

STERILISATION

Objectifs pédagogiques

1. Définir la stérilisation
2. Décrire les modes de stérilisation
3. Réaliser les procédés de stérilisation
4. Mettre en œuvre les contrôles
5. Valider les procédés de stérilisation

Plan

Introduction

I. Généralités

II. Procédés de stérilisation

III. Contrôle de stérilité

IV. Validation des procédés

Conclusion

Introduction

Historique

- **APPERT (1795)**: procédé de conservation des aliments par la chaleur ou **appertisation**
- **PASTEUR (1863)**: procédé de **pasteurisation**

Introduction

Historique

- **CHAMBERLAND (1880):** premier stérilisateur à vapeur d'eau (autoclave)
- **POUPINEL (1885):** premier stérilisateur à air chaud (**Etuve du Dr POUPINEL**)

Introduction

Intérêt: domaine pharmaceutique

STERILITE: absence de microorganismes

- Préparation de médicaments stériles
 - Préparations injectables, Collyres, Matériel chirurgical

Introduction

Intérêt: domaine pharmaceutique

- Production de matériels destinés au conditionnement aseptique

Ex: produits sanguins, dispositifs médicaux

- Création d'un environnement aseptique

Ex: salles d'opérations chirurgicales

I. Généralités

- 1. Définition**
- 2. Mécanismes de stérilisation**
- 3. Mécanismes, méthodes et modes de stérilisation**
- 4. Avantages et inconvénients des différentes méthodes de stérilisation**

1. Définition

Stérilisation

*Opération pharmaceutique qui consiste à détruire ou éliminer tous les **microorganismes** (bactéries, virus, champignons, parasites) présents sur un objet ou un produit*

2.Mécanismes de stérilisation

Deux mécanismes:

- **Destruction**

Ex: hydrolyse

- **Elimination**

Ex: filtration

3.Mécanismes, méthodes et modes de stérilisation

Mécanisme	Méthode	Mode
Destruction	Chaleur humide	Hydrolyse Dénaturation protéïque
	Rayonnements	Oxydation
	Gaz	Oxydation (acide peracétique) Alkylation (oxyde d'éthylène)
Elimination	Filtration	Filtration stérilisante

4. Avantages et inconvénients des différentes méthodes de stérilisation

Quelques caractéristiques (avantages et inconvénients)

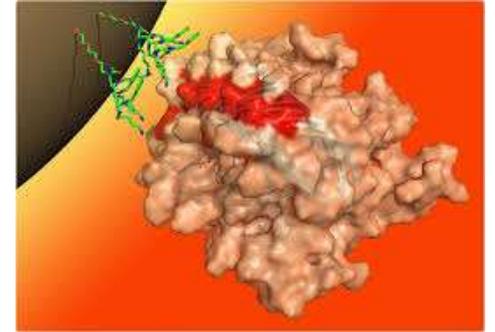
Méthode	Avantages	Inconvénients
Chaleur	Référence, stérilisation en conditionnement final	Faible conductivité thermique de l'air
Rayonnement	Rayons ionisants: Pouvoir pénétrant, rapidité	UV faible pouvoir pénétrant du verre et plastic Réactions chimiques
Gaz	Isolateurs d'isotechnie Fabrication stérile Contrôles microbiologiques	Risque d'explosion, solvants résiduels, toxicité, oxyde d'éthylène: odeur piquante, effet lacrymogène, attaque la peau et les muqueuses
Filtration	Rétention de pyrogènes	Cycle de température variable

5. Stérilisation et process industriel

Méthode	Caractéristiques	Exemple
Stérilisation terminale	Contenant + contenu En fin de fabrication	Traitement thermique Voie chimique Irradiation ionisante Microfiltration
Préparation aseptique	Fabrication en environnement aseptique extrêmement maîtrisé	-

- BPF (annexes); Norme EN 285 (grands stérilisateurs à chaleur humide pour le traitement des charges poreuses)

6. Cas particulier



Agents de transmission non conventionnels (ATNC): PRIONS

- Hydrolyse, dénaturation protéique
- Par Stérilisation par la chaleur humide sous pression à température >>> température méthode habituelle

II. Procédés de stérilisation

- 1. Stérilisation par la chaleur**
- 2. Stérilisation par filtration**
- 3. Stérilisation par Rayonnements**
- 4. Stérilisation par gaz**
- 5. Conditionnement aseptique, enceintes stériles**

1. Stérilisation par la chaleur

Principe de fonctionnement: source d'énergie électrique qui agit par chauffage de l'air entraînant la destruction par hydrolyse, dénaturation protéique

1. Stérilisation par la chaleur

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux microorganismes

Facteurs liés au milieu

Facteurs liés aux modalités de destruction

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux microorganismes

- Espèce microbienne
- Etat des germes
- Durée et nombre de germes

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux microorganismes

- **Espèce microbienne**
 - sensibilité à la chaleur variable selon l'espèce

Ex: *Clostridium botulinum* : Spores très résistants à la chaleur

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux microorganismes

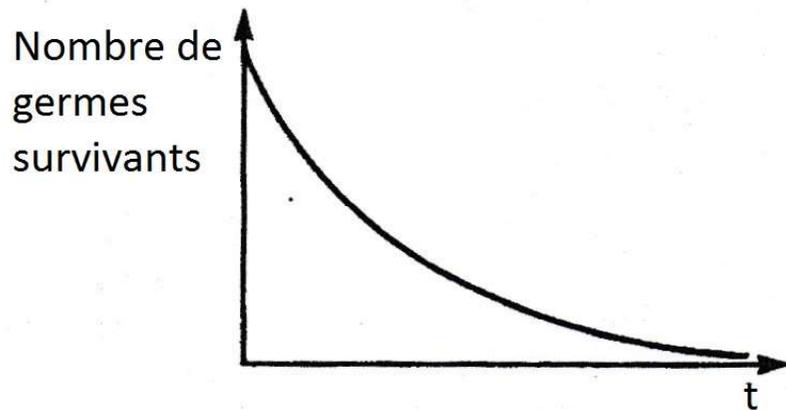
- **Etat des germes**
- Bactéries forme végétative détruites à $T^{\circ} = 52$ à 60°C en milieu aqueux pendant 5 à 60 mn
- Spores : Plus résistantes que les formes végétatives

Nécessitent des températures plus élevées pour les détruire

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux microorganismes

- **Nombre de survies** : Varie en sens inverse de la durée du traitement



$$\log \frac{N}{N_0} = -kt$$

N=Nombre de germes initial

N_0 = nombre de germes survivants au temps T

K= constante

T=durée du traitement

Courbe exponentielle qui tend vers zéro sans jamais l'atteindre

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux microorganismes

- **Nombre de survies** : *en fonction de la durée du chauffage*

Durée de chauffage	Nombre de survies
0D	10^4
1D	10^3
2D	10^2
3D	10^1
4D	10^0
5D	10^{-1}
6D	10^{-2}

Norme:
NAS < 10^{-6}

D=valeur de traitement (durée, dose) qui réduit jusqu'à 10% du nombre initial des germes viables

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés au milieu

- **Nature du milieu et présence de principe actif**
 - oriente le choix d'un traitement thermique
- **Principes actifs dans le milieu:**

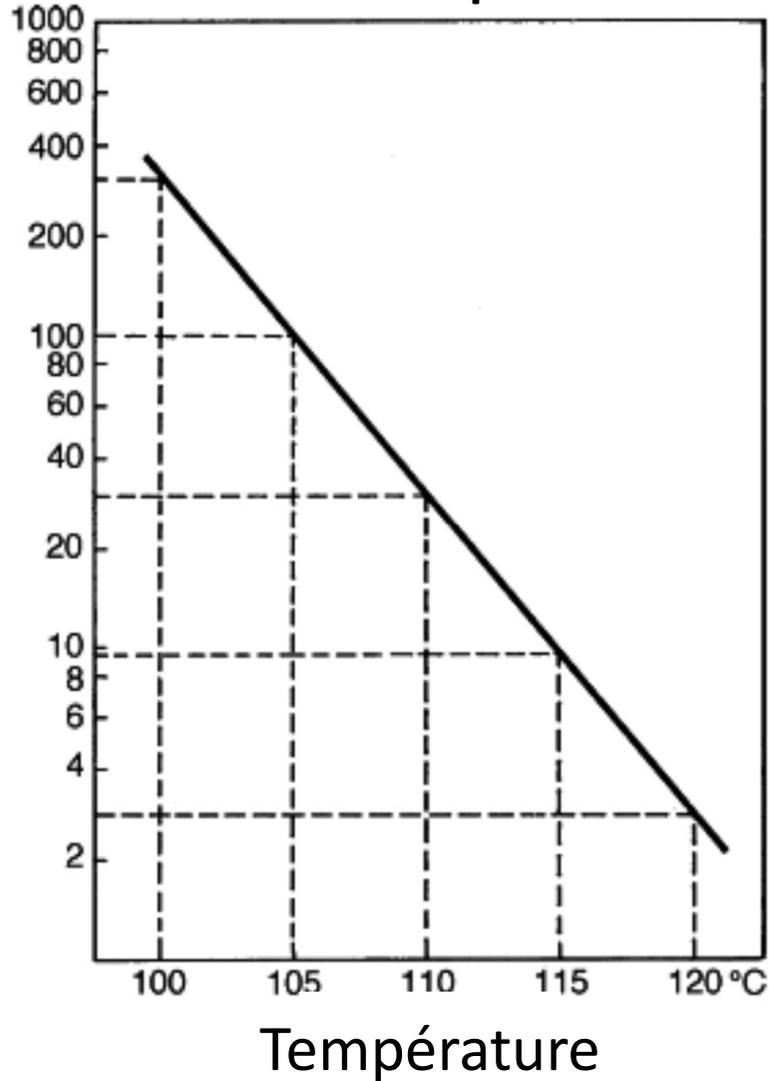
Ex : Carbonate acide de sodium et le salicylate de sodium

(Pouvoir bactéricide à chaud)

Facteurs liés aux modalités de destruction

Température (ex: Destruction de spores de *Clostridium botulinum* par la chaleur)

Temps qui assure pour chaque température une réduction de 10^{12} à 1 germe (minutes)



Temps < 3 min à 120°C

Temps = 9 min à 115°C

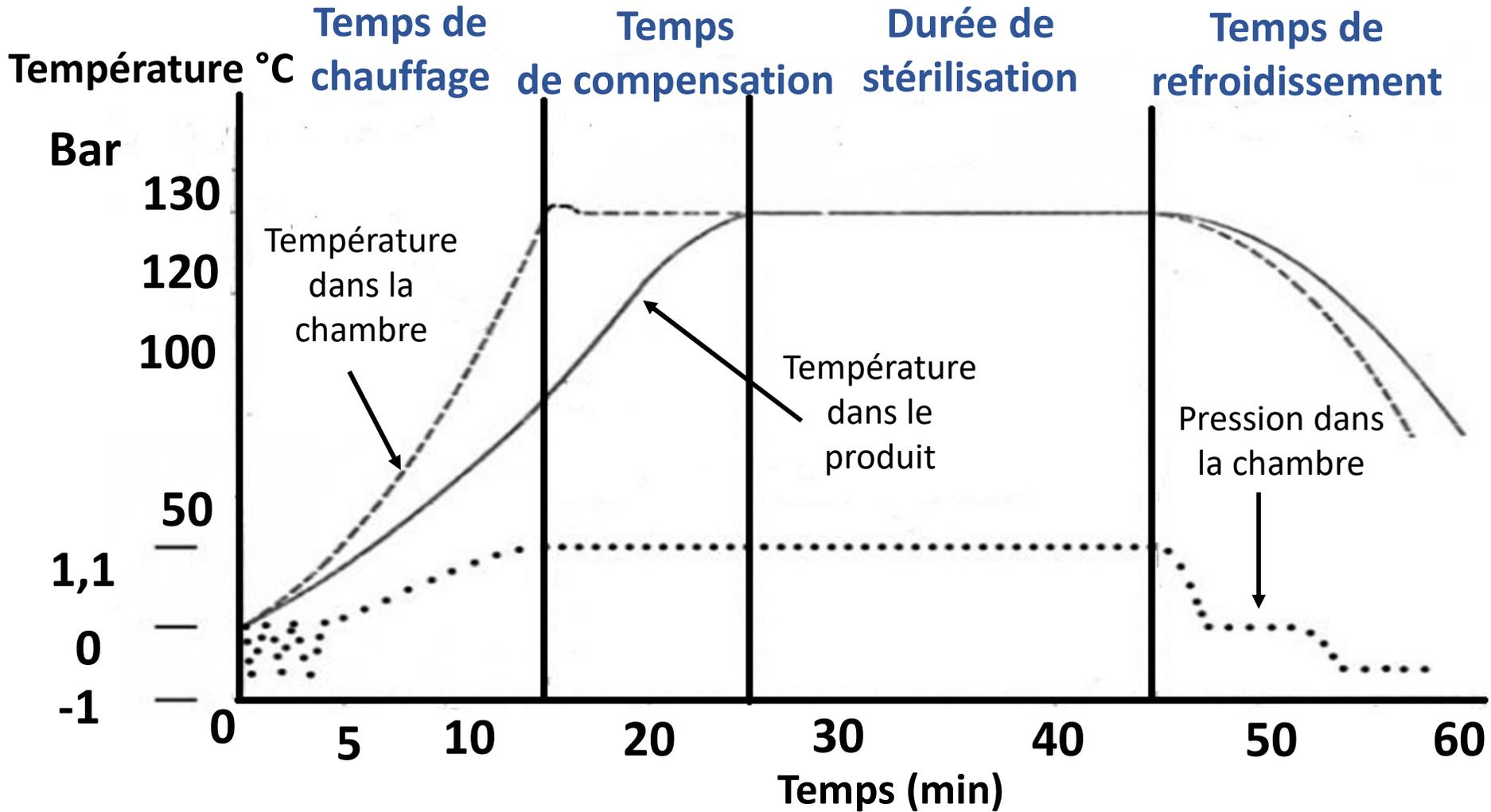
Temps = 30 min à 110°C

Temps > 4 h à 100°C

Bonne sécurité : 15 min à 121°C

Facteurs liés aux modalités de destruction

Ex: Destruction de spores de *Clostridium botulinum* par la chaleur



1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux modalités de destruction

