ÉVALUATION DES RISQUES
Principes généraux et approche méthodologique dans les phases d'un projet
P.32

RETOUR D'EXPÉRIENCE
Qualifications et surveillance de routine au bloc opératoire
P.12

FAITS & GESTES
➡ Une future unité de production de biomédicaments
➡ ABL renforce ses capacités à Lyon
P.08

NOVEMBRE-DÉCEMBRE 2018 NUMÉRO 117

BIMESTRIEL ISSN 1291-6978

SALLESPROPRES

N°117 LE MAGAZINE DE LA **MAÎTRISE DE LA CONTAMINATION**

DOSSIER

Biocontamination
air et surface

CAHIER SPÉCIAL
LABORATOIRE DE SÉCURITÉ BIOLOGIQUE

CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES

L'assurance qualité des résultats au laboratoire

Par Franck Polyn, HeX Lab

La question de la pertinence des résultats fournis par le laboratoire prenant en charge les échantillons issus des prélèvements environnementaux réalisés en zone à atmosphère contrôlée est essentielle : toutes les étapes sont génératrices d'incertitudes, nécessitant une approche métrologique afin de garantir la fiabilité des données.

La qualité microbiologique en salle propre est un impondérable permettant de satisfaire aux nombreuses obligations de résultats attendus dans ces environnements. Les résultats obtenus vont conduire le plus souvent à de lourdes conséquences, notamment si des niveaux d'exigences opposables sont attendus. Qu'en est-il de la pertinence des résultats fournis par le laboratoire prenant en charge les échantillons issus de prélèvements environnementaux réalisés en salles propres et en zones à environnement maîtrisé ? Toutes les étapes, depuis le transport jusqu'au dénombrement et l'identification des micro-organismes, sont sources d'incertitudes. Elles doivent être identifiées, évaluées et suivies. Une approche « métrologique » de la mesure de la biocontamination est également indispensable pour garantir la fiabilité des résultats : reproductibilité, répétabilité et intercomparaison.

Synthèse des exigences réglementaires, normatives et recommandations en matière de contrôles microbiologiques en salle propre

De nombreux référentiels applicables à la salle propre en industrie pharmaceutique et en établissement de santé proposent des critères microbiologiques sur l'air, les surfaces, les gants... sans précisions quant aux modes opératoires liés au prélèvement, au transport et à l'analyse. La norme ISO 14698 sur la biocontamination des environnements maîtrisés reste le support à utiliser mais elle présente trop peu d'indications en ce qui concerne les méthodes de prélèvement. D'où la nécessité de mettre en place des méthodes de prélèvement standardisées et documentées ainsi qu'une formation rigoureuse des opérateurs les réalisant. Ceci implique :

- un étalonnage du bio-impacteur d'air selon une fréquence définie par une analyse de risque (capacité de remettre en question les résultats depuis le dernier étalonnage conforme) ;
- une application des règles d'asepsie lors de la mise en œuvre du prélèvement en fonction de la zone prélevée (désinfection du matériel, hygiène des mains, port des gants, gestuelle, stérilisation et/ou désinfection des cribles...) ;
- une sélection documentée des milieux de culture (adaptée à la flore environnementale, avec ou sans neutralisants, boîte simple ou triple emballée « irradiée », conditions de conservation...) ;
- un plan d'échantillonnage (nombre de points, répartition, hauteur du point de prélèvement pour l'air...) ;
- une traçabilité de suivi des échantillons nécessaires au laboratoire pour l'interprétation des prélèvements (zone à risque, état d'occupation lors des prélèvements, identification des points prélevés, lot et DLC des milieux de culture...) ;
- une standardisation du conditionnement des boîtes et un transport le plus court possible validé par une étude d'impact du temps et de la température ;
- une réalisation de témoins positifs (boîtes volontairement contaminées par l'opérateur) et de témoins négatifs (boîtes non prélevées suivant le parcours des prélèvements) ;
- une application de critères microbiologiques en fonction du niveau de risque des locaux prélevés ;
- une qualification des opérateurs réalisant les prélèvements.

1 Vérification de l'impaction d'un prélèvement

La qualification des opérateurs est un point très important.

→ Le laboratoire prenant en charge les prélèvements devra prendre en compte les différents référentiels applicables aux locaux contrôlés et définir sa méthode d'analyse. Par secteur d'activité, on retrouve les textes suivants.

Les Bonnes Pratiques de fabrication (BPF)

L'industrie pharmaceutique doit se conformer aux exigences des BPF (n° 2015/12 bis). Elles définissent des limites recommandées en production pour l'air, les surfaces et les gants. Elles ne précisent pas pour autant les milieux de culture et les méthodes d'analyse pour le dénombrement des microorganismes. Elles attendent que vous justifiiez, argumentiez et donc documentiez vos choix en la matière.

