HAL
open science

Validation du procédé aseptique de radiomarquage cellulaire en radiopharmacie : mise en place d'un test de remplissage aseptique

Clémentine Berlion

To cite this version:

Clémentine Berlion. Validation du procédé aseptique de radiomarquage cellulaire en radiopharmacie : mise en place d'un test de remplissage aseptique . Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01254039

HAL Id: dumas-01254039

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01254039v1

Submitted on 11 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015 N°

VALIDATION DU PROCÉDÉ ASEPTIQUE DE RADIOMARQUAGE CELLULAIRE EN RADIOPHARMACIE : MISE EN PLACE D'UN TEST DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Par Clémentine BERLION

Née le 26/02/1990 à ANNECY (74)

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 03 Décembre 2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Madame Annabelle GÈZE, Maîtres de Conférences des Universités

Membres :

Madame Roseline MAZET, Radiopharmacien assistant hospitalier (Directeur de thèse)

Madame Marie-Dominique DESRUET, Radiopharmacien et praticien hospitalier

Monsieur Denis WOUESSIDJEWE, Professeur Universitaire

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

Université Joseph Fourier GRENOBLE PHARMACIE

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCH	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	**RAVELET**	**Corinne**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**RIBUOT**	**Christophe**	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	**RIEU**	**Isabelle**	D5	-
Professeure Emérite	**ROUSSEL**	**Anne -Marie**	D1	-
PU-PH	**SEVE**	**Michel**	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	**SOUARD**	**Florence**	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	**TARBOURIECH**	**Nicolas**	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
PAST	**TROUILLER**	**Patrice**	D5	-
MCU	**VANHAVERBEKE**	**Cécile**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	**WOUESSIDJEWE**	**Denis**	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT)»**

D2 : Département «Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département «Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maitres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

REMERCIEMENTS

A Madame Roseline Mazet, Radiopharmacien et assistant hospitalier, pour tes précieux conseils, ta sympathie et ta disponibilité. Merci de m'avoir si bien encadré tout au long de ce dernier travail universitaire.
Je t'adresse l'expression de toute ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

A Madame Annabelle Gèze, Maîtres de Conférences des Universités, pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.
Soyez assurée de mes sentiments les plus respectueux.

A Madame Marie-Dominique Desruet, Radiopharmacien et praticien hospitalier, pour votre accueil chaleureux lors de mon stage en radiopharmacie. Merci de m'avoir fait découvrir cette activité de la pharmacie hospitalière dans la bonne humeur et de m'avoir fait partager votre passion pour votre métier.
Veuillez recevoir le témoignage de toute ma gratitude.

A Monsieur Denis Wouessidjewe, Professeur Universitaire, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.
Trouvez ici l'expression de ma respectueuse considération.

Je souhaite également remercier les préparatrices en pharmacie hospitalière, ***Estelle, Gaëlle, Hélène et Laure*** ainsi que tous ***les membres du service de médecine nucléaire du CHU de Grenoble***. Merci pour votre accueil et pour le partage de vos expériences.

A mes adorables parents, Emmanuelle et Gilles,

Merci infiniment pour votre soutien et votre amour sans failles. Vous êtes extraordinaires et je pèse mes mots. Je vous dédie ce travail en témoignage de tout mon amour et de ma profonde reconnaissance.

A mon frère Charly, A ma sœur Florette,

Même si je ne vous le dis pas souvent, je vous aime énormément !

A Sandy,

Ma chère amie et confidente, pour ces indénombrables éclats de rire depuis toutes ces années. Que les prochaines années nous réservent encore de beaux moments de simplicité, de rire et de partage.

A la team P1, Aurore, Cissou, Marinette, Yohan, Thomas et Lu,

Vous avez définitivement marqué mes années Grenobloises. Merci pour toutes ces soirées, ces anecdotes et ces parties de rigolade. En espérant que ni le temps, ni la distance n'effacent notre amitié.

A Véro,

Ma super coloc' et chère amie de pharma.

A Marie, Caro. M, Caro. T et Lolo,

Mes copines pharma de choc! Lolo, même si tu as migré à Marseille, je ne t'oublie pas !

A tous mes copains de la filière industrie et du Master 2 Eudipharm,

Et à tous ceux que j'oublie…

A mamie Juju et mamida, qui de là-haut, veillent sur moi.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 5
TABLE DES MATIÈRES 7
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES 8
GLOSSAIRE 9
LISTE DES ANNEXES 12
LISTE DES FIGURES 13
LISTE DES TABLEAUX 14
CONTEXTE 15
I. INTRODUCTION 19
II. MÉTHODOLOGIE 24
III. RÉSULTATS 36
IV. DISCUSSION 40
V. CONCLUSION 43
DISCUSSION GÉNÉRALE 44
CONCLUSION GÉNÉRALE 57
BIBLIOGRAPHIE 58
ANNEXE 1 : Formulaire de réalisation des TRA – Marquage cellulaire 61
ANNEXE 2 : Formulaire de résultats 66

ISTE DES ABRÉVIATIONS, SYMBOLES ET ACRONYMES

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMDEC	Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité
ASN	Autorité de Sûreté Nucléaire
BPP	Bonnes Pratiques de Préparation
CHU	Centre Hospitalo Universitaire
^{51}Cr	Chrome 51
FDA	Food and Drug Administration
G	Gauge unité de mesure
HAFL	Hotte À Flux Laminaire
HMPAO	HéxaMéthylPropylèneAmine Oxime
IC	Intervalle de Confiance
^{123}I	Iode 123
MBq	MégaBecquerel
MRP	Médicament RadioPharmaceutique
NaCl	Chlorure de sodium
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur
QSP	Quantité Suffisante Pour
SCN	Staphylocoque Coagulase Négative
SNRPH	Syndicat National des Radiopharmaciens
SOFRA	Société Française de Radiopharmacie
^{99m}Tc	Technétium-99 métastable
TRA	Test de Remplissage Aseptique
TS	Trypticase Soja
UFC	Unité Formant Colonie
VG	Volume Globulaire
ZAC	Zone à Atmosphère Contrôlée

GLOSSAIRE

Biocontamination : Contamination d'une matière, d'un appareil, d'un individu, d'une surface, d'un liquide, d'un gaz ou de l'air par des particules viables.

Étape critique ou « worst case » : « Condition ou ensemble de conditions englobant les circonstances et les limites opérationnelles supérieures et inférieures, dans les limites des procédures opératoires, comportant le plus grand risque de défaillance du produit ou du procédé comparé aux conditions idéales. Ces conditions n'entraînent pas nécessairement la défaillance du produit ou du procédé. » (Bonnes Pratiques de Fabrication, 2014)

Générateur : « Tout système contenant un radioélément parent déterminé servant à la production d'un radioélément de filiation, obtenu par élution ou par toute autre méthode et utilisé dans un médicament radiopharmaceutique. » (Pharmacopée Européenne, 8ème édition, 2015, préparations radiopharmaceutiques)

Isotope : Nucléides présentant le même numéro atomique mais des nombres de masse différents.

Lot : « Quantité définie d'une matière première, d'un article de conditionnement, d'un produit fabriqué ou stérilisé en une série d'opérations telle qu'elle puisse être considérée comme homogène. » (Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière, 2001)

Marquage cellulaire radioisotopique : Opérations consistant après prélèvement sanguin du patient et isolement des éléments figurés (hématies, plaquettes, leucocytes/polynucléaires) à un radiomarquage par un radionucléide. Les cellules radiomarquées sont réadministrées au patient. L'activité de marquage cellulaire est incluse dans l'autorisation relative à la médecine nucléaire. (Autorité de Sûreté Nucléaire)

Matière première à usage pharmaceutique : « Tout composant utilisé dans la réalisation d'une préparation (substances actives, excipients, éléments de mise en forme pharmaceutique) destinés à être utilisés chez l'homme ou à leur être administrés. » (Bonnes Pratiques de Préparation, 2007)

Médicament Radiopharmaceutique (MRP) : « Tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs radioéléments (isotopes radioactifs), incorporés à des fins médicales. » (Pharmacopée Européenne, 8ème édition, 2015, préparations radiopharmaceutiques)

Précurseur : « Tout radioélément produit pour le marquage d'une autre substance avant administration. » (Pharmacopée Européenne, 8ème édition, 2015, préparations radiopharmaceutiques)

Procédé : Un procédé désigne une méthode utilisée en vue d'obtenir un résultat déterminé.

Radioélément, radionucléide : Synonymes d'élément radioactif, élément dont le noyau instable se désintègre.

Radiopharmacie : « Domaine de la pharmacie relatif aux médicaments radiopharmaceutiques, générateurs, trousses, précurseurs tels que définis à l'article L.5121-1 du CSP et, par extension, locaux de la pharmacie à usage intérieur, implantés dans un service de médecine nucléaire, affectés à la préparation et au contrôle de ces produits, ainsi qu'à leur livraison et leur stockage. » (Bonnes Pratiques de Préparation, 2007)

Radiopharmacien : « Pharmacien assurant au sein d'une pharmacie à usage intérieur l'approvisionnement, la détention, la gestion, la préparation et le contrôle des

médicaments radiopharmaceutiques, générateurs, trousses et précurseurs, ainsi que leur dispensation et répondant aux conditions de qualification et de formation prévues par l'arrêté du 1er décembre 2003 relatif aux qualifications et à la formation des pharmaciens utilisant des médicaments radiopharmaceutiques dans les établissements de santé et les syndicats interhospitaliers. » (Bonnes Pratiques de Préparation, 2007)

Stérilité : « Absence de tout micro-organisme viable. » (Bonnes Pratiques de Préparation, 2007)

Trousse : « Toute préparation qui doit être reconstituée et/ou combinée avec des radioéléments dans le produit radiopharmaceutique final, généralement avant son administration. » (Pharmacopée Européenne, 8ème édition, 2015, préparations radiopharmaceutiques)

Unité Formant Colonie (UFC) : Micro-organismes viables et cultivables, isolés et agglomérés que l'on dénombre comme une seule unité sur milieu gélosé.

Validation : « Confirmation par examen et apport de preuves tangibles que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. » (Norme ISO 9000 : 2005).

Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) : « Une zone à atmosphère contrôlée est constituée de locaux et/ou d'équipements dont les qualités microbiologiques et particulaires de l'air sont maîtrisées. » (Bonnes Pratiques de Préparation, 2007)

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : **Formulaire de réalisation des TRA – Marquage cellulaire** 61

Annexe 2 : **Formulaire de résultats** 66

LISTE DES FIGURES

Figure 1 **: Principe du radiomarquage** 15

Figure 2 **: Procédés de choix pour la préparation de médicaments stériles** 22

Figure 3 **: Schéma simplifié du volume globulaire au ^{51}Cr** 26

Figure 4 **: Composition du Klerkit®** 27

Figure 5 **: Opératrice réalisant un radiomarquage** 28

Figure 6 **: Prétraitement du prélèvement sanguin : comparaison entre les étapes du VG au ^{51}Cr et celles du TRA** 30

Figure 7 **: Marquage des globules rouges au ^{51}Cr : comparaison entre les étapes du VG et celles du TRA** 31

Figure 8 **: Lavage des globules rouges marquées au ^{51}Cr : comparaison entre les étapes du VG et celles du TRA** 32

Figure 9 **: Exemple d'un TRA négatif et d'un TRA positif** 34

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I **: Indications des différents radiomarquages cellulaires réalisés en radiopharmacie** 19

Tableau II **: Composition du milieu de culture type « Trypticase Soja » utilisé** 24

Tableau III **: Choix du marquage cellulaire pour la réalisation du TRA** 25

Tableau IV **: Recommandations pour la surveillance microbiologique des Zones à Atmosphère Contrôlée** 35

Tableau V **: Résultats des trois séries de TRA effectuées** 37

Tableau VI **: Modalités de réalisation des TRA issus de la littérature** 47

Tableau VII **: Milieux de culture utilisés pour les essais de stérilité** 52

Tableau VIII **: Avantages et inconvénients des TRA vs Essais de stérilité en radiopharmacie** 54

CONTEXTE

La radiopharmacie est une activité rattachée à la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI), soumise à autorisation préfectorale, dont le rôle est la préparation et la mise en forme des médicaments radiopharmaceutiques. Au CHU de Grenoble, ces locaux sont implantés dans le service de médecine nucléaire. Cette spécialité médicale, fondée sur l'utilisation des rayonnements ionisants, est destinée à fournir des renseignements sur la morphologie et le fonctionnement d'un organe ou d'un tissu exploré, dans 90% des cas à des fins diagnostiques et dans 10% des cas à des fins thérapeutiques (exemple de l'irathérapie à l'iode ^{131}I dans les cancers de la thyroïde).

