



HAL
open science

Validation du nettoyage des équipements de production dans l'industrie pharmaceutique: application à la production du baume algipan

Maud Berthieux

► **To cite this version:**

Maud Berthieux. Validation du nettoyage des équipements de production dans l'industrie pharmaceutique: application à la production du baume algipan. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01524121

HAL Id: dumas-01524121

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01524121v1>

Submitted on 17 May 2017

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.

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 SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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>



1^{er} exemplaire

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2000

N° d'ordre :

7027

**VALIDATION DU NETTOYAGE DES EQUIPEMENTS DE
PRODUCTION DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE :
APPLICATION A LA PRODUCTION DU BAUME ALGIPAN**

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT**

BERTHIEUX Maud

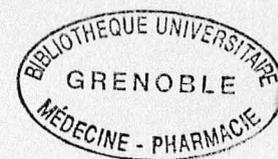
[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT,

LE 21 juillet 2000 A 17H00

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

**Madame le Professeur ALARY, Présidente du jury,
Madame GROSSET, Maître de conférence,
Madame CHARBONNIER, Pharmacien.**



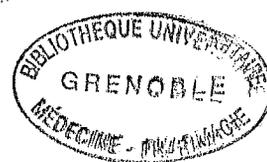
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38760 LA TRONCHE

- : - : - : - : - : -

Doyen de la faculté : M. Le Professeur **P. DEMENGE**
Vice Doyen : M. le Professeur **J. CALOP**

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie/Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38760 LA TRONCHE

-:~::~:~::~:-

Doyen de la Faculté : M. Le Professeur **P. DEMENGE**
Vice Doyen : M. le Professeur **J. CALOP**

MAITRES DE CONFERENCES – PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique
BENOIT-GUYAUD	Martine	Chimie Organique
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
DELETRAZ	Martine	Droit-Economie Pharmaceutique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie moléculaire et structurale
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Bactériologie
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
KRIVOBOK	Serge	Botanique – Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique
PERA	Marie-Hélène	Chimie Organique
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique alimentaire
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxicologie – Ecotoxicologie
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie-Pharmacologie
TAILLANDIER	Georges	Chimie Organique
VILLEMAIN	Danièle	Physique Pharmacie
VILLET	Annick	Chimie Analytique

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année : 2000

N° d'ordre :

**VALIDATION DU NETTOYAGE DES EQUIPEMENTS DE
PRODUCTION DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE :
APPLICATION A LA PRODUCTION DU BAUME ALGIPAN**

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT**

BERTHIEUX Maud

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT,

LE 21 juillet 2000 A 17H00

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

**Madame le Professeur ALARY, Présidente du jury,
Madame GROSSET, Maître de conférence,
Madame CHARBONNIER, Pharmacien.**

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame Alary qui me fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que Madame Grosset et Madame Charbonnier qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie O. Tinseau, P. Rousseau et toute l'équipe du laboratoire de contrôle de la qualité d'UCB Pharma pour leur contribution.

Je souhaite à ma soeur, Alice, de réussir le concours de fin de première année de Pharmacie et que ses études lui soient aussi agréables qu'elles l'ont été pour moi.

Je lui précise néanmoins que, même si les quatre années que j'ai laissées s'écouler avant de faire cette thèse m'ont permis de prolonger le doux sentiment d'être encore étudiante, ce n'est sûrement pas un exemple à suivre.

Je remercie donc tous ceux qui ont patiemment attendu ce jour et ceux qui, avec obstination et bravant mon mauvais caractère, n'ont eu de cesse de me rappeler qu'il me restait une thèse à faire!

Parmi ces derniers, figurent mes parents qui m'ont donné tout l'amour et les armes nécessaires à un bon départ dans la vie, et aussi David qui a su me soutenir et m'encourager dans les moments difficiles.

C'est à ma famille et à mes amis que je dédie cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION10

1ère partie :12

1- Origine des contaminations13

1-1- Contaminants "accidentels" et contaminants permanents.13

1-1-1- Les contaminants accidentels

1-1-2- Les contaminants permanents

1-2- Contamination croisée entre deux produits14

1-2-1- Les deux types de contamination croisée

1-2-2- Influence relative des vecteurs de contamination en fonction du type de contamination croisée

1-2-3- Influence de la forme galénique sur le risque de contamination en fonction du type de contamination croisée

1-3- La contamination microbiologique17

2- Nettoyage du matériel19

2-1- Les procédures de nettoyage du matériel	19
2-2- Maîtrise des conditions du nettoyage	23
2-3- Mécanismes, méthodes et produits de nettoyage	25
2-3-1- Les mécanismes du nettoyage	
2-3-2- Les méthodes	
2-3-3- Les produits de nettoyage	
2-3-4- Les produits désinfectants	
2-3-5- Conclusion sur les méthodes et les produits utilisés	
3- Démarche de la validation	40
3-1- Conditions préalables à la validation du nettoyage	40
3-2- Pourquoi valider le nettoyage du matériel ?	41
3-3- Choix du type de validation	41
3-4- Organisation de la validation	44
3-4-1- Protocole de validation	
3-4-2- Rapport de validation	
3-4-3- Suivi et actions correctives	
3-4-4- La revalidation	
4- Aspect réglementaire	50
4-1- Contexte américain	50
4-2- Guide d'inspection de la validation des procédés de nettoyage, à l'usage des inspecteurs de la FDA	51
4-3- Contexte français et européen	54
4-4- Guide des B.P.F.	55

4-5- Champ d'application de la validation du nettoyage du matériel	58
5- Contamination et échantillonnage	59
5-1- Théorie de la contamination, de la dispersion et points critiques	59
5-1-1- Théorie de la contamination	
5-1-2- Théorie de la dispersion	
5-1-3- Points critiques	
5-2- Les méthodes d'échantillonnage	61
5-2-1- Prélèvement de surface direct	
5-2-2- La méthode par rinçage	
5-2-3- La méthode placebo	
6- Traitement de l'échantillon	70
6-1- Méthodes physico-chimiques	70
6-2- Méthodes microbiologiques	74
7- Critères d'acceptation	77
7-1- Paramètres influençant les critères d'acceptation	77
7-1-1- Paramètres liés au contaminant	
7-1-2- Paramètres liés à l'équipement : Surfaces en contact avec le produit, points critiques	
7-1-3- Paramètres liés au lot suivant : Taille du lot, unité de prise, prise journalière	
7-1-4- Facteur de sécurité	

