

Article issu  
de la revue  
«Salles propres»  
n°63  
(Septembre 2009)

CONTRÔLE DE L'AIR

# Couplage biocollecteur/ cytomètre en phase solide

Par LUDOVIC PHILIPPE, AES Chemunex

La méthode traditionnelle de contrôle de l'environnement dans les salles propres est simple mais nécessite trois à cinq jours d'incubation. Combinant la cytométrie en phase solide et un système de collecte des micro-organismes de l'air qui permet de récupérer un échantillon liquide dans lequel sont concentrés les contaminants, une nouvelle approche est désormais possible, donnant des résultats au bout de trois heures.

Le contrôle microbiologique des salles propres et des environnements maîtrisés est devenu un élément-clé du programme d'assurance qualité pour les sites de production pharmaceutique. Traditionnellement, ces contrôles sont fondés sur une collecte des micro-organismes sur milieux gélosés suivie d'une culture de plusieurs jours. À la suite de la période de croissance, le niveau de contamination est déterminé par dénombrement des colonies visibles sur boîte. Cette méthode est simple à mettre en

œuvre mais présente l'inconvénient de fournir des résultats trois à cinq jours après le prélèvement, n'autorisant pas la mise en place d'actions correctives en temps réel. De plus, la méthode traditionnelle ne permet pas de dénombrer tous les micro-organismes présents dans l'air, entre autres les micro-organismes « stressés » ou à croissance lente. AES Chemunex a validé une approche couplant le biocollecteur innovant Coriolis  $\mu$ , utilisant une technologie cyclonique, avec l'analyseur de microbiologie rapide ChemScan RDI, reposant sur la

cytométrie à balayage permettant un délai de résultat de seulement 3 heures (de la phase de « collecte » au résultat final).

## Technologies utilisées

### Le biocollecteur portable

Le Coriolis  $\mu$ , conçu par la société Bertin Technologie (France), est un biocollecteur portable à haut débit qui grâce à son principe de collecte cyclonique originale permet l'obtention d'un échantillon liquide (figure 1).

Le contrôle microbiologique « actif » par aspiration de l'air à un débit de 300 L/min en conservant une vitesse adaptée permet d'obtenir des résultats plus représentatifs et plus précis qu'un contrôle d'air « passif » par simple sédimentation sur une boîte de Petri. Il suffit de 5 minutes pour prélever les particules biologiques contenues dans un échantillon de 1,5 m<sup>3</sup> d'air. L'air est aspiré directement dans un cône stérile contenant 15 mL d'un liquide de collecte spécifique optimisant la récupération des particules (figure 2). Les particules aspirées sont alors centrifugées sur les parois du cône et séparées de l'air ensuite évacué. Les particules en suspension dans le liquide de collecte sont simplement récu-

### 1 Biocollecteur



Le Coriolis  $\mu$  (Bertin Technologie) et ses consommables associés (tubes et liquides de collecte).

pérées dans le cône vissé sur l'appareil. Avec cette technologie, la majorité des particules d'une taille supérieure à 0,5  $\mu$ m peut être échantillonnée : bactéries, moisissures, levures. L'échantillon liquide permet la qualification et la quantification de la « flore totale » sans risque de saturation ou de dégradation du milieu de collecte.

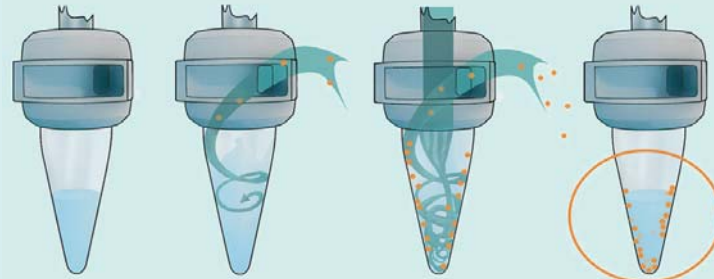
### L'analyseur de microbiologie en temps réel

Le marquage fluorescent des micro-organismes viables couplé à la cytométrie à balayage sur →

Article issu  
de la revue  
«Salles propres»  
n°63  
(Septembre 2009)

La solution  
de collecte est  
traitée selon  
le protocole en  
trois étapes :  
filtration,  
marquage et  
balayage laser.

