisation. Il est à noter, par contre, que l'utilisation d'UV 254 nm peut

*Avec l'aimable autorisation pour la partie technique de Mr. T. C. Soli de la société Soli Pharma Solutions (www.solipharmasol.com). Mr. Soli a fait partie de comités d'experts Pharmacopée US "Pharmaceutical Water" et est membre du Comité PhRMA Water Quality / USP23 "Water Changes".

générer des endotoxines... En remplacement ou en complément d'un traitement continu, la bio-décontamination discontinue utilise de manière périodique de l'eau chaude, de la vapeur ou un agent chimique oxydant. Ce traitement ponctuel a pour but de tuer les cellules isolées mais également de détruire un biofilm déjà formé.

L'eau chaude. Elle est de loin préférable à la vapeur sèche difficile à manipuler, incompatible avec certains équipements/matériaux et nécessitant une installation spécialement étudiée (voir encadré ci-contre). De plus, la vapeur va détruire un biofilm en le cuisant. Ces résidus de matière organique seront autant d'aspérités et de nourriture favorables à l'implémentation et au développement de nouvelles cellules pionnières. L'eau chaude n'est technologiquement pas simple à utiliser car si une eau à 55 °C est suffisante pour détruire la plupart des micro-organismes, il n'est pas facile de maintenir une température d'eau élevée dans toute une installation, bras morts y compris. Il faut également faire la chasse aux ponts thermiques, zones froides, matériaux plastiques et « flusher » les bras morts/vannes, si la conduction thermique n'est pas optimum.

Les agents oxydants. Pour ce qui est des agents oxydants, le tableau ci-dessous reprend les principaux types utilisés et leur pouvoir d'oxydation. En prenant le chlore comme référence, l'acide péracétique est, après l'ozone, le composé le plus actif sur les matières organiques. Il est commercialisé par nombre de fabricants, généralement en combinaison de peroxyde d'hydrogène avec des niveaux de pureté variables. Un tel traitement de choc sur toute une installation permet de détruire suivant les définitions de la pharmacopée toute vie microbiologique isolée ou sous forme de biofilm. Le choix d'une formulation chimique se fait donc en fonction de son efficacité mais également par rapport à la concentration chimique nécessaire; une faible concentration permet de limiter au maximum le temps de rinçage, la quantité d'eau nécessaire et le temps d'immobilisation des installations. Les formulations chlorées ont une efficacité très dépendante du pH de la solution. Les eaux purifiées ayant un pouvoir tampon faible, il y a toujours un risque d'efficacité moindre, même si les concentrations sont respectées.

Restreindre l'entrée de nouvelles cellules pionnières

Certains équipements permettent de limiter l'entrée des micro-organismes pionniers et donc de retarder l'apparition d'un biofilm et/ou l'apparition d'une contamination excessive.

TRAITEMENTS À L'EAU HAUTE TEMPÉRATURE

Exemples de recommandation en installation idéalement configurée

Eau à 65 °C Minimum 8 heures

Eau à 70 °C Minimum 4 heures

Eau à 80 °C Minimum 2 heures

Eau à 90 °C Minimum 1 heure

Le rayonnement UV. Une lampe UV émet un rayonnement lumineux Ultraviolet qui permet de détruire les micro-organismes exposés. Ce rayonnement limite considérablement le nombre de cellules pionnières, mais n'a aucune efficacité sur un biofilm installé. Ce type de lampe utilisée en continu sur l'installation aura une efficacité moyenne à bonne en fonction de sa configuration pour limiter au maximum les zones d'ombre mais aussi en fonction de son dimensionnement et de la qualité de la maintenance. Qui dit lumière dit potentiellement « ombre ». Ces zones d'ombre doivent être limitées au maximum car elles constituent autant de refuges pour les cellules. Des zones d'ombre peuvent être provoquées par une mauvaise configuration ou par un nombre trop important de micro-organismes où certains se sacrifient pour protéger le passage des autres... Ce type de traitement est intéressant en amont d'une filtration stérilisante et permet de prolonger l'efficacité du filtre.

