



# Contamination biologique dans un isolateur: Quelles leçons à retenir?

James Drinkwater, Bioquell UK Directeur Process et Conformité. Président PHSS – Pharmaceutical & Healthcare Sciences Society.

## **Contamination biologique en isolateur**

Des incidents de déviation microbiologique et de contamination biologique ont été relevés dans des isolateurs pharmaceutiques, y compris ceux utilisés en production, tests de stérilité et services pharmaceutiques aseptiques. Ce livre blanc se consacre à une sélection d'études de cas d'incidents de contamination biologique 'réels', passe en revue les causes profondes identifiées et examine les enseignements à en tirer.

Certains incidents de contamination biologique au sein d'isolateurs pharmaceutiques sont dus à un manque de connaissance ou de compréhension des étapes process en matière de:

- **contrôle de contamination biologique**
- **bio-décontamination**
- **gestion des déviations microbiologiques**

Les études de cas ci-dessous sont tirées d'évènements réels mettant en lumière certaines de ces carences. L'anonymat est respecté afin de protéger l'identité du client mais chaque cas fait l'objet d'un rapport d'incident détaillé faisant état de la cause profonde annoncée après investigation. Des enseignements sont à tirer dans tous les cas. Une amélioration des connaissances, des opérations manuelles et de la gestion process est toujours à l'ordre du jour.

### **Cas 1. Isolateur de production avec stérilisation de surface par vapeur de peroxyde d'hydrogène.**

#### **Incident de contamination biologique étudié: Indications de contamination sporadiques dans un isolateur de production servant à fabriquer des produits médicamenteux stériles.**

La tendance typique de suivi environnemental de cet isolateur de production soumis à une bio-décontamination régulière à l'aide de vapeur de peroxyde d'hydrogène, démontrait une récupération de zéro unité formant colonie (UFC). Des déviations sporadiques ont toutefois été observées, typiquement avec un résultat de suivi environnemental à 1 UFC. Les micro-organismes en question se sont avérés d'origine humaine.

Les critères d'acceptation étant préétablis à zéro UFC (BPF Annexe 1), tous les lots réalisés dans l'environnement de l'isolateur et sujets à cet incident de contamination biologique ont été écartés et identifiés comme produits 'fabriqués en environnement non-conforme'.

L'isolateur a été soumis à un examen approfondi après chaque incident. L'efficacité du cycle de bio-décontamination a également été contrôlée. Des indicateurs biologiques permettaient de vérifier une réduction 6-log des spores. Malheureusement aucune cause profonde ni cause probable n'a été trouvée.

A défaut d'explication définitive, l'équipe de production a fait appel à un consultant afin de passer en revue l'investigation. Le spécialiste a identifié un manque d'attention à une contamination biologique éventuelle après échantillonnage. La cause probable était une contamination secondaire de la boîte de Pétri lors du transfert au laboratoire microbiologique hors-site.

L'inspection plus approfondie d'une boîte Pétri de suivi environnemental à contamination irrégulière a révélé une croissance confinée au bord du disque. Cela a mis en évidence la présence antérieure de condensation avec une éventuelle propagation de contamination biologique de l'extérieur du disque vers le milieu de culture.

L'étude a révélé que chaque boîte était filmée avant transfert au laboratoire à l'aide de film adhésif **non-stérile**. Cette procédure était une mesure de sécurité supplémentaire prévue pour le transport vers le laboratoire. Par ailleurs le délai de transfert avant incubation de certains disques s'est avéré être considérable. Au global ce process avec des variations de la température ambiante, favorisait la condensation.

#### **Conséquences et enseignements tirés de l'incident de contamination biologique**

La définition de cet incident de contamination biologique comme significatif par rapport à la tendance normale des résultats était correcte, puisque pouvant laisser sous-entendre une perte éventuelle de maîtrise. L'éventualité du transfert d'échantillons comme vecteur de cause profonde de faux positifs a toutefois été négligée. Le laboratoire microbiologique pouvait confirmer qu'il ne s'agissait pas d'une erreur de laboratoire. Cependant, des échantillons contaminés ayant quitté la zone process présenteront des résultats 'positifs'. Il est toujours important d'effectuer un examen approfondi confirmant l'état de contrôle de l'isolateur, mais cet exemple révèle la nécessité d'une investigation plus large que l'environnement process seulement.