## 2 Principe de la technologie Coriolis

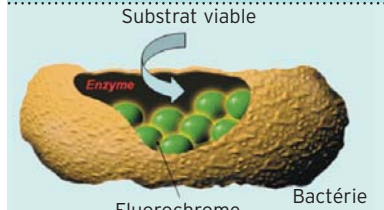


L'air est aspiré directement dans un cône stérile contenant 15 mL d'un liquide de collecte spécifique optimisant la récupération des particules.

→ membrane a été développée pour répondre aux besoins de rapidité et de sensibilité de l'industrie pharmaceutique. La cytométrie à balayage est utilisée en routine depuis plusieurs années pour le dénombrement en temps réel des micro-organismes dans les eaux de process ou pour l'évaluation de la biocharge de produits filtrables. Afin d'offrir une méthode d'analyse vraiment rapide et sensible pour les contrôles d'environne-

ment, une collecte en échantillon liquide et filtrable était nécessaire pour coupler les deux technologies. Le ChemScan RDI permet d'obtenir des résultats microbiologiques en temps réel grâce à une technologie fondée sur la détection des micro-organismes viables sur membrane filtrante. Aucune étape de croissance du micro-organisme n'étant requise, les résultats sont obtenus en quelques heures au lieu de quelques jours, avec une

## 3 Marquage fluorescent des micro-organismes viables



Le marquage reposant sur une réaction enzymatique, seuls les micro-organismes viables sont rendus fluorescents.

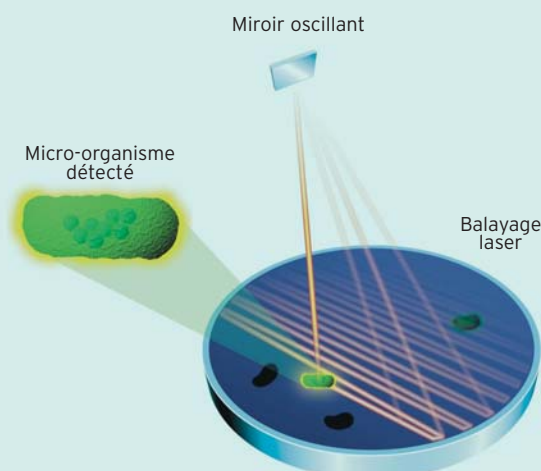
sensibilité de 1 micro-organisme par échantillon. L'analyse d'un échantillon au ChemScan RDI se fait en trois étapes :

- filtration ;
- marquage des cellules ;
- balayage laser et dénombrement.

Cette technologie allie la filtration de l'échantillon, le marquage direct des micro-organismes viables et le dénombrement des cellules par cytométrie à balayage laser. Les micro-organismes sont marqués directement et individuellement avec un réactif fluorescent à base d'un substrat de viabilité. Le marqueur étant actif sur les bactéries, les levures et les moisissures quel que soit leur état physiologique, végétative ou spore, le marquage fluorescent est « universel ». Celui-ci reposant sur une réaction enzymatique, seuls les micro-organismes viables sont rendus fluorescents (figure 3).

Après l'étape de marquage, la surface de la membrane de filtration est automatiquement et entièrement scannée par balayage laser (figure 4). Les micro-organismes marqués sont détectés et dénombrés un par un. Une discrimination des résultats est automatiquement effectuée par l'ordina-

## 4 Balayage laser de la membrane filtrante pour un dénombrement en 3 minutes



Après l'étape de marquage, la surface de la membrane de filtration est automatiquement et entièrement scannée par balayage laser.