Les Bonnes Pratiques applicables aux établissements de santé

• La décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire (BPTC) reprend les niveaux cibles des BPF. Elles précisent une température d'incubation comprise entre + 30 °C et + 35 °C pour la recherche de la flore mésophile et une température comprise entre + 20 °C et + 25 °C pour la croissance des moisissures, ainsi qu'une durée totale d'incubation de 2 à 5 jours pour la flore mésophile et de 5 à 7 jours pour les moisissures.

• L'arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation (BP FIV/PMA) ne précise pas de critères microbiologiques pour les locaux.

• Les Bonnes Pratiques de pharmacie hospitalière de juin 2001 (BPPH) définissent un seuil pour la qualité microbiologique de l'air en zone de conditionnement en activité (200 UFC/m³) sans autres précisions.

• Enfin, les Bonnes Pratiques de préparation (BPP n°2007/7bis) applicables aux PUI (pharmacies à usage intérieur) et aux officines de pharmacie reprennent les éléments des BPF **(tableau A)**.

Les référentiels normatifs

La norme NF EN ISO 14698-1 et 2 de mars 2004 ne précise pas de température d'incubation des prélèvements mais une durée d'incubation des bactéries de 2 à 5 jours et des fongiques de 5 à 7 jours. La révision de cette norme a été abandonnée en 2014 mais devrait être réexaminée en 2019. Le projet de norme PR NF EN 17141 « Salles propres et environnements maîtrisés apparentés – Maîtrise de la biocontamination » est en phase d'enquête publique (n° 2) avec une position nationale française transmise le 29 novembre 2018 (avis favorable) et assortie de commentaires. Sa publication est attendue pour 2019.

La norme NF S90-351 d'avril 2013 décrit le milieu de culture type PCA ou équivalent pour la flore bactérienne et le milieu MEA ou Sabouraud pour la flore fongique avec une température de 30 °C pendant 5 à 7 jours.

La Pharmacopée européenne

Elle ne comprend pas de méthode d'analyse d'air et de surfaces en salle propre. Elle reste néanmoins la référence pour l'industrie pharmaceutique pour les analyses d'eaux purifiées, de gaz, d'air comprimé, des produits pour la stérilité et les contrôles de contamination microbiologique (*bioburden*). Dans le chapitre 2.6.12

A Recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC durant la production

Limites recommandées de contamination microbiologiquea				
Classe	**Échantillon d'air (UFC/m²)**	**Boîtes de Petri, Ø = 90 mm (UFC/4h)[b]**	**Géloses de contact, Ø = 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 Petri peuvent être exposées pendant moins de 4 heures. Extrait des BPF (n° 2015/12 bis).

décrivant les essais sur les produits non stériles, les conditions d'incubation sont de 30-35 °C pendant 3 jours pour les bactéries et 20-25 °C pendant 5 jours pour les moisissures. Cette stratégie d'incubation est souvent prise en référence.

Les guides

Le guide *Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé* (CCLIN Sud-Ouest, 2016) précise d'incuber les géloses pour recherche de flore bactérienne à 30 ± 2 °C (milieux tous germes) et celles pour la recherche ciblée de fongiques à 22 ± 2 °C (milieux spécifiques) pendant 5 à 7 jours.
Le guide CTINLS *Surveillance de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces* (2002) précise des critères sur la flore totale bactérienne et fongique sans précision sur les méthodes d'analyses. Une révision de ce guide technique national est en phase finale de relecture. Il sera complémentaire du guide du CCLIN Sud-Ouest de 2016.

Bilan

Cette revue des différents référentiels nous amène à deux constats :
• l'absence de standards d'analyses microbiologiques de prélèvements issus de salles propres ;
• l'absence de critères qualitatifs concernant le laboratoire réalisant les analyses.

En effet, l'analyse des différents référentiels applicables au secteur de la salle propre pharmaceutique et hospitalière repris en référence de cet article fait apparaître un manque d'homogénéité dans les trois piliers influant directement le résultat : choix du milieu de culture, température et durée d'incubation. De même, certains textes précisent des critères pour la flore bactérienne et fongique, d'autres ne spécifient pas à quelle recherche correspond le seuil (cumul des deux flores ou flore totale bactérienne seule). Le laboratoire doit donc définir ses paramètres d'analyse et les valider. Il semble intéressant de rappeler que la validation des méthodes d'analyses non normatives est impérative dans le cadre de l'accréditation du laboratoire selon l'ISO 17025:2017.
Par ailleurs, aucun référentiel ne définit de critères qualitatifs pour le laboratoire réalisant les analyses de ce type de prélèvement. Il n'y a donc aucune obligation pour le laboratoire de devoir justifier sa compétence. Il est assez paradoxal d'avoir des critères microbiologiques cibles allant jusqu'à l'absence d'unité formant colonie (< 1 UFC) par mètre cube d'air ou pour 25 cm² de surface (classe A des BPF) sans connaître l'incertitude de mesure du laboratoire. De faux positifs (contamination au laboratoire) et inversement de faux « niveaux cibles » sont donc tout à fait probables sans maîtrise de la chaîne analytique dans son intégralité. Cette incertitude devient encore plus significative pour les seuils plus élevés, par exemple à 10 ou 200 UFC.