La microfiltration. Depuis la seconde guerre mondiale l'industrie produit des membranes filtrantes permettant d'arrêter par filtration les particules mais aussi les micro-organismes libres dans un liquide, c'est la micro-filtration. Ces membranes filtrantes dites « stérilisantes » ou membrane à 0,2 µm ou 0,22 µm de seuil de filtration peuvent donc servir de barrière aux micro-organismes en les empêchant, sans les détruire, d'aller plus loin dans

l'installation. Les micro-organismes s'accroissent donc sur la membrane filtrante. Ce type de technologie très répandue est très efficace mais limitée dans le temps, vu que les micro-organismes restent vivants sur le support. En quelques heures ou au plus quelques jours apparaissent dès lors les phénomènes « go-through » (passage à travers), « grow-through » (développement à travers) et « blow-through » (s'infiltrer à travers). Plus la membrane filtrante sera épaisse, plus elle générera des phénomènes de stress au niveau des bactéries à porosité équivalente, amplifiant les phénomènes de « go-through » et « blow-through ».

Ces membranes sont généralement validées suivant le challenge HIMA. La FDA définit ces filtres comme « un filtre qui, lorsqu'il est testé avec une suspension de *Pseudomonas* (Brevundimonas) diminuta contenant un minimum de 107 germes par cm² de surface de filtre, produit un effluent stérile. » La procédure exacte de ce test officiel a été définie par la « Health Industry Manufacturers Association » (HIMA) et est décrite dans « Microbiological Evaluation of Filters for Sterilizing Liquids » (HIMA document #3, Vol. 4, 1982). Depuis les années 1960, des problèmes occasionnels de contamination autres que ceux causés par des mycoplasmes ont été rapportés malgré l'utilisation de filtres membranes « stérilisants » de 0,2 et 0,22 microns. Quelques exemples significatifs :

- En 1967, Braun, Diesh et McCulloch⁽¹⁾ rapportèrent des phénomènes de passages de bactéries (Spirillaceae) à travers des membranes 0,22 µm, lors de la mise au point d'une méthode d'isolation de *Leptospires*.
- En 1978, Howard et Duberstein⁽²⁾ démontrèrent que des filtres membranes de 0,2 µm et 0,22 µm se laissent traverser par des bactéries en milieu aqueux.
- En 1985, Anderson et Bland⁽³⁾ rapportèrent le fait que des filtres membranes de 0,2 µm se laissent traverser par

Pouvoir d'oxydation relatif

Produit	Formule chimique	Pouvoir oxydant
Chlore gazeux	Cl ₂	1,00 (référence)
Ozone	O ₃	1,52
Acide peracétique	CH ₂ COOOH	1,33
Minnicare Cold Sterilant	CH ₂ COOOH + H ₂ O ₂	>1,30
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂	1,30
Acide hypochloreux	HOCl	1,10
Dioxyde de chlore gazeux	ClO ₂	0,70
Hypochlorure de sodium	NaOCl	0,69

Source Sofise

➤ *Burkholderia (Pseudomonas) pickettii* dans une solution saline.

- En 1993, la FDA rapporta la présence de *Pseudomonas cepacia* dans une eau déminéralisée en aval d'un filtre 0,2 µm. (4)
- *Pseudomonas* a été impliqué dans d'autres rapports mentionnant des contaminations en aval de filtres.

Dès lors, la FDA a reconnu que les filtres membranes 0,2 µm et 0,22 µm ne peuvent effectivement prévenir contre une contamination du filtrat et en 1996, elle a reconnu que l'usage de filtres 0,1 µm comme filtres finaux est « préférable pour garantir une stérilité du produit... ». (5) Cependant, le risque est alors de limiter le débit car on considère en moyenne une perte de 40 % de débit en échangeant des filtres stérilisant 0,2 µm par des 0,1 µm de taille et surface filtrante équivalente.