7-2- Critères d'acceptation physico-chimiques	79
7-2-1- Critère visuel	
7-2-2- Limite de détection	
7-2-3- Limites basées sur des formules faisant intervenir les paramètres énoncés au chapitre 7-1	
7-2-4- Démarche rationnelle basée sur la détermination de plusieurs limites	
7-2-5- Limite exprimée en nombre d'unités du produit suivant à éliminer	
7-3- Critères d'acceptation bactériologiques	87

2ème partie : Mise au point du protocole de validation du nettoyage après production du Baume Algipan88

1- Procédure générale de validation-qualification89

1-1- Processus de la validation d'une méthode ou d'un procédé89

1-1-1- Phase 0 : Rédaction des documents

1-1-2- Phase 1 : Constitution de l'équipe de validation

1-1-3- Phase 2 : Protocole de validation

1-1-4- Phase 3 : Validation proprement dite

1-1-5- Phase 4 : Exploitation des résultats, rédaction du rapport de validation

1-2- Traitement des écarts, améliorations91

1-2-1- Résultats sortant des critères d'acceptation

1-2-2- Résultats manquants ou documents manquants

2- Matériel de production et méthode de nettoyage après production du baume Algipan92

2-1- Process de fabrication et de conditionnement92

2-1-1- Matériel utilisé pour la fabrication

2-1-2- Matériel utilisé pour le stockage et le conditionnement

2-1-3- Risques de contamination liés aux équipements

2-1-4- Processus de fabrication et de conditionnement

2-2- Procédé de nettoyage et de désodorisation désinfection98

2-2-1- Matériel de fabrication

2-2-2- Matériel de stockage et de conditionnement

2-3- Choix des produits100

2-3-1- Le produit de nettoyage

2-3-2- Le produit désinfectant

2-3-3- Le produit désodorisant

2-3-4- L'alcool à 70°

2-3-5- Les fluides de nettoyage

3- Démarche de la validation104

3-1- Recherche des résidus d'Algipan et de la contamination

microbiologique : Prélèvements par écouvillonnage104

3-1-1- Prélèvements par écouvillonnage

3-1-2- Déterminations préalables à l'interprétation des résultats des prélèvements par écouvillonnage

3-1-3- Les limites du prélèvement par écouvillonnage

3-2- Recherche des résidus d'Algipan et de la contamination

microbiologique : Prélèvements par rinçage110

3-2-1- Matériel de fabrication

3-2-2- Matériel de stockage	
3-2-3- Matériel de conditionnement	
3-3- Recherche de traces des produits de nettoyage, de désodorisation et de désinfection : Prélèvement des eaux de rinçage	112
3-4- Récapitulatif des contrôles à effectuer	113
3-5- Détermination d'une molécule traceur pour la recherche des traces d'Algipan	114
3-6- Suivi des paramètres critiques du nettoyage	116
4- Validation du prélèvement par écouvillonnage et détermination du rendement de récupération	118
4-1- Ecouvillonnage pour la recherche de traces de salicylate de glycol	118
4-1-1- Principe	
4-1-2- Méthode	
4-1-3- Résultats obtenus	
4-1-4- Interprétation statistique des résultats, calcul du rendement de récupération	
4-2- Ecouvillonnage pour l'étude microbiologique	120
4-2-1- Principe	
4-2-2- Méthode	
4-2-3- Résultats obtenus	
4-2-4- Interprétation statistique des résultats, calcul du rendement de récupération	
5- Critères d'acceptation, résultats obtenus, interprétations	124
5-1- Critères d'acceptation	124

5-1-1- Produits de nettoyage, de désodorisation et de décontamination	
5-1-2- Contamination microbienne	
5-1-3- Résidus de salicylate de glycol	
5-2- Résultats obtenus sur le 1er lot de validation	131
5-2-1- Résultats obtenus pour le salicylate de glycol	
5-2-2- Résultats microbiologiques	
5-3- Interprétations, recherche de causes.....	135
5-3-1- Action corrective immédiate	
5-3-2- Recherche de causes	

CONCLUSION	146
-------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	148
----------------------------	-----

ANNEXES	151
----------------------	-----

INTRODUCTION

La validation du nettoyage a été une préoccupation majeure dans les années 1990 et a alors donné lieu à de nombreuses publications.

Même si l'intérêt d'un programme de validation du nettoyage est aujourd'hui largement reconnu, la **lourdeur** de la démarche reste un **frein** à la généralisation de sa pratique sur le terrain.

Comme souvent, l'industriel doit **faire des choix et définir des priorités**.

Il va concentrer ses efforts sur des produits ou des **process potentiellement à risques** :

- Nouveaux produits pour lesquels on ne dispose pas d'historique.
- Produits pour lesquels on dispose d'un historique qui n'est pas satisfaisant :
 - . On déplore des lots non conformes.
 - . L'historique des résultats des contrôles révèle une qualité acceptable, mais irrégulière. Cette non qualité risque d'occasionner des dérives pouvant aboutir à un produit non conforme.
- Produits pour lesquels on dispose d'un historique satisfaisant mais l'équipement, le process de fabrication ou la technique de nettoyage et de décontamination de cet équipement sont significativement modifiés.

Après avoir mené à terme sa démarche de validation du nettoyage des équipements jugés **prioritaires**, l'industriel devrait pouvoir **étendre** cette démarche au reste des équipements.

Dans la pratique, le suivi et la **revalidation** du nettoyage demandent beaucoup de temps et d'énergie et la difficulté va être de mener de front l'**extension de la démarche** et le **maintien** des validations déjà faites. Si la première tâche n'est pas remplie, on va aboutir à deux types

d'atelier de fabrication (à "deux vitesses") et si la seconde n'est pas remplie, le bénéfice de la démarche sera perdu.

Compte tenu de l'ampleur de la tâche, la démarche devra être très **rationnelle**; elle sera basée sur des principes qui sont aujourd'hui bien établis :

- maîtrise des paramètres influençant le nettoyage,
- prise en compte d'une molécule "traceur" ou de la situation la plus défavorable permettant d'étendre les résultats de la validation à l'ensemble des produits et des cas de figure,
- respect des réglementations,
- mode de prélèvement et traitement de l'échantillon adaptés,
- définition préalable des limites d'acceptation.