Article issu  
de la revue  
«Salles propres»  
n°63  
(Septembre 2009)

teur pour différencier les cellules marquées des autres événements. Les résultats sont obtenus par volume filtré.

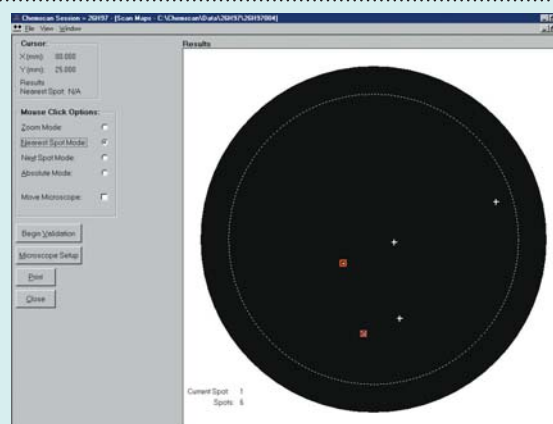
Pour un dénombrement simultané des bactéries mésophiles, sporulées ou non, des levures, des mycéliums et spores de moisissures, un protocole de marquage unique permet l'obtention de résultats en moins de 3 heures. Jusqu'à six membranes peuvent être marquées simultanément avant la lecture qui s'effectue par balayage laser de 3 minutes, membrane par membrane. Le résultat quantitatif fourni, sous forme de représentation graphique du filtre (figure 5), peut être validé visuellement par l'opé-

rateur grâce à un microscope à épifluorescence automatisé. La totalité de l'analyse ne prend que quelques heures.

### Couplage des méthodes

Une fois l'échantillon d'air collecté dans le cône à l'aide du Coriolis  $\mu$ , la solution de collecte compatible est ensuite traitée selon le protocole en trois étapes : filtration, marquage et balayage laser. Le ChemScan RDI détecte toutes les bactéries, levures et moisissures (incluant les spores) et permet d'obtenir un dénombrement supérieur ou égal à la méthode traditionnelle. La solution de collecte a été spécifiquement conçue pour ➔

## 5 Représentation graphique de la membrane filtrante

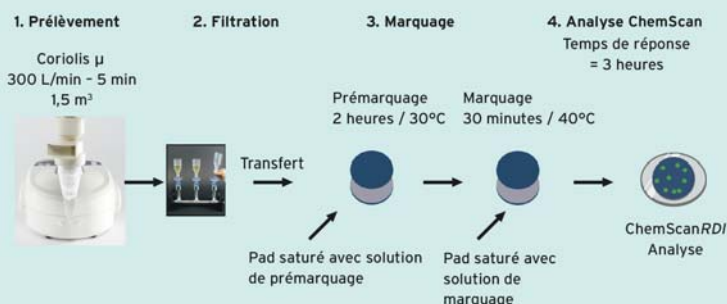


Le résultat quantitatif fourni sous forme de représentation graphique du filtre peut être validé visuellement par l'opérateur grâce à un microscope à épifluorescence automatisé.

Article issu  
de la revue  
«Salles propres»  
n°63  
(Septembre 2009)

L'étude sur  
la linéarité,  
l'exactitude,  
la précision et  
la limite de  
détection est  
en accord avec  
les critères  
d'acceptation  
de la  
Pharmacopée  
européenne.

## 6 Les quatre étapes du protocole Air monitoring avec le Coriolis $\mu$ et le ChemScan RDI



Une fois l'échantillon d'air collecté dans le cône à l'aide du Coriolis  $\mu$ , la solution de collecte est ensuite traitée selon le protocole en trois étapes : filtration, marquage et balayage laser, puis soumise à la détection par le ChemScan RDI.