Validation des standards d'analyses microbiologiques au laboratoire, un prérequis indispensable

Puisque les référentiels réglementaires et normatifs ne comprennent pas d'exigences spécifiques quant aux conditions de mise en analyse, le laboratoire doit les définir et les valider.
Des méthodes normatives d'analyses existent pour d'autres matrices comme l'aliment et l'eau. Cependant, elles ne →

LE SPÉCIALISTE SALLES PROPRES

Notre expertise à la hauteur de votre exigence

CLOISONS
. Classement au feu Euroclasses
. Résistance aux agents désinfectants
PORTES
. Affaiblissement acoustique
. Plafonds porteurs 150 kg/m² avec réservations
PLAFONDS
. Cloisons totalement affleurantes
. Portes bi-affleurantes
ÉQUIPEMENTS
. Large choix de coloris

BATIMPRO
SALLES PROPRES
CONCEPTEUR • FABRICANT • INSTALLATEUR
www.batimpro.fr
+33 (0)2 41 490 490 • contact@batimpro.fr
France et Europe

LES ORPAILLEURS | RCS B 379232697 00035 | Tous droits de reproduction interdits.

« Des méthodes normatives d'analyses existent pour d'autres matrices comme l'aliment et l'eau. »

sont pas forcément adaptées au dénombrement et à l'identification de micro-organismes « stressés » ou à l'état végétatif retrouvés dans l'environnement des salles propres. Dans ce cas, des milieux de culture plus adaptés, non sélectifs et des durées d'incubation de plusieurs jours sont généralement utilisés puisque plus appropriés.

La notion de germes « cultivables » apparaissant dans le projet de norme PR NF EN 17141 pose la question de l'exhaustivité du dénombrement.

Les termes « revivifiable », « flore aérobie revivifiable » (FAR), « mésophile », « flore totale »... occultent la problématique du « cultivable » en lien direct avec le milieu de culture et les conditions d'incubation utilisées.

La sélection du milieu de culture pour la recherche de la flore totale bactérienne et fongique doit prendre en compte les points suivants :

- les composants du milieu de culture (source de protéine, sucres...) ;
- la présence d'antibiotiques pour les analyses de surface et la recherche fongique afin d'éviter la compétition avec la flore bactérienne ;
- la présence de neutralisants des biocides pour les prélèvements de surfaces et de gants (lécithine, Tween 80, thiosulfate de sodium et histidine, par exemple) garantissant la neutralisation des désinfectants utilisés en nettoyage et désinfection ;
- la réalisation systématique d'essais de fertilité et de stérilité pour les milieux produits par le laboratoire ;
- la réalisation d'essais de fertilité pour les milieux de culture livrés prêts à l'emploi à réception et/ou à DLC selon une analyse de risque propre à chaque utilisateur ;
- la qualité de l'emballage afin d'éviter le dessèchement pendant le stockage et l'incubation ;
- la présence de disséquant, gage de qualité du conditionnement ;
- le type d'emballage (simple ou triple en fonction de la classification des locaux à prélever) et l'irradiation pour les environnements aseptiques ;
- le volume de milieu de culture par boîte. Plus il est faible, plus les boîtes se dessècheront rapidement pendant le stockage ;
- la durée de DLC qui peut aller de 1 à 6 mois en fonction du fournisseur ;
- les conditions de conservation, notamment la température et l'hygrométrie ;
- certains aspects pratiques comme les couvercles verrouillables.

Cette liste n'est pas exhaustive mais elle constitue une base de critères qualitatifs.

Une validation par des essais de fertilité selon la Pharmacopée européenne entre différents fournisseurs peut être réalisée afin d'évaluer le recouvrement sur une sélection de souches bactériennes et fongiques de souches de collection et de souches terrains (environnement utilisateur).

Concernant les températures d'incubation, plusieurs approches existent :

- l'approche médicale à 37 °C pour les bactéries et 30 °C pour les moisissures ;
- l'approche environnementale à 30 °C pour les bactéries et 24 °C pour les moisissures ;
- l'approche pharmacopée à 30-35 °C pendant 3 jours pour les bactéries et 20-25 °C pendant 5 jours pour les moisissures.

Compte tenu des durées d'incubation longues, des lectures intermédiaires doivent être réalisées afin d'éviter d'avoir des boîtes non dénombrables par envahissement.

Concernant l'interprétation des résultats, les critères microbiologiques définis dans les différents référentiels sont essentiellement quantitatifs. Le laboratoire doit préciser les recherches qu'il réalise pour statuer sur la conformité d'une installation vis-à-vis de ces critères :

- dénombrement de la flore totale bactérienne seule ;
- dénombrement de la flore totale bactérienne et fongique en interprétant le cumul ;
- dénombrement de la flore totale bactérienne et fongique en interprétant les dénombrements séparément.

Lors des prélèvements d'air par impaction, le type de crible doit être pris en compte. Un facteur correctif sera donc appliqué.