- **Température**

- **Valeur stérilisatrice F_T à la température T:**

- ✓ Traduit l'efficacité du traitement thermique pour un germe de valeurs D_T connue

$$F_T = D_T \times \log N$$

$$N_0$$

F_T = Valeur stérilisatrice

D_T = Durée de chauffage

N_0 = nombre de germes initial

N = nombre de germes au temps T

1.1 Sensibilité des microorganismes à la chaleur

Facteurs liés aux modalités de destruction

- **Humidité et pH**

- Destruction plus difficile en chaleur sèche qu'en chaleur humide

- ✓ Chaleur sèche : oxydation des protéines à T° élevée

- ✓ Chaleur humide : coagulation des protéines

- **pH**

- Stérilisation plus aisée en milieu acide ou alcalin

1. Stérilisation par la chaleur

1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

- Chaleur sèche
- Chaleur humide

1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

Chaleur sèche

Principe de fonctionnement: traitement thermique à l'air chaud à P° atmosphérique

Appareillages :

- ✓ Fours ou étuves à air chaud: type pasteur
- ✓ Stérilisateurs Poupinel

1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

Chaleur sèche

Pharmacopée eur:

- **Barème minimal:** 160°C, 2h30
- Autres couples de stérilisation ex: 140°C, 4h/170°C, 1h/180°C, 30 min

But: atteindre NAS 10^{-6}

NB: association à la dépyrogénéisation au-delà de 220 °C (contenants en verre objets métalliques pour préparations parentérale)

1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

Appareillages (fours, étuves, tunels à air chaud)

Air filtré au préalable, ventilateur(s)



- Fours à deux portes préférables (entrée, sortie)
- En enceinte stérile emballage étanches pas nécessaires



Four à chaleur sèche
FEDEGARI
Installation
STERIGENE

<https://youtu.be/Ax1Guh8CU1k>

Tunnel de Stérilisation/ Dépyrogénéisation

1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

Chaleur humide

Principe de fonctionnement

- Production de vapeur d'eau par chauffage sous pression
- Obtention d'une vapeur saturante : élément de stérilisation
- Transfert de calories et dégradation des structures chromosomiques des noyaux des micro-organismes

1. Stérilisation par la chaleur

1.2 Méthodes de stérilisation

Chaleur humide

Avantages

- Facile à mettre en œuvre
- Ecologique
- Economique

1.2 Méthodes de stérilisation

Chaleur humide

Durée du temps d'exposition totale:

- Temps de réduction décimale d'une souche de *Géobacillus stéarothermophilus* (réduction de la concentration de 90% soit 1 log)

1.2 Méthodes de stérilisation

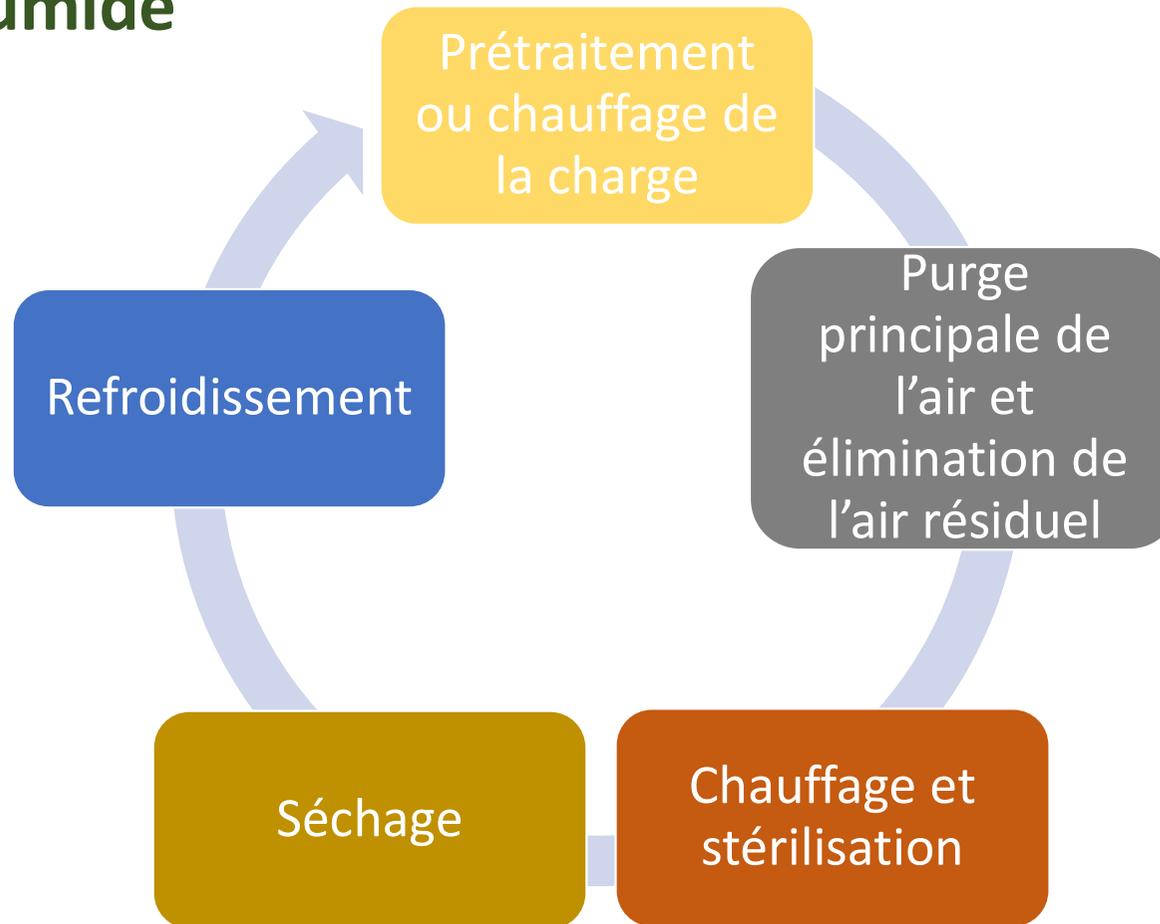
Chaleur humide

Cycle de stérilisation à la vapeur: facteurs d'influence

- type de charge
- géométrie du stérilisateur
- matériaux
- emballages

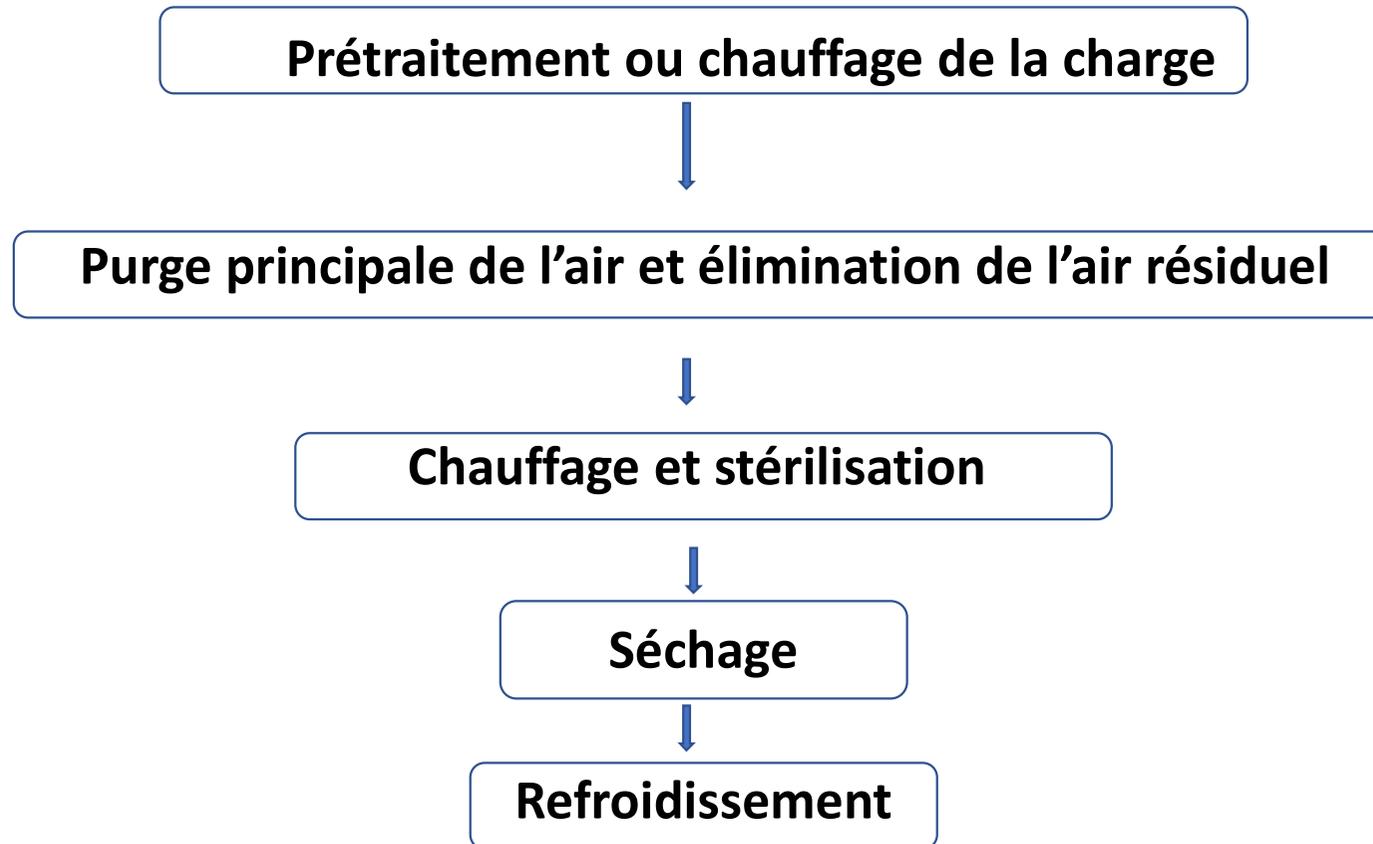
1.2 Méthodes de stérilisation

Chaleur humide



Cycle de stérilisation à la vapeur: exemple

Cycle de stérilisation à la vapeur



*Rq: Phase de désorption en OE (faible taux d'OE résiduel au niveau du **matériau stérilisé**)*

Purge principale de l'air et élimination de l'air résiduel

POURQUOI?

Trop grande hétérogénéité des T° mesurées au temps T peut résulter de la présence d'air résiduel

Donc: bonne diffusion de la vapeur en tout point de l'enceinte conditionne efficacité de la stérilisation

Purge principale de l'air et élimination de l'air résiduel

- Pompe à vide (valeur seuil 70 mbars)
- Pour favoriser l'absence de poches d'air soit:
 - ✓ Répétition de phases: vide/injection de vapeur
 - ✓ Balayage permanent de vapeur sous vide

Purge principale de l'air et élimination de l'air résiduel

Détermination du nombre et de l'amplitude des pulses vide-vapeur:

- Quand? lors des phases d'optimisation du cycle
- Comment? Selon la difficulté d'extraire la charge; en fonction de la corrélation pression/T° et la qualité de la charge finale requise

Chauffage et stérilisation

Par transfert de chaleur en condensant la vapeur sur les éléments à stériliser

Palier de stérilisation= étape où l'on compense les pertes énergétiques liées aux diverses fuites du système afin de maintenir une T° suffisante pour produire l'effet recherché

Chauffage et stérilisation

Recommandation pharmacopée

Durée minimale de palier

15 min à 121°C

Rq: des temps plus courts sont possibles mais doivent être dûment justifiés

Phase post-stérilisation: Séchage et refroidissement

Précautions:

Maintient de la pression dans l'enceinte (récipients pleins bouchés hermétiquement) sinon risque de faire exploser la charge

Matériel et textiles: séchage prédomine sur le refroidissement (revaporiser les condensats formés au chauffage et autre phase précédente)

Phase post-stérilisation: Séchage et refroidissement

Crack test

- Peut précéder la phase de refroidissement
- Détection des défauts et microfuites
- Casse provoquée des récipients non intègres dont la pression interne est encore supérieure
- Comment: tirage rapide + maintient en dépression

Phase post-stérilisation: Séchage et refroidissement

Bonnes Pratiques de Stérilisation

- Impossibilité d'ouvrir simultanément les portes de chargement et déchargement (flux unidirectionnel)
- Impossibilité d'ouvrir la porte de déchargement de l'enceinte tant que le cycle de stérilisation n'est pas conforme aux spécifications programmées

Phase post-stérilisation: Séchage et refroidissement

Bonnes Pratiques de Stérilisation

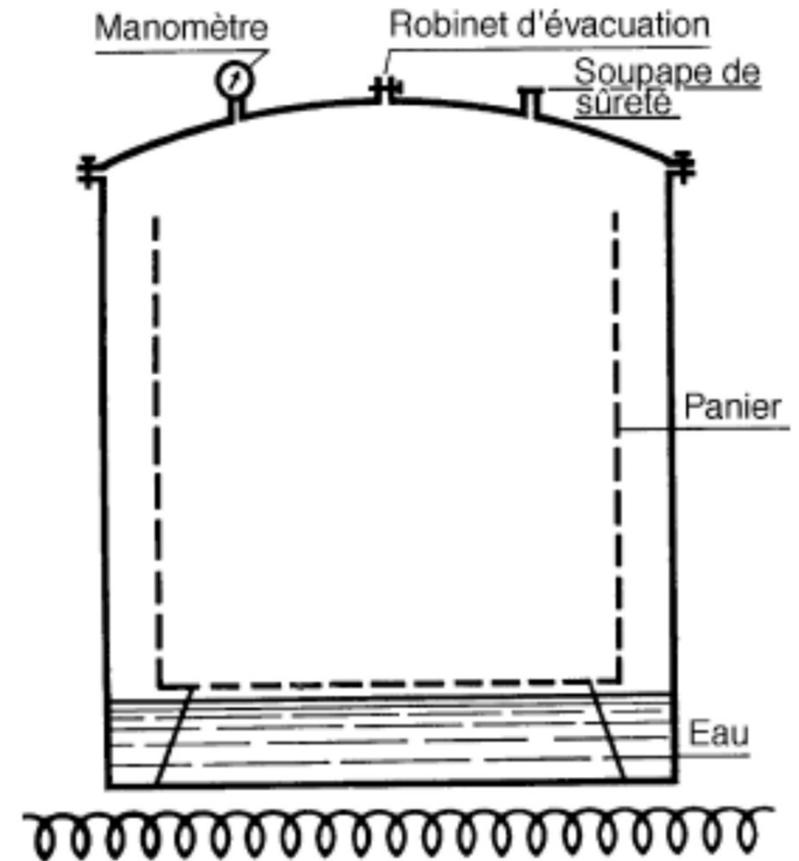
- Un périphérique doit indiquer à chaque extrémité
 - ✓ position des portes (portes verrouillées ou non),
 - ✓ Pression de la chambre
 - ✓ État du process (cycle en cours/cycle terminé)