Les produits radiopharmaceutiques comprennent les médicaments radiopharmaceutiques (MRP), les trousses, les générateurs et les précurseurs. Les spécialités pharmaceutiques prêtes à l'emploi représentent 20 à 30% des MRP, ce qui explique que la majorité de l'activité radiopharmaceutique consiste à réaliser des préparations pharmaceutiques *in situ*. Une préparation est effectuée à partir d'une trousse (ou vecteur) qui sera marquée par un radionucléide (figure 1). Le radionucléide peut être soit prêt à l'emploi et dénommé précurseur, soit élué d'un générateur (cas du technétium 99m).

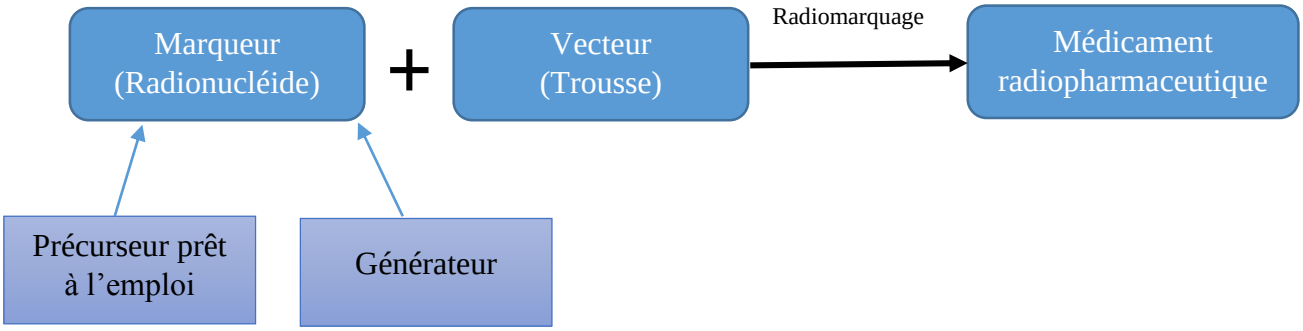

Figure 1 : Principe du radiomarquage

Le médicament radiopharmaceutique (MRP) se définit comme « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales » (1). Ils sont généralement stériles (2) et de ce fait doivent satisfaire à la fois aux exigences des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) et à la réglementation des radionucléides artificiels utilisés à des fins médicales (3).

Les MRP sont le plus souvent injectables et multidoses. Il appartient donc au radiopharmacien, garant de la qualité pharmaceutique des MRP, de s'assurer que les mesures de radioprotection sont compatibles avec un respect strict des règles d'asepsie, permettant de garantir la stérilité du médicament à injecter aux patients (4). La radioprotection est définie par l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) comme « l'ensemble des règles, des procédures et des moyens de prévention et de surveillance visant à empêcher ou réduire les effets nocifs des rayonnements ionisants produits sur les personnes directement ou indirectement, y compris lors des atteintes portées à l'environnement » (5). Afin d'éviter ou de réduire ces risques, la radioprotection s'appuie sur trois grands principes : la justification, l'optimisation et la limitation des doses de rayonnement (5).

Selon les BPP, « les préparations radiopharmaceutiques stériles n'étant pas stérilisées dans leur récipient final, toutes les opérations sont conduites de façon aseptique ». L'objectif de la préparation aseptique est de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants stériles (matières premières et articles de conditionnement) en utilisant des matériels de préparation stérilisés selon les méthodes décrites à la pharmacopée. Le moyen d'atteindre cet objectif est d'opérer dans des conditions et au sein d'installations conçues pour empêcher la contamination microbienne, c'est-à-dire

dans une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) au minimum de classe D. Ces ZAC, classées selon leur niveau de propreté, sont constituées de locaux et d'équipements dont les qualités microbiologique et particulaire sont maîtrisées (6).

Le personnel doit également recevoir une formation appropriée et évaluée afin de réaliser ce type de préparation.

Afin de s'assurer que les procédés de préparation aseptique mis en œuvre permettent d'obtenir effectivement des préparations stériles, la réglementation (6–8) exige de les valider initialement par un Test de Remplissage Aseptique (TRA), ou *media fill test.* Le TRA simule la fabrication en remplaçant les matières premières par un milieu de culture (6). La validation initiale du procédé de préparation par le *media fill test* fait partie intégrante de la qualification de performance, définie selon les BPP comme « la vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été agencés, sont en mesure de fonctionner de manière efficace et reproductible, sur la base de la méthode opérationnelle approuvée et de la spécification du produit ».

Au sein de la radiopharmacie du CHU de Grenoble, cinq procédés de préparation ont été identifiés (9) :

- Procédé 1 : Remplissage de dose patient à partir d'un flacon multidose grâce à un automate de remplissage.

- Procédé 2 : Remplissage manuel de dose patient à partir d'un flacon multidose, enceinte Medisystem 404.

- Procédé 3 : Remplissage manuel de dose patient à partir d'un flacon multidose, enceinte Medisystem 402.

- Procédé 4 : Réalisation d’une préparation radiopharmaceutique et remplissage de dose patient à partir de cette préparation.

- Procédé 5 : Réalisation d’un radiomarquage cellulaire.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons tout particulièrement à la validation du procédé de radiomarquage cellulaire, dernier procédé restant à valider. Il s’agit d’un procédé en système ouvert, dont les étapes sont conduites dans des hottes à flux d’air laminaire (HAFL) vertical de classe A, placées dans un environnement contrôlé au minimum de classe C.

I. INTRODUCTION

En radiopharmacie, le personnel peut être amené à réaliser un marquage isotopique des cellules sanguines *in vitro*. Le principe du radiomarquage cellulaire consiste à prélever le sang d'un patient, à isoler une lignée cellulaire, puis à « l'étiqueter » *in vitro* à l'aide d'un isotope radioactif avant de la réinjecter au patient : la cellule devient alors un traceur.

Le radiomarquage cellulaire s'effectue sur différents éléments figurés du sang : les érythrocytes, les leucocytes totaux dont les polynucléaires et les thrombocytes. Il est réalisé dans un but diagnostique (Tableau I).

Lignées cellulaires	**Trousses et / ou Isotopes radioactifs**	**Indications**
Polynucléaires Neutrophiles	^{99m}Tc HMPAO	Diagnostic d'infections ostéoarticulaires ou endovasculaires
Thrombocytes	^{111}In	Thrombopénie
Érythrocytes	^{51} Cr	Étude de la durée de vie des érythrocytes dans les diagnostics d'anémie
	^{51} Cr	Diagnostic de polyglobulie
	^{99m}Tc	Recherche de saignement digestif
	^{99m}Tc	Diagnostic de rate ectopique
	^{99m}Tc	Ventriculographie

Tableau I : Indications des différents radiomarquages cellulaires réalisés en radiopharmacie

La réglementation ne permet pas d'établir, de manière précise, le statut juridique des éléments figurés du sang radiomarqués. La réflexion sur le statut des cellules du sang

radiomarquées se poursuit depuis plusieurs années et a suscité de nombreux débats. Tout d'abord, le 5 décembre 2001, le syndicat national des radiopharmaciens (SNRPH) et l'ordre des pharmaciens ont sollicité l'avis du directeur de l'évaluation des médicaments et des produits biologiques de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) concernant le statut attribué aux préparations de cellules marquées par des radionucléides. La réponse du directeur général de l'AFSSAPS datant du 14 février 2003 mentionne ne pas reconnaitre le statut de médicament aux cellules radiomarquées. En effet, la seule catégorie possible de médicaments issus du sang sont les médicaments dérivés du sang, et selon l'agence « il n'apparait pas envisageable de placer l'activité de marquage cellulaire dans le monopole de la PUI » (10).

Les cellules du sang radiomarquées ne sont donc pas considérées comme des médicaments et à cela s'ajoute le fait que l'activité de radiomarquage cellulaire n'est pas mentionnée dans les BPP parues en 2007.

Le 26 février 2007, la loi n°2007-248 a modifié la définition du médicament (Code de la Santé Publique, Article L5111-1) par ajout du paragraphe « lorsque, eu égard à l'ensemble de ses caractéristiques, un produit est susceptible de répondre à la fois à la définition du médicament prévue au premier alinéa et à celle d'autres catégories de produits régies par le droit communautaire ou national, il est, en cas de doute, considéré comme un médicament » (11). Malgré ces arguments allant en faveur d'un statut de médicament, l'AFSSAPS reste sur sa première position.

Les éléments figurés du sang radiomarqués pourraient alors se rapprocher de la définition de la thérapie cellulaire somatique qui appartient à la classe des médicaments de thérapie innovante. La thérapie cellulaire somatique consiste à manipuler substantiellement des cellules de façon à modifier leurs caractéristiques structurelles, pour permettre de

diagnostiquer une maladie. La parution du Règlement européen 1394/2007/CE en novembre 2007 pourrait apporter une solution intéressante car il permet la création d'un statut pour les préparations hospitalières de « médicaments de thérapie innovante préparés de façon ponctuelle » avec la création d'une catégorie « médicaments de thérapie cellulaire somatique ». La définition de cette catégorie permettrait de qualifier au mieux le statut des cellules du sang radiomarquées.

Cependant, à ce jour, la clarification du statut des cellules du sang radiomarquées pour usage diagnostique est toujours attendue de la part des autorités de tutelle et il apparait évident que la parution d'un texte réglementaire à ce propos soit nécessaire pour harmoniser les pratiques.

Selon la position de l'AFSSAPS datant de 2003, les cellules du sang radiomarquées ne sont pas considérées comme des médicaments, et sont donc, de ce fait, placées sous la responsabilité du médecin nucléaire. Cependant, en l'absence de statut juridique clair, la responsabilité technique du radiomarquage *in vitro* des éléments figurés du sang est, le plus souvent, déléguée au radiopharmacien, qui applique les mêmes exigences en termes d'asepsie et de radioprotection que pour les MRP (12).

De plus, les cellules radiomarquées et réinjectées au patient doivent être stériles. Les BPP décrivent trois procédés de préparation de médicaments stériles (6), résumés dans la figure 2 ci-dessous :

- La **stérilisation terminale** par la chaleur humide est la méthode de choix, mais celle-ci n'est pas envisageable dans le cas des préparations magistrales hospitalières.