### **Cas 2. Isolateur de test de stérilité – unité pharmaceutique.**

#### **Incident de contamination biologique étudié: 'Positifs' de traces de doigt relevés en isolateur de test de stérilité avec micro-organismes identifiés d'origine humaine.**

Des échantillons d'une ligne de production de médicament ont été soumis par lot à un test de stérilité dans un isolateur flexible. Des charges de matière, des échantillons de produit ainsi que l'isolateur lui-même ont subi un traitement à la vapeur de peroxyde d'hydrogène. Toutes les charges matières ont été positionnées sur support à point de contact pour exposition à la vapeur. Le test de stérilité se déroulant avec l'isolateur fermé et ré-ouvert seulement à la fin du test. Les déchets d'emballage ont été évacués à l'aide d'un port container à transfert rapide.

Le cycle de vaporisation par peroxyde d'hydrogène a été élaboré par un consultant indépendant. Celui-ci avait l'expérience d'un type de générateur de vapeur précis mais aucune avec le générateur utilisé dans l'isolateur en question. Le cycle a toutefois été mis au point pour une charge de test fixe et l'approbation réglementaire accordée.

Avec les changements dans le temps des échantillons produit les résultats de suivi environnemental faisaient apparaître dans l'isolateur des 'positifs' de trace de doigt avec des micro-organismes d'origine humaine. Les positifs étaient de niveau faible (1 UFC) et aléatoires.

Tous les paramètres critiques ont été contrôlés (la validité de la calibration, le choix de l'agent de décontamination et des protocoles de laboratoire,...) et déclarés conformes.

### **Conséquences et enseignements tirés de l'incident de contamination biologique**

Une variation de la configuration de charge, émanant du changement d'échantillons produit n'avait jamais été envisagée lors de l'élaboration du cycle. Par conséquent le cycle ne donnait aucune garantie d'efficacité process, en matière de ciblage des surfaces par une bonne distribution de vapeur ou de produit de désinfection. Des process comportant une variation de la configuration de la charge nécessitent toujours une analyse et une étude raisonnées. Les variations de la configuration de charge ont remis en question les caractéristiques des supports à point de contact mis au point pour la charge d'origine validée. Il est très probable que les résultats positifs de trace de doigt résultaient de surfaces d'emballage masquées. Certains articles se trouvaient potentiellement en contact avec ces surfaces masquées et par conséquent exclus du process de bio-décontamination.

### **Cas 3. Contrat de service de test de stérilité utilisant un isolateur de test de stérilité.**

**Incident de contamination biologique étudié: un isolateur de test de stérilité présentait fréquemment une contamination par spores dans les résultats de suivi environnemental.**

Un laboratoire microbiologique utilisait un process en lots avec isolateur de test de stérilité à écoulement d'air unidirectionnel et vaporisation simultanée par peroxyde d'hydrogène de charges de test et d'échantillons.

L'ouverture de l'isolateur s'effectuait seulement à la fin de tout test de stérilité. L'évacuation des déchets d'emballage se réalisait à l'aide d'un système de port d'ensachage à transfert rapide.

Des échantillons arrivaient du pays entier, souvent sans triple ou double emballage extérieur pour prévenir la pénétration de contamination biologique dans la salle propre de test et dans l'unité. L'entreprise de test contractante avait installé un 'bain d'alcool' à proximité de l'isolateur de test de stérilité. Ceci permettait le lavage d'échantillons produit avant leur mise en place en isolateur sur supports à point de contact. Certains produits n'étant pas protégés hermétiquement contre la vapeur ne se prêtaient pas à une bio-décontamination par peroxyde d'hydrogène. Dans ces cas les échantillons étaient simplement désinfectés manuellement au bain d'alcool avant introduction dans l'isolateur vaporisé par container de transfert rapide.

L'isolateur de test de stérilité présentait fréquemment dans les résultats de suivi environnemental une contamination par spores.

D'après le fabricant contractant ce phénomène était caractéristique des limitations du procédé de bio-décontamination par peroxyde d'hydrogène. Le client devait, selon le fabricant de l'isolateur, s'attendre de temps en temps à des résultats inexplicables. Ceci était 'naturel' de la part d'un process que l'on n'estimait pas à la hauteur d'une stérilisation intégrale, par ex. en autoclave.

### **Conséquences et enseignements tirés de l'incident de contamination biologique**

Tout incident de bio-décontamination au sein d'un isolateur décontaminé à l'aide de vapeur de peroxyde d'hydrogène doit être considéré comme significatif. Sauf indication d'un changement de l'état de contrôle on ne doit s'attendre à aucune contamination biologique occasionnelle même de faible niveau.