1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

Chaleur humide

Appareillages

- **Autoclaves**
- ✓ Enceinte cylindrique en cuivre ou acier inoxydable
- ✓ Munie d'un couvercle massif fixé par des boulons (1 ou 2 portes)



<https://www.youtube.com/watch?v=9M7noZWs09s>

Fonctionnement autoclave

1.2 Méthodes de stérilisation

Chaleur humide

- Autoclaves

Conditions de référence

Médicaments stériles

15 min à 121°C

Dispositifs médicaux, objets de conditionnement
(si résistants à la chaleur)

10 min à 134°C

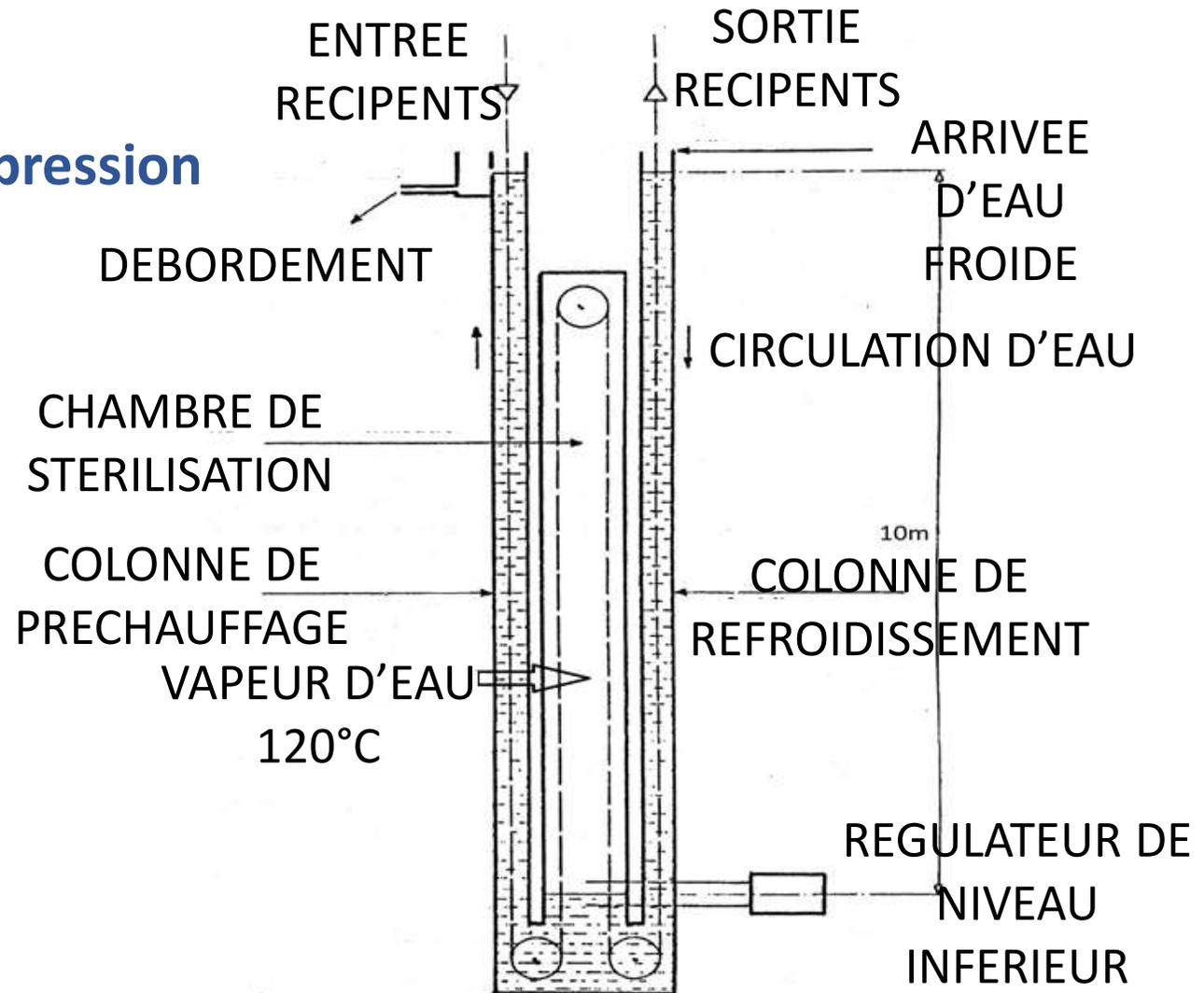
Hôpital (risque de PRIONS)

18 min à 121°C

Chaleur humide

Appareillages

- Stérilisateur à vapeur sous pression



1.2 Méthodes de stérilisation par la chaleur

Chaleur humide

Éléments de contrôle

- Température (différents endroits, cycle de température)
- Pression, air résiduel
- Purge
- Ventilation, refroidissement
- Efficacité: inactivation de germes *Geobacillus stearothermophilus*

2. Stérilisation par filtration

2.1 Principe de fonctionnement et Filtres utilisés

- Mode de stérilisation applicable aux fluides : Liquides, gaz, solutions
- Choix du média filtrant le plus adapté
- Implique une répartition aseptique de la solution

2. Stérilisation par filtration

2.1 Principe de fonctionnement et Filtres utilisés

Critères de choix du média filtrant le plus adapté

- ✓ Compatibilité avec le ou les PA dissouts
- ✓ Taux de rétention
- ✓ Diamètre des pores (0,22 ou 0,1 μm)

2. Stérilisation par filtration

2.1 Principe de fonctionnement et Filtres utilisés

Mécanismes de rétention des particules lors de la filtration

- ✓ Interception directe (criblage)
- ✓ Impact inertiel (attraction électrostatique)
- ✓ Adsorption sur le média filtrant

2. Stérilisation par filtration

2.1 Principe de fonctionnement et Filtres utilisés

Différentes membranes de filtration définies par:

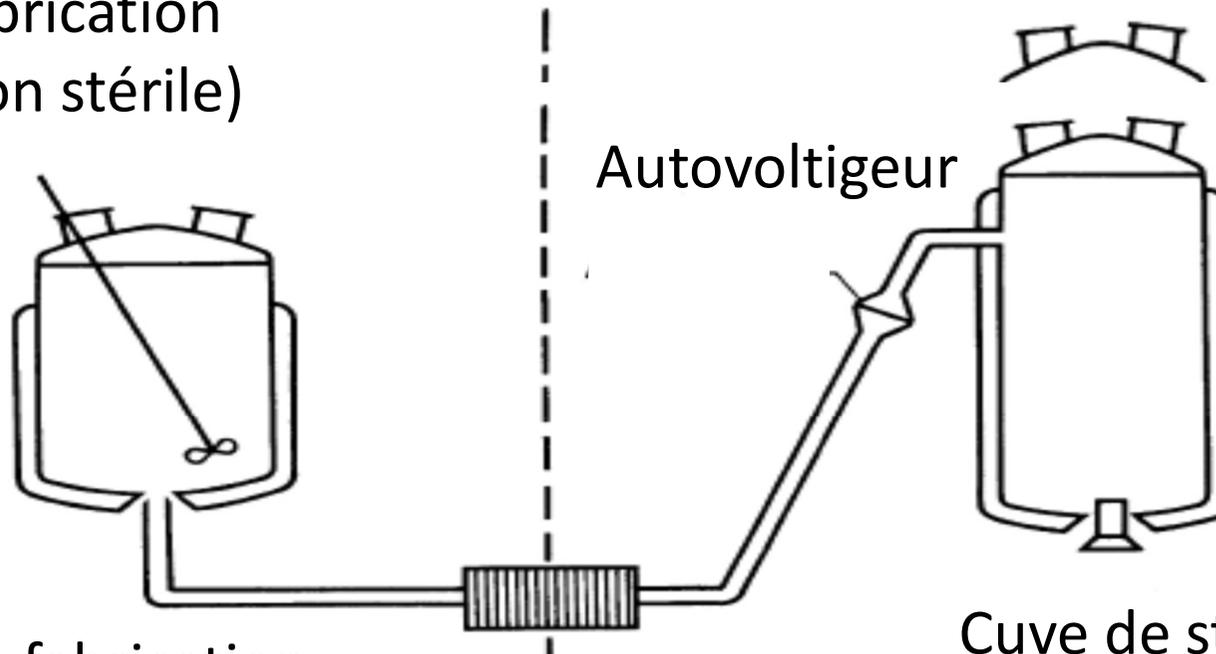
- ✓ la nature du média filtrant (cellulose polysulfone, nylon, polypropylène, PVDF, PTFE...)
- ✓ La porosité (rapport du volume de vides sur le volume total du filtre)
- ✓ Le seuil de rétention (lié au diamètre des pores)
- ✓ Perte de charge

2. Stérilisation par filtration

2.2 Dispositif

Filtres écrans avec membranes filtrantes très fines +++
Ouverture Pores : 0,20 à 0,22 μm maxi

Cuve de fabrication
(Solution non stérile)



Cuve de fabrication
(Solution non stérile)

Filtre stérilisant

Cuve de stockage
de solution stérile

2. Stérilisation par filtration

2.3 Etapes préparatoires : tests de routine de qualification des filtres

- 1. Vérification de la stérilité de l'installation en aval du filtre**
- 2. Assurance de l'intégrité du filtre** avant répartition et après filtration (vérification de l'efficacité de filtration)
- 3. Condition préopératoires liées au produit à stériliser**

2. Stérilisation par filtration

2.3 Etapes préparatoires : tests de routine de qualification des filtres

Vérification de la stérilité de l'installation en aval du filtre

Stérilisation du circuit de répartition par la vapeur propre (121°C-20 min)

Stériliser tout le matériel de filtration et de répartition au préalable sans oublier tous les éléments des contenants de réception de la solution

2. Stérilisation par filtration

2.3 Etapes préparatoires : tests de routine de qualification des filtres

Assurance de l'intégrité du filtre

- avant répartition
- après filtration (vérification de l'efficacité de filtration)

2. Stérilisation par filtration

2.3 Etapes préparatoires : tests de routine de qualification des filtres

Assurance de l'intégrité du filtre (cas des filtres hydrophiles) :

- Point de bulle
- Test de diffusion
- Test de tenue en pression
- Corrélation au challenge bactérien

2. Stérilisation par filtration

Assurance de l'intégrité du filtre (cas des filtres hydrophyles) :

Corrélation au challenge bactérien:

vérification que le filtre permet d'obtenir un filtrat stérile à partir d'une solution de 10^7 *Brevundimonas diminuta*/cm² de surface de filtration

2. Stérilisation par filtration

2.3 Etapes préparatoires : tests de routine de qualification des filtres

Conditions préopératoires liée au produit à stériliser

- Faible biocharge de la solution à stériliser (pour chaque lot)
- Ajout de bactériostatique par précaution
- Réalisation de la filtration le plus tôt possible après la préparation de la solution
- Seconde filtration stérilisante en amont de la répartition (réduction des risques)

2. Stérilisation par filtration

2.4 Validation de la répartition après filtration stérilisante

S'intéresser au:

- Filtre
- Conditions de préparation
- Répartition de la solution

2. Stérilisation par filtration

2.4 Validation de la répartition après filtration stérilisante

Technique de fabrication doit être:

- parfaitement définie
- Formalisée
- respectée

2. Stérilisation par filtration

2.4 Validation de la répartition après filtration stérilisante

Libération de lot de produit issu d'une répartition aseptique

- Doit être associée à un contrôle rigoureux d'un grand nombre de paramètres du processus
- Evaluation rigoureuse des risques: tout écart à la procédure définie doit être enregistré (fiche de déviation)

2. Stérilisation par filtration

2.4 Validation de la répartition après filtration stérilisante

Etapes

1. Simulation de répartition d'un bouillon de culture (« Média Fill test »)
2. Incubation
3. Dénombrement des unités contaminées par mirage de chaque unité remplie

2. Stérilisation par filtration

2.4 Validation de la répartition après filtration stérilisante

Remarques

- Simulation du procédé de production réel
- Evaluation des risques potentiels et des conditions limites opératoires :
« les opérations critiques doivent être exécutées afin de vérifier qu'elles sont maîtrisées en terme d'asepsie »
- Validation initiale nécessaire mais non suffisante (validation périodique au moins 2X par an)

2. Stérilisation par filtration

2.4 Validation de la répartition après filtration stérilisante

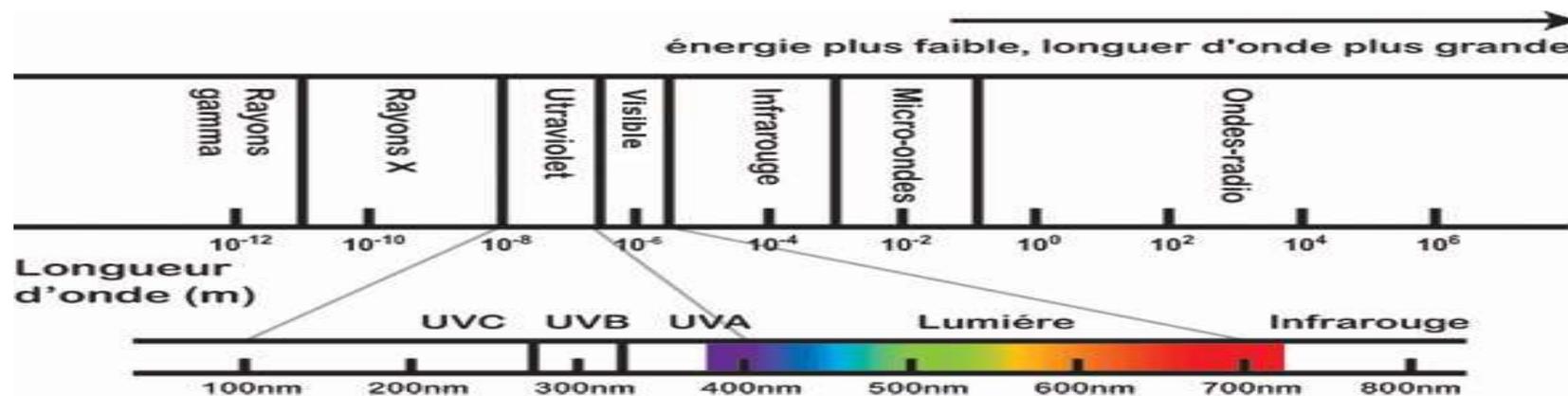
Norme d'acceptation: Norme ISO-DIS-13408-1