Au-delà de la théorie de la validation du nettoyage, l'industriel doit s'appuyer sur la connaissance de ses propres équipements, de ses propres process de fabrication et de nettoyage, des produits qu'il met en oeuvre et des risques spécifiques à son environnement, pour que sa démarche soit **pertinente**.

La démarche doit se décliner au cas par cas et la validation du nettoyage des équipements après production du Baume Algipan sur le site UCB Pharma à Limay est un exemple de l'application de ces principes.

1ère partie :

1- Origine des contaminations

Une des caractéristiques essentielles du médicament est sa **pureté**; si la pureté initiale des matières premières qui entrent dans sa composition est bien contrôlée, elle risque d'être **compromise** au cours du processus de fabrication. Les sources de contamination sont diverses; elles doivent être connues pour pouvoir être maîtrisées.

1-1- Contaminants "accidentels" et contaminants permanents

On distingue les contaminants "accidentels" des contaminants "de routine" (1, 17, 23) :

1-1-1- Les contaminants accidentels

Ils peuvent être de différentes natures :

- des contaminants biologiques : insectes, rongeurs, oiseaux...
- des contaminants physiques : métaux, verre, joints...
- des contaminants chimiques : pesticides, engrais, liquide de refroidissement...

1-1-2- Les contaminants permanents

Ils sont omniprésents tout au long du processus industriel; ils sont aussi de différentes natures, biologiques, physiques ou chimiques, mais ils sont en général bien identifiés et font l'objet d'efforts constants visant à la maîtrise de cette contamination de routine. Il peut s'agir de :

- résidus de matières premières, résidus de produits de nettoyage, leurs produits de dégradation actifs ou non.
- eaux de nettoyage ou de rinçage.
- graisse, huile de machine., gaz (formol résiduel), vapeur non propre.
- salissures physico-chimiques : poussières naturelles et industrielles (particules, fibres).
- microbes.

Les principaux vecteurs de ces contaminants sont les suivants :

- les locaux au sens large : surfaces et air recyclé ou déplacé.
- le personnel, les vêtements du personnel.
- les matières premières et les articles de conditionnement, les contenants de matières premières et d'articles de conditionnement.
- les équipements de fabrication et de conditionnement, les équipements intermédiaires de transfert.
- les déchets.

1-2- Contamination croisée entre deux produits

Il existe un risque de contamination chimique permanent entre deux produits A et B dès lors que ces deux produits sont fabriqués sur un même site.

La contamination chimique entre deux produits A et B est appelée "**contamination croisée**".

1-2-1- Les deux types de contamination croisée

Contamination croisée successive

Un produit A est fabriqué dans le même local et avec le même matériel qu'un produit B.

Après la fabrication du produit A, on procède à la fabrication d'un produit B.

Il existe un risque de contamination du produit B par des résidus du produit A.

Les vecteurs des résidus du produit A peuvent être :

- Le matériel de fabrication :

Les surfaces en contact direct avec les produits sont mal nettoyées.

- Les locaux :

Les surfaces qui ne sont pas en contact direct avec les produits sont mal nettoyées et une contamination aéroportée ou via le personnel est possible.

- Le personnel lui-même peut être la réserve et le vecteur des contaminants s'il ne change pas de tenue entre les deux fabrications.

- L'air ambiant si le système d'extraction et de renouvellement de l'air est insuffisant.

Contamination croisée simultanée

Les produits A et B sont fabriqués en même temps avec du matériel et dans des locaux différents.

Le risque de contamination est double : le produit A peut contaminer le produit B et le produit B peut contaminer le produit A.

La contamination peut être aéroportée. La contamination par le personnel est possible si les opérateurs transitent d'un local à l'autre sans changer de tenue.

1-2-2- Influence relative des vecteurs de contamination en fonction du type de contamination croisée

Tableau I : Importance relative des vecteurs de contamination successive ou simultanée (23, Ateliers nationaux de la qualité).

Contamination	Successive Même local, même matériel	Simultanée Locaux et matériel différents (mais à proximité)
Produits	A -> B	A <=> B
Facteurs		
Matériel	++++	0
Personnel	++	++
Locaux (surfaces)	++	+
Air (ventilé)	+	+++

Le principal vecteur d'une contamination successive est le **matériel** (vecteur de résidus du produit précédent) alors que, pour une contamination simultanée, il s'agit de l'**air** qui va transporter tout particulièrement les formes solides à l'état de poudre.

Le rôle joué par le personnel est très dépendant des contraintes d'hygiène et vestimentaires imposées aux opérateurs.

Si le personnel change de tenue à chaque produit et ne transite pas d'un local à l'autre, son rôle devient nul.

1-2-3- Influence de la forme galénique sur le risque de contamination en fonction du type de contamination croisée

La contamination successive qui se fait essentiellement via le matériel est d'autant plus importante que le nettoyage est difficile; les formes galéniques les plus en cause sont donc les **formes pâteuses** et les

liquides peu hydrosolubles tels que les huiles, mais aussi les sirops.

La contamination simultanée qui est essentiellement aéroportée met surtout en cause les **substances pulvérulentes** et les **processus poussiéreux**.

Tableau II : Influence de la forme galénique sur la nature de la contamination (23, Ateliers nationaux de la qualité).

Contamination	Successive	Simultanée
Forme galénique		
Formes solides	++	+++
Formes pâteuses	+++	+
Formes liquides :		
- eau (injectables)	+/-	+/-
- huile, sirop	+++	+/-

1-3- La contamination microbiologique

Au niveau des équipements non stériles, de nombreux micro-organismes sont présents et vont pouvoir se multiplier à la faveur de conditions d'humidité et de chaleur adéquates.

Ainsi la contamination microbienne va-t-elle se développer au sein des **résidus chimiques** de produits liquides ou pâteux après un nettoyage insuffisant ou après un nettoyage suivi d'un séchage insuffisant (5).

Le nettoyage et la décontamination microbienne sont donc intimement liés, la décontamination ne pouvant pas être envisagée sans un nettoyage correct préalable ou simultané. Un **séchage** minutieux sera nécessaire après l'opération de nettoyage-décontamination pour éviter la multiplication microbienne et la contamination du produit suivant.

