

Validation d'une méthode de cytométrie en flux pour le contrôle Qualité et la libération de produits pharmaceutiques non stériles

Spécialisée dans la fabrication de matières premières pour l'industrie pharmaceutique, SPI Pharma vient récemment de mettre en place un système de microbiologie rapide basée sur la cytométrie flux pour le contrôle libératoire de produits pharmaceutiques non obligatoirement stériles. L'industriel décrit ici les étapes et les résultats de la validation de ce protocole permettant d'obtenir des réponses de présence/absence en vingt-quatre heures.

Par Denis Solinas,

SPI Pharma

La notion de productivité, devenue un élément clef pour l'industrie pharmaceutique, contraint les industriels à travailler dans une logique de flux tendu et de respect des délais de production. La maîtrise du process et des produits finis nécessite la mise en oeuvre de contrôles microbiologiques strictes et réglementés. Les méthodes d'analyses définies dans la Pharmacopée européenne et américaine sont toutes basées sur la croissance des germes avec des phases d'incubation sur boîtes de Pétri de plusieurs jours. Dans ces conditions, le résultat microbiologique libératoire devient un point crucial qui, à lui seul, peut faire gagner ou perdre de précieux jours de logistique.



Le site de production de SPI Pharma près d'Aix-en-Provence.

La société SPI Pharma, spécialisée dans la fabrication de supports de médicaments et matières premières pour l'industrie pharmaceutique tels que les principes actifs anti-acide (hydroxyde d'aluminium, hydroxyde de magnésium), a engagé une démarche innovante pour atteindre ces objectifs de flux tendu en validant une nouvelle méthode de microbiologie rapide basée sur la technologie de marquage de viabilité de Chemunex couplée à une lecture par cytométrie en flux.

Avec la mise en place de cette méthode rapide dans le laboratoire de contrôle qualité, les résultats microbiologiques sont désormais disponibles en seulement vingt-quatre heures pour la production. Le laboratoire de microbiologie du site de Septemes Les Vallons, près d'Aix en Provence, peut confirmer, au responsable de production, la libération des produits finis dès le lendemain de la production, tout en maintenant le niveau de qualité exigé. Les bénéfices liés à l'implantation de cette nouvelle méthode rapide sont la réactivité sur le process et la réduction des coûts de stockage.

A travers les méthodes de référence décrites dans la Pharmacopée Européenne, les méthodes alternatives sont également citées comme pouvant être utilisées dans la mesure où l'équivalence entre la méthode rapide et la méthode conventionnelle a été démontrée. L'implantation de cette nouvelle méthode par cytométrie de flux (BactiFlow) s'est donc inscrite dans une démarche de

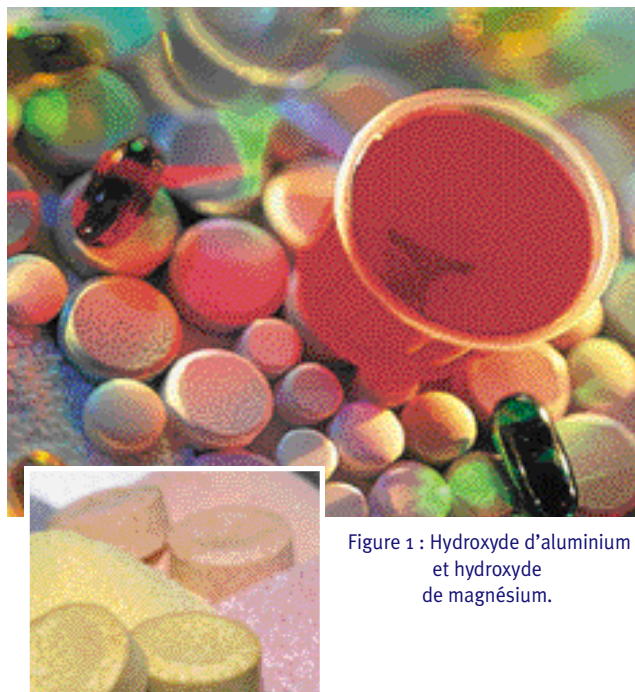


Figure 1 : Hydroxyde d'aluminium et hydroxyde de magnésium.

validation inspirée des guides ou directives tels que le paragraphe 5.1.6 de Pharmeuropa, l'USP, « *the validation of compendial methods <1225>* » ou encore le PDA *Technical Report 33*.