- Tend vers une approche statistique de l'évaluation du test
- Définit la taille du lot de simulation à réaliser, les critères d'acceptation, la notion de qualification initiale/requalification

3. Stérilisation par Rayonnements

= radiostérilisation: 2 types de rayonnements

- Radiations électromagnétiques (rayons UV, X, IR)
- Radiations particulières ou ionisantes (rayonnements α , β , γ)



3. Stérilisation par Rayonnements

3.1 Principe de la Radiostérilisation

Efficacité bactéricide, sporicide et virucide

2 types de sources

- ✓ **Radioéléments** : émettent des photons γ (électromagnétique)

Ex: Cobalt 60

- ✓ **Accélérateurs d'électrons**: émetteurs de rayonnement β
(particulaire)

3. Stérilisation par Rayonnements

3.2 Différents types d'irradiateurs

- ✓ **Irradiateurs utilisant les électrons accélérés**
- ✓ **Irradiateurs à rayonnements γ**
- ✓ **Irradiateurs à rayonnements X**

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs utilisant les électrons accélérés

Le pouvoir pénétrant dépend de

- l'énergie de l'accélérateur: Plus l'énergie est importante, plus le pouvoir pénétrant est élevé
- La masse volumique du composé pénétré

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs utilisant les électrons accélérés

Pouvoir pénétrant en fonction de l'énergie de l'accélérateur

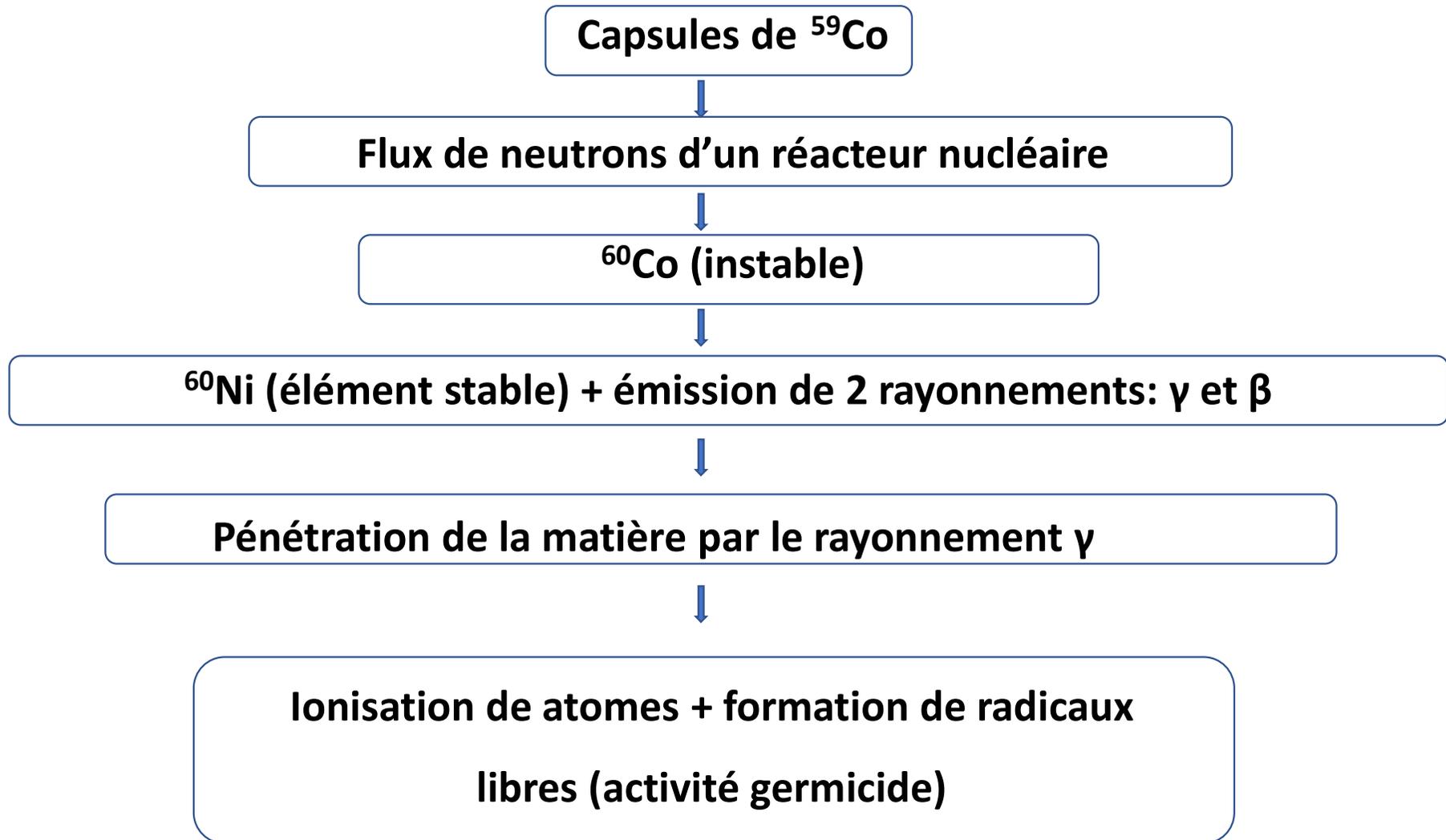
Energie	Pouvoir de pénétration (cm)	Masse volumique du composé (g/cm ³)
< 300 KeV	0,06	1
0,7 à 5 MeV	2	1
> 10 MeV	30	0,15

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs à rayonnements γ

- Sources utilisées à ce jour: sources à ^{60}Co , le ^{137}Cs n'est plus utilisé
- Irradiateurs de grande dimension, protégés par d'épais murs en béton (éviter l'émission des $R\gamma$ en dehors)
- Appareils fonctionnant soit en continu (charge transportée sous la zone d'irradiation par un convoyeur), soit de façon discontinue

Processus de stérilisation à rayonnement γ



3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs à rayonnements γ

Paramètres contrôlés en routine

- Positionnement correct de la source
- Activité de la source
- Temps d'exposition (process discontinu) ou vitesse du convoyeur (process continu)
- Dose adsorbée
- Définition de la charge et densité du produit

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs à rayonnements γ

Comment garantir que la dose permet d'assurer une stérilité de 10^{-6} ?

- Calculer le temps d'exposition grâce à la détermination fréquente de l'activité de la source au cours du temps

Rq: notamment à chaque fois que la source doit être rechargée

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs à rayonnements X

Principe

RX produits par l'action d'un faisceau d'électrons accélérés sur une cible métallique

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs à rayonnements X

Facteurs d'influence

Dose adsorbée dépend:

- Faisceau d'électrons
- Largeur de balayage
- Vitesse du convoyeur

3.2 Différents types d'irradiateurs

Irradiateurs à rayonnements X

Paramètres contrôlés

- Enregistrement continu des caractéristiques du faisceau et de la vitesse du convoyeur
- Dose adsorbée
- Distribution du produit et densité des matériaux)

3.3 Conditions d'utilisation

Avant la stérilisation :

- ✓ Conditionner les articles dans des emballages étanches de manière à rester stériles jusqu'au moment de l'emploi

Choix de la dose de rayonnements ionisants dépend :

- ✓ Contamination initiale
- ✓ Radiosensibilité des germes

3.4 Éléments de contrôle

- Contrôle qualitatif et quantitatif de la contamination avant l'irradiation
- Détermination de la dose minimale de rayonnement au cours d'essais préliminaires

3.5 Choix de la méthode d'irradiation

- Paramètres à étudier:
 - Paramètres liés au produit
 - Facteurs économiques

3.5 Choix de la méthode d'irradiation

Paramètres liés au produit

- Compatibilité avec le produit
- Durée minimum du temps d'exposition
- Uniformité de la dose
- Qualification du produit

3.6 Choix de la méthode d'irradiation

Facteurs économiques

- Rendement
- Taux d'utilisation
- Maintenance

4. Stérilisation par gaz

4.1 Principe

- Activité bactéricide repose sur la **réaction d'alkylation** des acides nucléiques des cellules mais aussi des protéines
- **Alkylation**: hydroxyéthylation irréversible au niveau de l'azote des bases puriques, des phosphates

4. Stérilisation par gaz

4.1 Principe

- Applicable au matériel dans des conditions déterminées :
Température, Durée, Humidité, Concentration
- Mais pas de gaz stérilisant idéal
- Trois gaz sont actuellement utilisés : **Oxyde d'éthylène, Acide péracétique, Peroxyde d'hydrogène** ou stérilisation au **gaz plasma**

4. Stérilisation par gaz

4.2 Oxyde d'éthylène

Propriétés physico-chimiques

- A T° ambiante, gaz incolore très diffusible
- Gaz comprimé liquéfié : C_2H_4O
- Miscible à l'eau en toutes proportions et les solvants organiques courants
- T° d'ébullition: 10,7°C
- Densité: 1,52
- Pression de vapeur: 1,45 bar à 20°C; -3,80 bar à 50°C

4.2 Oxyde d'éthylène

Remarques

- Ne doit pas être mélangé avec l'eau car donne un hydrate solide
- Dans le stérilisateur, pour une activité germicide, utilisé en présence de vapeur d'eau
- Large spectre d'activité

4.2 Oxyde d'éthylène

Remarques

- **Après stérilisation** :Élimination de l'oxyde d'éthylène dépend de la nature des articles

Ex: Libération rapide à partir des gazes et cotons, Un peu plus lent à partir du Polyéthylène, assez long pour les Polychlorure de vinyle, silicones, caoutchoucs

4.2 Oxyde d'éthylène

Remarques

- **Après stérilisation**

- Désorption à la température ordinaire : peut durer 8 à 15 jours et même beaucoup plus
- Oxyde d'éthylène résiduel :

Action conjuguée de la chaleur et du vide pour bien éliminer

4.2 Oxyde d'éthylène

Éléments de contrôle

- Efficacité dépend de plusieurs facteurs :
 - ✓ Nombre et nature des germes à détruire
 - ✓ Durée du traitement
 - ✓ Nature des articles et des emballages

4.2 Oxyde d'éthylène

Éléments de contrôle

- Spores les plus résistantes à l'oxyde d'éthylènes: spores de *Bacillus subtilis* variété *niger* morphotype *globigii*
- Servent de témoins biologiques de stérilisation
- Paramètres: $D_T = 2,7$ min à $T = 50^\circ\text{C}$; $Z = 40^\circ\text{C}$

Z = valeur d'inactivation thermique: variation de T° permettant de modifier 10 fois la valeur D_T

4.2 Oxyde d'éthylène

Éléments de contrôle

- Spores les plus résistantes à l'oxyde d'éthylènes: spores de *Bacillus subtilis* variété *niger* morphotype *globigii*
- Servent de témoins biologiques de stérilisation
- Paramètres: $D_T = 2,7$ min à $T = 50^\circ\text{C}$; $Z = 40^\circ\text{C}$

Z = valeur d'inactivation thermique: variation de T° permettant de modifier 10 fois la valeur D_T

4.2 Oxyde d'éthylène

Précautions

- Polymérisation de l'OE facile à l'état liquide: accélérée par la P°, la chaleur et différents produits chimiques
- Or, stocké sous forme liquide en bouteille sous-pression
- Conséquences: durée de stockage courte (< 3 mois); stockage à l'abri de la chaleur (< 30°C); bouchage des filtres et vannes d'alimentation de la chambre du stérilisateur

4.2 Oxyde d'éthylène

Précautions

- OE inflammable s'il est utilisé pur
- Enceinte doit être en dépression pour éviter toute fuite
- Ou usage à l'état dilué (généralement dans du CO₂) sous pression

4.2 Oxyde d'éthylène

Précautions

- OE gaz toxique également pour l'homme:
 - ✓ par contact en milieu humide : irritations, brûlures sévères de la peau, des yeux, de la sphère nasale et buccale,
 - ✓ par inhalation: brûlures des muqueuses respiratoires, nausées et vomissements, voire œdème aigu du poumon
- OE mutagène et cancérogène

4.2 Oxyde d'éthylène

Précautions

- Normes toxicologiques:
 - ✓ VLE (valeur limite d'exposition): 5 ppm pendant 15 min
 - ✓ VME (valeur moyenne d'exposition): 1 ppm pendant 8 heures



Le personnel doit être protégé!