Les exigences en matière de propreté microbiologique sont très dépendantes du produit fini; elles dépendent de la **sensibilité** du produit

au développement microbien et du **niveau de contamination microbienne acceptable** dans le produit fini :

- préparation stérile pour les injectables.
- niveau microbien contrôlé dans les liquides ou semi-solides non stériles.
- tolérances beaucoup plus larges pour les formes sèches qui ne font pas toujours l'objet d'un contrôle microbiologique.

Une attention toute particulière devra être portée aux points bas, aux pompes, aux vannes, aux filtres et autres équipements difficiles à sécher.

La qualité de l'eau de rinçage doit être correcte; un traitement particulier peut être nécessaire (ajout d'hypochlorite...). Il est préférable d'utiliser de l'eau purifiée pour les rinçages.

L'utilisation d'une solution acide permet de lutter contre le développement microbien et notamment contre le biofilm à la surface de l'équipement.

Pour certains équipements, on peut être amené à réaliser une série de rinçages juste avant de les utiliser pour éliminer les micro-organismes qui auraient pu se développer.

2- Nettoyage du matériel

Bien souvent, dans l'industrie pharmaceutique, les équipements sont **multi-produits** (ils servent à la fabrication de plusieurs produits); le risque de **contamination croisée** liée à un nettoyage insuffisant du matériel en contact direct avec le produit est donc une préoccupation majeure.

Afin de maîtriser ce risque, un certain nombre de précautions doivent être prises pour obtenir un nettoyage de qualité; il faut considérer le terme de nettoyage au sens large, c'est à dire englobant une décontamination éventuelle.

La façon de procéder au nettoyage doit être détaillée **par écrit**. Le personnel affecté au nettoyage doit être **formé** à cette opération, il doit connaître et appliquer les consignes écrites.

Faire ce qui est écrit, c'est à dire appliquer une méthode, est une étape nécessaire mais qui ne suffit pas à garantir la qualité du nettoyage; c'est seulement la **validation** de la méthode de nettoyage qui garantit la qualité du nettoyage en montrant, de manière **objective**, que la méthode conduit aux résultats escomptés.

2-1- Les procédures de nettoyage du matériel

Les procédures de nettoyage ont un rôle informatif : ce sont les règles du jeu, elles indiquent à chacun les comportements à adopter (5, 12).

Elles peuvent prévoir certains cas particuliers pouvant survenir et la conduite qu'il faut alors adopter de manière à éviter les initiatives intempestives et les réactions à chaud en cas d'anomalie. "Comment agir?", "Qui prévenir?" sont des questions auxquelles elles doivent répondre.

Prévoyant le comportement à adopter, elles sécurisent le personnel.

La présence de procédures écrites auxquelles il est possible de se reporter permet de lutter contre les effets néfastes de la tradition orale. Celle-ci peut conduire à des déformations du message : mauvaise formulation ou mauvaise compréhension.

La procédure est un engagement, l'entreprise affiche sa volonté de jouer la transparence auprès du personnel comme auprès des auditeurs (7).

Les points clefs d'une procédure de nettoyage sont les suivants :

- 1- Objet : nettoyage des locaux, nettoyage des équipements.
- 2- Niveau de propreté à atteindre : propreté visuelle, propreté chimique, propreté microbiologique, propreté particulière.
- 3- Décrire les équipements ou les surfaces générales à nettoyer.
- 4- Décrire le démontage préalable éventuel de certaines pièces de l'équipement, ainsi que leur remontage et les précautions à prendre pour éviter la recontamination lors de leur remontage (17).
- 5- Citer le matériel de nettoyage (brosses, tissus à récurer, racloirs, tissus d'essuyage...).
- 6- Citer les agents de nettoyage utilisés et les conditions d'emploi.
- 7- Citer le personnel en charge du nettoyage, sa qualification et ses responsabilités.
- 8- Citer les précautions particulières (sécurité, consignes d'exploitation) : il faudra déterminer et maîtriser le temps maximal et les conditions d'attente entre la fin d'une fabrication et l'opération de nettoyage.
- 9- Décrire le mode opératoire proprement dit, préciser le type du nettoyage : manuel, semi-automatique, automatique par une station de nettoyage en place (NEP).
- 10- Durée de validité du nettoyage : délai maximum après lequel on peut

mettre en oeuvre un élément nettoyé sans procéder à un nouveau nettoyage.

Les conditions dans lesquelles sont maintenus les locaux, le matériel et les équipements durant la période de validité du nettoyage doivent être précisées.

L'état "Propre" ou "A nettoyer" doit être indiqué sur l'élément (17, 18), en précisant quel était le produit précédent, la date du nettoyage et l'opérateur qui l'a réalisé.

11- Préciser les contrôles, les vérifications et les enregistrements.

Le document d'enregistrement permet d'impliquer l'opérateur.

Son visa sur ce document d'enregistrement est un engagement différent de l'affirmation : "On a fait comme d'habitude".

Une enquête très rapide sur le terrain montre souvent que ce genre de déclaration est à prendre avec la plus grande prudence.

De plus, il assure la traçabilité des opérations de nettoyage (7).

12- Prévoir les anomalies et les actions correctives en définissant les responsabilités de chacun.

S.W. Harder (5), comme P.Y. Mc Cornick (17), distingue les procédures de nettoyage entre deux lots d'un même produit et les procédures de nettoyage entre deux produits différents.

Lorsque deux lots d'un même produit sont fabriqués successivement avec un même équipement, on parle de fabrication "**en campagne**"; c'est un gain de temps dans la mesure où les procédures de nettoyage peuvent être allégées par rapport à ce qui doit être fait entre deux produits différents.

Si le planning le permet, il est préférable de fabriquer 3 lots d'un produit A puis 3 lots d'un produit B plutôt que d'avoir un enchaînement du type produit A, produit B, produit A, produit B...

Dans le premier cas, celui des "**serial procedures**", l'objectif est la **propreté visuelle**.

Pour les formes sèches, il sera souvent suffisant de réaliser une simple aspiration à sec, plutôt qu'un nettoyage en milieu humide qui risque d'occasionner un développement microbien.

Pour les formes liquides ou semi-liquides, le problème essentiel est la contamination microbienne.

Dans le second cas, celui des "**non serial procedures**", en plus de l'aspect microbiologique, le **taux de résidus chimiques** doit être dans des **limites acceptables**.

Comme pour tout document, les étapes de la vie d'une procédure de nettoyage sont au nombre de quatre (12) :

- rédaction,
- diffusion,
- application,
- révision;

La conception et la mise en place des procédures est un moment privilégié pour la formation et la sensibilisation du personnel aux problèmes de la qualité (12).