La procédure de validation a ainsi suivi les standards définis en incluant les qualifications d'installation (QI), la qualification opérationnelle (QO) et la qualification de performance (QP). Dans cet article nous décrivons la qualification de performance qui représente la performance de la méthode analytique alternative.

Matériels et méthodes

Souches utilisées. Les souches utilisées dans la qualification de performance sont celles recommandées dans les pharmacopées :

- Formes végétatives bactériennes :
 - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).
 - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
 - *Escherichiae Coli* (ATCC 8739).
- Bactérie sporulée :
 - *Bacillus subtilis spores* (ATCC 6633).

Les solutions stock des souches sont préparées conformément à la méthode décrite dans le protocole de qualification de performance 1 fourni par le fabricant. Les cultures utilisées sont issues d'une colonie de moins de cinq générations et moins de dix jours sur boîtes stockées à + 2 - 8°C. Une colonie est prélevée et remise en suspension dans un tube stérile contenant un gramme de billes de verre (diamètre 4 mm) puis ajoutée 10 ml de bouillon nutritif, le même que celui utilisé pour le test de présence/absence.

Après homogénéisation pour éliminer les agrégats cellulaires, les dilutions de travail servant à réaliser les contaminations artificielles à faible charge sont préparées à partir de la solution stock diluée dans le bouillon nutritif, de 10^{-1} à 10^{-4} . La dilution la plus forte est alors analysée au BactiFlow avec un protocole de dénombrement direct afin d'estimer la concentration initiale de la solution stock. Le dénombrement obtenu en temps réel permet de préparer la solution stock à 100 cellules/ml.

Produits testés : hydroxyde d'aluminium et hydroxyde de magnésium. Les produits à contrôler sont des principes actifs anti-acide sous forme de gel ou de poudre et sont produits en condition non stérile. Les analyses ont porté sur des échantillons provenant de plus de trois lots différents. Les critères microbiologiques requis sont ceux de la Ph a macopée européenne (Flore Totale < 100 UFC/g et absence de germes spécifiés).

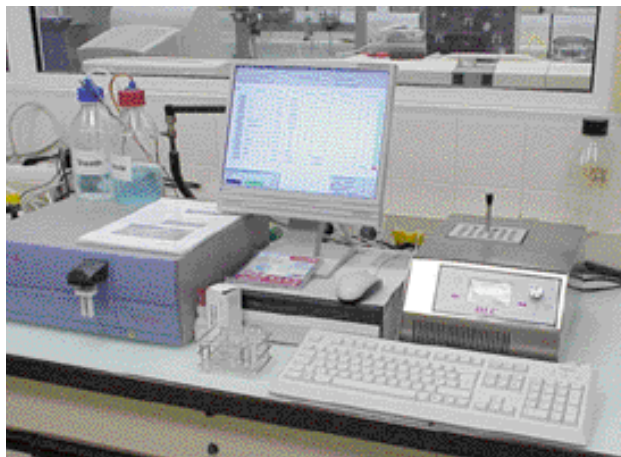


Figure 2 : Cytomètre en flux BactiFlow.

Méthode de référence. L'analyse du produit à contrôler se fait à partir d'une prise d'essai de 10 g diluée dans 90 ml de neutralisant (diluant pharmacopée) pendant deux heures. Puis 1 ml de cette suspension est inoculé sur TSA pour une incubation à $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant cinq jours. Cette approche permet ainsi d'obtenir un résultat en absence de croissance avec une sensibilité < 10 UFC/g. La méthode de référence étant basée sur un dénombrement et la méthode alternative proposée sur un présence/absence (sensibilité attendue < 1 UFC/g), les niveaux de sensibilité attendus des deux méthodes sont donc différents. Dans ces conditions, il a été nécessaire de définir les limites d'acceptation pour valider la nouvelle méthode alternative (voir paragraphe sur la Qualification de performance sur les produits finis).