Le laboratoire peut utiliser deux milieux par point de prélèvement. Ainsi la flore bactérienne est dénombrée sur une gélose pour la flore et totale et les levures et moisissures sur une gélose pour flore fongique additionnée de chloramphénicol. Cet antibiotique empêche la croissance des bactéries et limite donc la compétition des deux flores.

L'utilisation d'une gélose unique de type flore totale bactérienne (TCS, TSA...) est une méthode utilisée pour le dénombrement des deux flores, en l'absence de spécifications dans les référentiels. Une première incubation à 20-25 °C est réalisée pour la flore fongique suivie d'une deuxième incubation à 30-35 °C pour la flore bactérienne (incubation

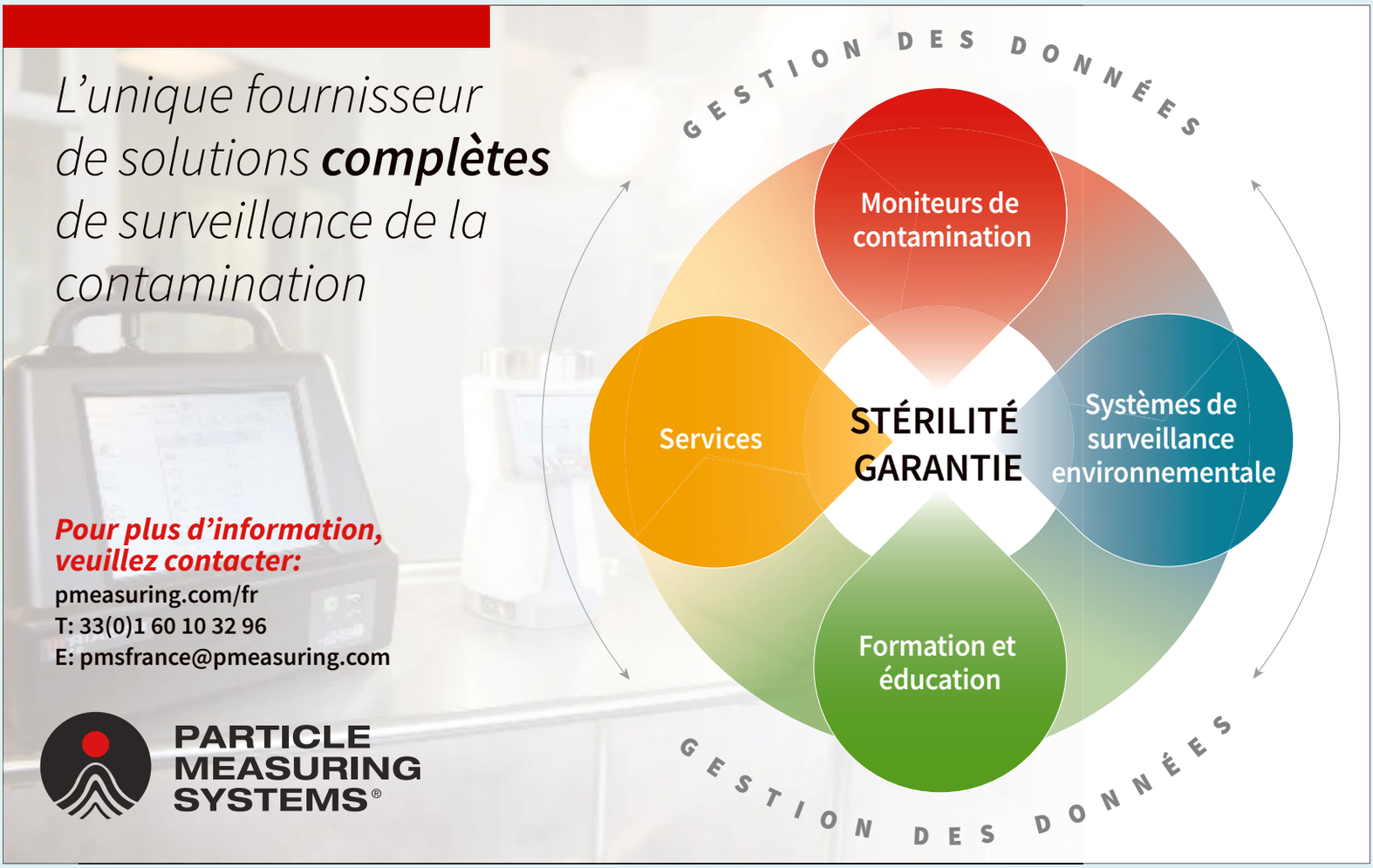
retrouvée en essais de Pharmacopée). Le laboratoire qui applique cette méthode doit la valider, par exemple par la réalisation d'essais comparatifs des deux méthodes à l'aide de suspensions de bactéries et de moisissures. L'objectif étant de mesurer les éventuels écarts de recouvrement.
Le choix entre milieux dissociés et gélose unique doit faire l'objet d'une validation de méthode. En effet, ce choix peut se révéler différent en fonction du nombre d'unités formant colonies retrouvé sur le milieu de culture (ex. : un milieu si < 10 UFC/boîte et deux milieux si ≥ 10 UFC/boîte).