Dans le cas présent le bain d'alcool était censé éradiquer des charges microbiennes importantes. Son utilisation devait surmonter un mauvais contrôle de contamination des échantillons accédant à la salle blanche.

L'alcool n'est pas une substance sporicide. Ainsi les spores éventuellement présentes restaient à la surface, l'alcool agissant ainsi comme 'enduit' plutôt que comme désinfectant pour les articles arrivant dans l'isolateur. Il est peu probable que le cycle de peroxyde d'hydrogène ait été conçu pour combattre une telle charge microbienne émanant de spores hautement résistantes.

La désinfection manuelle de transfert avait pour effet un transfert de contamination biologique potentielle aux échantillons à l'intérieur de l'isolateur. En l'absence d'une étape de bio-décontamination supplémentaire il y avait un risque d'incidents de contamination biologique.

En des termes plus simples, le process était bancal. Il y avait besoin d'un meilleur suivi en aval d'échantillons de test quittant des salles propres contrôlées. L'état de propreté de ce genre d'échantillons aurait dû être maintenu pour empêcher toute contamination pendant le transit au laboratoire de test et le process BPF typique de retrait progressif de couches d'emballage aux barrières appliqué, ceci afin d'éviter le défi majeur d'une pénétration de charge microbienne dans l'unité de test de stérilité. De telles mesures auraient évité le recours au bain d'alcool.

### **Cas 4. Isolateur pharmaceutique avec process de nettoyage et désinfection manuels uniquement.**

**Incident de contamination biologique étudié: Niveaux de contamination biologique aléatoires mais réguliers, supérieurs aux préconisations BPF Annexe 1.**

Les isolateurs dédiés à la production de médicaments sur ordonnance et soumis uniquement à un process de désinfection manuel (par ex. une vaporisation/ essuyage) sont souvent atteints de niveaux de contamination biologique aléatoires mais réguliers, supérieurs aux préconisations BPF Annexe 1- c.à.d. zéro UFC. Tout procédé de désinfection manuelle varie largement en fonction de l'opérateur. D'autres variables du process auront également des répercussions éventuelles pour l'efficacité, par ex. un flux d'air filtré par HEPA a tendance à sécher les désinfectants de surface, compromettant ainsi le délai nécessaire à une suppression microbienne.

Les isolateurs pharmaceutiques fonctionnent typiquement en process de transfert fermé, par ex. d'un flacon vers une seringue et d'une seringue vers une poche IV. Le risque de contamination biologique dans cette situation se situe au niveau des connexions aseptiques. Une contamination biologique au sein d'un isolateur pharmaceutique représente un risque produit et un danger pour les patients, nécessitant une gestion des risques qualifiée.

Le défi est dû ici à la variabilité du process de bio-décontamination et

à la variabilité correspondante des résultats de suivi environnemental nécessitant enquête. Les déviations microbiologiques sont à l'origine d'une charge de travail considérable pour le CQ, et l'existence de certaines anomalies peut masquer des incidents de contamination potentiellement plus graves.

### **Conséquences et enseignements tirés de l'incident de contamination biologique**

La mise en œuvre de procédés de bio-décontamination performants (tels que la vapeur de peroxyde d'hydrogène) permet de réduire/éliminer les incidents de contamination biologique et d'éviter des investigations de déviation laborieuses (et coûteuses). Le post-montage de ce genre de système dans des isolateurs existants est éventuellement envisageable. Cependant des aménagements pour la désinfection de la charge dans ces isolateurs seront peut-être nécessaires.

L'objectif est de réaliser pour des services pharmaceutiques aseptiques des temps de cycle courts et pratiques, assurés par ce nouveau process de bio-décontamination efficace.

Les process faisant appel à une désinfection manuelle nécessitent des niveaux importants de formation et de contrôle procédural, ainsi qu'un suivi pour gérer les risques de contamination biologique. Ils suscitent par ailleurs un examen régulier des résultats environnementaux, tels que les taux d'incidence et les niveaux de croissance sur boîtes de pétri.

Les produits préparés en isolateur de pharmacie sont souvent à utilisation immédiate. Le risque d'une prolifération de croissance microbienne de niveau clinique significatif est ainsi réduit. Mais certaines zones de l'isolateur, telles que les connecteurs à manche pour gants nécessitent une désinfection approfondie. Pour un meilleur nettoyage et un accès pour la désinfection optimisé le démontage de ces pièces peut s'avérer nécessaire. A défaut la contamination biologique risque de s'installer durablement dans l'isolateur.