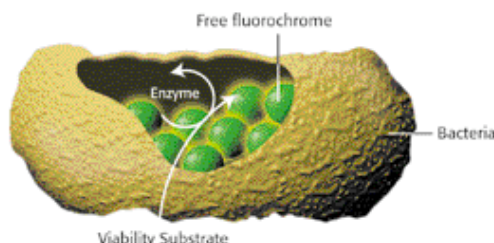
Méthode alternative. Matériel : BactiFlow, cytométrie en flux. La méthode alternative utilisée pour cette validation est un cytomètre en flux adapté pour la microbiologie : le BactiFlow (Chemunex, Ivry-Sur-Seine,

France). Le BactiFlow est équipé d'une source d'excitation laser solide à 488 nm (Figure 2). Tous les réactifs et consommables ont été fournis par les sociétés Chemunex et Aes Laboratoire.

Deux photomultiplicateurs collectent la lumière fluorescente émise par chacune des cellules marquées. Les signaux obtenus sont ensuite discriminés de façon entièrement automatique par l'informatique et permet ainsi de faire la différence entre les signaux à retenir pour le dénombrement (les micro-organismes viables marqués), et le bruit de fond (particules auto fluorescentes). Les micro-organismes détectés et comptés sont ensuite reportés et traduits sans interprétation de l'opérateur en réponse « Feu vert » « Feu rouge ».

Protocole BactiFlow : test de présence/absence. Les échantillons sont préparés selon les recommandations du fabricant ; réf : 302-D0510-03. Dix grammes du produit à analyser sont dilués dans 90 ml de neutralisant (diluant pharmacopée). Après deux heures de contact, 10 ml du produit neutralisé sont repris dans 90 ml de bouillon nutritif afin d'obtenir un enrichissement d'un gramme de produit. L'échantillon ainsi préparé est ensuite incubé pendant vingt-quatre heures à 32°C +/-2°C avant l'analyse au BactiFlow.

Figure 3 : Principe de marquage de viabilité Chemunex.



A l'issue de la phase d'enrichissement 200 µl d'échantillon enrichi sont prélevés pour réaliser le marquage de viabilité. Aux 200 µl d'échantillons sont ajoutés successivement un contre colorant pour éliminer le bruit de fond induit par la matrice, la solution de marquage permettant le marquage des cellules viables par la mise en évidence d'une activité enzymatique intracellulaire liée à l'intégrité membranaire du micro-organisme. Après les douze minutes de marquage à 30°C +/-2°C, un deuxième contre colorant contenant un standard interne est ajouté avant l'injection de l'échantillon dans l'analyseur pour une lecture automatique en une minute (Figure 3).

Interprétation des résultats.

Critère de Qualification performance 1 avec les cultures pures.

Le BactiFlow a été testé avec les cultures pures conformément aux recommandations. Les critères d'acceptation

appliqués sont déterminés pour démontrer que la méthode alternative est au moins équivalente à la méthode de référence. S'agissant d'un test qualitatif, seuls les paramètres de validation suivants ont été pris en compte.

Exactitude et fidélité.

La méthode alternative doit donner des résultats équivalents à la méthode de référence. Ainsi les résultats attendus doivent être équivalents aux résultats trouvés. Dans le cadre d'un test qualitatif (test de présence/absence) les charges d'inoculum comprises entre 5 et 10 UFC/g, attendus positifs doivent tous être confirmés positifs conformément à la méthode de référence.

Limite de détection.

La méthode d'alternative doit donner des résultats au moins équivalents à la méthode existante. Le critère permettra de valider la limite de détection pour des valeurs d'inoculum < 1 UFC/g.

Qualification de performance sur les produits finis (hydroxyde d'aluminium et hydroxyde de magnésium). La performance de qualification 2 a été réalisée en trois étapes successives.

Validation de la spécificité du protocole de marquage et maîtrise du bruit de fond matrice.

Le protocole de marquage doit garantir l'absence de marquage de micro-organisme mort (résultat négatif après marquage d'une suspension de micro-organismes ayant subi un traitement thermique à 80°C +/-2°C pendant 10 min). Vérification de l'absence d'interférence matrice (résultats négatifs pour un bouillon nutritif stérile seul et pour un bouillon nutritif avec la matrice non contaminée inférieure).