L'identification des micro-organismes, positionnez-vous !

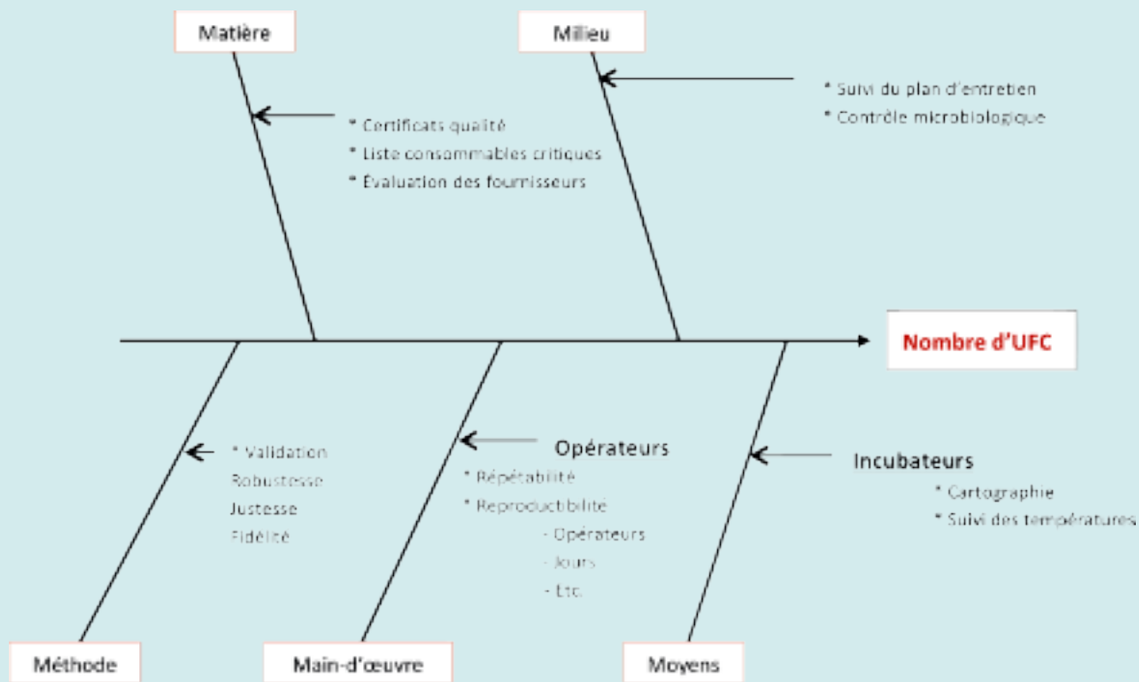
Le laboratoire doit également préciser s'il intègre les critères qualitatifs (genre et espèce des micro-organismes) et une liste de micro-organismes indicateurs d'un risque de contamination du process, du produit ou du patient. Ces critères qualitatifs d'identification existent dans les référentiels hospitaliers pour les locaux « patient » mais pas dans les locaux soumis aux Bonnes Pratiques (pharmaceutiques, thérapie).
Pour l'industrie pharmaceutique, l'annexe 1 des GMP (opposable au niveau européen) en cours de révision met en avant dans le chapitre 9.33 l'identification au genre et à l'espèce des micro-organismes détectés en grade A et B, ainsi que dans les grades C et D selon une stratégie de contrôle de contamination définie par l'industriel. Cette notion qualitative de la contamination retrouvée dans les zones classées, au-delà de l'aspect quantitatif, nécessitera une étude documentée de l'écologie microbienne des environnements de production (par exemple les OOS – out of specification –, boîtes non dénombrables, présence de micro-organismes indicateurs dont des moisissures...). En d'autres termes, êtes-vous en capacité de connaître la carte d'identité microbiologique de vos environnements ?
Différentes méthodes d'identification qui existent reposent sur des méthodes biochimiques, phénotypiques et génétiques.

Les galeries d'identification biochimique (type API)

Cette méthode historique d'identification au laboratoire repose sur la recherche de caractères biochimiques du métabolisme glucidique et protidique du micro-organisme en microgalerie. Elle nécessite une observation macroscopique, microscopique, des tests d'orientation rapide afin de sélectionner la galerie adaptée →



2 Exemple de diagramme pour un processus analytique



Ce diagramme permet de matérialiser de manière structurée le lien entre les causes et leur effet (défaut, panne, dysfonctionnement...).

au micro-organisme à identifier (entérobactérie, non-entérobactérie, staphylocoque, streptocoque...). Peu adaptée pour de gros volumes d'identification, cette méthode connaît quelques limites et certains micro-organismes ne seront pas identifiés à l'espèce (par exemple les *Micrococcus* très couramment retrouvés en salle propre).

Les méthodes biochimiques et phénotypiques automatisées (type Biolog et Vteck)

L'évaluation phénotypique comprend l'étude du profil biochimique et des propriétés métaboliques d'un micro-organisme par l'entremise de test sur ses conditions de croissance, sur ses activités enzymatiques et sur la composition de ses cellules en acide gras.