La rédaction du document est une étape fondamentale qu'il convient d'utiliser habilement.

Le rédacteur s'informe de l'existant dans les moindres détails; c'est l'occasion d'un **dialogue** avec le personnel qui peut aider considérablement la rédaction et surtout l'application.

La quête de renseignements , ainsi que les tentatives de mise en place de procédures d'essai , sont un temps fort d'**échange** et de **formation** du personnel qui se sent détenteur d'un savoir qu'il restitue à l'entreprise.

L'application et la mise en place de la procédure sont aussi l'occasion d'une "formation-information". Par exemple, un travail en zone stérile sera précédé d'une démonstration montrant le niveau de contamination bactériologique - test de la main sur une boîte de Pétri -, et le niveau de contamination particulaire - comptage des particules pendant un habillage ou un déshabillage.

Enfin, lors de la révision, un **retour sur le terrain** et un échange avec le personnel chargé d'appliquer la procédure, sous forme d'un audit, pourra révéler des **dérives**. La mise à jour du document sera l'occasion d'un **rappel** sur son contenu (12).

La codification de la manière de faire sous forme de procédures est le

passage obligé pour l'obtention d'un nettoyage **reproductible**.

2-2- Maîtrise des conditions du nettoyage

La validation repose sur une **extrapolation** : quand l'efficacité du nettoyage est démontrée sur **au moins trois lots** dans des conditions définies, on conclut que le nettoyage dans ces conditions conduit au résultat escompté de manière reproductible (13).

L'intérêt de la validation repose sur la **reproductibilité**.

Les conditions du nettoyage doivent être maîtrisées pour que l'on puisse procéder à cette extrapolation; elles doivent être reproductibles et reproduites à chaque nettoyage. Cet impératif suppose :

- La formalisation par écrit des opérations de nettoyage-décontamination.

- La formation et l'habilitation du personnel; il connaît et applique correctement les procédures de nettoyage.

- La maîtrise des paramètres liés au nettoyage (1).
 - . Nature des agents détergents et désinfectants.
 - . Concentration des solutions désinfectantes et détergentes.
 - . Volumes de solutions détergentes et désinfectantes.
 - . Volumes de rinçage et nombre de rinçages.
 - . Débit et pression des fluides de nettoyage, de rinçage et de séchage.
 - . Température des diverses solutions utilisées pour le nettoyage, la désinfection ou le rinçage.
 - . Qualité des fluides, en particulier qualité chimique et bactériologique de l'eau utilisée dans les solutions détergentes, désinfectantes ou pour le rinçage (17).
 - . Vitesses et durées d'agitation.
 - . Durée et enchaînement des opérations.

- La maîtrise des caractéristiques environnementales ayant une incidence sur le nettoyage.

- . Contamination particulaire de l'air.
- . Biocontamination de l'air.
- . Température ambiante.
- . Hygrométrie.
- . Dépression et surpression d'air.

Le matériel et les agents de nettoyage doivent être décrits en précisant les références et doivent être qualifiés ce qui signifie qu'il est prouvé :

- qu'ils sont adaptés au mode de nettoyage,
- qu'ils n'altèrent pas la surface à nettoyer,
- qu'ils ne génèrent et ne transfèrent pas de contaminants.

Dans le cas d'une station de NEP (Nettoyage En Place), la qualification comprend (7, 13) :

- la qualification de l'installation : construction des tuyauteries, qualité des matériaux, intégrité et étanchéité des soudures, points bas, vidanges, conception hygiénique des points de prélèvement, des capteurs ainsi que des instruments de mesure du débit, de la température ou de la conductivité...
- la qualification opérationnelle : elle repose sur la maîtrise des paramètres (pression, débit, température, qualité de l'eau...) qui conduisent à la reproductibilité du système.

Pour les consommables, le fournisseur doit indiquer leur nature et la nature physico-chimique des impuretés relarguées dans des conditions définies.

Quant aux agents de nettoyage, ils doivent être achetés auprès de fournisseurs sélectionnés ou agréés par l'entreprise.

Les fournisseurs doivent transmettre, en fonction de l'utilisation des agents de nettoyage, la documentation suivante :

- la composition, au minimum qualitative, et si possible un

- certificat d'analyse,
- les données de sécurité,
 - le mode d'emploi,
 - une méthode de dosage,
 - une méthode de recherche des traces.

En fonction du risque pour le produit, les agents de nettoyage peuvent être identifiés et gérés à réception au même titre que les matières premières.

Les fournisseurs de consommables et d'agents de nettoyage doivent garantir la constance de la qualité de leurs produits.

L'environnement, le matériel, les produits de nettoyage sont sous contrôle (suivi des modifications). Les modifications nécessitant une revalidation doivent être décrites dans le protocole de validation.

Après validation, certains paramètres restent à contrôler systématiquement par des tests de routine car leur maîtrise est aléatoire.

Par exemple, des bandelettes-tests permettent de vérifier rapidement la qualité du rinçage effectué de manière manuelle par un opérateur.

Un contrôle ponctuel peut être réalisé à la suite d'une intervention de maintenance ou d'un arrêt prolongé.

2-3- Mécanismes, méthodes et produits de nettoyage

2-3-1- Les mécanismes du nettoyage

Plusieurs mécanismes sont mis en jeu dans l'élimination des résidus (9) :

- Une **action mécanique** telle que le brossage, les hautes pressions, l'utilisation de neige carbonique.
- Une **dissolution** dans un solvant organique ou dans l'eau. La dissolution peut être facilitée par l'utilisation d'une solution acide pour dissoudre des résidus alcalins et inversement, par

l'utilisation d'une solution alcaline pour des résidus acides.

- La **détergence** repose sur l'utilisation d'un surfactant, le plus souvent en solution aqueuse. L'agent de surface se place à l'interface entre le résidu et l'eau. Les étapes sont les suivantes :

. Le **mouillage**; le surfactant rend le résidu plus hydrophile en abaissant la tension superficielle entre le résidu et l'eau.

. **L'émulsification**; Le résidu est désagrégé et mis en suspension dans l'eau sous forme de micelles.

. La **dispersion**; elle repose sur la faculté qu'a le détergent de maintenir les résidus sous forme de micelles en suspension dans l'eau évitant leur redéposition à un autre endroit de l'équipement.