Validation de l'efficacité de la neutralisation du produit.

La neutralisation du produit testé est efficace si les résultats du test avec l'étape de neutralisation et d'enrichissement permettent la détection après l'étape d'incubation d'une contamination faible (comprise entre 1 et 5 UFC/g). Les charges de micro-organismes, après incubation, avec et sans matrice, ne doivent pas être différentes de plus de 0,3 Log pour valider la neutralisation complète du produit, permettant la croissance des micro-organismes pendant la phase d'incubation.

Test d'équivalence.

Mesurer la similarité de la méthode alternative avec la méthode de référence à remplacer. Les tests sont réalisés sur chaque échantillon en parallèle sur plus de trois lots

différents de production d'hydroxyde d'alumine et d'hydroxyde de magnésium sous forme de poudre et sous forme de gel.

Critère d'acceptation :

- Résultats Conformés BactiFlow (< 1 UFC/g) / Résultats Non Conformés Méthode Pharmacopée (> 100 UFC/g) **0 %**
- Résultats Non Conformés BactiFlow (> 1 UFC/g) / Résultats Non Conformés Méthode Pharmacopée (> 100 UFC/g) **100 %**
- Résultats Non Conformés BactiFlow (> 1 UFC/g) / Résultats Conformés Méthode Pharmacopée (< 100 UFC/g) < **6 %** *

*ce critère tient compte du fait que la présence/absence permet un seuil de sensibilité attendu supérieur à celui du dénombrement direct. Ainsi, un résultat de dénombrement conforme (méthode pharmacopée) avec absence de colonie sur boîte ne traduit qu'une contamination < 10 UFC/g aussi nous pouvons observer un résultat non-conforme en Bactiflow pour une présence de germe comprise entre 1 et 9 UFC/g. Le taux de NC acceptables supplémentaires a donc été défini à 6 % maximum, tenant compte de l'objectif initial de flux tendu à mettre en place, un résultat positif nécessitant des analyses complémentaires, donc un délai libératoire supplémentaire.

Résultat de la Qualification

Qualification d'installation (QI) et Qualification opérationnelle (QO).

Avant la réalisation du protocole de qualification de performance, l'ensemble de la QI et QO a été réalisé par le fournisseur et approuvé par le service Assurance Qualité.

		Méthode de référence en Présence/Absence	
		Résultats positifs	Résultats négatifs
Méthode BactiFlow	Résultats positifs*	50	2
	Résultats négatifs	1	31

(* seuil de positivité > 500 count/ml)

Tableau 1 : corrélation des deux méthodes sur cultures pures

Qualification Performance 1 en culture pure.

Exactitude et fidélité.

Les résultats de ce critère de validation sont résumés dans le *Tableau 1*. On observe une bonne corrélation avec cinquante tests trouvés positifs par les deux méthodes et trente et un test trouvé négatif. Tous les échantillons avec des inoculum compris entre 5 et 10 UFC/g sont confirmés positifs avec le protocole présence/absence quelle que soit la méthode utilisée.

Seuls trois résultats sur quatre-vingt quatre sont trouvés discordants par rapport aux résultats attendus. Cette

Inoculum théorique	Inoculum réel	Méthode Référence	Méthode BactiFlow
Solution stock (100 UFC / ml)	M= 112 +/-4		
10 UFC / bouteille	M= 11 +/-3.8	+	+
1 UFC / bouteille	M= 1.4 +/-1.4	-	-
		-	-
		+	+
		+	+
		+	+
0.5 UFC / bouteille	M= 0.6 +/-0.7	-	-
		-	-
		+	+
		+	+
		+	+
0 UFC / bouteille	0	-	-
Niveau de détection relatif LOD50%		0.347 [0.066-1.84]	0.347 [0.066-1.84]

Chaque échantillon a été analysé en triple.

divergence peut s'expliquer du fait des faibles inoculum employés pour chaque essai.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus est issu d'analyses en triple de chaque bouillon d'enrichissement. Aucune discordance n'a été observée au sein d'un même enrichissement. Les résultats sont donc considérés comme équivalents et conformes aux critères d'acceptation.