- La **filtration stérilisante**, avant remplissage dans le conditionnement final. Cette méthode s'effectue grâce à un filtre stérile à pores, de diamètre inférieur ou égal à 0,22µm et nécessite une maîtrise de la contamination microbienne.
- La **préparation aseptique** repose sur l'utilisation de matériel stérile dans une ZAC afin de conserver la stérilité de la préparation. Il existe deux types de procédés de préparation aseptique : la **préparation aseptique en système clos** et la **préparation aseptique en système ouvert.**

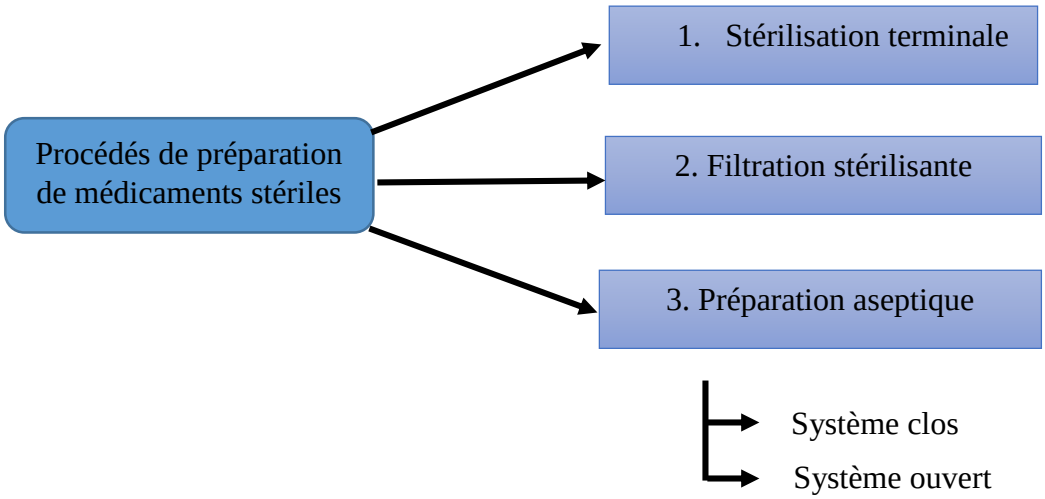

Figure 2 : Procédés de choix pour la préparation de médicaments stériles

En radiopharmacie, l'instabilité du complexe vecteur-précurseur ainsi que sa nature radioactive rend impossible la méthode de stérilisation terminale. La filtration stérilisante n'est également pas envisageable puisque les éléments figurés du sang mesurent plus de 0,22 µm de diamètre. Le procédé de choix est donc la préparation aseptique.

Le procédé de radiomarquage cellulaire au CHU de Grenoble se définit comme un processus aseptique en milieu ouvert : cela signifie qu'au moins une des étapes n'est pas réalisée en système clos (BPP), c'est-à-dire que le prélèvement et le transfert d'un produit stérile vers un autre contenant stérile est réalisé de telle manière que le produit puisse être

en contact avec l'environnement. De ce fait, le risque de contamination microbiologique est considéré comme élevé (6,8,13) et le respect des règles d'hygiène au cours d'un processus de radiomarquage *in vitro* des cellules du sang est donc primordial. Compte tenu du fait que les cellules sont réinjectées au patient, de la complexité technique des marquages cellulaires, des équipements nécessaires et du niveau de sécurité exigé, il est indispensable de disposer d'un local spécifiquement dédié à cette activité et de valider le procédé de radiomarquage. Les radiomarquages comportant des étapes en ouvert doivent être réalisés sous HAFL en classe A, dans un environnement en surpression au minimum de classe C (10).

Le TRA permet la validation d'un procédé aseptique, à condition que le test soit représentatif du procédé habituel, et en comprenne toutes les étapes, même les plus critiques (14,15). En effet, il doit mimer le procédé aseptique en remplaçant chaque produit par un milieu de culture afin de vérifier visuellement l'absence de contamination microbienne. Il permet ainsi de mettre en lumière les erreurs de protocole ou de manipulation, pouvant entraîner une rupture de l'asepsie et un risque de libérer des préparations non stériles (15).

Le but de ce travail consiste à valider le procédé aseptique de radiomarquage cellulaire par un TRA afin de déterminer si les conditions aseptiques ont été maintenues pendant toutes les étapes du marquage cellulaire, et de démontrer ainsi que le procédé mis en œuvre garantit *a priori* la stérilité du produit fini.

II. MÉTHODOLOGIE

Selon les BPP, « la validation des procédés de préparation aseptique comprend une simulation du procédé à l'aide d'un milieu de culture […] se rapproche le plus possible des procédés de préparation aseptique et en comprend toutes les étapes ». Ainsi, le TRA se déroule dans des conditions opératoires se rapprochant le plus possible de celles rencontrées lors du procédé de préparation habituel, selon un même mode opératoire et en utilisant le même type de matériel (16). Ce test consiste donc à remplacer les matières premières par un bouillon de culture stérile de type « Trypticase Soja », dont la composition est reportée dans le tableau II ci-dessous (17).

Trypticase peptone	17 g
Phytone peptone	3 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2.5 g
Glucose	2.5 g
Eau distillée	1 L

Tableau II : Composition du milieu de culture type « Trypticase Soja » utilisé

Ensuite, il s'agit de mimer les différentes étapes du procédé à l'aide du milieu de culture et de vérifier l'absence de contamination microbiologique après 14 jours d'incubation.

De plus, le TRA doit être au moins égal à la taille d'un lot de production (16). Trois lots consécutifs conformes sont nécessaires pour valider le procédé aseptique.

La première étape a consisté à définir le mode opératoire afin que le TRA soit le plus représentatif possible. En effet, le procédé de radiomarquage cellulaire comprend différentes procédures : le marquage des polynucléaires au ^{99m}Tc, le volume globulaire

et le test de Weber isotopique. Ces trois techniques sont considérées comme à risque élevé de contamination microbiologique car au moins une des étapes de la préparation est réalisée en système ouvert (6,8,13). Elles présentent également de fortes similitudes entre elles, avec des étapes identiques. Notre choix de mode opératoire s'est donc basé sur le nombre d'étapes en ouvert puis sur le nombre total d'étapes de chaque technique. Ainsi, le mode opératoire choisi inclut les étapes des deux autres techniques et permet de valider l'ensemble des radiomarquages cellulaires.

Types de marquage cellulaire	**Nombre d'étapes en ouvert**	**Nombre total d'étapes**
Marquage des polynucléaires au ^{99m}Tc	9	10
Test de Weber isotopique	9	11
Volume globulaire	11	13

Tableau III : Choix du marquage cellulaire pour la réalisation du TRA

D'après le tableau III, il apparait que le volume globulaire est le procédé de radiomarquage cellulaire comportant le plus grand nombre d'étapes en système ouvert, et donc le plus grand nombre d'étapes à risque. Nous avons donc choisi les modalités de réalisation d'un volume globulaire au ^{51}Cr pour le déploiement du TRA.

La réalisation d'un volume globulaire (VG) consiste à déterminer le volume occupé dans l'organisme par les hématies. Cet examen va permettre de diagnostiquer une polyglobulie vraie, définie par l'augmentation de la masse totale de l'organisme en globules rouges. Globalement, le sang du patient est prélevé, les hématies sont marquées au ^{51}Cr avant d'être réinjectées au patient (Figure 3).

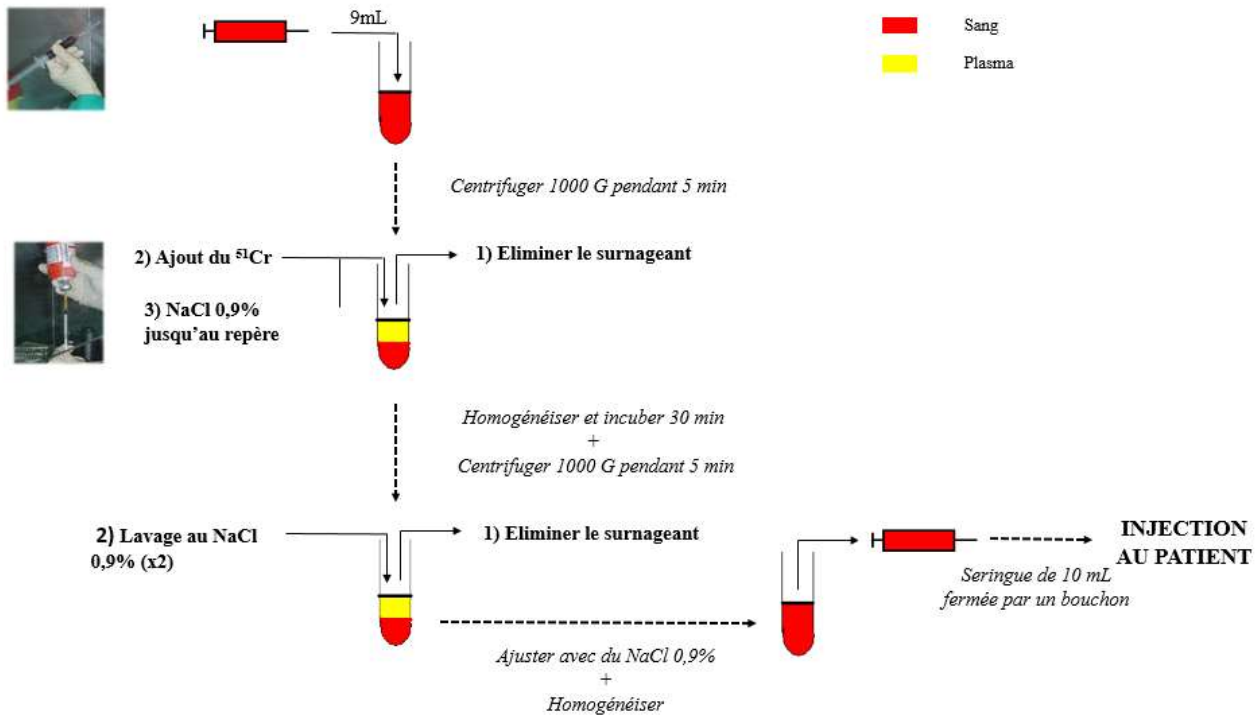

Figure 3 : Schéma simplifié du volume globulaire au ^{51}Cr

Les TRA doivent être réalisés dans les conditions jugées les plus défavorables, c'est-à-dire dans des conditions comportant le plus grand risque de défaillance du procédé comparé aux conditions idéales (7). En effet, le test doit intégrer des conditions limites défavorables ou « worst cases » afin de prendre en compte les étapes critiques et ainsi refléter une situation extrême pouvant se révéler plus intéressante en terme d'analyse de risque (16). Afin de se placer dans les pires conditions d'un point de vue septique, nous avons défini les conditions défavorables de la façon suivante :

- Insister sur le temps d'ouverture du tube Falcon et de l'ampoule contenant le milieu de culture. En effet, un temps de contact prolongé avec l'air augmente le risque de contamination du Trypticase Soja.
- Utiliser seulement 1 ampoule stérile de Trypticase Soja (TS) au lieu de 3.

- Ajouter une étape de lavage (soit 3 étapes de lavage au total)
- Utiliser la même aiguille pour la réalisation des 3 étapes de lavage.
- Réaliser 2 VG consécutifs (temps de travail long, la fatigue du manipulateur favorisant les erreurs de manipulations)

Les matières premières telles que le sang du patient, le ^{51}Cr et les ampoules de chlorure de sodium 0,9% sont remplacées par un bouillon de culture stérile à base d'hydrolysat de caséine et de soja, appelé Trypticase Soja. La stérilité ainsi que la fertilité du milieu de culture a été préalablement certifiée par le fabricant. Nous avons choisi le kit universel Klerkit ®, commercialisé par la société Shield Medicare (Caerphilly, Angleterre) pour la réalisation du TRA au sein de l'unité de radiopharmacie. Le Klerkit ® a été choisi pour des raisons pratiques : en effet, le procédé aseptique du volume globulaire prévoit d'utiliser des ampoules, et ce kit est le seul à proposer du bouillon de culture sous forme d'ampoules. Il s'avère être bien adapté pour la réalisation de ce TRA puisqu'il contient une poche stérile de TS de 100 mL, un flacon stérile de TS de 50 mL, une ampoule stérile de TS de 10 mL ainsi que trois flacons stériles en verre de 20 mL, comme représenté dans la figure 4 ci-dessous.