4.2 Oxyde d'éthylène

Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Note for guidance européenne « limitation of the use of ethylene oxide of medicinal product-3AQ3a »:

- Stérilisation à l'OE doit être restreinte au maximum
- Usage d'une autre méthode chaque fois que cela est possible

Ex: radiostérilisation pour MP destinées à une répartition aseptique de poudre stérile

4.2 Oxyde d'éthylène

Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Paramètres à maîtriser:

- **Humidité relative au niveau du produit**
- **Conditionnement de la charge**
- **Concentration en oxyde d'éthylène**

Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Paramètres à maîtriser:

➤ **Humidité relative (HR) au niveau du produit**

- Eau nécessaire à la réaction d'alkylation et permet une meilleure diffusion du gaz à travers les emballages polaires
- En général: **HR= 40 à 50%** (jusqu'à 80%)
- Humidification préalable ou au cours du cycle
- Si préalable, la stérilisation doit suivre immédiatement la phase de « préconditionnement »

Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Paramètres à maîtriser:

➤ **Conditionnement de la charge**

- Dans des protecteurs individuels de stérilité, des emballages de protection, des cartonnages de regroupement
- **Ces matériaux et le produit captent une partie de l'humidité qui fait alors défaut au process**

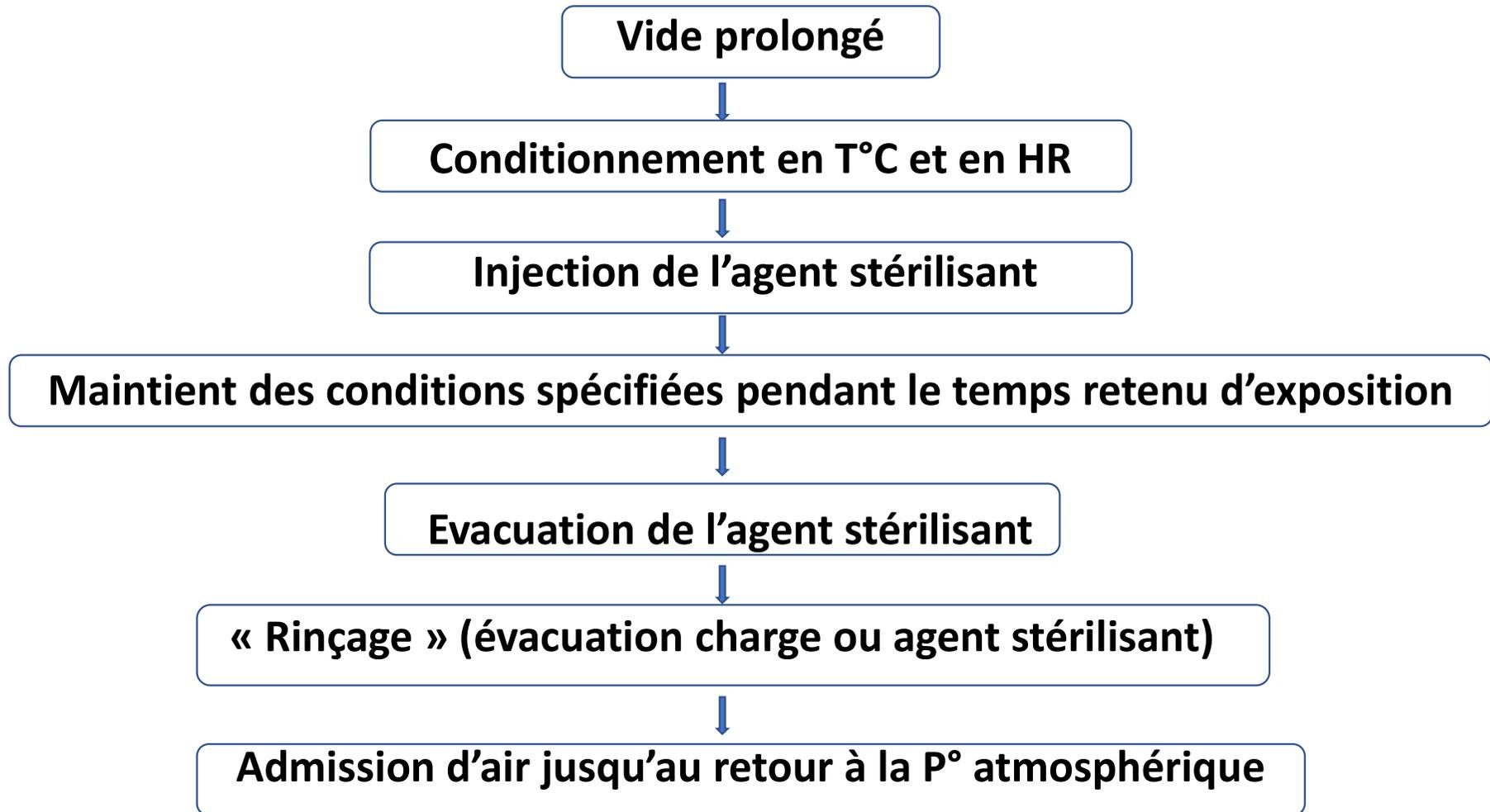
Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Paramètres à maîtriser:

➤ **Concentration en oxyde d'éthylène**

- Concentration utile entre 300 et 1200 mg/L
- **Nécessité d'une concentration homogène en tous points donc vide prolongé préalable**

Phases du cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène



*Rq: Phase de désorption en OE (faible taux d'OE résiduel au niveau du **matériau stérilisé**)*

Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Phases du cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène

Désorption en OE:

- *Les matériaux plastiques peuvent fixer des quantités considérable d'OE et une vitesse de désorption lente: ex PVC*
- ✓ *Réaliser une désorption à la T° la plus élevée compatible avec le matériau ex: 60°C*

Procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Phases du cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène

Désorption en OE:

- *Plus phase d'exposition longue, + taux de rétention de l'OE élevée, + temps de désorption allongé*
- ✓ *Faire désorber dans des chambres-étuves dans lesquelles le taux de renouvellement de l'air est élevé (> 20 vol/h) pour réduire la durée de la phase de désorption*

4.2 Oxyde d'éthylène

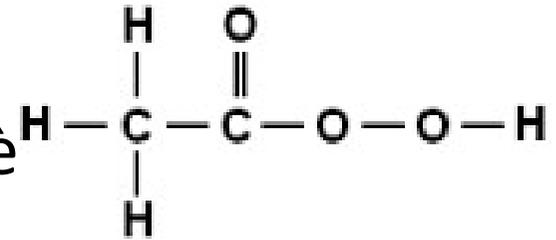
Contrôle du taux d'oxyde d'éthylène résiduel

Différentes méthodes:

- Dosage par CPG head-space après désorption (Pharmacopée)
- Extraction aqueuse avec simulation d'utilisation (Norme ISO) = méthode de réf des DM (Norme ISO 10993-7: 1995)
- Extraction organique avec simulation d'utilisation (Norme ISO)

4.3 Acide péracétique

- Utilisé parfois à la place de l'oxyde d'éthylène
- Liquide incolore à la température ordinaire
- Propriétés antimicrobiennes : bactéricide, virucide, fongicide
- ✓ Agent d'oxydation très puissant
- ✓ Agit par libération d'oxygène sous forme atomique



4.3 Acide péracétique

- Solution concentrée :
- ✓ Forte odeur piquante
- ✓ Effet lacrymogène
- ✓ Attaque la peau et les muqueuses
- Très peu pénétrant
- Mais action stérilisante puissante

4.4 Peroxyde d'hydrogène ou stérilisation au gaz plasma

- vaporisation sous vide poussé (50 Pa)
- Génération d'un plasma sous l'effet d'un champ électrique = gaz hautement ionisé composé d'ions, d'électrons et de particules neutres produisant une lumière visible
- **Plasma**= état sous lequel on retrouve des radicaux H° et HO°

4.4 Peroxyde d'hydrogène ou stérilisation au gaz plasma

= Procédé STERRAD®

Développé par la société JOHNSON & JOHNSON MEDICAL

- Procédé utilisé en stérilisation hospitalière
- Ne s'utilise pas pour les objets creux et long

Intérêt:

- élimine les traces de peroxyde d'hydrogène résiduel sur les matériels (Transformation en eau et oxygène non toxiques)

5. Conditionnement aseptique, enceintes stériles

5.1 Précautions particulières

- Pour les produits qui ne peuvent pas être stérilisés dans leur conditionnement définitif
- Préparer ces produits dans des enceintes stériles
- Asepsie aussi rigoureuse que possible
- Enceintes = **Zones d'atmosphère contrôlée (ZAC)**

5.2 Caractéristiques

Dimensions très diverses :

- Vitrine, entourage d'une machine
- Salle entière de fabrication

Si installation complexe et de grande taille :

- Difficile de maintenir un niveau élevé d'asepsie

Répartition d'un médicament solide :

- Ne constitue pas un milieu favorable aux microorganismes
- Donc moins exigeant que si solution de produits biologiques

5.3 Filtration stérilisante de l'air

- 2 types de flores dans l'atmosphère :
 - Flore saprophyte, Flore de germes pathogènes
- Flore saprophyte :
 - Non pathogène
 - Mais gênante pour l'obtention d'atmosphères stériles
 - Certaines peuvent être s/f de spores résistantes

5.3 Filtration stérilisante de l'air

- **Flore de germes pathogènes :**
 - Se trouvent à proximité des êtres vivants
 - Ne peuvent survivre longtemps dans l'air
- **Transport des germes par des supports divers :**
 - **Poussières d'origines très diverses :**
 - Certaines facilitent la conservation des germes et même leur multiplication

5.3 Filtration stérilisante de l'air

- Teneur de l'air en microorganismes est très variable
- Air des villes : **bcp plus pollué que celui des campagnes**
- Les germes se multiplient plus vite en atmosphère très humide
- Facilement disséminés si mouvements d'air
- En tenir compte lors de la stérilisation de l'air

5.3 Filtration stérilisante de l'air

- **Élimination des germes en suspension dans l'air :**
 - **Réalisée par filtration à l'aide de filtres stérilisants**
 - **Précédés de préfiltres :**
 - *Assurent le dépoussiérage*
 - *Arrêtent une forte proportion de germes*
 - *Évitent le colmatage rapide des filtres stérilisants*
- **Tubes à UV germicides : Placés après les filtres stérilisants**

5.4 Enceintes stériles

Enceintes stériles classiques

- **Isolateurs en isotechnie**
 - Peuvent être de formes diverses
 - Habituellement de taille réduite
 - Ils sont clos : **Opérateur se trouve à l'extérieur**

ISOLATEUR D'ISOTECHNIE



5.4 Enceintes stériles

Enceintes stériles classiques

- **Opérations réalisées :**
 - Soit à l'aide de gants étanches
 - Soit à l'aide d'un demi-scaphandre
 - Soit par un mécanisme dont les commandes sont à l'extérieur
- Permet de réduire au minimum les interventions humaines directes

5.4 Enceintes stériles

Enceintes stériles classiques

- **Salles ou blocs stériles :**
 - Installation plus complexe
 - Manipulateurs se trouvent à l'intérieur :
 - **Ils constituent une source de contamination importante**
 - Des lampes à UV sont placées à tous les niveaux par précaution

5.4 Enceintes stériles

Enceintes stériles classiques

- **Applications :**
 - Conditionnement aseptique
 - Manipulation de produits à risque élevé pour le personnel

5.4 Enceintes stériles

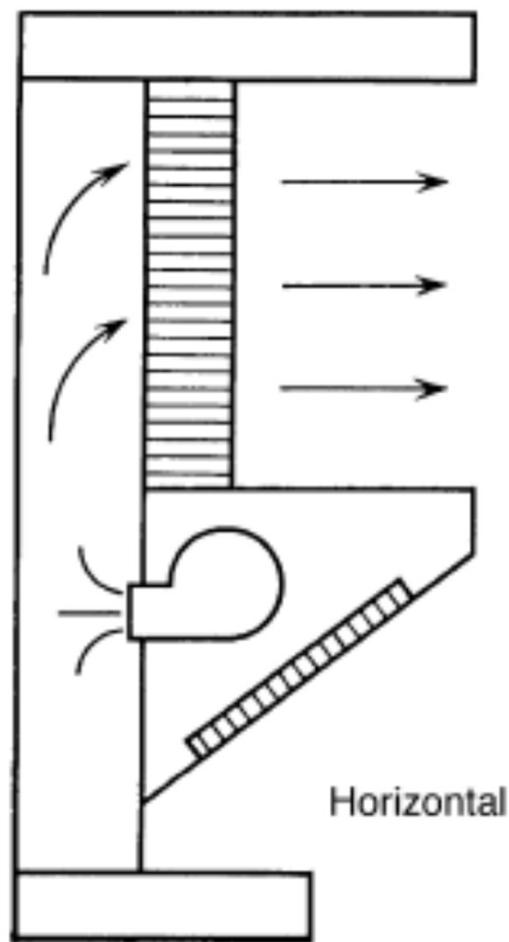
Enceintes stériles à flux d'air laminaire

- **Flux d'air laminaire :**
 - **Déplacement d'air à vitesse uniforme**
 - **Avec un minimum de tourbillons**
- **Enceintes comportent deux faces poreuses opposées**

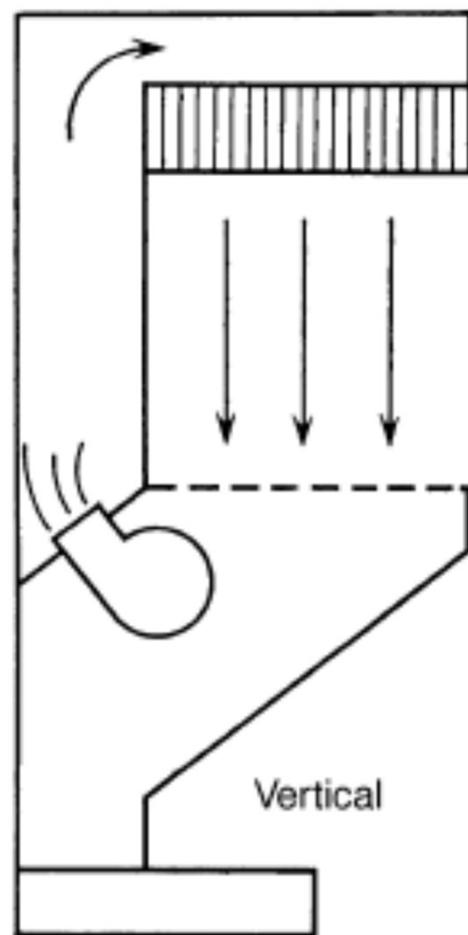
5.4 Enceintes stériles

Enceintes stériles à flux d'air laminaire

- Entrée de l'air :
 - Par des filtres stérilisants
 - **Élimination de toutes les particules contenues dans l'air**
- Usages :
 - **Blocs opératoires, Fabrications aseptiques**

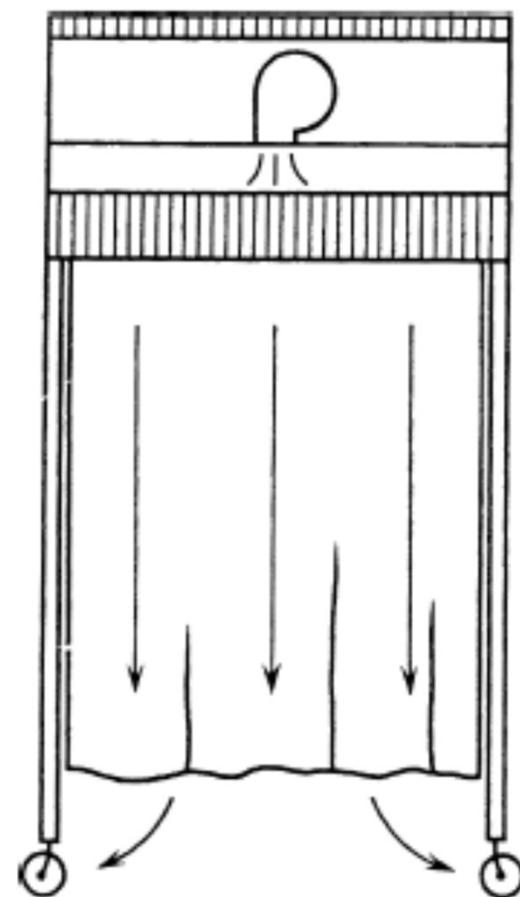


Horizontal



Vertical

Hottes à flux d'air laminaire.