Limite de détection.

La limite de détection d'une méthode analytique est définie comme la plus petite concentration de micro-organisme présente dans un échantillon qui peut être détecté. Dans le cadre d'un test qualitatif, le test consistera à réaliser le test de présence/absence comparativement avec les deux méthodes avec des charges de micro-organismes de plus en plus faible et en dessous de 1 UFC/g.

Quatre niveaux cibles de contamination ont été testés pour chacun des micro-organismes (0 – 0,5 – 1 et 10 UFC par bouteille de 90 ml de Bouillon nutritif). Six analyses en triple ont été réalisées pour les niveaux de concentration de 0,5 et 1 micro-organismes. Les contaminations ont été réalisées directement dans le bouillon nutritif, avant incubation.

Pour chaque niveau de contamination, l'homogénéité des suspensions est vérifiée par dix dénombrements sur gélose TSA. Le calcul de l'intervalle de confiance est établi par la moyenne et l'écart type. Les quatorze bouteilles préparées par souche sont incubées vingt-deux heures à 32°C +/-2°C (*Tableau 2*).

La limite de détection est déterminée pour chaque souche par le test statistique de Spearman Karber. Celui-

Tableau 2 : résultats d'essai limite de détection sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

ci permet de déterminer statistiquement la plus petite quantité de micro-organisme détectable par la méthode garantissant 50 % de détection.

Chaque souche est ainsi évaluée selon le plan d'essai présenté en *tableau 2* (à titre d'exemple avec *Staphylococcus aureus*), l'ensemble des résultats est résumé dans le *tableau 3* et permet de valider pour chaque souche testée que la limite de détection de la méthode est quelle que soit la souche <1 UFC/g ce qui permet de valider la méthode pour un test qualitatif en présence /absence dans 1 g et garantir l'absence des germes spécifiés.

	Méthode de référence	BactiFlow (Cytométrie en flux)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	0,268 [0,062-1,154]	0,268 [0,062-1,154]
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	0,347 [0,066-1,840]	0,347 [0,066-1,840]
<i>Bacillus subtilis spores</i> (ATCC 6633)	0,409 [0,09-1,851]	0,530 [0,117-2,400]
<i>Escherichiae Coli</i> (ATCC 8739)	0,134 [0,035-0,519]	0,134 [0,035-0,519]

Tableau 3 : limite de détection LOD50% pour chacune des souches.

Si nous prenons les résultats *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), le LOD50% est de 0,347 [0,062-1,154] pour les deux méthodes, ainsi la limite de détection pour *Staphylococcus aureus* est de 0,347 UFC/g de produit, la méthode BactiFlow garantie donc de détecter 50 % des échantillons contaminés à 0,347 UFC/g avec un intervalle de confiance compris entre 0,062 et 1,154.

Qualification performance 2 en présence du produit fini.

Validation de la spécificité du protocole de marquage et maîtrise du bruit de fond matrice.

L'analyse au BactiFlow après marquage de viabilité sur les

bouillons d'enrichissement contaminés traités à la chaleur montre des échantillons exempts de germes (*tableau 4*). Les contrôles en boîte de pétri sont en accord avec les résultats de la cytométrie en flux. Les résultats en cytométrie de flux après traitement de dix minutes à 80°C montrent que les marquages sont spécifiques des germes viables.

L'absence d'interférence matrice est également vérifiée par l'absence de résultats faussement positifs sur des échantillons négatifs (témoin bouillon nutritif + matrice) (*Tableau 4*).