La spectrométrie de masse (type Maldi-Tof)

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge. Il existe plusieurs types de spectromètres de masse pouvant séparer des molécules plus ou moins grandes et leurs méthodes ont toutes en commun les étapes suivantes : préparation et introduction de l'échantillon, ionisation des molécules d'intérêt, séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge, détection et amplification du signal et analyse des données et identification de l'échantillon.

Le séquençage génétique

Les critères morphologiques et biochimiques ont permis durant de nombreuses années d'identifier des souches isolées à partir de prélèvements biologiques. La technologie permet aujourd'hui, en 24 à 48 heures et par une approche génétique, une identification précise à l'espèce de souches isolées d'origine biologique et environnementale. Parmi les méthodes disponibles sur le marché aujourd'hui, on retrouve le séquençage du gène codant l'ARNr 16S. Fondée sur une amplification génique par *polymerase chain reaction* (PCR) couplée au séquençage par la méthode Sanger des fragments obtenus, cette technique consiste à décrypter en premier lieu le gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARN) 16S et à réaliser la comparaison des séquences obtenues sur des bases de données internationales (EMBL, NCBI, BiBi, Genebank...) afin d'identifier le genre et l'espèce bactérienne ayant la plus grande homologie de séquence avec la souche inconnue.

Le gène codant l'ARNr 16S est un gène constitué d'une alternance de régions dites conservées et de régions hypervariables (V1 à V9). La composition nucléotidique de ces dernières est suffisamment discriminante pour une identification à l'espèce. Et pour certains genres bactériens ayant une forte homologie de séquence interespèce, cette approche est alors complétée par le séquençage d'un ou plusieurs gènes plus variables au sein d'un même genre (sodA, rpoB, gyrB, hsp65, ADNr 23S...).

Choix de la méthode

Parmi les critères de choix de méthode d'identification, on pourra prendre en compte :

- la taille de la base de données pour obtenir le plus d'identification à l'espèce (de quelques centaines à plusieurs centaines de milliers en fonction de la méthode retenue) ;
- la fiabilité du résultat (pourcentage d'identification) ;
- la capacité de volume de traitement ;
- le délai d'obtention du résultat.

De toutes les méthodes présentées, le laboratoire mais surtout l'utilisateur de ces données (pharmaciens, hygiénistes, QA, QC...) doit être en mesure de comprendre et de valider le niveau de précision attendu. L'identification au niveau génétique, par sa précision, apporte indéniablement un avantage dans l'analyse des causes les plus probables lors de résultats non conformes ou de contamination.

La fiabilité de l'identification est également importante pour la mise en collection des souches issues des prélèvements nécessaire pour des comparaisons éventuelles avec des contaminants du produit ou des essais d'efficacité des produits désinfectants utilisés.

Vers une approche métrologique de l'analyse microbiologique

Une fois les standards d'analyse définis (milieux de culture, température d'incubation, durée d'incubation, lectures intermédiaires et méthodologie d'identification si nécessaire), le processus d'analyse doit faire l'objet d'une approche méthodologique de l'ensemble des paramètres pouvant influencer le résultat. Indispensable pour toute démarche d'accréditation selon l'ISO 17025:2017, cette analyse peut être réalisée à l'aide de différents outils méthodologiques d'analyses de risques (HACCP, 5M, Amdec...). Quelle que soit la méthode utilisée, l'ensemble du processus doit être pris en compte depuis l'arrivée des échantillons au laboratoire à l'élimination des boîtes de prélèvement. L'objectif de cette approche est :

- d'identifier les facteurs critiques associés aux méthodes, aux équipements et au laboratoire ;
- de démontrer que ces facteurs sont contrôlés par la mise en place d'essais de reproductibilité, de répétabilité ;
- d'estimer les incertitudes de mesure pour les analyses.

En l'absence d'étalon pour les analyses d'air et de surface en salle propre et zone à environnement maîtrisé, cette approche méthodologique visant à maîtriser les facteurs ayant un impact direct sur le résultat paraît indispensable.

Identification des sources d'incertitudes (approche 5M)

La méthode 5M est une méthode d'analyse qui sert à rechercher et à représenter de manière synthétique les différentes causes possibles d'un problème. Elle fut créée par le professeur Kaoru Ishikawa d'où son appellation « méthode d'Ishikawa ».

Elle utilise une représentation graphique (diagramme) en forme d'arêtes de poisson **(figure 2)** pour matérialiser de manière structurée le lien entre les causes et leur effet (défaut, panne, dysfonctionnement...).

Cette méthode est particulièrement adaptée au processus de laboratoire. Les 5M se déclinent de la manière suivante : matière, milieu, main-d'œuvre, matériel et méthode.