Même si ces trois actions sont ici bien séparées, en réalité elles coexistent pour tout bon système détergent.

- Un quatrième mécanisme repose sur des **réactions chimiques** qui vont transformer la molécule de départ en molécules plus petites qui seront plus facilement éliminées par l'action détergente.

. **L'oxydation**; l'exemple le plus connu est l'utilisation d'hypochlorite de sodium pour oxyder et dégrader des molécules organiques en molécules plus faciles à éliminer. Le peroxyde d'hydrogène, le peracétate de sodium ou l'ozone sont d'autres agents oxydants.

. **L'hydrolyse** repose sur l'utilisation d'une solution acide ou basique sur un ester, un amide ou un ether; la molécule va se dégrader en résidus solubles dans l'eau.

. Les **réactions enzymatiques** peuvent dégrader certaines molécules organiques. Ainsi les protéases

permettent la dégradation des protéines en petites molécules plus solubles.

Plusieurs modes d'action peuvent être combinés lors du nettoyage. Quand une solution alcaline chlorée est mise en contact avec un résidu protéique, l'agent alcalin permet le mouillage du résidu ce qui favorise le contact entre l'agent chloré et le résidu. Ainsi, l'oxydation est facilitée, les produits de dégradation sont plus hydro-solubles et peuvent donc plus facilement être éliminés ou ils sont plus facilement mis en suspension et dispersés.

2-3-2- Les méthodes

Nettoyage automatique et nettoyage manuel

Tableau III : Avantages et inconvénients en fonction du type de nettoyage (1, 23).

Nettoyage	Avantages	Inconvénients
Manuel	Démontage possible. Visualisation du résultat possible. La qualité du nettoyage peut être meilleure que par les autres techniques (17).	Risque au remontage (exemple : oubli d'une vis...) Reproductibilité plus aléatoire (influence humaine).
Automatique Exemples : tunnel de lavage de conteneurs, NEP...	Adapté aux opérations complexes ou très répétitives. Enregistrement automatique des paramètres de nettoyage.	Vérification visuelle du résultat pas toujours possible.
Semi-automatique Exemple : Nettoyage manuel avec des appareils haute pression	Meilleure reproductibilité que le nettoyage manuel	

Nettoyage de fin de lot, nettoyage de fin de campagne,
nettoyage après intervention technique

Tableau IV - Exemple d'une politique de nettoyage en fonction du motif du nettoyage (23).

Changement de produit	Même produit <i>en campagne</i>	Après intervention de l'entretien <i>sur les parties en contact direct ou non avec le produit</i>
<p>Nettoyage approfondi systématique avec parfois une partie du matériel réservée : tuyaux, tissus. Validation nécessaire du nettoyage.</p> <p>Cas particuliers :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Le produit suivant est un dosage plus fort, mais a la même formule. - Le produit suivant contient un principe actif de plus. 	<p>Même journée : enchaînement de lots. Nettoyage suffisant pour respecter la notion de lot et ne pas modifier les paramètres de la fabrication ni les normes du produit. Pas de validation.</p> <p>Nouvelle journée ou nombre de lots supérieur ou égal à n : Nettoyage permettant de constater visuellement l'absence de produit et s'appuyant sur des vérifications microbiologiques et physico-chimiques (pas de produit de dégradation).</p>	<p>En routine :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Au cours d'un lot : nettoyer spécifiquement la partie contaminée par l'intervention. - Entre 2 lots : recommencer l'opération de nettoyage approfondi effectuée en fin de lot ou de journée. <p>Révision lourde (annuelle...) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Signaler à l'utilisateur la présence de produit dans les parties démontées à cette occasion. - Revoir le nettoyage ou l'équipement si nécessaire. - Procédure de nettoyage : faire précéder la procédure standard "changement de produit", par une procédure complémentaire adaptée à cette opération annuelle.

Mécanisme du nettoyage

Le nettoyage comporte plusieurs étapes; le bionettoyage qui doit aboutir

à un niveau bas de contamination microbienne inclut une étape de désinfection.

Les grandes étapes sont les suivantes (17) :

- **Elimination des déchets ou souillures macroscopiques.**
- **Elimination des souillures libres, impuretés microscopiques** pouvant se déposer sur une surface de manière lâche et aisément éliminables.
- **Elimination des souillures adhérentes,** impuretés microscopiques qui adhèrent à la surface par des phénomènes physiques et/ou chimiques.
- **Elimination des produits utilisés et des salissures.**

Le **rinçage intermédiaire** permet de :

- . parfaire la récupération des solutions résiduelles,
- . stopper l'action chimique du détergent,
- . neutraliser le pH,
- . supprimer les risques d'interférences entre la solution résiduelle et la solution désinfectante comme la "consommation" du principe actif désinfectant ou l'incompatibilité chimique.

- **Application éventuelle d'un désinfectant;** par principe, on ne peut désinfecter que ce qui est propre d'où la nécessité du nettoyage préalable.

Le plan classique du bionettoyage (20) se déroule en **cinq étapes** mais des variantes sont possibles (Tableau V).

Le plan à **sept étapes** permet de réaliser successivement un nettoyage acide puis un nettoyage alcalin, ces deux étapes étant séparées par un rinçage. Ce type de plan est utilisé en présence d'importants résidus minéraux, en plus des résidus organiques.

A l'inverse, quand les surfaces sont peu encrassées, un plan en

trois étapes peut être suffisant; un seul produit détergent et désinfectant peut, en une seule étape, réaliser le nettoyage et la désinfection ce qui supprime aussi l'étape de rinçage intermédiaire.

Tableau V: Etapes fondamentales du nettoyage et de la désinfection (20).

	Plan en 5 points	Plan en 7 points	Plan en 3 points
Elimination des déchets et des souillures libres	Prélavage	Prélavage	Prélavage
Elimination des souillures adhérentes et incrustées	Détergence	Nettoyage acide Rinçage Nettoyage alcalin	Nettoyage- Désinfection
Récupération et rinçage-récupération	Rinçage intermédiaire	Rinçage intermédiaire	
Elimination des micro-organismes	Désinfection	Désinfection	
Rinçage final	Rinçage final	Rinçage final	Rinçage final

Matériel de nettoyage

Une attention toute particulière doit être portée à l'entretien du petit matériel utilisé pour le nettoyage et la désinfection; en effet, ce matériel peut lui-même être source de contamination croisée ou de contamination bactériologique (17). Des procédures d'entretien devraient exister et être validées.