	Méthode BactiFlow Count/ml	Méthode de référence (100µl du milieu enrichi sur TSA)
TR	0 / 0	0 / 0
Témoins souche sans matrice (21 UFC/10g)	3,4.10 ⁶ N=3	>300 N=2
Témoins souche sans matrice (287 UFC/10g)	3,4.10 ⁶ N=3	>300 N=2
Témoin produit 1 (gel)	0 / 0 / 0	0 / 0
Produit 1 (Gel) Taux 21UFC/10g	2,3.10 ⁶ N=3	>300 N=2
Produit 1 (Gel) Taux 287UFC/10g	2,1.10 ⁶ N=3	>300 N=2
Témoin produit2 (Poudre)	0 / 0	0 / 0
Produit 2 (Poudre) Taux 21UFC/102	2,4.10 ⁶ N=3	>300 N=2
Produit 2 (Poudre) Taux 287UFC/10g	2,8.10 ⁶ N=3	>300 N=2

Tableau 5 : résultats sur les essais de neutralisation des produits finis.

Validation de l'efficacité de la neutralisation du produit. Des produits finis (poudre et gel) ont été artificiellement contaminés à faible charge. Deux niveaux de contaminations ont été testés (cible à 2 UFC/g, réel à 21 UFC/10 g et cible à 20 UFC/g, 287 UFC/10 g).

Dix grammes de produit sont dilués dans 90 ml de neutralisant (diluant pharmacopée). Après deux heures de temps de contact, les produits neutralisés sont artificiellement contaminés aux niveaux de cibles indiqués ci-dessus. Après homogénéisation, 10 ml du bouillon neutralisantensemencé sont repris dans 90 ml de bouillon nutritif pour incubation vingt-deux heures à 32°C +/-2°C.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) a été utilisée pour cet essai. Des témoins souche, avec et sans matrice, aux deux niveaux de contamination, sont réalisés afin de vérifier la capacité de la méthode à détecter une faible contamination en présence de matrice et ainsi valider la bonne neutralisation du produit et donc l'absence de pouvoir inhibiteur résiduel.

Tableau 4 : test de spécificité après traitement thermique.

	SANS TRAITEMENT		TRAITEMENT 80°C 10 minutes	
	Gélose TSA*	BactiFlow **	Gélose TSA*	BactiFlow **
<i>Escherichiae Coli</i> (ATCC 8739)	>300 >300	5,7.10 ⁶ 5,5.10 ⁶	< 1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	>300 >300	8,2.10 ⁵ 9,0.10 ⁵	< 1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	>300 >300	2,1.10 ⁵ 2,5.10 ⁵	< 1	-
Témoin Bouillon nutritif	< 1	-	< 1	-
Témoin réactif	Nd	-	Nd	-

< 500 Count / ml d'échantillon analysé = Négatif

> 500 Count / ml d'échantillon analysé = Positif

* UFC / ml de bouillon d'enrichissement

**count / ml d'échantillon analysé

Les résultats présentés dans le *Tableau 5* montrent que la plus faible charge à 21 UFC/10 g soit 2 UFC/g est bien détectée par le protocole de présence/absence en présence des deux produits.

Bien que nous ne soyons pas sur un test quantitatif du fait de l'incubation, l'analyse par cytométrie de flux réalisant un dénombrement du bouillon enrichi permet de vérifier que la charge obtenue après incubation en présence de matrice ne diffère pas de plus de 0,3 Log par rapport au témoin souche pour les produits 1 et 2 (*Tableau 6*) L'absence d'interférence matrice est donc bien confirmée. Le critère d'efficacité de la neutralisation du produit est donc validé.

	Cible niveau 2 UFC/g	Moyenne Ecart Témoin/Ech
Témoin souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	$3,4 \cdot 10^6$ = 6,53 Log	-
Produit 1 (gel)	$2,2 \cdot 10^6$ = 6,36 log	-0,17 Log
Produit 2 (Poudre)	$2,4 \cdot 10^6$ = 6,38 Log	-0,15 Log

Tableau 6 : validation de l'efficacité de la neutralisation des poudres et gels pour un inoculum de départ à 2 UFC/g de produit.

Test d'équivalence.

Le test d'équivalence a été réalisé pendant six mois sur 452 produits, répartis sur plus de trois lots différents de production à la fois sur les produits en poudre et en gel. Chaque produit a été testé en parallèle par les deux méthodes (dénombrement direct par la méthode de référence et test présence/absence par le Bactiflow). Les résultats ont été répartis en différentes catégories, résultats positifs et négatifs (*Tableau 7*).