Des membranes configurées

Afin d'augmenter la surface filtrante, la membrane est plissée avant d'être insérée dans la cartouche filtrante, permettant d'obtenir des surfaces comprises entre 0,5 m² et 0,7 m². Les médias les plus couramment utilisés sont le Polyethersulfone, le Nylon 6.6 ou le PVDF. L'épaisseur de ces membranes se situe entre 150 et 300 µm. Pourquoi alors ne pas utiliser à la fois une micro-filtration performante et une bio-décontamination efficace? Autrement dit, améliorer la filtration est une chose, mais si on peut également utiliser et y associer une bio-décontamination plus performante, cela permettra alors de se prémunir contre les désagréments de ces contaminations bactériennes. Ce concept permet d'arrêter les micro-organismes en continu par filtration et de les détruire périodiquement avant qu'ils ne passent à travers la membrane pour contaminer l'installation et installer un biofilm.

Les fibres creuses comme solution de filtration

Plutôt que d'utiliser des membranes plissées forcément limitées en surface filtrante, la technologie de membrane en fibre creuse présente l'énorme avantage de multiplier la surface de filtration par 2 voire 3 pour une même taille d'élément filtrant. Une surface de filtration plus importante permet alors de réduire le seuil de filtration sans perte de débit. Tout en étant conforme aux mêmes normes, un filtre 0,1 µm offrira donc un même débit que la plupart des filtres 0,2 µm de même taille. Une filtration stérilisante plus serrée offre alors une garantie supérieure quant à la protection d'un système de production et de distribution d'eau purifiée.

Agent de biodécontamination. Il faut utiliser un produit concentré de grade phar-



maceutique, à base d'acide peracétique, qui permet une bio-décontamination de l'ensemble d'une installation de production et de distribution d'eau purifiée. Cette solution de biodécontamination devra détruire les micro-organismes « pionniers » mais aussi les biofilms sur les membranes d'osmose inverse, membranes filtrantes, résines échangeuses d'ions, réservoirs et boucle de distribution.

La combinaison gagnante. Il a été démontré à de nombreuses reprises par des utilisateurs que l'utilisation de ce type de filtre 0,1 µm fourni en cartouche filtrante standard protège de manière efficace l'installation de distribution d'eau purifiée. De plus, la bio-décontamination périodique permet de supprimer les micro-organismes pionniers et fixés sur les surfaces, y compris les membranes filtrantes. La combinaison des deux offre une solution économique car elle permet de prolonger la durée de vie des filtres tout en espaçant les traitements chimiques.

En conclusion, une bonne protection contre les micro-organismes « pionniers » représente la clé pour éviter des problèmes de contamination d'une eau purifiée dans l'industrie. Différentes technologies existent et peuvent se combiner afin d'améliorer les performances. C'est le cas avec cette technologie de filtres membranes stérilisantes plus serrés pour une meilleure efficacité et un produit de grade pharmaceutique pour détruire les micro-organismes libres ou fixés sur les surfaces. Il en résulte incontestablement une meilleure protection de l'installation de traitement d'eau purifiée, une limitation de la contamination dans le temps et un espacement dans les traitements. ■

**PRODUITS DE FILTRATION
UTILISANT LA TECHNOLOGIE
DE MEMBRANE EN FIBRE
CREUSE POUR L'INDUSTRIE
PHARMACEUTIQUE ET DES
BIOTECHNOLOGIES.**

Références :

1. J.L. Braun, S.L. Diesch and W.F. McCulloch (1968). A method for isolating leptospire from natural surface waters. Canadian Journal of Microbiology 14: 1011-1012
2. G. Howard and R. Duberstein (1980). A case of penetration of 0.2µm rated membrane filters by bacteria. Journal of the Parenteral Drug Association 34: p. 95.
3. R.L. Anderson, L.A. Bland, M.S. Favero, M.M. McNeil, B.J. Davis, D.C. Mackel and C.R. Gravelle (1985). Factors associated with *Pseudomonas pickettii* intrinsic contamination of commercial respiratory therapy solutions marketed as sterile. Applied and Environmental Microbiology 58: 1343-1348.
4. D.L. Michels (1993) Validation and control of deionized water systems. FDA, Rockville MD 20857.
5. CDER Perspective on Isolator Technology (1996) ISPE Barrier Isolation Technology Conference, Rockville MD.