### A Conditions expérimentales

Test	Conditions expérimentales
Linéarité	5 concentrations
Exactitude	500-100-50-5-0 micro-organismes/volume filtré
Limite de quantification	5 réplicats en CBO4, 3 sessions
Précision	1 concentration : 50 micro-organismes/volume filtré, 15 réplicats en CBO4

Pour chaque concentration, trois tubes de collecte (liquide de collecte + micro-organismes) sont préparés pour le contrôle des inoculums, l'analyse ChemScan RDI et l'analyse de la méthode de référence (avec Coriolis  $\mu$ ).

### B Critères choisis

Test	Critère (d'après le critère EP)
Linéarité	Sur les résultats ChemScan, la linéarité est prouvée si - la pente est significative ; - le test de déviation par rapport à la linéarité est non significatif
Exactitude	Sur les résultats ChemScan, recouvrement > 70 % vis-à-vis de l'inoculum témoin
Précision	CV de la méthode de référence $\geq$ CV de la méthode alternative. Dans le cas contraire, un test F est effectué pour contrôler l'équivalence de la variance
Limite de quantification	Plus basse concentration de l'inoculum témoin démontré exact

L'étude comparative couvre les critères de linéarité, d'exactitude, de précision et de limites de quantification avec en parallèle les méthodes conventionnelle et alternative sur trois micro-organismes (*S. epidermidis*, spores de *B. subtilis*, spores de *A. brasiliensis*). CV = coefficient de variation.

→ maintenir la viabilité des micro-organismes pendant 3 heures à température ambiante dans l'attente de l'étape de marquage et de dénombrement (figure 6).

### Validation

La validation du protocole de contrôle microbiologique de l'air couplant le Coriolis  $\mu$  et le ChemScan RDI a été réalisée à travers une étude comparative couvrant les critères de linéarité, d'exactitude, de précision et de limites de quantification avec en parallèle les méthodes conventionnelle et alternative sur trois micro-organismes des Pharmacopées européenne et américaine (*S. epidermidis*, spores de *B. subtilis*, spores de *A. brasiliensis*) (tableaux A et B). Les résultats complets obtenus durant cette étude sont présentés dans un rapport de validation et résumés dans le tableau C. La conclusion montre que l'étude sur la linéarité, l'exactitude, la précision et la limite de détection pour tous les germes testés est en accord avec les critères d'acceptation de la Pharmacopée européenne. Les figures 7 et 8 sont des exemples représentatifs des résultats obtenus pour *S. epidermidis*.

De plus, les performances biologiques et physiques du Coriolis  $\mu$  ont aussi été testées avec succès selon les recommandations de la norme ISO 14698-1 par l'agence HPA (Health Protection Agency, située à Porton Down, Royaume-Uni).

Les tests montrent une efficacité physique de capture par l'appareil de 62 % pour les particules de moins de 1  $\mu$ m et 100 % pour celles de diamètre supérieur à 3,5  $\mu$ m. Dans une salle propre, pour la fraction granulométrique comprise entre 3,5 et 15  $\mu$ m, le rendement de collecte atteint 99 %.

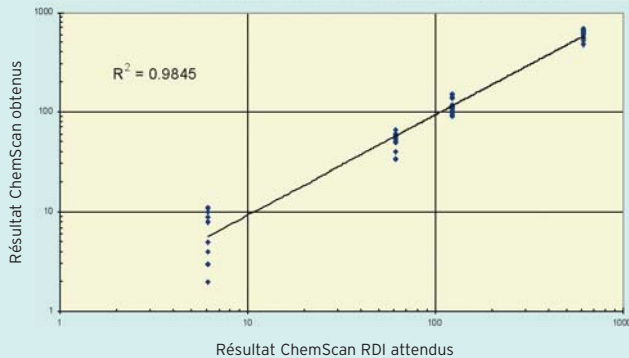
Article issu  
de la revue  
«Salles propres»  
n°63  
(Septembre 2009)