Tableau 7 : répartition des positifs et négatifs selon la méthode d'analyse.

	P/A BactiFlow Non Conforme	P/A BactiFlow Conforme	TOTAL
Dénombrement Par méthode Pharmacopée Conforme	24 (5,5%)	403 (92,8%)	427
Dénombrement Par méthode Pharmacopée Non Conforme	7 (1,7%)	0 (0%)	7
TOTAL	31	403	434

Tous les résultats positifs sur Bactiflow ont fait l'objet d'une confirmation sur boîte de Pétri à partir du bouillon enrichi. Aucun, résultat négatif BactiFlow n'a été confirmé positif par la méthode de référence. L'absence de faux négatif est donc bien validée. Sept résultats non conformes sur BactiFlow, n'ont pas été confirmés sur boîte de Pétri en dénombrement. Comme indiqué dans

le paragraphe relatif aux critères d'équivalence, ces résultats s'expliquent par la différence des deux approches, l'une en dénombrement directe avec un résultat final sur une prise d'essai de 0,1 g de produits dans l'inoculum neutralisé ensemencé dans la boîte, l'autre en présence/absence avec un résultat final sur une prise d'essai de 1 g de produit enrichi.

La méthode Bactiflow a mis en évidence 5,5 % de résultats non-conformes (en test de présence/absence) quand la méthode de dénombrement a confirmé un résultat conforme < 100 UFC. Ceci est acceptable compte tenu du passage d'une méthode de dénombrement à une méthode qualitative. Toutefois le nombre de positif supplémentaire n'excède pas le critère des 6 % requis dans les critères d'acceptation.

L'étude de qualification de performance réalisée chez SPI Pharma montre que les résultats obtenus avec la technique rapide de cytométrie de flux BactiFlow sont équivalents aux résultats obtenus avec la méthode de référence.

Les tests d'équivalence réalisés sur six mois de production ont montré une sensibilité équivalente à la méthode de référence. La mise en place de cette méthode qualitative permet ainsi en une seule analyse de contrôler la production en vingt-quatre heures, en confirmant également l'absence des germes spécifiés. La validation de cette nouvelle approche a montré qu'un test qualitatif, dans ce cas précis, ne pénalisait pas le flux de libération des produits par rapport à une analyse quantitative. La libération des produits finis, ainsi validée en vingt-quatre heures, permet une réduction des coûts de stockage et une augmentation de la production en flux tendu. Par ailleurs, si le Bactiflow est ici validé dans le cadre d'une analyse qualitative, il n'est reste pas moins un outil permettant les dénombrements directs applicables pour certaines matrices en fonction de leur bruit de fond. Cet aspect a d'ailleurs été utilisé lors de cette validation pour l'estimation des solutions stocks nécessaires à la préparation des inoculums ou encore pour valider l'efficacité de la neutralisation et la maîtrise du pouvoir inhibiteur résiduel. ■

Références bibliographiques

Validation des méthodes microbiologiques alternatives, chapitre <1223>. Pharmacopeial forum 28 (1) : Janv-Fev 2002.

Technical report N° 33 : *Evaluation, Validation and implementation of new microbiology testing methods*, PDA Journal of pharmaceutical Sciences and technology. Supplement TR33, 2000 : 54 : n°3.

Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologie, section 3.2. *Validation des essais qualitatifs de détection de microorganismes dans un échantillon*. Pharmeuropa Vol.16, 5.1.6. n°4, octobre 2004.

Qualification Installation, Opérationnelle et performance, support documentaire Chemunex (réf : 302-Do401-02 / 302-Do402-02/302-Do221-01).

Brailsford MA, Gattley S. *Rapid analysis of micro organisms using flow cytometry. Flow cytometry in Microbiology 1993*. Ed. Lloyd D: Springer-Verlag, London: 171-180.

Johnson B. *Evaluation of a new system for rapid microbiological detection in non-sterile pharmaceutical products*. European Pharmaceutical Review 1999; 4(1) : 55-59.

Philippe L. *A new rapid analysis system for complete microbial quality control in the cosmetic industry*. SOFW. June, 2000; 28-30.