2-3-3- Les produits de nettoyage

Les agents de nettoyage doivent être choisis de manière à (1, 22, 23) :

- être les plus simples possibles, contenant le moins de composants possibles,
- avoir une composition qualitative et quantitative parfaitement

définie,

- être compatibles avec les équipements de production et les matériaux des surfaces à nettoyer,
- être les moins dangereux ou toxiques possibles pour le personnel,
- être solubles et faciles à éliminer,
- être faciles à dénaturer pour les rendre inactifs et atoxiques,
- ne pas générer ou transférer de contaminants,
- permettre une méthode analytique pouvant les doser et en rechercher les traces,
- avoir une toxicité qui soit documentée pour pouvoir établir les critères d'acceptation.

Les agents alcalins

Ils réalisent des émulsions, la saponification des graisses et la formation de solutions colloïdales notamment avec les résidus protéiques. Ils sont utilisés contre l'ensemble des **souillures organiques** mais ils ont peu ou pas d'effet sur les dépôts minéraux.

Tableau VI : Avantages et inconvénients des principaux agents alcalins.

Produits	Avantages	Inconvénients
Hydroxyde de sodium pH > 13	Le meilleur agent de saponification Bon pouvoir solubilisant et dispersant Bactéricide Bon marché Bonne aptitude à éliminer les salissures en solution ou en dispersion	Très corrosif Dangereux pour les yeux, la peau et les voies respiratoires Difficile à éliminer par rinçage Faible pouvoir mouillant et émulsifiant Absence d'effet tampon
Carbonate disodique	Bon marché	Peu efficace Précipite le carbonate de calcium
Phosphate trisodique	Bon pouvoir émulsifiant Effet tampon Ne précipite pas le carbonate de calcium Rinçage facile	Faible pouvoir séquestrant pour le calcium Assez corrosif Prix élevé

Les agents acides

Ils sont utilisés pour éliminer des salissures incrustées et des dépôts, surtout **minéraux**, dus à l'application de solutions alcalines. Ils permettent d'éliminer le carbonate de calcium qui se forme quand l'eau est dure ou d'autres souillures minérales, et de rénover les surfaces en inox rapidement ternies par ces dépôts minéraux.

Tableau VII : Avantages et inconvénients des principaux agents acides.

Produits	Avantages	Inconvénients
Acides inorganiques ou minéraux	Dissolution des dépôts minéraux résistants	Très agressifs Difficiles à manipuler Inhibiteurs de corrosion nécessaires Vapeurs acides avec l'acide chlorhydrique ou nitrique
Acides organiques	Dissolution des dépôts minéraux, alcalino-terreux notamment (sels de calcium et de magnésium) L'acide citrique ou l'acide gluconique séquestre le calcium et le magnésium en milieu alcalin	Légère corrosion des métaux Attaquent la pierre et le béton

Les tensioactifs ou agents de surface

Ils **potentialisent** l'action de la base ou de l'acide par leur pouvoir **mouillant**. Ils **émulsionnent les huiles et les graisses** en se plaçant à l'interface des deux phases, leur partie hydrophile dans l'eau et leur partie hydrophobe au sein de la souillure. Ils **solubilisent les protéines**, dispersent les résidus et **évitent leur redéposition**

Tableau VIII : Avantages et inconvénients des principaux tensioactifs.

Produits	Avantages	Inconvénients
Anioniques		
Sels d'acides gras Exemples : Palmitates, oléates, stéarates, laurates sodiques ou potassiques	Très bons détergents, très mouillants, moussants, émulsifiants, dispersants	Inopérants en milieu acide Précipitation des ions calcium et magnésium
Alkyl sulfates et alkyl ethersulfates Exemples : lauryl sulfate et lauryl ethersulfate	Bon marché Bon pouvoir mouillant, très moussants	Biodégradabilité moyenne Incompatibilité avec les cationiques
Alkyl sulfonates, alkyl arylsulfonates Exemples: Dodécylbenzène sulfonate	Grand pouvoir détergent et moussant Insensibles à l'eau dure	Incompatibilité avec les cationiques
Cationiques		
Ammoniums quaternaires Exemple : Sels d'amines grasses	Bon pouvoir mouillant Stables en milieu acide Bactéricides Non influencés par la dureté de l'eau	Incompatibilité avec les anioniques
Non ioniques		
Alkylphénol ethoxylé, alcool gras ethoxylé, alkyl polyglucoside	Bon pouvoir détergent, mouillant, dispersant Moussants ou peu moussants Neutres, non irritants Efficaces en eau dure	Prix de revient élevé
Amphotères dont la charge est fonction du pH		
De type "acide aminé" Exemple : Dérivés de betaïne ou de glycine	Désinfectants, antistatiques, peu agressifs	Sensibles à la présence d'ions

Les agents divers

Les chélatants tels que les polyphosphates, l'éthylène diamine tétracétate de sodium (EDTA), sont utiles du fait de leur pouvoir **séquestrant** quand l'eau est dure, pour **éviter la précipitation** des carbonates de calcium et de magnésium.

Les silicates sont des agents **anticorrosion**; ils ne l'empêchent pas mais la limitent, en formant progressivement un film protecteur qui laisse un aspect terne et grisâtre sur les surfaces.

Les produits enzymatiques se développent en réponse au souci permanent de **préserver le matériel et l'environnement**.

2-3-4- Les désinfectants

Les aldéhydes agissent sur les groupements aminés terminaux des protéines et sur les acides aminés de la cellule, avec formation de ponts méthylène. La concentration moyenne d'utilisation est de 1 à 2 %.

Les dérivés halogénés provoquent une oxydation non spécifique et irréversible du matériel cellulaire. Leur spectre est large, ils sont bactéricides et virucides.

L'association avec un détergent alcalin limite les risques de corrosion et accroît le pouvoir bactéricide du désinfectant chloré.

Les ammoniums quaternaires s'adsorbent à la surface de la paroi cellulaire et réagissent au niveau des membranes avec les groupements ioniques des acides aminés, des fonctions carboxyliques, des phospholipides et des protéines. Ceci entraîne des perturbations stériques et un blocage des voies métaboliques par inactivation des enzymes cellulaires.