Matière

Ce premier axe comprend les consommables, les milieux et les réactifs nécessaires à l'analyse (dénombrement et identification des micro-organismes). Une liste des matières ayant un impact possible sur le résultat doit être dressée. Les certificats qualité des fournisseurs doivent être récoltés, vérifiés et conservés, notamment concernant la stérilité et la fertilité. Si des milieux de culture sont fabriqués par le laboratoire, ils doivent faire l'objet d'essais de stérilité et de fertilité. Le stockage des milieux et des réactifs doit être réalisé selon les préconisations du fournisseur en termes de délai et de température.

Milieu

Le milieu correspond aux locaux d'essais. Ils doivent être réservés uniquement aux analyses d'environnement, en séparant les activités de bactériologie et de mycologie afin d'éviter les contaminations croisées. Les locaux doivent être distincts des activités de laverie, fabrication de milieux de culture et de stérilisation. Un suivi de la qualité microbiologique de l'air et des surfaces de l'environnement des essais est à réaliser. Le laboratoire doit fixer ses propres critères microbiologiques avec des seuils d'alerte (surveillance renforcée) et des seuils d'actions correctives. Des boîtes de milieux de culture non prélevées peuvent être placées dans les étuves de manière régulière afin de s'assurer de l'absence de contamination lors de l'incubation.

Méthode (mode opératoire)

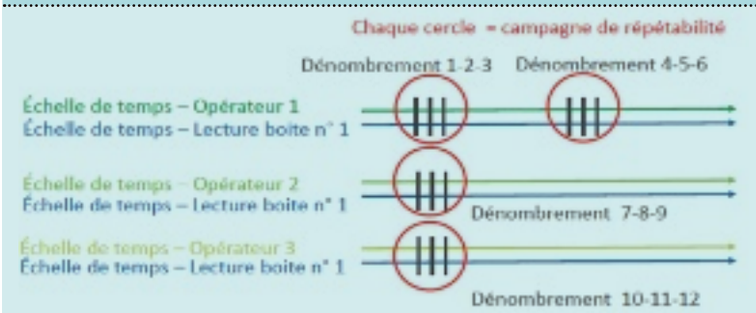
La méthode d'analyse doit faire l'objet d'une validation. Il est important de vérifier la capacité du laboratoire à quantifier les micro-organismes et à les identifier. Pour le dénombrement et en absence d'étalon pour l'air et les surfaces, le laboratoire pourra valider ses milieux de cultures, durée et température d'incubation à l'aide de souches microbiennes calibrées fournies avec des certificats précisant la charge et l'incertitude. Cette méthode est utilisée par les laboratoires réalisant des analyses d'eau sous accréditation ISO 17025.

Moyens (matériels)

Les enceintes climatiques, les enceintes de stockage en froid positif font l'objet de cartographies et de suivi de température en continu. Ces équipements doivent permettre d'assurer une température stable de manière homogène dans l'intégralité du volume quel que soit le chargement. Le cas échéant, en fonction des résultats de la cartographie, un volume utile est déterminé et identifié dans les équipements. →

« Une fois les standards d'analyse définis, le processus d'analyse doit faire l'objet d'une approche méthodologique de l'ensemble des paramètres pouvant influencer le résultat. »

3 Représentation de campagne de répétabilité



Pour évaluer la répétabilité, il est nécessaire de faire dénombrer plusieurs boîte de Petri au même opérateur, de façon répétée et rapprochée.

Main-d'œuvre

Les opérateurs réalisant les analyses doivent faire l'objet d'une qualification spécifique au dénombrement et à l'identification de prélèvements d'environnement, notamment des moisissures.

Exemple d'évaluation des incertitudes liées aux opérateurs (main-d'œuvre)

Parmi les sources d'incertitudes lors de l'analyse microbiologique de prélèvements issus de salle propre, celle liée aux opérateurs est la principale à évaluer. Elle est à mesurer pour un même opérateur et pour les opérateurs entre eux.

Répétabilité

L'ISO/CEI GUIDE 99:2011 définit la répétabilité comme « *Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps* ». Adaptée au laboratoire, évaluer la répétabilité correspond à faire dénombrer plusieurs boîtes de Petri comprenant des colonies microbiennes (si possible proche des niveaux cibles : 10, 50, 100 et 200 UFC) de façon répétée et rapprochée par le même opérateur **(figure 3)**.

Reproductibilité

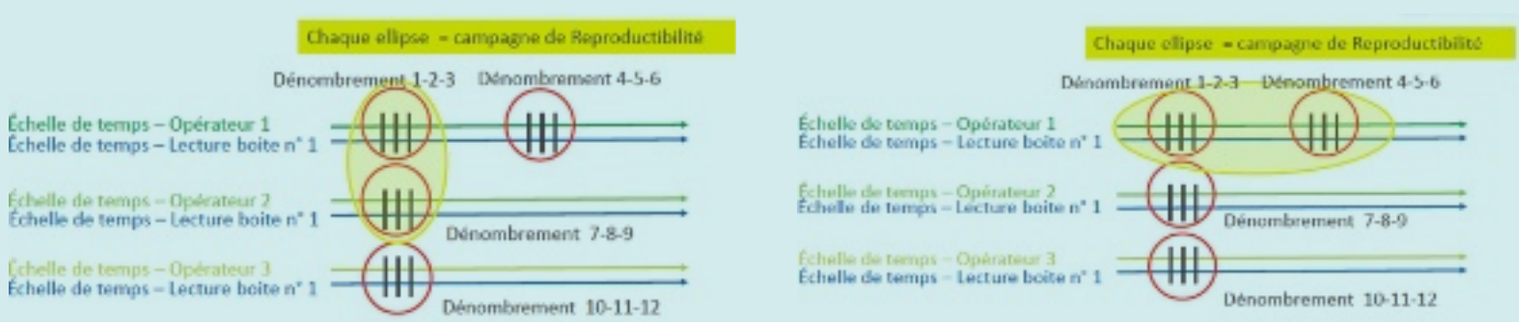
L'évaluation de la reproductibilité pour un même opérateur ou entre plusieurs opérateurs consiste à reproduire des essais de répétabilité à des périodes espacées et à les comparer entre elles.