Figure 4 : Composition du Klerkit®

Le reste du matériel (aiguille, tube Falcon, seringue, …) est le matériel utilisé habituellement.

La réalisation des TRA s'effectue par binôme. Une préparatrice en pharmacie hospitalière aura le rôle de manipulateur et sera assistée par une deuxième personne chargée de superviser le déroulement du test et de vérifier l'absence de déviation par rapport au protocole habituel. En effet, ce type de déviation peut mener à des faux positifs. Le superviseur se munit d'un formulaire de réalisation du TRA (Annexe 1) dans lequel il retrouve la liste du matériel nécessaire, l'ordre et la description des différentes étapes. Nous avons demandé à l'opérateur en charge du TRA de manipuler conformément à ses pratiques habituelles afin de se rapprocher au maximum de la réalité. De plus, afin d'éliminer tous biais liés au manipulateur, les trois séries de TRA seront réalisées par le même binôme, formé à ce procédé de préparation (Figure 5).

La réalisation du TRA se déroule dans le laboratoire de radiomarquage cellulaire du service situé dans une ZAC de classe C, au niveau du PSM de type II Herasafe KS 12, de classe A.

Figure 5 : Opératrice réalisant un radiomarquage

Les trois figures ci-dessous décrivent les différentes étapes d'un volume globulaire au ^{51}Cr, qui sont respectivement le prétraitement du prélèvement sanguin (Figure 6), le marquage des globules rouges au ^{51}Cr (Figure 7) et enfin le lavage des globules rouges marquées au ^{51}Cr (Figure 8). Chaque étape du volume globulaire correspond à une étape du TRA associée. Nous avons réalisé deux volumes globulaires consécutifs, trois fois à une semaine d'intervalle.

Figure 6 : Prétraitement du prélèvement sanguin : comparaison entre les étapes du VG au ^{51}Cr et celles du TRA

Légende :

- Étapes du VG au ^{51}Cr
- Étapes du TRA
- Étapes critiques ou « worst cases »
- Matériel et/ou information nécessaire à la réalisation du VG
- Matériel et/ou information nécessaire à la réalisation du TRA

Figure 7 : Marquage des globules rouges au ^{51}Cr : comparaison entre les étapes du VG et celles du TRA

Légende :

- Étapes du VG au ^{51}Cr
- Étapes du TRA
- Étapes critiques ou « worst cases »
- Matériel et/ou information nécessaire à la réalisation du VG
- Matériel et/ou information nécessaire à la réalisation du TRA

Étapes du volume globulaire		Étapes du test de remplissage aseptique	
Centrifuger le tube Falcon à 1000 G pendant 5min	• Vérifier la présence d'activité du tube avant chaque centrifugation	Placer le tube Falcon dans la centrifugeuse pendant 5 min	• Placer le flacon de 50 ml dans l'activimètre
Désinfecter le tube Falcon	• Essuyer avec une lingette de détergent/désinfectant	Désinfecter le tube Falcon	• Essuyer avec une lingette de détergent/désinfectant
Introduire le tube sous le PSM	• Mettre des gants stériles	Introduire le flacon sous le PSM	• Mettre des gants stériles
Enlever le surnageant et l'éliminer	• Seringue de 10 mL + cathéter 45mm • Ne pas prendre de globules rouges	Enlever 2 mL de milieu de culture	• Seringue de 10 mL + cathéter 45mm • Enlever les 2 mL en 3 fois
*Ajuster au repère par du chlorure de sodium 0,9%		*Ajouter 2 mL de l'ampoule de 10 mL	
Mélanger 20 secondes au vortex		Mimer l'agitation au vortex pendant 20 secondes	
Centrifuger le tube Falcon à 1000 G pendant 5min		Placer le tube dans la centrifugeuse pendant 5 min	
** Enlever le surnageant et l'éliminer	• Seringue 10 mL + cathéter 45 mm	**Enlever 2 mL de milieu de culture	• Seringue 10 mL + cathéter 45 mm • Enlever les 2 mL en 3 fois
Effectuer un 2ème lavage à partir de l'étape * jusqu'à l'étape **		Recommencer 2 FOIS à partir de l'étape* jusqu'à l'étape**	
Compléter jusqu'au repère avec du chlorure de sodium 0,9%	• Homogénéiser ensuite au vortex	Ajouter 2 mL de l'ampoule de 10 mL	• Mimer ensuite l'agitation au vortex pendant 20 secondes
Prélever 0,5 mL de sang marqué	• Seringue 1 mL + cathéter 45 mm • Adapter un bouchon stérile sur la seringue	Prélever 0,5 mL de TS dans le tube Falcon	• Seringue 1 mL + cathéter 45 mm • Adapter un bouchon stérile sur la seringue
Prélever le reste des hématies marquées au ^{51}Cr	• Seringue 10 mL + cathéter 45 mm • Adapter un bouchon stérile sur la seringue	Prélever le reste de TS présent dans le tube	• Seringue 10 mL + cathéter 45 mm • Adapter un bouchon stérile sur la seringue

Figure 8 : Lavage des globules rouges marquées au ^{51}Cr : comparaison entre les étapes du VG et celles du TRA

Légende :

- Étapes du VG au ^{51}Cr
- Étapes du TRA
- Étapes critiques ou « worst cases »
- Matériel et/ou information nécessaire à la réalisation du VG
- Matériel et/ou information nécessaire à la réalisation du TRA

Par ailleurs, la pratique du TRA est associée à la surveillance de l'environnement (18). Afin de contrôler la qualité microbiologique de l'environnement au sein du laboratoire de radiomarquage cellulaire, chaque TRA s'accompagne de prélèvements de surface effectués grâce à des géloses Tryptone Soja Agar de type contact, fournies par le laboratoire de bactériologie du CHU de Grenoble. Cinq types de prélèvements ont été effectués pour chaque série de TRA : le premier prélèvement s'effectue sur une paillasse du laboratoire située en dehors du PSM. Le second est réalisé sur le plan de travail à l'intérieur de l'enceinte, avant de commencer les manipulations. Lorsque toutes les étapes du test sont terminées, un autre prélèvement est réalisé sur le plan de travail. Pour finir, le manipulateur effectue un prélèvement sur ses gants, au niveau des doigts de la main droite et de la main gauche.

Une fois le TRA terminé, les échantillons contenant le milieu de culture ainsi que les 5 géloses sont transférés au laboratoire de bactériologie. Les échantillons seront incubés 14 jours selon un protocole validé avec le service de bactériologie du CHU de Grenoble, 7 jours à 22°C puis 7 jours à 30°C tandis que les géloses seront incubées 3 jours à 30°C. Le but est de vérifier la stérilité du milieu de culture. Les échantillons à analyser sont les suivants : le flacon de 50 mL de Trypticase Soja, la poche de 100 mL de Trypticase Soja, le tube à hémolyse, la seringue « étalon » et enfin la seringue « patient ». Il est important d'étiqueter chaque élément à incuber pour permettre leur identification. La validation d'une série de TRA repose uniquement sur la conformité de la « seringue patient », les autres échantillons et géloses seront incubés pour investiguer en cas de contamination microbiologique et ainsi comprendre l'origine de la contamination.

Au sein du laboratoire de bactériologie, un technicien effectue un contrôle visuel quotidien pendant les 14 jours d'incubation sur chaque échantillon contenant le milieu de

culture. Pour cela, il a à sa disposition un formulaire de résultats (Annexe 2) permettant de réaliser la traçabilité des résultats du TRA. L'objectif est de repérer la présence d'une turbidité dans le milieu de culture, qui met en évidence une croissance microbiologique. La présence d'une turbidité signifie que le test est non-conforme (Figure 9) : dans ce cas, la contamination doit être confirmée par une identification microbiologique. Toutes les seringues « patient » doivent être admises pour que le procédé de radiomarquage cellulaire soit validé.

TRA négatif à gauche (milieu limpide) et TRA positif à droite (milieu trouble)

Figure 9 : Exemple d'un TRA négatif et d'un TRA positif

Afin de définir les critères d'acceptation au niveau environnemental, nous nous sommes basés sur les limites de contamination microbiologique recommandées par les BPP (6), présentées dans le tableau IV ci-dessous.

Limites recommandées de contamination microbiologique				
Classe	**Echantillon d'air UFC/m^3**	**Boîtes de Pétri (diamètre de 90 mm) UFC/4heures**	**Géloses de contact (diamètre 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	-

UFC : Unité Formant Colonie

Tableau IV : Recommandations pour la surveillance microbiologique des Zones à Atmosphère Contrôlée

III. RÉSULTATS

Après 14 jours d'incubation, aucune des seringues « patient » n'a présenté de turbidité. De la même manière, aucune seringue « étalon », poche de Trypticase Soja et aucun flacon de Trypticase Soja n'ont été contaminés. Cependant, 4 tubes à hémolyse sur 6 ont été contaminés par un *Staphylococcus* coagulase négative.

Quatre géloses sur 30 ont révélé une contamination microbienne anormale à la fin des 3 jours d'incubation. Toutes les géloses contaminées concernent les géloses « main gauche ». La bactérie en question était un *Staphylococcus* coagulase négative.

Le tableau V ci-après reprend les résultats des trois séries de TRA.

Échantillons	Série du 21/01/2014		Série du 28/01/2014		Série du 04/02/2014	
	1	2	1	2	1	2
Seringue patient	0	0	0	0	0	0
Flacon 50 mL	0	0	0	0	0	0
Poche 100 mL	0	0	0	0	0	0
Tube à hémolyse	0	0	+	+	+	+
Seringue étalon	0	0	0	0	0	0
Gélose laboratoire	0	0	0	0	0	4 UFC
Gélose paillasse 1	0	0	0	0	0	0
Gélose paillasse 2	0	0	0	0	0	0
Gélose main droite	0	0	0	0	0	0
Gélose main gauche	0	2 UFC	2 UFC	0	3 UFC	2 UFC

UFC = Unité Formant Colonie
0 : milieu de culture limpide ; + : milieu de culture trouble

Tableau V : Résultats des trois séries de TRA effectuées

Sur l'ensemble des échantillons contenant du milieu de culture stérile, seul les tubes à hémolyse issus des quatre dernières séries de TRA ont présenté une turbidité. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les tubes à hémolyse ainsi que leurs bouchons ne sont pas stériles. Bien que l'extérieur des tubes à hémolyse soit désinfecté avec une solution de détergent-désinfectant avant leur introduction sous le PSM, l'intérieur du tube destiné à être en contact avec le milieu de culture ne l'est pas. Cette situation peut exposer à un risque de contamination microbiologique. De même, un défaut de désinfection des dispositifs médicaux avant leur introduction sous le PSM peut également participer à la contamination du milieu de culture à l'intérieur des tubes à hémolyse.

De plus, quatre géloses « main gauche » sur six ne sont pas conformes puisque les prélèvements de doigts présentent des résultats supérieurs à 1 UFC (Tableau IV). Ces résultats sont étonnants étant donné que la préparatrice change de paires de gants stériles fréquemment au cours du protocole.

Les espèces rencontrées sur les géloses contact et les tubes à hémolyse sont des *Staphylococcus* coagulase négative (SCN) : ce type de staphylocoque est naturellement présent dans la flore cutanéo-muqueuse de l'Homme, mais également dans l'environnement (sol, poussière..) de par leur capacité d'adhésion aux matériels étrangers.

Les SCN sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales. Parmi les espèces de *Staphylococcus* coagulase négative rencontrées à l'hôpital, *Staphylococcus epidermidis* est la plus fréquente (26,2%) (19). Bien que cette espèce commune de la flore cutanée est considérée comme généralement inoffensive, *S.epidermidis* s'est avéré être la cause de nombreuses infections nosocomiales ces vingt dernières années (20).