## ● Résultats

Test	Résultats			
Linéarité	La linéarité du protocole de contrôle aérien est démontrée pour les trois souches dans l'intervalle calculé			
Exactitude	Recouvrement > 70 % pour les trois souches jusqu'à 5 cellules/volume			
Précision		Contrôle de l'air	Méthode de référence	Test F
	<i>S. epidermidis</i>	CV = 14	CV = 15	Pas de différence significative
	<i>B. subtilis</i>	CV = 42	CV = 50	
	<i>A. brasiliensis</i>	CV = 24	CV = 34	Pas de différence significative
Limite de quantification	5 cellules/volume filtré			

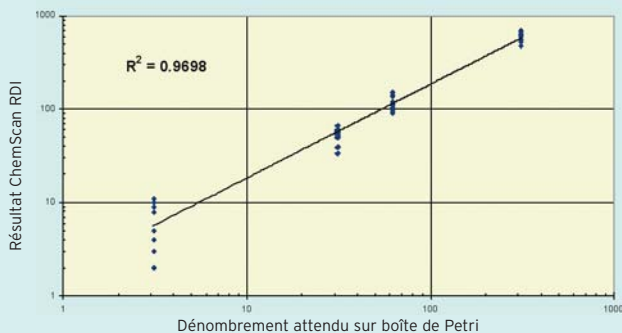
L'étude sur la linéarité, l'exactitude, la précision et la limite de détection pour tous les germes testés sont en accord avec les critères d'acceptation de la Pharmacopée européenne.

### 7 Linéarité pour *S. epidermidis*



La linéarité du protocole de contrôle aérien est démontrée pour *S. epidermidis* ( $r^2 = 0,9845$ ).

### 8 Exactitude pour *S. epidermidis*



Jusqu'à 5 cellules/volume, les deux méthodes assurent un recouvrement > 70 % pour les trois souches vis-à-vis de l'inoculum témoin.

Article issu  
de la revue  
«Salles propres»  
n°63  
(Septembre 2009)

## → Étude de cas

Une étude de faisabilité de cette nouvelle solution rapide de contrôle microbiologique de l'air en temps réel a été effectuée par le docteur Lin Chen, S. Fennel et W. Snapp (Pfizer Saint Louis – États-Unis).

### Contexte

Contrôler la qualité microbiologique de l'environnement vise à garantir la qualité des produits fabriqués en salles propres et à assurer la santé et la sécurité du personnel et des personnes exposées. Une mesure fiable de la contamination microbienne dépend du choix d'un échantillonneur d'air adapté, de la représentativité de l'échantillon et de la limitation des pertes dues au prélèvement par défaillance de l'échantillonneur pour capter les particules contenant des micro-organismes ou en raison de l'inactivation des micro-organismes viables lors de leur collecte. L'objectif était de réaliser l'étude de faisabilité de l'échantillonneur d'air Coriolis  $\mu$  couplé avec le cytomètre à balayage ChemScan RDI afin de mettre en œuvre une nouvelle solution permettant une enquête rapide en cas de contamination et la surveillance de routine des sites de production.

### Matériel et méthodes

L'échantillonnage de l'air a été effectué dans l'un des laboratoires de microbiologie en utilisant soit un échantillonneur d'air traditionnel (par impaction), soit le Coriolis  $\mu$ . Les échantillons recueillis avec le Coriolis  $\mu$  ont été analysés par la méthode traditionnelle (boîte) et par la méthode rapide ChemScan RDI.

### Résultats

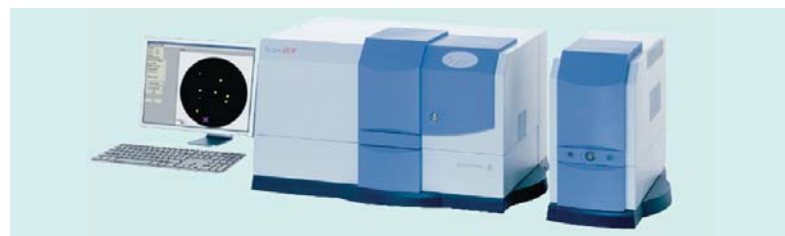
#### Comparaison

##### Coriolis $\mu$ /impacteur

Le contrôle a été effectué en différents points, les préleveurs étant placés côte à côte, deux répliqués étant utilisés (**tableau D**). Un échantillon obtenu avec le Coriolis  $\mu$  (0,45  $\mu\text{m}$ ) a été filtré, le filtre étant ensuite mis à incuber sur gélose TSA 72-96 heures à 20-25 °C et 48-72 heures à 30-35 °C.