Les charges de matière sur ordonnance représentent de loin le plus gros risque de contamination biologique par transfert. Dans ce cas des doigts de gants contaminés (à la suite de manipulations de matières partiellement contaminées) sont éventuellement utilisés à proximité immédiate de connexions aseptiques pour le transfert de produits stériles. Ceci peut entraîner l'introduction en zones aseptiques de matière biologique indésirable. La gestion des risques de contamination biologique peut s'appuyer le cas échéant sur un transfert de bouillon adapté, à la fin de chaque lot/période de production, (cette opération faisant partie du programme de suivi environnemental et non seulement d'une qualification arbitraire de la part de l'opérateur). Ceci permet de tester la technique de l'opérateur tout en étant proche d'une simulation de process, où les risques de contamination biologique sont réels.

## **Cas 5. Isolateur pharmaceutique avec isolateur vaporisé à vide (à l'aide de vapeur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et matières introduites dans l'isolateur désinfectées par vaporisation/essuyage.**

### **Incident de contamination biologique étudié: Croissance relativement élevée d'UFC au sein d'isolateurs utilisés pour reconstitutions cytotoxiques.**

Dans ce cas d'étude les isolateurs servaient à la reconstitution cytotoxique par ordonnances pour patient unique. Il s'agissait d'isolateurs à flux turbulent mais configurés pour vaporisation de routine (à vide) à la vapeur de peroxyde d'hydrogène. La vaporisation avait lieu avec les portes du sas de transfert intérieures ouvertes, afin d'assurer une décontamination simultanée de l'isolateur et des sas de transfert. Le cycle de vapeur de peroxyde a été validé pour une efficacité de réduction de la biocharge 6-log avec indicateurs biologiques.

Les transferts de charge en isolateur étaient décontaminés à l'aide d'un process de vaporisation/essuyage manuel (puisque le cycle de vaporisation VPH aurait été beaucoup trop long en la présence d'un sas de transfert).

Au démarrage les résultats de suivi environnemental faisaient ressortir une récupération d'UFC allant jusqu'à 10% des disques échantillon de milieu de croissance. Au bout d'une formation intense visant l'amélioration du process de désinfection, les résultats du suivi (repos et toucher de doigt) indiquaient une baisse des UFC, avec présence sur 5% des disques échantillon.

L'influence de la fréquence de vaporisation sur les résultats de contamination biologique de l'isolateur a été l'objet de débat, par ex. une vaporisation hebdomadaire au lieu de celle appliquée habituellement tous les quinze jours; mais après examen cela s'avérait sans impact notable.

### **Conséquences et enseignements tirés de l'incident de contamination biologique**

Les emballages extérieurs stériles sont difficilement bio-décontaminés avec un process de désinfection manuelle. La bio-décontamination de surfaces est un process extrêmement variable et difficilement maîtrisable dans la lutte contre la bio-contamination.

Le process de pharmacie étant très largement manuel, (les mêmes gants servant à manipuler des emballages, des récipients de médicaments stériles et des dispositifs de transfert) il y aura toujours des risques de contamination biologique. La vaporisation des isolateurs permet de maîtriser la contamination biologique résiduelle mais dès l'entrée dans la zone process de l'isolateur de charges partiellement désinfectées (à la suite d'un mauvais process de bio-décontamination) il y a un risque renouvelé de contamination biologique.

L'importance, dans le domaine de contrôle de contamination biologique d'isolateurs pharmaceutiques, d'un bon process de désinfection de transfert ne peut pas être sous-estimée.

## Cas 6. Isolateur de pharmacie avec technologie de vaporisation totale (à l'aide de vapeur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour l'isolateur à modules complet et vaporisation rapide de matière introduite dans l'isolateur.

### **Incident de contamination biologique étudié: Contamination fongique et sporifère inattendue au sein d'isolateurs dans une unité de services aseptiques.**

Le suivi environnemental indiquait, pour un ensemble d'isolateurs à préparation aseptique désinfectés par vaporisation à peroxyde d'hydrogène, une perte de contrôle avec croissance microbiologique (fongique et sporifère) inattendue.

Le module de préparation aseptique comportait deux isolateurs à flux turbulent interconnectés avec un sas de vaporisation rapide servant à introduire le matériel dans la zone process de l'isolateur.