L'origine la plus plausible de cette contamination à SCN serait donc une contamination du milieu de culture via la flore cutanée de l'opérateur, par exemple, avec une faute d'asepsie pendant l'enfilage aseptique des gants. Cependant cela n'a pas été constaté par le superviseur. Par conséquent, il semblerait logique que l'origine de cette contamination soit plutôt environnementale. En effet, l'environnement hospitalier comprend une large variété de microorganismes plus ou moins pathogènes, dont les staphylocoques sont l'une des espèces les plus représentées. Plus particulièrement, il a été démontré que de nombreux services hospitaliers sont colonisés par des SCN. Parmi 148 bactéries isolées dans des prélèvements de surface, 57% était des SCN (21). De plus, la présence de SCN dans nos tubes à hémolyse n'est pas un cas isolé puisque d'autres auteurs ont évoqué la

contamination d'une préparation hospitalière par une souche de SCN : ce microorganisme avait été retrouvé sur le sol, les murs mais aussi sur les tables et dans l'air des locaux de la pharmacie hospitalière (22).

Malgré ces contaminations microbiologiques à SCN, les seringues patient sont restées stériles après 14 jours d'incubation sur les trois séries de TRA réalisées. Le procédé de radiomarquage cellulaire est donc validé.

IV. DISCUSSION

Au sein de la radiopharmacie du CHU de Grenoble, le procédé aseptique de radiomarquage cellulaire est le plus à risque de contamination microbiologique car il comporte des étapes en système ouvert sur des éléments figurés du sang qui seront ensuite réinjectés au patient sans stérilisation terminale. Parmi les différents radiomarquages cellulaires, le volume globulaire représente l'un des processus les plus longs et les plus à risque. En effet, il contient le plus grand nombre d'étapes en ouvert, ce qui signifie que c'est le procédé le plus à risque septique (Tableau III).

Cependant, nous aurions pu choisir le radiomarquage *in vitro* des polynucléaires car il s'agit du radiomarquage le plus pratiqué en médecine nucléaire et que sa réalisation complexe comporte un grand nombre d'étapes. Son objectif est de localiser d'éventuels foyers inflammatoires ou infectieux. La complexité de ce radiomarquage cellulaire réside dans la préparation d'une trousse d'éxametazine ou HMPAO (Ceretec®), marquée au ^{99m}Tc, peu stable, devant être injectée dans les 30 minutes (23). La préparation de la trousse est donc réalisée extemporanément au sein du « labo chaud », dans une enceinte blindée de classe A. Elle est ensuite transférée dans la salle de radiomarquage où elle doit être ajoutée rapidement au culot de polynucléaires après sa réalisation. C'est donc le radiomarquage qui comporte le plus d'étapes du fait de la préparation du ^{99m} Tc- HMPAO, mais inclut seulement dix étapes, dont neuf en ouvert dans la salle de radiomarquage, et trois étapes dans l'enceinte blindée du « labo chaud ». Or, les étapes dans l'enceinte blindée ont déjà été validées par un TRA dans le procédé 4.

Nous n'avons pas retenu la technique de Weber isotopique pour valider le TRA car elle présente moins d'étapes et moins d'étapes en ouvert que le volume globulaire. Contrairement au marquage *in vitro* des polynucléaires, le marquage des érythrocytes

pour la réalisation d'un volume globulaire ou un Weber ne passe pas par l'intermédiaire d'une trousse car le ^{51}Cr existe sous forme d'une solution stérile prête à l'emploi. Le ^{51}Cr est un marqueur de choix pour la lignée érythrocytaire car il a la capacité de se fixer à la chaine β de l'hémoglobine.

Ainsi, le processus de radiomarquage des globules rouges pour le volume globulaire représente donc le procédé le plus long et le plus à risque du fait du grand nombre d'étapes et d'étapes en ouvert. Comme nous avons déjà validé la préparation aseptique d'une trousse dans le procédé 4 et que les différentes étapes de ces trois radiomarquages présentent de fortes similitudes dans la pratique, en choisissant le procédé le plus long et le plus à risque, cela nous permet de valider l'ensemble des marquages cellulaires effectués dans le service de radiopharmacie.

L'utilisation de flacons et d'ampoules de milieu de culture prêts à l'emploi ont permis de mimer parfaitement la préparation aseptique du volume globulaire au ^{51}Cr. De plus, le test a été conduit dans les mêmes conditions que la préparation habituelle. Malgré la contamination de quatre tubes à hémolyse et de quatre géloses « main gauche », les manipulations effectuées ont permis d'assurer une absence de croissance bactérienne dans chaque seringue « patient ».

En effet, même si quatre géloses « main gauche » ont été contaminées, cela n'a pas eu de répercussions sur les résultats étant donné que les seringues « patient » sont restées limpides. Les prélèvements de surface effectués en parallèle à l'aide des géloses de type contact sont conformes à la réglementation (< 25 UFC/gélose pour un environnement de classe C), témoignant d'un environnement maîtrisé de la ZAC. L'objectif étant que les

seringues « patient » ne soient pas contaminées, nous pouvons donc valider nos trois séries de TRA et ainsi valider le procédé de radiomarquage cellulaire.

Ce travail nous a permis d'effectuer la validation du procédé aseptique de radiomarquage cellulaire par la réalisation d'un TRA. Cependant, une validation périodique doit également être conduite au minimum une fois par an (24,25), et en cas de changement majeur dans le procédé, de dérive, de travaux ou de nouvel équipement.

V. CONCLUSION

Bien que le radiomarquage cellulaire ne soit pas sous le monopole pharmaceutique, le médecin nucléaire peut déléguer cette activité au radiopharmacien. Il applique alors les mêmes exigences en termes d'asepsie et de radioprotection que pour la préparation des médicaments radiopharmaceutiques. La stérilisation de la préparation dans son conditionnement final n'étant pas réalisable, le procédé de choix recommandé par les Bonnes Pratiques de Préparation est la préparation aseptique. Afin de s'assurer de la maîtrise de la contamination bactérienne et du maintien de l'asepsie, la validation des procédés de préparation aseptique est essentielle. Ce travail a consisté en la réalisation d'un test de remplissage aseptique (TRA) destiné à valider le procédé de radiomarquage cellulaire, considéré comme à risque élevé de contamination microbiologique du fait des étapes en ouvert. Les TRA, tests mentionnés dans les Bonnes Pratiques de Préparation et de Fabrication, consistent à mimer le procédé de préparation à l'aide d'un bouillon de culture de type Trypticase Soja, en incluant les conditions critiques pouvant être rencontrées dans la routine. Les trois lots de TRA mimant le processus aseptique du volume globulaire au ^{51}Cr ont été satisfaisants et permettent de valider le procédé aseptique de radiomarquage cellulaire.

Pour être concluante, la validation du procédé aseptique s'appuie sur un programme d'assurance qualité global incluant entre autre une surveillance environnementale (air et surface), ou la formation des manipulateurs afin de maîtriser au mieux le risque microbiologique. Elle ne peut se résumer qu'à la conformité des TRA. Les TRA ne sont que le reflet ou le révélateur de la maîtrise d'un ensemble de paramètres.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les TRA ont été initialement développés pour l'industrie pharmaceutique (8,26). Ce test de remplissage, ou essai de simulation, est apparu comme une exigence réglementaire dans les BPF en 2006 puis dans les BPP de 2007 dans le but de valider un procédé aseptique. Cependant, le TRA fait simplement l'objet d'une citation dans ces textes réglementaires mais on ne retrouve aucune description ni modalités de mise en œuvre ou d'analyse du TRA. Le nombre de séries et le nombre d'unités de TRA à réaliser ainsi que le protocole de réalisation et d'analyse sont donc laissés à l'appréciation des professionnels.

De ce fait, les pharmaciens hospitaliers ont dû adapter les TRA au milieu hospitalier afin de passer de lots de plus de 3000 unités de l'industrie pharmaceutique à des lots de moins de 300 unités pour les préparations hospitalières, voire une seule unité pour les préparations magistrales. En radiopharmacie, le nombre d'unités préparées par les préparateurs est très limité par rapport aux quantités produites dans l'industrie pharmaceutique, ce qui peut conduire à une sous-estimation du risque de contamination microbiologique. De plus, le problème de transposition des TRA de l'industrie pharmaceutique à la pratique hospitalière, et plus particulièrement à la radiopharmacie, porte sur la complexité des procédés de préparation aseptique. En effet, l'industrie pharmaceutique présente généralement des procédés automatisés, en système clos ou avec une méthode de stérilisation terminale, alors qu'en milieu hospitalier, les procédés sont essentiellement manuels. Les procédés aseptiques en pharmacie hospitalière sont généralement plus longs, plus complexes et la taille des lots est faible. Ces points soulèvent donc la question de la puissance statistique des TRA en pharmacie hospitalière.

Il est légitime de se demander si la taille du lot de TRA en radiopharmacie est statistiquement significatif et plus particulièrement dans le cadre d'un marquage cellulaire. En effet, selon la norme ISO 13408-1 (26), les niveaux d'acceptation pour les TRA non-conformes sont les suivants : un seuil d'alerte est fixé à 0,05% (IC à 95%) et un seuil d'action à 0,1% des unités produites non conformes (IC à 95%) pour des lots d'au moins 3000 unités. Les niveaux d'acceptation cités ci-dessus ne sont pas applicables en pratique hospitalière du fait de la différence de la taille des lots. Afin d'augmenter la puissance statistique, il faudrait réaliser un plus grand nombre de TRA pour un lot donné, ce qui est difficilement envisageable en radiopharmacie pour des raisons de coût, de temps et surtout de représentativité des procédés aseptiques.

Outre cette remise en cause de la puissance statistique, la deuxième limite du TRA réside dans son manque de sensibilité. En effet, il est lié au choix du milieu de culture et des températures d'incubation. Le bouillon de type Trypticase Soja est un milieu nutritif classique, non universel. Ce milieu ne permet pas la croissance de tous les germes puisqu'il ne constitue pas un milieu approprié pour la culture de microorganismes exigeants ni pour la détection des microorganismes anaérobies stricts (27,28). Ce facteur peut impacter les résultats obtenus, en diminuant le nombre d'échantillons troubles, donc positifs. Le bouillon de type Trypticase Soja permet tout de même le développement d'un large nombre de microorganismes, en particulier les bactéries aérobies et anaérobies facultatives courantes (27). De même, il n'existe aucune condition idéale de température ou de durée d'incubation des TRA, étant donné que le spectre de température d'incubation s'étend entre 20°C et 35°C. Ceci est confirmé par les données issues de la littérature, résumées dans le tableau VI. Or, ces conditions d'incubation ne sont pas propices à la sélection de certaines bactéries. Par exemple, une incubation entre 20 et 35°C ne

permettra pas la détection d'une bactérie thermophile, qui nécessite un environnement plus chaud pour croître. Donc un TRA peut, au final, se révéler conforme car les conditions d'incubation n'ont pas été favorables à la croissance de la bactérie. La Société Américaine de Microbiologie a affirmé que « d'après leur expérience, une température d'incubation de 32°C ± 2°C couvre un spectre plus large de potentiels contaminants et agents pathogènes » (29). La question des conditions d'incubation est largement discutée mais ne fait pas l'unanimité entre les différents professionnels de santé et autorités compétentes. Ainsi, les bactériologistes du CHU nous ont conseillés 7 jours d'incubation à +22°C suivis de 7 jours à +30°C.

En revanche, la spécificité du milieu de culture, c'est-à-dire sa capacité à rester limpide lorsqu'il n'y a aucune contamination microbiologique, semble plutôt bonne. De plus, si le lecteur a un éventuel doute concernant l'analyse des TRA, un ensemencement du milieu de culture sera effectué pour confirmer ou infirmer une contamination microbiologique.