#### Prélèvement avec le Coriolis $\mu$ et détection avec le ChemScan RDI

Chaque échantillon obtenu avec le Coriolis  $\mu$  est divisé en deux aliquotes A et B. L'analyse est effectuée suivant le protocole ChemScan RDI. Les résultats observés (**tableau E**) sont notamment dus aux micro-organismes viables mais non cultivables (VNC) qui ne peuvent être



Le ChemScan RDI assurant le comptage microbiologique.

détectés par la méthode traditionnelle d'impaction malgré leur caractère potentiellement pathogène.

### Discussion

Le préleveur cyclonique Coriolis  $\mu$  est un outil facile à utiliser qui collecte un échantillon d'air dans un milieu liquide, ce qui permet une analyse par une méthode de microbiologie rapide. L'étude de faisabilité menée au laboratoire de microbiologie Pfizer de Saint Louis indique que le système Coriolis recueille les micro-organismes aéroportés de façon équivalente aux systèmes par impaction. L'analyseur ChemScan RDI peut être utilisé comme méthode de microbiologie rapide suite au prélèvement du Coriolis afin de donner rapidement des résultats (environ 3 heures du prélèvement à la suite). Il est également montré ici que la quantité de micro-organismes détectés avec le Scan RDI est plus élevée qu'avec la méthode traditionnelle dans la

mesure où elle n'est pas fondée sur la cultivabilité mais sur la viabilité. Les seuils d'alerte et d'action appropriés pourront nécessiter une réévaluation.

### Conclusion

La cytométrie à balayage ChemScan RDI combinée au biocollecteur Coriolis  $\mu$  permet la détection des micro-organismes de l'air en moins de 3 heures, offrant ainsi l'occasion d'adopter une approche préventive dans la qualité microbiologique d'environnement en industrie pharmaceutique. Il peut être utilisé pour investigation ou en routine dans les diverses zones contrôlées, salles propres et en production. En complément de l'application pour le contrôle de l'air, les applications pour l'analyse de surface en 3 heures avec les écouvillons floqués ChemSwab et l'analyse des eaux de process font de la plate-forme analytique ChemScan RDI un outil rapide pour les tests de l'environnement. ■

#### D Comparaison Coriolis $\mu$ /impacteur

Échantillons	Impaction	Coriolis $\mu$ + boîte
Hotte à flux laminaire	0	1 M
Hotte à flux laminaire	0	0
Plan de travail 2	6 (4 M + 2 B)	2 B
Plan de travail 2	4 (2 M + 2 B)	1 M
Plan de travail 3	6 (3 M + 3 B)	8 (7 M + 1 B)
Plan de travail 3	2B	8 (3 M + 3 B)

L'impacteur et le Coriolis  $\mu$  donnent des résultats équivalents sur les échantillons d'air du laboratoire (M : moisissure, B : bactérie).

#### E Prélèvement avec le Coriolis $\mu$ et détection avec le ChemScan RDI

Échantillons	Coriolis $\mu$ + Scan RDI	Coriolis $\mu$ + boîte
Hotte à flux laminaire	0	0
Hotte à flux laminaire + manipulations	1	0
Plan de travail 3	9	2 (1 M + 1 B)
Plan de travail + marche	66	7 (3 M + 4 B)
Plan de travail + manipulations	103	8 B

L'analyse avec le ChemScan RDI donne des résultats plus élevés que la méthode traditionnelle pour les échantillons contaminés (M : moisissure, B : bactérie).