Tente à flux d'air laminaire.

5.5 Classification des zones d'atmosphère contrôlée

Classe A

- Opérations à haut risque :
 - Remplissage
 - Ampoules et flacons ouverts
 - Raccordements aseptiques
- Travail sous flux d'air laminaire

5.5 Classification des zones d'atmosphère contrôlée

Classe B

- Opérations de préparation et de remplissage aseptiques
- Environnement immédiat d'une zone de classe A

Classes C et D

- Destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles

Caractéristiques des zones d'atmosphère contrôlée (ZAC)

Classe	Au repos ^b		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particules par m ³ , de taille égale ou supérieure à :			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3500	0	3500	0
B ^a	3500	0	350 000	2000
C ^a	350 000	2000	3 500 000	20 000
D ^a	3 500 000	20 000	non défini ^c	non défini ^c

Tableau 3.10**Limites recommandées de contamination microbiologique^(a)**

Classe	Échantillon d'air ufc/m ³	Boîtes de Pétri (diam. : 90 mm), ufc/4 heures ^(b)	Géloses de contact (diam. : 55 mm), ufc/plaque	Empreintes de gant (5 doigts) ufc/gant
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	–
D	200	100	50	–

(a) Il s'agit de valeurs moyennes.

(b) Certaines boîtes de Pétri peuvent être exposées pendant moins de quatre heures. (ufc : unité formant colonie)

III. Contrôle de stérilité

1. Valeur stérilisatrice

1.1 Définition

- Méthode de calcul dont le résultat est exprimé en minutes à une T° de référence
- Permet de quantifier l'effet stérilisant, reliant proportionnellement la réduction de la contamination biologique au temps d'exposition de celle-ci à une énergie thermique

1.Valeur stérilisatrice

1.2. Intérêt

Permet de:

- Maîtriser et quantifier l'effet d'un traitement à la chaleur sèche (F_H) ou humide (F_0)
- Comparer tous les cycles ou traitements de stérilisation par rapport à un objectif réglementaire

Ex: entre eux pour déterminer le plus efficace, le plus économique, le moins traumatisant pour une charge...

1.Valeur stérilisatrice

1.3 Lois

Illustrée par 2 lois:

- Loi de décroissance du nombre de micro-organismes en fonction du temps à T° constante
- Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

- Peut être comparée à une loi cinétique d'ordre 1
- Témoigne d'un environnement donné à T° stable d'une relation d'effet dose progressive liant l'effet biologique à l'absorption de la chaleur humide ou sèche

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

3 paramètres principaux:

- Concentration initiale
- Concentration finale
- Temps de réduction décimale: D_T

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Concentration initiale (Ci) et finale (Cf)

- Au cours de la stérilisation la Ci réduite progressivement jusqu'à atteindre Cf
- Importance de connaître Ci ou **biocharge** (bioburden) et définir l'unité
- A défaut de norme, unité retenue:
 - ✓ conditionnement unitaire du produit pour les charges multiples
 - ✓ Surfaces, volumes si une seule unité représente la charge

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Concentration initiale (C_i) et finale (C_f)

- C_i mesurée soit:
 - ✓ Au sens statistique du terme
 - ✓ Estimée et surévaluée selon la méthode de **surdestruction** (overkill) si le produit n'est pas thermolabile

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Concentration initiale (Ci) et finale (Cf)

- Cf est:
 - ✓ Très inférieure à 0
 - ✓ S'exprime comme la Probabilité de Survie d'un Micro-organisme (PSMO) dans l'unité traitée
 - ✓ PSMO jamais inférieure à 10^{-6} : 1 malchance sur 1million de conserver un germe viable dans cette unité (réglementation européenne injectables stériles humains)

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Concentration initiale (Ci) et finale (Cf)

- **Exemple**

- ✓ Ci surestimée (biocharge): **10^6**

- ✓ Cf attendue: **10^{-9}**

- ✓ La stérilisation devra permettre une réduction de **10^6 à 10^{-9}**
soit une réduction de 15 log

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

- **Définition**

Temps nécessaire pour réduire la population de micro-organismes d'un facteur 10, soit 90% ou 1 log

= valeur permettant de passer de C_i à C_f

Germe de référence: *Géobacillus stéarothermophilus* $D_{T121,1^\circ\text{C}}$

comprise entre 1,5 et 2,3 minutes (généralement exploitée à 2 min)

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

- Exemples : valeurs de D à $T = 121^\circ\text{C}$ ($250^\circ\text{F} = 121,11^\circ\text{C}$)
 - Bactéries non sporulées: $D_{T <} 10$ s
 - Spores de bactéries courantes :
 - ✓ $D_{T <} 30$ s (résistance moyenne) ex: *Clostridium botulinum*
 - ✓ $D_T = 30$ s à 1 min (résistance élevée) ex: *Clostridium sporogenes*
 - Spores de bactéries exceptionnellement résistantes: $D_T = 1$ min à 3 min

Ex: *Géobacillus stéarothermophilus*

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

- Exemples : valeurs de D à T= 121°C (250°F=121,11°C)

Exercice: si nous retenons D= 1min quel temps d'exposition à 121,1°C de chaleur humide permettront la réduction de 15 log de la biocharge? La valeur obtenue 10^{-9} est-elle satisfaisante pour la stérilisation des injectables ?

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

- **Exemples : valeurs de D à T= 121°C (250°F=121,11°C)**

Dans notre exemple, si nous retenons $D= 1\text{min}$ alors 15 min d'exposition à 121,1°C de chaleur humide permettront la réduction de 15 log de la biocharge et donc précisément d'atteindre une concentration finale de 10^{-9} , satisfaisant pour la stérilisation des injectables puisque inférieure à 10^{-6}

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

Exercice:

✓ Ci surestimée (biocharge): 10^{10}

✓ Cf obtenue: 10^{-4}

Quelle la réduction obtenue?

Si nous retenons $D= 2$ min quel temps d'exposition à $121,1^\circ\text{C}$ de chaleur humide ont permis la réduction de la biocharge?

La valeur obtenue est-elle satisfaisante pour la stérilisation des injectables ?

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

- **Remarques**

- **$D = 1$ pour la flore bactérienne commune**

- **$D = 2$ pour *Geobacillus stearothermophilus***

- *Valeur D de la flore bactérienne locale et au min de la souche de référence indispensable pour définir le couple temps-température d'un cycle de stérilisation d'un soluté injectable*

Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à température constante

Temps de réduction décimale: D_T

- **Remarques**

- D peut varier de **100% à 500%** selon:

- ✓ la **souche**

- ✓ Le **milieu de dilution** et la concentration saline ou la présence d'ions **Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺** et de **KCl**

- De **1 à 3** selon les **formulations des élastomères**

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Introduction de la notion d'inactivateur thermique Z

Définition

- Variation de T° nécessaire pour modifier la valeur de temps de réduction décimale D d'un facteur 10
- Plus on élève T° de traitement, plus le temps de réduction diminue
- Valeur de référence: Z=10°C chaleur humide (*Géobacillus stearothermophilus*)

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Introduction de la notion d'inactivateur thermique Z

Définition

Dans le cadre de la stérilisation par la voie humide:

- Lorsque $Z = 10^\circ\text{C}$ et $T = 121,1^\circ\text{C}$
- $F_T^Z = F_0$

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Définition

Comparaison des traitement thermiques différents:

- F^Z_T permet de comparer des couples Temps/Température
- $F \ll O \gg$, $F \ll H \gg$ et $F \ll T \gg$ sont des cas particuliers

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Comparaison des traitement thermiques différents:

- **Exemple:**

Soit à comparer 2 traitements à la chaleur humide:

- Traitement 1: 121°C pendant 20 min
- Traitement 2: 118 °C pendant 30 min

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Comparaison des traitement thermiques différents:

- **Exemple:**

« Grâce à Z on peut déterminer pour 1 min de traitement à une T° X quel est son effet stérilisant équivalent à la T° de référence. »

Ex: 1 min à 113,6°C correspond à 0,177 min à 121,1°C (voir table des calculs d'équivalences photocopié en annexe)

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Comparaison des traitement thermiques différents: Table (polycop)

- Temps exprimé en min d'effet stérilisant à 121,1°C pour 1 min de traitement à la T° lue pour les entiers dans la 1ere colonne de gauche et pour la décimale sur la première ligne
- 1min à 113,6°C garantit même effet stérilisant que 0,177 min à 121°C

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Comparaison des traitement thermiques différents:

- **Exemple 1:**

Si nous devons réduire de 15 log soit 15 min à 121,1 °C avec $D=1$ alors la durée de la phase stérilisante à 113,6°C sera de $15/0,177$ soit environ 1h 25 min

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Comparaison des traitement thermiques différents:

- **Exemple 2:**

2 min à 118,1°C et 0,5 min à 124,1 °C équivalent à 1 min à 121,1°C d'où:

$$(30 \text{ min à } 118^{\circ}\text{C}) / (2 \text{ min à } 118^{\circ}\text{C}) = (15 \text{ min à } 121^{\circ}\text{C})$$

Soit un traitement d'environ 25% inférieur à celui de 20 min à 121°C

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Valeur stérilisatrice: F_0 en chaleur humide et F_H en chaleur sèche
(cas particuliers du modèle général F^T_Z corrélant un effet à un apport thermique)

- **F_0 = somme des effets stérilisants par unité de temps sur toute la durée de la phase déclarée comme stérilisante dans un cycle de stérilisation**

Donc:

$$F_0 = \sum_0^t 10^{(T-T_{ref}) / Z} \times \Delta t$$

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Valeur stérilisatrice: F_0 en chaleur humide et F_H en chaleur sèche

(cas particuliers du modèle général F^T_z corrélant un effet à un apport thermique)

- En pratique: c'est la surface définie entre la ligne de base, c'est-à-dire la T° seuil à partir de laquelle on accepte de quantifier l'effet stérilisant (souvent 100°C) et le profil de la courbe tracée lors du traitement de la charge.

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Valeur stérilisatrice: F_0 en chaleur humide et F_H en chaleur sèche (*cas particuliers du modèle général F^T_z corrélant un effet à un apport thermique*)

- Calcul mathématique par intégration du couple T°/Temps et

graphiq

$$F_0 = \sum_0^t 10^{(T-121,11) / 10} \times \Delta t$$

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Valeur stérilisatrice: F_0 en chaleur humide et F_H en chaleur sèche (*cas particuliers du modèle général F^T_Z corrélant un effet à un apport thermique*)

- F_0 permet donc de comparer l'efficacité thermique de traitements différents en rapportant tout aux conditions de réf ($Z=10^\circ\text{C}$ et $T= 121,1^\circ\text{C}$)

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Valeur stérilisatrice: F_0 en chaleur humide et F_H en chaleur sèche (*cas particuliers du modèle général F^T_Z corrélant un effet à un apport thermique*)

- Quand un produit n'est pas traité à la température de réf, la valeur stérilisatrice F_0 = temps équivalent qu'il aurait fallu appliquer au produit si la T° de stérilisation était de $121,1^\circ\text{C}$

Loi des équivalences d'effets thermobiologiques

Temps équivalent

Valeur stérilisatrice: F_0 en chaleur humide et F_H en chaleur sèche (*cas particuliers du modèle général F^T_Z corrélant un effet à un apport thermique*)

Exemple

- Stérilisation par la voie sèche: T° de réf pour $F_H = 170^\circ\text{C}$
- Germe de réf= *Bacillus subtilis variété niger* pour lequel $D_{170^\circ\text{C}} = 4$ min avec $Z = 20^\circ\text{C}$. On parle de F_H (H pour « Heat »)

2. Témoins de stérilisation

On distingue 2 types de témoins:

- **Témoins physico-chimiques**
- **Témoins biologiques**

Utilisés pour chaque type de stérilisation **sauf la filtration stérilisante**

2. Témoins de stérilisation

2.1. Témoins physico-chimiques

Projet de Norme EN 867

Substances qui témoignent que le produit est passé par la phase de stérilisation

Usage pendant longtemps de tubes de verre contenant des **substances chimiques pures à point de fusion caractéristique + indicateur coloré**

Ex: Acide benzoïque $\theta_f = 121^\circ\text{C}$

Indicateur coloré = éosine (passe du rose pâle au rose orangé)

2. Témoins de stérilisation

2.1. Témoins physico-chimiques

Mode de stérilisation	Indicateur	Caractéristiques
Chaleur humide	Bande thermosensible 3M-1222	Changement de couleur lors du contact avec la vapeur d'eau
Chaleur sèche	Bande thermosensible 3M-1226	Changement de couleur dès atteinte du point de fusion
Rayonnement	Pastille PVC imprégnée d'indicateur coloré	-
Plasma	Bande adhésive	Changement de couleur lors du contact avec le peroxyde d'hydrogène

2. Témoins de stérilisation

2.1. Témoins physico-chimiques

Autres indicateurs

Type d'indicateur	Caractéristiques
Indicateurs multiparamètres	Prennent en compte l'agent stérilisant + durée de traitement + concentration de gaz ou dose de rayon
Indicateur BOWIE-DICK https://www.medicalexpo.fr/prod/ellab-validation-monitoring-solutions/product-126579-924469.html	Disque thermosensible utilisé pour vérifier l'efficacité du prétraitement dans les autoclaves à vapeur d'eau