En conclusion, le Trypticase Soja incubé ne met en évidence que ce qu'il est techniquement et microbiologiquement capable de détecter.

	TRA n°1	TRA n°2	TRA n°3
Objectif	Valider la préparation stérile de [^{90}Y] DOTATOC	Valider la technique aseptique des opérateurs	Valider la préparation de séparation et radiomarquage des leucocytes par le ^{99m} Tc- HMPAO
Niveau de risque de contamination microbiologique de la préparation	Risque élevé	Risque élevé selon le type de transfert	Risque élevé
Milieu de culture utilisé	Trypticase Soja	Trypticase Soja	Trypticase Soja
Condition d'incubation	37°C±1°C pendant 14j	32°C pendant 14j	32,5°C pendant 7j puis 22,5°C pendant 7j
Nombre de TRA effectués	3	3 TRA/opérateurs sur 3 j différents	18
Contrôles environnementaux associés	Aucun	Aucun	Non documenté
Particularité	Simulation du contrôle qualité, de la dispensation des doses et de leur transport	Contamination intentionnelle des flacons (bouchon) avec une suspension d'*Enterococcus faecalis*	18 TRA réalisés par 6 opérateurs différents
Résultats	Aucune contamination microbiologique	Taux de contamination = 2,3%	Aucune contamination microbiologique
Références bibliographiques	(30)	(31)	(32)

Tableau VI : Modalités de réalisation des TRA issus de la littérature

De par les différentes limites attribuées au TRA, ce test n'est donc pas suffisant pour valider à lui seul un procédé aseptique dans sa globalité et nécessite d'être intégré dans un système d'assurance qualité. La mise en place d'une démarche d'assurance qualité en

pharmacie hospitalière vise à répondre aux exigences réglementaires et comprend « l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les préparations sont de la qualité requise pour l'usage auquel elles sont destinées. Elle est obtenue par la mise en œuvre d'un ensemble approprié de dispositions préétablies et systématiques, destinées à donner confiance en l'obtention de la qualité requise » (BPP). Dans le cadre de ce système d'assurance qualité, la radiopharmacie du CHU de Grenoble a mis en place une cartographie des risques. Au sein du processus intitulé « Préparation des médicaments radiopharmaceutiques (MRP) ou cellules marquées avec un isotope radioactif », deux risques majeurs relatifs à la rupture de l'asepsie ont été identifiés : le premier risque concerne la non maîtrise microbiologique et particulaire de l'environnement (ZAC, PSM, enceinte) et le second implique le non-respect des consignes d'hygiène. La méthode de l'Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC) a été appliquée et a permis de déterminer les risques liés à la préparation et ainsi d'estimer la criticité (C) de chaque risque identifié, en calculant le produit de la Gravité (G) et de la Fréquence (F). L'indice de criticité du risque « Non maîtrise de l'environnement » a été estimé à 4, correspondant à une criticité du risque faible. Ici, la gravité du risque a été considérée comme critique (score 4) et la fréquence considérée comme rare (score 1) selon la table de cotation AMDEC. Le même score a été attribué au second risque « non-respect des consignes d'hygiène ». Les dispositifs de maîtrise de risque mis en œuvre sont la surveillance de la qualité de l'air et la réalisation de prélèvements de surface selon un rythme validé par le service d'hygiène du CHU de Grenoble, ainsi que le respect des BPP et des procédures d'hygiène du personnel.

Les risques identifiés relatifs à la rupture de l'asepsie, le caractère manuel de la préparation aseptique associé à la complexité de la réalisation d'étapes en ouvert révèlent tout l'intérêt de la mise en place d'un TRA en radiopharmacie.

La notion d'assurance qualité en radiopharmacie est très large et implique une évaluation des risques sur l'intégralité des étapes du circuit du médicament radiopharmaceutique telles que : commande, réception et stockage du matériel et matières premières, prescription, préparation du MRP et contrôle qualité, dispensation, administration et enfin gestion des déchets radioactifs. Le TRA s'intègre dans une démarche de validation des procédés de préparation aseptique, qui elle-même rentre dans le cadre de la démarche globale d'assurance qualité. Les paramètres influençant la qualité microbiologique lors d'un procédé de préparation aseptique sont :

- La maîtrise microbiologique et particulaire de l'air et des surfaces de la ZAC
- La conformité du nettoyage
- La compétence du personnel (formation initiale et continue)
- Protocole de préparation adapté, écrit et validé

La maîtrise de la qualité microbiologique et particulaire de la ZAC, s'appuie sur une conception des locaux conformes aux recommandations, sur des relevés quotidiens de pression et de température ainsi que sur des prélèvements particulaires et microbiologiques au niveau de l'air et des surfaces de la ZAC, des HAFL ou enceintes blindées. Ces contrôles microbiologiques (aérobiocontamination et surfaces) doivent être réguliers, planifiés, tracés et doivent satisfaire aux recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC présentées dans le tableau IV. Des seuils d'alerte et d'action appropriés sont définis pour les résultats de la surveillance particulaire et microbiologique

(6). Si le niveau d'alerte est atteint, il s'agira par exemple de réaliser à nouveau un bionettoyage avant d'effectuer ensuite un nouveau prélèvement (18).

Une méta-analyse à propos du risque de contamination microbiologique des préparations aseptiques dans différents environnements a permis de confirmer que le taux de contamination microbiologique des doses individuelles préparées dans les locaux de la PUI (1,9%) était inférieur comparés aux préparations réalisées au sein des unités cliniques (5%) (33). Pourtant, une enquête réalisée entre le 31 janvier 2011 et le 30 avril 2011 a montré que les radiopharmacies n'étaient pas toujours très propres. Cette enquête a également permis d'établir un état des lieux sur les contrôles environnementaux réalisés dans les locaux et les équipements de radiopharmacie : elle a révélé que les contrôles environnementaux étaient réalisés moins régulièrement que les contrôles physiques (contrôle des pressions et taux de renouvellement de l'air). De plus, de grandes variabilités entre les radiopharmacies ont été détectées au niveau de la fréquence de réalisation des contrôles, des valeurs cibles recommandées et/ou exigées et de l'aménagement des locaux et des équipements. Certains sites assez vétustes ne possèdent pas de sas d'entrée au local de préparation et ont des difficultés à atteindre les valeurs cibles exigées par la réglementation en vigueur (34). De ce fait, un groupe de travail de la Société Française de RAdiopharmacie (SOFRA) a établi des recommandations dans le but de guider les professionnels vers des pratiques homogènes pour la surveillance de l'environnement en radiopharmacie (18).

Les BPP comme les BPF soulèvent l'importance de la formation initiale et continue du personnel en charge des manipulations. En effet, la maîtrise du risque microbiologique repose également sur le respect des principes d'hygiène et d'asepsie de la part des préparateurs lors de l'entrée et de la sortie du local de préparation, se traduisant par le

respect des règles d'habillage, par une bonne hygiène des mains et par la maîtrise de la préparation aseptique (18,35).

L'ensemble de ces contrôles qualité permettent de caractériser, de quantifier et de suivre dans le temps la biocontamination en radiopharmacie avec pour objectif final de garantir la sécurité du patient (35). Le suivi et la conformité de l'ensemble de ces paramètres sont indispensables mais non suffisants au maintien de la stérilité du produit fini.

L'objectif du TRA est de valider *a priori* le procédé de préparation. Il ne peut en aucun cas assurer à lui seul la stérilité du produit fini car ce test ne représente qu'une image à un instant donné. Le TRA ne peut donc remplacer l'essai de stérilité mais peut venir le compléter.

L'essai de stérilité est considéré selon la Pharmacopée Européenne 8^{éd} comme un « contrôle supplémentaire de la qualité de la production en cas de production aseptique » (36). L'essai de stérilité, tout comme le TRA s'inscrit dans une démarche d'assurance qualité et fait partie des contrôles finaux réalisés avant la libération d'un lot. Ce test, qui doit être effectué dans des conditions aseptiques, permet de s'assurer que le produit fini est bien stérile. Il est réalisé soit par la technique de filtration sur membrane soit par ensemencement direct du milieu de culture avec l'échantillon à examiner. Pour des lots inférieurs à cent unités, le nombre minimal d'unités à examiner par milieu est de 10%, avec un minimum de 4 unités. De la même manière que les TRA, l'essai de stérilité est validé si aucune croissance bactérienne n'est observée au bout de 14 jours d'incubation selon les conditions d'incubation détaillées dans le tableau VII ci-après.

	Croissance microbienne	Température d'incubation
Milieu liquide de thioglycolate	Bactéries anaérobies et aérobies	30-35°C
Milieu à l'hydrolysat de caséine et de soja	Levures, moisissures et bactéries aérobies	20-25°C

Tableau VII : Milieux de culture utilisés pour les essais de stérilité

Cependant, pour les préparations radiopharmaceutiques, la réalisation de l'essai de stérilité présente plusieurs contraintes :

- Tout d'abord, la taille réduite des lots ne permet pas de prélever les volumes préconisés par la Pharmacopée Européenne. En effet, il n'est pas concevable d'ensemencer un nombre minimal d'unités car la taille d'un lot d'une préparation magistrale est généralement égale à une unité. De plus, pour des récipients dont le volume est inférieur à 1 mL, la totalité du contenu du récipient doit être utilisé pour l'essai de stérilité. Si le volume est compris entre 1 et 40 mL, la moitié du contenu de chaque récipient doit être utilisée pour chaque milieu (36). Donc la taille réduite des lots ne permet pas un prélèvement pour chaque lot. Cependant, la Pharmacopée Européenne ne détaille pas comment adapter les volumes d'échantillonnage aux préparations magistrales.

- Pour les radioéléments dont la demi-vie ($T_{1/2}$) est courte, par exemple le ^{99m}Tc ($T_{1/2}$ = 6h) ou ^{123}I ($T_{1/2}$ = 13h), l'injection de la préparation au patient sera effectuée avant l'obtention des résultats de l'essai de stérilité, qui nécessitent d'attendre 14 jours d'incubation (30).

- Cet essai comporte des risques d'irradiation puisque l'échantillon ensemencé est radioactif. En radiopharmacie, la technique par ensemencement direct s'avère être la plus appropriée pour des raisons de radioprotection. En effet, la filtration sur membrane est une technique nécessitant plus d'étapes, ce qui augmente le risque d'irradiation du personnel. De plus, la filtration sur membrane n'est pas adaptée aux petits volumes d'échantillons dont nous disposons. Un temps de décroissance radioactive peut être nécessaire avant de réaliser l'essai, au détriment de la détection des microorganismes. Pour les radioéléments de courte demi-vie comme le ^{99m}Tc, ce délai permet de garantir, après décroissance radioactive, l'absence de radioactivité dans les milieux de culture lors de leur lecture par une personne du laboratoire d'Hygiène. Cependant, lorsqu'il s'agit de radioéléments avec des demi-vies plus longues, comme le ^{51}Cr ($T_{1/2}$ = 27,7 jours), une activité résiduelle rend impossible la prise en charge de ces milieux par un personnel extérieur (35).

Il en ressort que l'essai de stérilité en radiopharmacie s'avère plus compliqué à mettre en place de par le caractère radioactif de la préparation. Le TRA permet de s'affranchir de cette contrainte et constitue un test plutôt facile à mettre en œuvre après une étude approfondie du protocole opératoire à simuler (Tableau VIII).