Le module isolateur était typiquement maintenu en pause aseptique (avant revaporisation) pendant deux semaines, avec introduction sécurisée de matériel par vaporisation rapide et sortie par un système d'ensachage thermo-scellé.

En dehors des résultats microbiologiques, les relevés de ppm en matière de concentration de vapeur indiquaient des valeurs en baisse par rapport à la tendance normale. Ces valeurs faibles ont toutefois été comparées à des valeurs déjà tirées vers le bas par un mauvais emplacement de suivi. Au final il a été difficile d'interpréter l'impact réel du changement relativement faible des niveaux de ppm.

L'importance critique d'une bonne présentation de la charge dans l'enceinte de vaporisation rapide était bien comprise (c.à.d. le fait que les surfaces obstruées ou qui se touchaient ne sont pas décontaminées). Toutefois, le recours à des racks à point de contact ont en principe permis de contrôler la pénétration de contamination biologique dans les isolateurs. La contamination microbiologique constatée était par conséquent peut-être due à d'autres causes profondes.

### **Conséquences et enseignements tirés de l'incident de contamination biologique**

Le peroxyde d'hydrogène est une vapeur condensable. Une température trop basse dans le tuyau d'alimentation et plus particulièrement au niveau buse d'injection (à l'arrivée) se traduit par des pertes par condensation sur le circuit d'injection de la zone cible de l'isolateur. La température minimum d'alimentation pour ce système avec injection de peroxyde d'hydrogène au débit prédéfini était de 40°C, alors que la température réelle, à cause d'une défaillance, était tombée à 30°C.

La présence de températures inférieures à celles validées pour le peroxyde d'hydrogène dans la zone cible se traduisait par des niveaux de micro-condensation insuffisants pour une bio-décontamination efficace, invalidant ainsi le cycle. Compte tenu des limites d'alerte élargies la capacité à détecter des déviations avait disparu, exposant le système à des changements susceptibles de compromettre l'efficacité du cycle.

La dégradation de l'isolant ne fut pas détectée par le système et sans entretien la gaine a continué de se dégrader jusqu'au déclenchement d'une panne système, révélée par les résultats microbiologiques.

Même si les taux ppm de dosage vapeur faibles indiquaient un moindre contrôle, les valeurs relevées n'étaient pas utiles. En effet, l'emplacement des relevés se trouvait après les filtres HEPA sur le circuit retour de la vapeur (où les résultats ppm sont typiquement bas à cause d'une absorption par les filtres).

Pour un meilleur suivi et dans le cadre des corrections et actions préventives (CAPA), le capteur de vapeur a été déplacé pour mesures directes dans la zone process. Les CAPA comportaient également un recalibrage des points critiques d'alerte afin de remettre en place le suivi premier et secondaire.

## En résumé

Une meilleure compréhension des causes profondes ainsi qu'un enrichissement des connaissances process permettent une gestion des risques de contamination biologique en tant qu'étape proactive et préventive au sein de la conception et des opérations.

Par contre, une contamination biologique inattendue nécessite un process formalisé d'analyse des causes profondes (HACCP), une identification microbiologique (au niveau espèce) et des mesures correctives et préventives, ceci afin d'éviter une récurrence.

Il s'agit potentiellement d'actions longues, ayant des répercussions sur les opérations de production et une augmentation significative de la charge de travail de l'AQ (besoin de lancer et de gérer un process coûteux de recherche de causes profondes).

Décharge: Ce document est à but marketing uniquement et n'est qu'un résumé des informations disponibles; les clients et prospects ne doivent se fier au contenu de ce document. Bioquell SAS ou ses filiales distributeurs, agents ou licenciés (formant l'ensemble "Bioquell") se réservent le droit de modifier ce document à tout moment sans notification préalable. Utiliser les systèmes VPH en toute sécurité. Prenez connaissance des informations d'utilisation avant toute utilisation.

Bioquell est un nom de marque déposé de Bioquell UK Ltd.  
© Bioquell SAS (2016). Tous droits réservés

**E: [info@bioquell.fr](mailto:info@bioquell.fr)**  
**W: [www.bioquell.com](http://www.bioquell.com)**

**Bioquell UK**  
**T: +44 (0)1264 835 835**  
**Bioquell USA**  
**T: +1 (215) 682 0225**

**Bioquell Ireland**  
**T: +353 (0)61 603 622**  
**Bioquell Asia**  
**T: +65 6592 5145**

**Bioquell France**  
**T: +33 (0)1 43 78 15 94**  
**Bioquell China**  
**T: +86 755 8631 0348**