<https://www.medicalexpo.fr/prod/ellab-validation-monitoring-solutions/product-126579-924469.html>

2. Témoins de stérilisation

2.2 Témoins biologiques

- Témoins incluant une **population dénombrée d'un germe connu**
- Vérification de la réduction de **6 log de cette population après traitement stérilisant**

NB: ne permettent pas de garantir l'obtention de la probabilité de survie d'un microorganisme de 10^{-6}

2. Témoins de stérilisation

2.2 Témoins biologiques

- Définis par le **projet de Norme EN 866**
- Pour chaque indicateur doivent être fournis les renseignements suivants:
 - Nom du germe et population N_0
 - Valeur D_T

2. Témoins de stérilisation

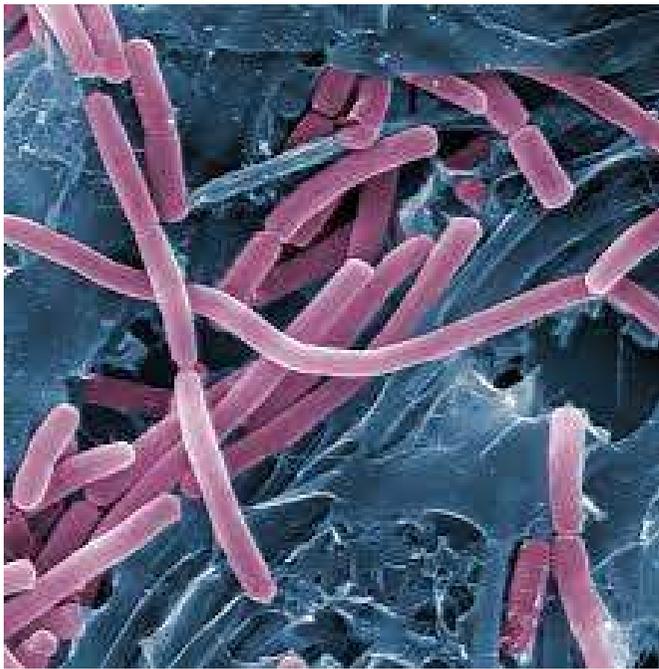
2.2 Témoins biologiques

Indicateurs selon le mode de stérilisation

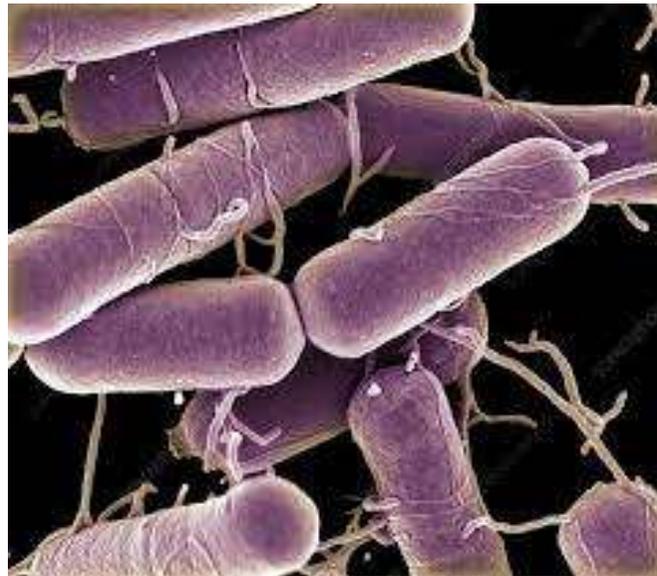
Mode de stérilisation	Germe de référence
Chaleur sèche	<i>Bacillus subtilis</i>
Chaleur humide	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
Oxyde d'éthylène	<i>Bacillus subtilis variété niger</i>
Rayonnement	<i>Bacillus pumilus</i>

2. Témoins de stérilisation

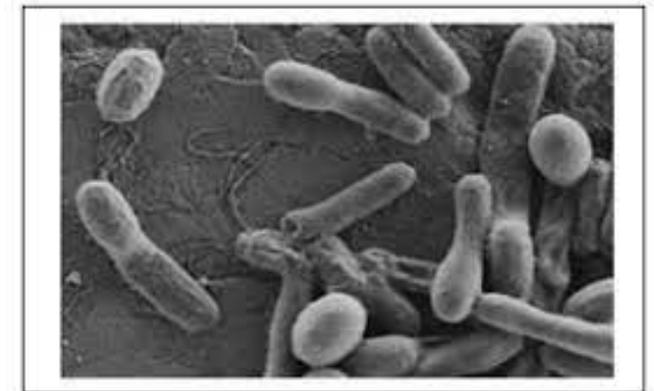
2.2 Témoins biologiques



Bacillus pumilus



Bacillus subtilis



*Geobacillus
stearothermophilus*

3. Essais de stérilité

3.1 Méthodes

- Soit par technique de filtration sur membrane pour les formes liquides
- Soit par culture sur milieu nutritif avec le produit à examiner
- Essai doit être réalisé dans de conditions aseptiques

3. Essais de stérilité

3.2 Notion de stérilité

- On ne peut parler que de probabilité de stérilité
- Loi de décroissance du nombre de microorganismes en fonction du temps à T° cte = loi exponentielle asymptotique tendant vers 0
- En pratique courante , but= atteinte d'un PSMO de 10^{-6}

PSMO= Probabilité de survie d'un microorganisme

3. Essais de stérilité

3.2 Notion de stérilité

PSMO pour chaque unité ou pour une production entière s'exprime avec un risque infiniment faible si:

- Le traitement est conforme à l'attendu: homogène, effectué à des $T^\circ >$ à celle retenue pour la détermination de la PSMO
- Uniformité spatio-temporelle démontrée conforme en qualification de performances et satisfait aux règles statistiques d'extrapolation à l'ensemble de la charge

3. Essais de stérilité

3.3 Remarques

- non suffisant pour conclure à la stérilité d'un lot compte tenu de l'échantillonnage réalisé.
- défini par la pharmacopée européenne.
- échantillonnage prévu pour un lot de taille supérieure à 500 unités est de 20 unités à prélever: probabilité de trouver une unité non stérile sur cet échantillon est relativement faible.

3. Essais de stérilité

3.3 Remarques

- Il convient donc de concevoir cet essai dans le cadre d'un plan d'assurance de la qualité de la stérilisation qui intègre:
 - ✓ qualification du matériel
 - ✓ validation des procédés de fabrication (maîtrise de la biocharge du produit)

3. Essais de stérilité

3.3 Remarques

- Validation des procédés de stérilisation (valeur stérilisatrice suffisante)
- un des éléments, au même titre que les témoins de stérilisation, qui permet de conclure à la probabilité de stérilité du produit comme la biocharge initiale avant stérilisation et la maîtrise des conditions de fabrication

3. Essais de stérilité

3.4 Confirmation de l'efficacité du procédé

- Indicateurs biologiques : exemples
 - ✓ Spores de *Bacillus stearothermophilus*
 - ✓ Spores de *Bacillus subtilis*

3. Essais de stérilité

3.4 Confirmation de l'efficacité du procédé

- **Résultat favorable**

Aucun germe contaminant décelé dans l'échantillon examiné

Conditions :

- S'applique aux substances, préparation et produits devant être stériles

IV. Validation des procédés

1. Intérêt

- Risque important d'hétérogénéité des traitements!!!
- Pour les produits biologiques: démontrer que le procédé utilisé permet d'éliminer les contaminants viraux potentiels

NB: quelque soit le procédé, qualification préalable de l'appareil (pré-réception chez le constructeur)

2. Stérilisation par la chaleur sèche

Technologie utilisée

- tant en **process discontinu**: fours ou étuves pour les charges variées, de volume relativement faible (maxi 465m²)
- qu'en **procédé continu**: tunnels acceptants de grande cadence de charges régulières et de dimensions modestes

2. Stérilisation par la chaleur sèche

- Qualification du matériel
- Test d'étanchéité de l'enceinte
- Etude de la distribution de la chaleur
- Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte
- Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

2. Stérilisation par la chaleur sèche

2.1 Qualification du matériel (ex: tunnel)

S'intéresser aux différents éléments du système:

- **Capteurs de température étalonnés**
- **Vitesse d'entraînement du tapis (four en continu)**
- **Systemes annexes: flux d'air laminaire (cas de tunnel en continu pour répartition aseptique)**

2. Stérilisation par la chaleur sèche

2.2 Etude de la distribution de la chaleur

- Conduite à diverses vitesses d'entraînement et à diverses vitesses de soufflage d'air (équipements munis de flux d'air)
- vérifier dans différentes conditions de fonctionnement la cinétique de température liée au mouvement du tapis

2. Stérilisation par la chaleur sèche

2.2 Etude de la distribution de la chaleur

Etapas

- Placer en ligne perpendiculaire au tapis nombre de sondes suffisant (établir profil de température dans le système)
- Pour chaque sonde déterminer T° maxi atteinte
- Vérifier écart max entre les sondes (valeur guide: 15°C pour les tunnels continus a flux laminaire)

2.2 Etude de la distribution de la chaleur

Étapes

- Thermocouples placés dans la charge afin de déterminer le profil de température dans celle-ci.
- Sondes placées en divers points de la charge (côté gauche, centre et côté droit du tapis)

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

- Conditions de fonctionnement doivent être parfaitement définies avant la réalisation de ces essais
- En particulier: conditions minimales et maximales de fonctionnement d'après les résultats de l'étude de distribution de la chaleur faite précédemment
- 3 essais consécutifs identiques doivent être conduits afin de démontrer la reproductibilité du procédé

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

- Pour chaque essai tester la phase de chargement du tunnel (début), la pleine charge (milieu) et la phase de vidage du tunnel (fin)
- En effet, résultats différents pour chaque phase du fait de l'asservissement aux équipements en amont (laveuse) et en aval (remplisseuse).

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

- Tunnels modernes: phase de chargement (qui s'effectue à la vitesse de la laveuse) = étape pendant laquelle le tapis est arrêté et intégré au processus pour permettre à la charge de recevoir la quantité de chaleur nécessaire.

NB: Lorsque le tunnel sert également à la dépyrogénéisation des contenants:

Validation de la dépyrogénéisation par la mesure de la réduction du taux d'endotoxines placées dans les contenants à traiter

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

Etapas

- Introduire une quantité connue d'endotoxines bactériennes dans des flacons
- Soumettre les flacons au procédé de stérilisation/dépyrogénéisation (5000 UI d'endotoxines s d'*Escherichia coli* / contenant)..

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

Étapes

- Placer ces flacons au(x) point(s) le(s) plus déformable(s) du tunnel et
- Placer a proximité des sondes de température.
- Déterminer la teneur en endotoxine après traitement
- En déduire l'efficacité de celui-ci

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

Etapas

- une réduction de 3 log décimale de la teneur en endotoxines bactériennes doit être atteinte
- Algorithme de valeur stérilisatrice transposé alors à la destruction des endotoxines bactériennes
- Ainsi on parle de F_T (dépyrogénéisation)
- T° de réf retenue: soit 170°C soit 250°C

2.3 Etude de la pénétration de la chaleur dans la charge

Etapes

- Valeur de la létalité : 48,4°C ou 54°C suivant les auteurs

En pratique, intéressant:

- d'utiliser valeurs de Tref a 250°C et de Z à 54°C ce qui correspond aux valeurs les plus contraignantes et
- d'avoir une valeur Fd minimale à atteindre de 30 min

Rq: La Pharm. Eur .fixe un cycle min de dépyrogeneisation de 30 minutes a 250°C

Exemple de plan Q.O/Q.P (voir polycop)

Vérification du fonctionnement des éléments de pilotage et de sécurité du tunnel

Etalonnage des instruments de mesure

Intégrité des filtres

Vitesses d'air

Comptage particulaire

Epreuve de distribution de la chaleur

Epreuve de pénétration de la chaleur dans la charge

Challenge en endotoxines bactériennes

3. Stérilisation par la chaleur humide

Qualification du matériel (ex: autoclave à vapeur saturée)

Lignes directrices et points les plus critiques nécessitant qualification: en QI, QO et QP

3. Stérilisation par la chaleur humide

3.1 Éléments à vérifier en QI

Elaboration des protocoles selon la configuration propre à chaque équipement:

1. **Hydraulique** ex: filtre, pompe, vanne, limiteur de débit
2. **Electricité** ex: moteur, composant de l'armoire électrique
3. **Pilotage** ex: clavier, écran, imprimante, modules
4. **Mesures** ex: manomètre, capteur de pression capteur de T°
5. **Documentation** ex: dossiers de réception, d'épreuve, techniques

3. Stérilisation par la chaleur humide

3.2 Éléments à vérifier en QO

Préalable: calibrage P°/T° des organes de mesure avec:

- Étalons montés en parallèle des équipements contrôlés
- Fourniture des enregistrements
- Fourniture des certificats d'étalonnage raccordés aux étalons internationaux

3. Stérilisation par la chaleur humide

3.2 Éléments à vérifier en QO

1. Fluides (qualitatif-quantitatif)
2. Electrique (sécurités sur ouverture, T° de la chambre...)
3. Pilotage (identification et niveaux d'accès, conformités de paramétrages, alarmes procédés...)
4. Essais techniques (Test d'étanchéité, Stérilisation filtres...)