	Avantages	Inconvénients
Test de Remplissage Aseptique	• Valider *a priori* l'asepsie d'un procédé • Pas de risque d'irradiation ou de contamination radioactive du personnel • Peu de moyens matériel • Réflexion sur les pratiques du service • Formation des opérateurs	• Manque de puissance statistique • Manque de sensibilité du milieu • Temps de manipulation long, donc propice aux fautes d'asepsie
Essais de stérilité	• S'assurer de la stérilité du produit fini	• Risque d'irradiation du personnel • Difficulté d'adapter les volumes et le nombre d'unité de prélèvement • Préparation réinjectée avant obtention des résultats de l'essai

Tableau VIII : Avantages et inconvénients des TRA vs Essais de stérilité en radiopharmacie

Le risque infectieux d'origine microbiologique associé à l'injection des MRP préparés en routine est peu documenté dans la littérature. Ceci s'explique en partie par le statut ambulatoire de la majorité des patients de médecine nucléaire qui rend difficile le suivi et la déclaration d'infections différées dans le temps. Néanmoins ce risque infectieux ne doit

pas être négligé du fait de la contamination possible des préparations injectables par des germes présents dans l'environnement hospitalier et/ou par des germes de la peau des opérateurs (35).

Les MRP, utilisés pour la plupart sous forme injectable, doivent obligatoirement répondre aux essais de la monographie des produits stériles. En pratique, la maîtrise du risque microbiologique se révèle compliquée du fait des exigences nécessaires pour assurer le confinement de la radioactivité et la radioprotection de l'environnement et des travailleurs, qui sont parfois difficilement compatibles avec la réalisation de préparations injectables stériles (35). En effet, le principe de radioprotection prime sur le principe de maîtrise du risque microbiologique, ce qui accentue le risque de rupture d'asepsie. Bien que limité de par sa faible puissance statistique et son manque de sensibilité, le TRA a l'avantage de s'affranchir de cette contrainte de radioprotection et permet d'éviter l'irradiation du personnel. Le TRA constitue un outil de validation des procédés de préparation aseptique en simulant au plus près les conditions de routine. Le caractère manuel des préparations aseptiques ainsi que leur complexité liée à la présence d'étapes en ouvert justifient l'intérêt de cet essai de simulation. Cependant, ce test de simulation n'est pas suffisant à lui seul pour assurer la stérilité du produit fini, et il apparait essentiel que le programme de simulation aseptique doit compléter un programme de contrôle environnemental régulier.

Le TRA, test réalisé *a priori* ainsi que l'essai de stérilité réalisé *a posteriori*, représentent donc des tests complémentaires qui s'inscrivent tous deux dans une démarche qualité de maîtrise du risque biologique. Enfin, cette démarche d'assurance qualité inclut la formation initiale et continue des opérateurs aux techniques de préparation aseptique et aux principes d'hygiène. Le TRA pourrait également être utilisé pour la formation et la

validation des opérateurs au procédé aseptique. Ainsi, il s'intègrerait complètement dans ce processus d'assurance qualité puisqu'il constituerait un outil pédagogique intéressant (31).

THÈSE SOUTENUE PAR : Clémentine BERLION

TITRE : VALIDATION DU PROCÉDÉ ASEPTIQUE DE RADIOMARQUAGE CELLULAIRE EN RADIOPHARMACIE : MISE EN PLACE D'UN TEST DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail a permis la validation initiale du procédé aseptique reproduisant les étapes d'un radiomarquage cellulaire. Par la suite, l'objectif pour la radiopharmacie du CHU de Grenoble sera d'instaurer des validations périodiques de tous les procédés, grâce au déploiement de test de remplissage aseptique (TRA) à intervalles réguliers et après travaux ou modification importante du procédé. Bien que le TRA n'ait pas la capacité de démontrer à lui seul l'assurance de la stérilité du produit fini, il s'intègre dans une démarche d'assurance qualité globale et apporte des éléments complémentaires à l'essai de stérilité tout en s'affranchissant des contraintes de radioprotection. En outre, le TRA pourrait être utilisé pour la formation et la validation des opérateurs. En effet, bien que critiquable d'un point de vue de la puissance statistique, le TRA est un outil pédagogique de formation initiale et continue des opérateurs aux techniques de préparation aseptique et aux principes d'hygiène. Pour conclure, le TRA nous a permis d'initier une réflexion sur les pratiques en radiopharmacie et de tester à la fois les procédures, l'environnement ainsi que les compétences du personnel. Ce test de simulation s'inscrit donc dans une démarche d'assurance qualité du processus de préparation des médicaments radiopharmaceutiques et d'amélioration continue des pratiques du personnel.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 05/11/2015

LE DOYEN	LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
Pr. Christophe RIBUOT	Madame Annabelle GÈZE

BIBLIOGRAPHIE

1. Code de la santé publique - Article L5121-1. Code de la santé publique.

2. Monographie des préparations radiopharmaceutiques. Pharmacopée Européenne. In: 8e éd. 2015.

3. Arrêté du 30 octobre 1981 relatif aux conditions d'emploi des radioéléments artificiels utilisés en sources non scellées à des fins médicales.

4. Aupée O, Rizzo-Padoin N, Le Garlantezec P, Bohand X, Foehrenbach H, Laroche P. Aspects pratiques de radioprotection en radiopharmacie. Arch Mal Prof Environ. 2009;70(4):385-94.

5. Code de la santé publique - Article L1333-1. Code de la santé publique.

6. AFSSAPS. Bonnes Pratiques de Préparation. JORF; 2007.

7. ANSM. Bonnes Pratiques de Fabrication. JORF; 2014.

8. Hung JC. USP general chapter <797> pharmaceutical compounding-sterile preparations. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2004;45(6):20N, 28N.

9. Buisson T, Mazet R, Desruet M-D, Foroni L. Congrès SNPHPU (Tours, France). Rencontres Convergences Santé Hôpital. Bilan multicentrique des contrôles particulaires et microbiologiques de l'environnement et des enceintes blindées en radiopharmacie. 2015.

10. Couret I, Desruet M-D, Bolot C, Chassel M-L, Pellegrin M. Préparation in vitro des cellules du sang marquées par des radionucléides : statut et recommandations. Médecine Nucl. 2010;34(11):625-9.

11. Code de la santé publique - Article L5111-1. Code de la santé publique.

12. Vial F, Desruet M-D, Biechlin M-L, Leger S. Congrès SNPHPU. Réalisation des marquages cellulaires : peut-on répondre aux contraintes liées à la radioactivité et à celles régissant l'obtention d'une préparation? 2006.

13. PIC/S. Recommendation on the validation of aseptic processes. 2011.

14. Kerneur N. Tests de remplissage aseptique en radiopharmacie : une solution pour la validation du procédé de préparation aseptique? Thèse d'exercice : Pharmacie. Caen; 2013.

15. Chancel O. Congrès GERPAC (Presqu'île de Giens, France). Préparations stériles en pharmacie hospitalière. Tests de remplissage aseptique en pharmacie hospitalière : intérêts et limites. 2011.

16. Serra M, Roseti L, Bassi A. Media fill for validation of a good manufacturing practice-compliant cell production process. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2015;1283:161-9.

17. FDA. Bacteriological Analytical Manual: Trypticase Soy Broth [Internet]. Food and Drug Administration. 2001 [cité 22 sept 2015]. Disponible sur: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063805.htm

18. Bruel D, Duez C, Ebel-Lao S, Garrigue H, Le Meur C. Guide de surveillance de l'environnement des unités de préparation des médicaments radiopharmaceutiques de la Société française de radiopharmacie. Pharm Hosp. 2011;46(1):45-52.

19. Wojtyczka RD, Orlewska K, Kępa M, Idzik D, Dziedzic A, Mularz T, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus epidermidis strains from a hospital environment. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(5):4619-33.

20. Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? Br J Dermatol. 2008;158(3):442-55.

21. Gonsu KH, Guenou E, Toukam M, Ndze VN, Mbakop CD, Tankeu DN, et al. Bacteriological assessment of the hospital environment in two referral hospitals in Yaoundé-Cameroon. Pan Afr Med J. 2015;20:224.

22. Zembrzuska-Sadkowska E. The danger of infections of the hospitalized patients with the microorganisms present in preparations and in the hospital environment. Acta Pol Pharm. 1995;52(2):173-8.

23. Résumé des Caractéristiques du Produit. Ceretec 500 microgrammes, trousse radiopharmaceutique. 2013.

24. Sadeghipour F. Séminaire du MAS en Pharmacie Hospitalière (Lausanne, Suisse). La préparation des médicaments parentéraux à l'hôpital. Fabrication aseptique : Exigences, Techniques, Applications Pratiques. [Internet]. 2014 [cité 1 oct 2015]. Disponible sur: http://files.chuv.ch/internet-docs/pha/enseignement/pha_seminairemas_2011_sadeghipour.pdf

25. Marie JL, Poupot B, Amoignon T, Bourny E, Chemtob C, Euzen A, et al. Guide pratique pour la réalisation des tests de remplissage aseptique avec milieu de culture : Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Prat. 1998;8(1):18-26.

26. International Organization for Standardization. Chapter 10: process simulation. ISO 13408-1: 2008. Aseptic processing of health care products - part 1 : general requirements. II ed. Geneva, Switzerland. 2008.

27. Mode d'emploi-milieux en flacon prêts à l'emploi - BD Tryptic Soy Broth (TSB) [Internet]. [cité 29 sept 2015]. Disponible sur: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/FR-BA-257107.pdf

28. Stucki C, Sautter A-M, Favet J, Bonnabry P. Microbial contamination of syringes during preparation: the direct influence of environmental cleanliness and risk manipulations on end-product quality. Am J Health Syst Pharm. 2009;66(22):2032-6.

29. Baselski VS. ASM comments on U.S. Pharmacopeia (USP), proposed changes to chapter [Internet]. American Society for Microbiology. 2005. Disponible sur: https://www.asm.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2497

30. Sirna V, Garaboldi L, Papi S, Martano L, Omodeo Salè E, Paganelli G, et al. Testing of microbial contamination during the preparation of the radiocompound [^{90}Y]DOTATOC for clinical trials: a process validation study by Media Fill approach. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2010;54(5):553-9.

31. Sigward E, Fourgeaud M, Vazquez R, Guerrault-Moro M-N, Brossard D, Crauste-Manciet S. Aseptic simulation test challenged with microorganisms for validation of pharmacy operators. Am J Health Syst Pharm. 2012;69(14):1218-24.

32. Urbano N, Modoni S, Schillaci O. Media Fill Test for validation of autologous leukocytes separation and labelling by (99m)Tc-HmPAO. Nucl Med Biol. 2013;40(1):104-8.

33. Austin PD, Elia M. A systematic review and meta-analysis of the risk of microbial contamination of aseptically prepared doses in different environments. J Pharm Pharm Sci. 2009;12(2):233-42.

34. De Boisgrollier A., Edet S, Zarid-Chakik M. Congrès GERPAC (Presqu'île de Giens, France). Préparations stériles en pharmacie hospitalière. Contrôles environnementaux des locaux et équipements de radiopharmacie : état des lieux en France. 2011.

35. Maia S, Nicol B, Rouleau A, Guilloteau D, Van der mee-marquet N. Contamination microbiologique en radiopharmacie : problématiques et mise en œuvre de contrôles dans le cadre d'une démarche qualité. Pharm Hosp. 2008;43(172):11-7.