Deux tests statistiques peuvent être utilisés pour interpréter ces résultats : le test de Cochran pour vérifier une absence de variance aberrante et le test de Grubbs pour vérifier l'absence de moyenne aberrante. En l'absence de valeurs aberrantes, le laboratoire pourra, sur la base de ces essais, calculer l'écart type de reproductibilité et de reproductibilité liée aux opérateurs. Il pourra également en définir les valeurs limites pour la qualification de ces opérateurs **(figure 4)**.

Intercomparaison

La participation à des essais interlaboratoires n'est pas possible dans le scope des prélèvements microbiologiques d'air et de surface, en l'absence d'étalon disponible (Pourtant, il y a déjà eu des essais d'intercomparaison pour les comptages particulaires dans l'air alors que là non plus il n'y a pas d'étalon de référence !). Des essais sur les eaux propres peuvent néanmoins être intéressants à réaliser

4 Représentation de campagnes de reproductibilité



Les essais de reproductibilité consistent à reproduire des essais de répétabilité à des périodes espacées et à les comparer entre elles.

pour la partie dénombrement et identification, les seuils microbiologiques de ces eaux étant proches des critères microbiologiques des contrôles en salle propre.

Conclusion

Les conséquences financières d'un dépassement de seuil menant à un arrêt de production, à la fermeture d'une salle d'opération ou à l'élimination de produits fabriqués doivent faire l'objet d'une analyse de risques. Il est donc important d'avoir l'esprit critique face aux résultats de contrôles microbiologiques en salle propre. L'approche décrite dans cet article est pragmatique, fondée sur une méthode d'analyse et de maîtrise de risque industriel et sanitaire. Complétée par une vision « métrologique » de la microbiologie environnementale, elle permettra de garantir la pertinence des résultats du laboratoire. Cette démarche s'intègre également dans la norme ISO/IEC 17025:2017 définissant les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'essais.

L'accréditation selon l'ISO 17025:2017 concernant l'analyse microbiologique des prélèvements en salles propres est un référentiel incontournable. En effet, l'accréditation de la phase de prélèvement, bien qu'intéressante, n'aura d'intérêt que si elle est suivie d'une phase analytique sous portée d'accréditation.

Le document LAB INF 53 du Cofrac de septembre 2016 définit les lignes de portée d'accréditation pour la biocontamination (air et surface) dans les locaux tertiaires, les lieux de travail et les environnements maîtrisés.

D'ailleurs, pour le secteur pharmaceutique, notamment ceux soumis aux inspections FDA, la volonté de s'assurer de la compétence technique en privilégiant des sous-traitants accrédités est renforcée depuis le 19 janvier 2016. ■

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **NF EN ISO 14698-1**, mars 2004
- **NF EN ISO 14698-2**, mars 2004
- **Pr EN 17141** « Salles propres et environnements maîtrisés : Maîtrise de la biocontamination »
- **NF S 90-351**, avril 2013
- **Publication du Conseil supérieur de la sante n° 8364**, août 2010
- **Bonnes Pratiques de pharmacie hospitalière**, juin 2001
- **Décision du 27 octobre 2010** définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire
- **Arrêté du 3 août 2010** modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation
- **NF S98-030**, mars 2012
- **ISO/IEC 17025:2017**
- **Bonnes Pratiques de fabrication** (n° 2015/12bis)
- **Bonnes Pratiques de préparation** (n° 2007/7bis)
- **LAB INF 53 :** Nomenclature et expression des lignes de portée d'accréditation pour la biocontamination – Cofrac
- **Guide Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé**, CCLIN Sud-Ouest, 2016
- **Guide CTINLS Surveillance de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces**, 2002

schülke

Gamme complète pour l'hygiène des surfaces, des équipements et du personnel

125 ans d'expérience

1200 employés

70 personnes dédiées à la R&D

2 usines : Chalon sur Saône (France), Norderstedt (Allemagne)

Exigez l'expertise, choisissez schülke !

Schülke France SARL
22 terrasse Bellini 92806 Puteaux
T. 01 42 91 42 42 I schuelkefrance.info@schuelke.com

Air Liquide HEALTHCARE