3.2 Éléments à vérifier en QO

Test d'étanchéité

- Tests de mise sous vide afin de garantir une éventuelle recontamination après la phase de stérilisation
- Si nécessaire on effectue des test sous pression selon la technologie utilisée

Test d'étanchéité

Après installation d'un manomètre de grande précision (lecture du mbar entre 0 et 4 bars), 2 tests peuvent être effectués:

- Test de tenue au vide: généralement il existe un programme dédié
- Test de maintien en pression: programme ou manuel

Test d'étanchéité

Test de tenue au vide

1. Descente au vide (70 mbar)
2. Stabilisation pendant 5 min au moins
3. Maintien au vide pendant 10 min ou plus
4. Noter valeurs de pression au début et à la fin de la phase de maintien au vide

Norme EN285: remontée de $P^\circ < 1,3$ mbar/min

Test de maintien en pression

1. Fermer la porte sur un appareil froid
2. Ouvrir manuellement vanne d'admission d'air comprimé dans la chambre jusqu'à 2 bars.
3. Noter P° initiale après 3 min de stabilisation
4. Fermer la vanne et attendre 10 min
5. Noter P° Finale
6. Calculer l'écart obtenu

Norme EN285: $< 1,3$ mbar/min

Test d'étanchéité

- Exemple de rédaction d'une fiche de test (voir polycop)
- Exemple de fiche de résultat (voir polycop)

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

- Vérifier que la distribution de la chaleur dans l'enceinte de stérilisation est homogène
- Vérifier qu'il n'existe pas de point de froid ou que ce point froid est identifié
- Convient pour cycles incluant phases de vide (vérifier la qualité de ce vide par le test de fuite)

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

- Mesure de la répartition de la chaleur dans l'enceinte à vide (sans charge) au moins 3 fois (reproductibilité du process)
- Nombre de sondes à positionner lié à son volume (pas directement proportionnel)

Ex: si 10 à 12 capteurs suffisent pour des volumes de 1 m³

Pour 20 m³ on dépassera rarement 50 capteurs

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

- Réalisation d'une cartographie des T° dans l'enceinte vide lors des phases de stérilisation

Critères d'acceptation:

- EN 554: dispositifs médicaux
- EN 285: Charges poreuses et instruments

l'enceinte

Ecart de T° dans la chambre:

- Toutes les T° doivent être comprises entre 0 et +3°C de la T° de consigne (ex: 121°C à 124°C si consigne est de 122°C)
- Chaque capteur ne doit pas varier en uniformité temporelle de plus de 1°C (EN 554) ou 1,5°C (EN 285)
- Tous les capteurs ne diffèrent pas les uns des autres de plus de 2°C à un temps T (uniformité spatiale)

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

Adéquation T°/P° (table de REGNAULT)

- Vérification avec la table de la corrélation de la T° de vaporisation °C avec sa tension de vapeur saturante mesurée en bar (garantie d'un traitement à la vapeur saturée uniquement, sans autre gaz en quantité critique)

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

Adéquation T°/P° (table de REGNAULT)

- Exploitation des moyennes de T° et P° du plateau de stérilisation
- Comparaison de l'EMT (Ecart Maximal Toléré) entre la moyenne des P° réelles obtenues et la P° théorique obtenue selon Regnault à partir de la moyenne des T°

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

Adéquation T°/P° (table de REGNAULT)

- EMT doit être inférieur ou égal à EMA (Ecart Maximal accepté) de référence défini selon les tolérances sur les boucles de mesure et la variabilité acceptable du procédé
- Moyenne des T° → T Regnault → Pression théorique
- $EMP = | P \text{ réelle} - P \text{ Théorique} |$
- $EMT < \text{ou} = 50 \text{ mbar}$: **essai conforme (Tolérance 35 à 80 mbar)**

Test d'homogénéité de la répartition de la chaleur dans l'enceinte

Adéquation T°/P° (table de REGNAULT)

NB:

- Si $EMT > EMA$ et $Pr > Pth$: présence autre gaz que vapeur
- Si $EMT > EMA$ et $Pr < Pth$: présence vapeur surchauffée peu stérilisante

3.3 Éléments à vérifier en QP

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

- Vérification de la conformité de la pénétration de la chaleur dans la charge par rapport à ce qui est programmé
- Placement aléatoire de capteurs de T° dans la charge à stériliser (flacons, poches)
- Si charge hétérogène, répartition non aléatoire des capteurs mais selon le degré de criticité ou zones les plus défavorables

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

- Vérification de la conformité de la pénétration de la chaleur dans la charge par rapport à ce qui est programmé
- Placement aléatoire de capteurs de T° dans la charge à stériliser (flacons, poches)
- Si charge hétérogène, répartition non aléatoire des capteurs mais selon le degré de criticité ou zones les plus défavorables

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

- Test pour chaque type de charge et 3 fois pour chaque charge (reproductibilité du procédé)
- Une charge est définie par la capacité des contenants (500 ml, 1L), le nombre de contenants placés dans l'enceinte et la plan de chargement dans l'enceinte
- Définir des charges standards à respecter au mieux en routine

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

Recueil de données:

- Pour une charge minimale
- Pour une charge maximale

Définition des charges compatibles avec le procédé

Détermination des objectifs attendus (tels que définis dans la Pharmacopée et selon les niveau d'exigence requis)

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

Exigences:

- Durée de chaque phase du cycle de stérilisation
- Couple temps/T° selon estimation de la valeur F_0 minimale
- Dispersion des T° les unes par rapport aux autres (tolérance)
- Positionnement des capteurs dans la charge permettant aussi la recherche du point le plus froid de la charge

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

- Couple temps/ T° selon estimation de la valeur F_0 minimale

$T^\circ_{\max} \leq T^\circ \text{ consigne} \pm 3^\circ\text{C}$

$F_0 \geq 15 \text{ min}$

Cycle de réf: 121,0 °C/15 min

Test de pénétration de la chaleur dans la charge

Exigences:

- Dispersion des T° les unes par rapport aux autres (tolérance)
- ✓ Dispersion inter sondes ≤ 2 °C
- ✓ Variation pour une sonde ≤ 1 °C au palier de stérilisation
- ✓ Dispersion des T° produit: consigne $\pm 0,5$ °C ou 1 °C

3.4 Après le déroulement du processus de validation

Examen approfondi des données recueillies et des enregistrements (électroniques ou papiers) permettra de vérifier l'obtention des objectifs attendus

Ex: Bon déroulement du programme, homogénéité de la charge, pénétration de l'agent stérilisant, reproductibilité...)

Exemple de fiche de résultats: voir polycop

- Reproductibilité du procédé doit être ainsi démontrée
- Les conditions opératoires standards doivent être définies

NB:

- Toute modification de l'installation engendre une nouvelle validation
- Fréquence **essai de pénétration de la chaleur: au moins 1 fois par an**
- Fréquence **requalification complète: tous les 3 ans**

4. Stérilisation par filtration stérilisante

Contrôles en cours et fin de filtration stérilisante

- Le filtrat :
 - ✓ ne doit pas donner de développements microbiens dans un milieu de culture approprié
 - ✓ Vérifier la compatibilité de la solution avec les constituants du filtre

5. Stérilisation par rayonnements (radiostérilisation)

5.1 Qualification du matériel

Paramètres d'utilisation définis, maîtrisés et vérifiés:

- Activité et positionnement correct de la source
- Composition et densité du matériau
- Densité et plan de chargement du produit
- Durée de l'irradiation

5.2 Cartographie de doses pour la qualification de l'appareil

1. Définition des matériaux de référence pour les essais de qualification et des plans de chargement
2. Détermination de la pénétration des rayons dans la charge en plusieurs endroits (dosimètres)
3. Obtention des doses min pour stérilisation efficace et max compatibles avec le matériau du produit et des emballages

5.3 Cartographie de doses en opération

1. Définition des conditions opératoires
2. Etude des conséquences de l'irradiation sur le produit et son emballage
3. Fixation des doses stérilisantes (dose applicable) et maximale (tolérances acceptables)

5.3 Cartographie de doses en opération

Définition des conditions opératoires

- Description du produit emballé (dimension, densité...)
- Plan de chargement dans le conteneur d'irradiation
- Dimensions du conteneur d'irradiation

5.3 Cartographie de doses en opération

- Réalisation d'une cartographie des doses mesurées plusieurs fois à l'aide de dosimètres judicieusement placés dans la charge
- Norme EN 552 « validation et contrôle de routine par la stérilisation par irradiation »

6. Stérilisation par gaz (oxyde d'éthylène)

6.1 Qualification du matériel

- Vérifier que l'équipement est conforme quant aux phases du cycle nécessaire: préconditionnement, stérilisation, aération
- Instruments utilisés pour la régulation: affichage et enregistrement doivent être étalonnés et dosimètres

6. Stérilisation par gaz (oxyde d'éthylène)

6.2 Qualification opérationnelle

But= définir conditions dans lesquelles les stérilisations doivent être effectuées

- Durée de phase de préconditionnement (T°, HR)
- Durée d'attente entre la phase de préconditionnement et début du cycle de stérilisation

6. Stérilisation par gaz (oxyde d'éthylène)

6.2 Qualification opérationnelle

Démontrer:

- Qu' à la fin de la période de préconditionnement définie tous les éléments de la charge sont à la T° et HR spécifiées
- Corrélation entre HR et augmentation P° résultant de l'admission de vapeur

6.2 Qualification opérationnelle

Démontrer que (Norme EN 550):

- au moment de l'admission de l'OE, tous les éléments de la charge sont toujours à T° et HR spécifiées
- concentration en OE dans la charge est correcte
- désorption conduite pendant un temps suffisant à la T° spécifiée
- Niveau d'OE résiduel après désorption < limites spécifiées

7. Validation microbiologique de la stérilisation

7.1 Objectifs

- Connaître la qualité microbiologique du produit à stériliser
- Vérifier que les paramètres retenus permettent d'obtenir effectivement la stérilité du produit

7. Validation microbiologique de la stérilisation

7.2 Méthodes

- Déterminer en routine la biocharge des produits (bioburden) avant stérilisation (notion quantitative)
- Également la flore endogène (notion qualitative)

Identification + Létalité c'est-à-dire déterminer valeurs de Z et D correspondant aux germes contaminant le produit

7.2 Méthodes

Ou Déterminer la létalité bactériologique

- Concept proche de la valeur stérilisatrice
- Comparer cette valeur à la valeur stérilisatrice

7.2 Méthodes

Calcul de la létalité bactériologique

$$F_b = D \times \log N_0 - \log (2,303 \log (n/q))$$

D: D value

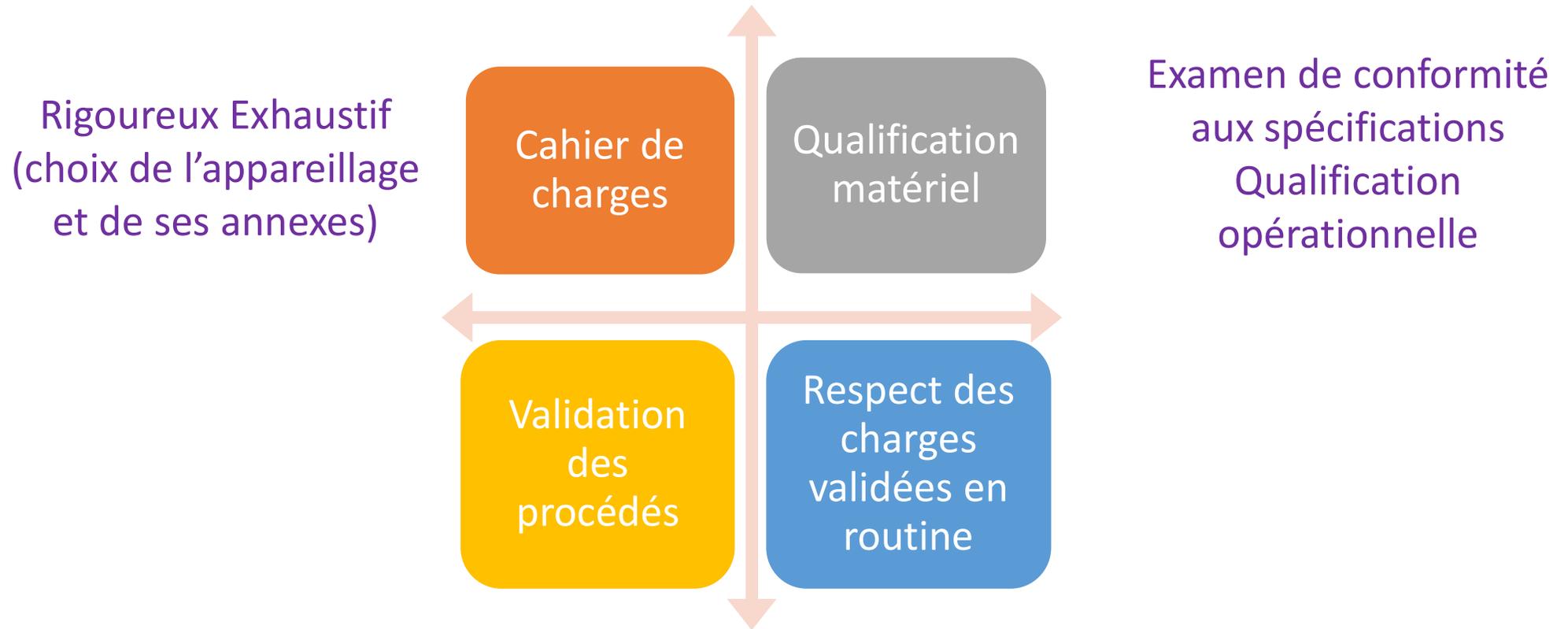
N_0 : Dénombrement de l'IB en ufc/ampoule

N: nombre de répliquats= nbre d'IB placés dans la charge

q: nbre de répliquats négatifs avec $q=n-1$ si tous les IB sont négatifs

IB=Indicateur Biologique UFC= Unité Formant Colonie

8. Bonnes pratiques de stérilisation (BPS)



CONCLUSION

PROCEDE DE STERILISATION

- Vaste champ d'application: nombreuses techniques
- Complexité des concepts et des appareillages
- Normes rigoureuses
- Fort impact qualité /coût

Applications

1. En pharmacie

Méthode	Applications
Chaleur	Récipients en verres, objets métalliques
Filtration	Fluides, gaz, solutions sensibles à la chaleur (protéines, extraits de plante)
Rayonnements	Isolateurs, postes de sécurité biologique (UV) Seringues , aiguilles, sondes (α ; β)
Oxyde d'éthylène	Seringues à usage unique
Acide peracétique	Isolateurs d'isotechnie, produits stériles
Peroxyde d'hydrogène	Matériaux sensible à la chaleur (gels hydroalcooliques)

Applications

2. A l'hôpital

- Enceintes = Zones d'atmosphère contrôlée (ZAC)
- Élimination des germes en suspension dans l'air par filtration à l'aide de filtres stérilisants
- Tubes à UV germicides : Placés après les filtres stérilisants

Ex: isolateurs en isotechnie, Salles ou blocs stériles contenant des lampes UV, zones aménagées (pandémie à coronavirus)

Applications

3. Autres applications

- Industrie agroalimentaire: conservation des aliments
- Electronique et informatique: fabrication des puces électroniques et composants d'ordinateurs