36. Monographie de la Stérilité. Pharmacopée Européenne. In: 8e éd. 2015.

ANNEXE 1 : FORMULAIRE DE REALISATION DES TRA – MARQUAGE CELLULAIRE

Avant de commencer

1. Lire la procédure de réalisation du TRA se rapportant au procédé testé.
2. Se munir de l'ensemble du matériel nécessaire

Nom de l'opérateur	Nom du superviseur	Procédé testé	Date du test
		Marquage cellulaire	

Matériel nécessaire :

Articles	Nombre	Marque	N° lot	Date de pér.	Superviseur
Poche de 100 mL de Trypticase Soja	1				☐
Flacon 50 mL de Trypticase Soja	1				☐
Ampoule 10 mL de Trypticase Soja	1				☐
Tube Falcon 50 mL	1				☐
Portoir pour tube Falcon 50 mL	1				☐
Tube à hémolyse + bouchon	1				☐
Portoir pour tube à hémolyse	1				☐
Seringues stériles 10 mL	8				☐
Seringues stériles 1 mL	2				☐
Bouchons stériles	2				☐
Aiguilles stériles 25 G	3				☐
Cathéters 45mm 16 G	7				☐
Géloses Tryptone Soja Agar type Count Tact à dater	5				☐
Alcool isopropylique	1				☐

Solution détergente-désinfectante (type Aniosurf)					☐
Boîte jette-aiguille	1				☐
Pot à déchets stérile	1				☐
Compresses stériles	2				☐
Champ stérile	1				☐
Paires de gants stériles	8				☐
Centrifugeur	1				☐
Activimètre	1				☐
Agitateur Vortex	1				☐

Réalisation du test :

Items	Superviseur
1. **Salle de prélèvement** : Désinfecter le bouchon de la poche de Trypticase Soja 100 mL avec une compresse imbibée d'alcool isopropylique	☐
2. Prélever à l'aide d'une seringue de 10 mL et d'une aiguille 25G, 10 mL de milieu de culture dans la poche de 100 mL	☐
3. Transporter la seringue dans une boîte et la remettre au service de radiopharmacie	☐
4. **Laboratoire de radiomarquage cellulaire** : Respect des procédures concernant l'hygiène des mains et l'habillage	☐
5. Réaliser le prélèvement dans le laboratoire à l'aide de la gélose « laboratoire »	☐
6. Préparer le matériel nécessaire	☐
7. Respect de la procédure pour rentrer le matériel sous la hotte à flux laminaire	☐
8. Réaliser le prélèvement sur le plan de travail du PSM à l'aide de la gélose « paillasse 1 ». Désinfecter l'endroit où le prélèvement a été effectué	☐
9. Introduire la seringue de 10 mL sous le PSM, après l'avoir essuyé à l'aide d'une solution de détergeant-désinfectant	☐
10. Mettre des gants stériles	☐

11. Après avoir éliminé l'aiguille, mettre 1 mL dans le tube à hémolyse et 9 mL dans le tube Falcon. Laisser le tube Falcon ouvert environ 30 secondes avant de le refermer.	☐
12. Placer le tube Falcon 5 minutes dans la centrifugeuse	☐
13. Essuyer le tube Falcon avec une lingette imprégnée de détergent-désinfectant avant de le réintroduire sous le PSM	☐
14. Mettre à nouveau des gants stériles	☐
15. Enlever 2 mL de milieu de culture avec une seringue de 10 mL+ un cathéter 45 mm. Enlever les 2 mL en plusieurs fois (en 3 fois) et éliminer le tout dans le pot à déchets.	☐
16. Simuler la mesure de l'activité du flacon de Trypticase Soja 50 mL en le plaçant dans l'activimètre	☐
17. Mettre des gants stériles	☐
18. Désinfecter le bouchon du flacon de Trypticase Soja avec une compresse imbibée d'alcool isopropylique	☐
19. Prélever 0.5 mL dans le flacon à l'aide d'une seringue de 1 mL + une aiguille 25G	☐
20. Réaliser une QSP 1 mL à partir de l'ampoule de Trypticase Soja 10 mL	☐
21. Ajouter les 1 mL au volume restant dans le tube Falcon. Eliminer la seringue dans la boite jette-aiguille	☐
22. Mimer l'agitation au vortex pendant 30 secondes	☐
23. Incuber 30 min à température ambiante sous le PSM	☐
24. Sortie du laboratoire	☐
25. Simuler la mesure de l'activité en plaçant le tube Falcon dans l'activimètre	☐
26. Placer le tube Falcon dans la centrifugeuse pendant 5 minutes	☐
27. Essuyer le tube avec une lingette imprégnée de détergeant-désinfectant puis l'introduire sous le PSM	☐
28. Mettre des gants stériles	☐
29. Enlever 2 mL de milieu de culture avec une seringue de 10 mL + un cathéter 45 mm. Enlever les 2 mL en plusieurs fois (en 3 fois)	☐
30. Ajouter 2 mL de l'ampoule de 10 mL	☐
31. Mimer l'agitation au vortex pendant 20 secondes	☐

32. Placer le tube Falcon dans la centrifugeuse pendant 5 minutes	☐
33. Enlever 2 mL de milieu de culture avec une seringue de 10 mL + un cathéter 45 mm. Enlever les 2 mL en plusieurs fois (en 3 fois)	☐
34. Ajouter 2 mL de l'ampoule de 10 mL	☐
35. Mimer l'agitation au vortex pendant 20 secondes	☐
36. Placer le tube Falcon dans la centrifugeuse pendant 5 minutes	☐
37. Enlever 2 mL de milieu de culture avec une seringue de 10 mL + un cathéter 45 mm. Enlever les 2 mL en plusieurs fois (en 3 fois)	☐
38. Ajouter 2 mL de l'ampoule de 10 mL	☐
39. Mimer l'agitation au vortex pendant 20 secondes	☐
40. Placer le tube Falcon dans la centrifugeuse pendant 5 minutes	☐
41. Enlever 2 mL de milieu de culture avec une seringue de 10 mL + un cathéter 45 mm. Enlever les 2 mL en plusieurs fois (en 3 fois)	☐
42. Ajouter 2 mL de l'ampoule de 10 mL	☐
43. Simuler la mesure de l'activité en plaçant le tube dans l'activimètre	☐
44. Prélever 0.5 mL de TS dans le tube Falcon à l'aide d'une seringue de 1 mL + un cathéter 45 mm. Adapter un bouchon stérile sur la seringue	☐
45. Prélever le reste du milieu de culture présent dans le tube Falcon dans une seringue de 10 mL à l'aide d'un cathéter 45 mm long. Adapter un bouchon stérile sur la seringue	☐
46. Simuler la mesure d'activité en mettant la seringue munie d'un bouchon stérile dans la louche de l'activimètre	☐
47. Réaliser les prélèvements sur le plan de travail du PSM à l'aide de la gélose « paillasse 2 ». Désinfecter l'endroit où le prélèvement a été effectué	☐
48. Réaliser un prélèvement au niveau des doigts de la main droite à l'aide de la gélose sur laquelle est écrit « main droite »	☐
49. Réaliser un prélèvement au niveau des doigts de la main gauche à l'aide de la gélose sur laquelle est écrit « main gauche »	☐
50. Sortir le matériel à l'extérieur du PSM	☐
51. Respecter les procédures pour le nettoyage du PSM	☐
52. En dehors du PSM, vérifier que chaque élément soit bien étiqueté	☐
53. Vérifier au compteur Geiger que chaque élément ne soit pas contaminé	☐

54. Remplir le formulaire des résultats et transférer le formulaire et les différents éléments au laboratoire de contrôle où ils seront incubés 7 jours à 22°C et 7 jours à 30°C.	☐
55. Chaque élément sera inspecté quotidiennement et les résultats reportés	☐

Remarques :

Remarques du superviseur	Superviseur
56. Toutes les étapes de la procédure ont été respectées	☐
57. Tout le matériel a été sorti du laboratoire	☐

Remarques sur la réalisation du TRA

Signature de l'opérateur : _____ Date : _____.

Signature du superviseur : _____ Date : _____.

ANNEXE 2 : FORMULAIRE DE RÉSULTATS

Nom de l'opérateur	Nom du superviseur	Procédé testé	Date du test
		Marquage cellulaire	

1. **Environnement du test :**

Unité où le test est réalisé	Type de paillasse	Contrôle de la pression
☐ Labo. Pharmacotechnie ☐ Radiopharmacie ☐ URCC	☐ Isolateur ☐ HAFL ☐ Enceinte blindée ☐ COMECER	☐ Conforme ☐ Non conforme

2.Informations sur le milieu de culture Trypticase Soja :

Fabricant du milieu de culture	N° de lot	Date d'expiration

3.Informations sur l'incubation :

Nom du contrôleur de l'incubation		Type d'incubateur	
Remarques sur l'incubation			

4. Résultats :
14 jours d'incubation : 7 jours à 22°C et 7 jours à 30°C

Critères d'acceptation :
Présence de turbidité = **ECHEC**
Tous les articles doivent être admis pour que le procédé soit validé.
La contamination doit être confirmée par une identification microbiologique

Inspectez quotidiennement :

Indiquez : **+** pour turbidité

0 pour clarté

w/e pour relevé manqué pour le week-end

Article	**Jour**														**Admis ou échec**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Flacon 50 mL Trypticase Soja															
Poche 100 mL Trypticase Soja															
Tube à hémolyse															
Seringue étalon															
Seringue patient															

Critères d'acceptation environnement :
Géloses « main » + « paillasse » = **0 colonie**
Gélose « laboratoire » = **<50UFC** pour classe D et **<25 UFC** pour classe C

Les géloses doivent être examinées quotidiennement

Gélose	**Jour**			**Admis ou échec**
	1	2	3	
Main droite				
Main gauche				
Gélose paillasse 1				
Gélose paillasse 2				
Gélose laboratoire				

5.Conclusions :

Le procédé est ☐ Conforme ☐ Non conforme Signature :
Date : _____.

Le procédé est ☐ Validé ☐ Non validé Signature :
Date : _____.

REMARQUES : Informez immédiatement le responsable d'unité de tout échec.
3 TRA conformes sont nécessaires pour valider un procédé.

Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.

Serment de Galien

« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

ANNÉE DE SOUTENANCE : 2015

NOM ET PRÉNOM DE L'AUTEUR : Clémentine BERLION

TITRE DE LA THÈSE : **VALIDATION DU PROCÉDÉ ASEPTIQUE DE RADIOMARQUAGE CELLULAIRE EN RADIOPHARMACIE : MISE EN PLACE D'UN TEST DE REMPLISSAGE ASEPTIQUE**

RÉSUMÉ : Le radiomarquage cellulaire (RC) consiste à prélever du sang du patient, à étiqueter in vitro une lignée cellulaire avec un isotope radioactif avant de la réinjecter au patient. Ce procédé est à risque élevé de contamination microbiologique car certaines étapes sont en système ouvert. Le but de ce travail consiste à valider a priori le procédé aseptique de RC par un test de remplissage aseptique (TRA) afin de démontrer que le procédé permet d'obtenir un produit stérile. Le TRA mime le procédé en remplaçant chaque produit par du bouillon de culture stérile, tout en introduisant des étapes critiques. Parmi l'ensemble des procédés de RC, le choix du procédé de préparation aseptique pour la réalisation du TRA s'est porté sur le volume globulaire au ^{51}Cr car c'est l'examen comportant le plus d'étapes en système ouvert, et donc le plus de risque de contamination microbiologique. Deux séries de TRA ont été réalisées à trois reprises, chaque TRA étant accompagné de prélèvements de surface. Les échantillons contenant le milieu de culture ont été incubés 14 jours, 7 jours à 22°C et 7 jours à 30°C. Aucune des 6 seringues patient n'a présenté de contamination. Par contre, 4 tubes à hémolyse et 4 géloses ont été contaminés par un Staphylococcus coagulase négative. Le TRA n'est pas suffisant à lui seul pour assurer la stérilité du produit fini et s'inscrit donc dans un système d'assurance qualité global. Malgré ses limites liées au manque de puissance statistique et de sensibilité, il constitue un outil pédagogique intéressant. Ce travail a permis la validation initiale du procédé aseptique de RC et une réflexion sur les pratiques en radiopharmacie.

MOTS CLÉS : Radiomarquage cellulaire, procédé aseptique, validation, test de remplissage aseptique.

ADRESSE : 2079, route de ferrières 74370 PRINGY