C'est sans doute la haute teneur en phospholipides des parois des bactéries Gram⁺ qui les rend plus sensibles que les bactéries Gram⁻.

Les ammoniums quaternaires peuvent être utilisés seuls sur une surface à nettoyer en tant que détergent-désinfectant.

En tant que bactéricides, ils sont souvent associés à des aldéhydes

(sporicides) ou à des phénols (bactéricides et fongicides) en raison d'effets synergiques puissants.

Les amphotères, grâce à leur structure du type "acide aminé", sont incorporés par les cellules à la place d'acides aminés, ce qui perturbe la structure des composés cellulaires et conduit à l'autolyse des cellules microbiennes.

Les acides anioniques tels que l'acide phosphorique provoquent des altérations de la membrane et perturbent la perméabilité cellulaire.

Tableau IX : Avantages et inconvénients des principaux désinfectants.

Produits	Avantages	Inconvénients
Aldéhydes		
Exemples : Formaldéhyde, glutaraldéhyde, glyoxal	Large spectre bactéricide Non corrosif	Action lente (de quelques h à 24 h) Résidus d'odeur fréquents (formol) Formation de résidus durs (du type galalythe) avec les souillures organiques
Dérivés halogénés		
Dérivés chlorés Exemples : Hypochlorite de sodium (eau de Javel), Di et tri-chlorocyanurate de sodium Chloramines	Spectre large Action rapide contre les bactéries Gram ⁺ et Gram ⁻ , les levures et les moisissures Action moins rapide contre les spores Peu coûteux Faible toxicité Efficacité qui augmente avec la température Bonne miscibilité avec les produits alcalins Peu affectés par la dureté de l'eau Incolores Utilisation aisée Bonne rinçabilité	Mauvaise stabilité à chaud, à l'état dilué et à la lumière dans le cas de l'hypochlorite de sodium Stabilité limitée durant le stockage Sensibilité aux matières organiques et inorganiques Efficacité fortement liée au pH pour les hypochlorites (pH alcalin) Action corrosive notamment à pH < 8,5 Irritant pour les muqueuses sous forme gazeuse

L'iode et les produits iodés	Grande efficacité même à faible dose Propriétés tensioactives importantes Action à froid (40°C) Faible toxicité	Moins efficaces que le chlore contre les spores et les bactériophages Instables à haute température et à la lumière Mauvaise conservation au stockage Inefficacité à pH > 8 Corrosifs surtout à pH acide Coloration des matériaux traités Sensibles aux matières organiques et à la dureté de l'eau Irritants pour les yeux Coût élevé Peuvent être fortement contaminés
Les ammoniums quaternaires		
Chlorure d'hexadécyl triméthyl ammonium Chlorure d'alkyl diméthyl benzyl ammonium	Grande efficacité sur les bactéries Gram ⁺ Grande stabilité Bon pouvoir mouillant Non corrosifs, voire inhibiteurs de corrosion et anti-dépôts Inodores Peu toxiques Non agressifs pour la peau	Moins efficaces sur les bactéries Gram ⁻ Sensibles aux matières organiques et à la dureté de l'eau Relativement coûteux Parfois fortement contaminés Difficiles à rincer Utilisés à trop faible concentration, émergence de souches résistantes
Les amphotères		
Tégo 51 (Goldschmidt)	Pouvoir mouillant Large spectre d'activité Faible toxicité Biodégradables	Efficacité liée au pH Coûteux Parfois fortement contaminés Utilisés à trop faible concentration, émergence de souches résistantes
Les oxydes et les peroxydes		
Peroxyde d'hydrogène, permanganate de potassium	Spectre large Décomposition en O ₂ et H ₂ O, pas de résidus toxiques Action très rapide pour l'ozone	Parfois coûteux (Ozone) Instables Le peroxyde d'hydrogène doit être utilisé à concentration et à température élevées pour une désinfection complète et rapide

L'eau oxygénée activée, combinaison de peroxyde d'hydrogène et d'acide acétique	Spectre large Assez stable en utilisation normale (température ambiante, faible concentration) Sans toxicité	Sensible à la présence de souillures Instable en longue conservation
Acides, bases et alcools		
Acides et bases forts	Grande efficacité Efficacité accrue par une température élevée	Corrosivité importante
Acides anioniques : Acide phosphorique	Spectre large Action rapide pH optimum < 3 Recommandés sur l'acier inox et pour les NEP Evitent les dépôts minéraux en neutralisant une alcalinité excessive Pas corrosifs Peu sensibles aux interférences des matières organiques ou minérales	Leur activité décroît avec l'augmentation du pH
Alcools	Actifs sur les formes végétatives à température ambiante Désinfection des petites surfaces	Actifs à faible dilution Sans effet sur les spores bactériennes

2-3-5- Conclusion sur les méthodes et les produits utilisés

Il n'existe pas de tendance générale car les méthodes et les produits dépendent du type de salissures à nettoyer (nature chimique, quantité...), du niveau de contamination microbiologique avant et du niveau à atteindre après la décontamination.

Cependant, certaines pratiques sont souvent appliquées :

- Pour des équipements peu encrassés, un nettoyage et une décontamination **simultanés** représentent un réel gain de temps et d'eau. Dans ce cadre, on trouve souvent l'association d'un détergent non ionique et d'un ammonium quaternaire.

- On **évitera** l'utilisation d'un produit chaque fois que possible; pour des salissures peu tenaces, un rinçage à l'eau peut suffire. On sera alors dispensé de la validation du rinçage.

- Les salissures **minérales** sont **rare**s dans l'industrie pharmaceutique; l'eau utilisée pour la fabrication est le plus souvent déminéralisée. L'utilisation de produit de nettoyage **acide** est donc **rare**.

- L'action d'un agent de nettoyage **alcalin** efficace et peu coûteux permet d'éliminer toutes les traces de produits **organiques** qui représentent l'essentiel des salissures dans l'industrie pharmaceutique. Ces salissures peuvent être tenaces, notamment dans le cadre des formes pâteuses.

- Le désinfectant est choisi pour son **spéctre large** et pour un mode d'utilisation qui s'adapte bien aux **contraintes de production**. Ainsi, si l'action doit être **rapide**, on utilisera un agent **oxydant** mais si l'équipement est mis en contact **prolongé** avec le décontaminant (le vendredi soir pour être rincé et utilisé le lundi matin), on préférera utiliser un **amphotère**.

- Afin d'éviter l'acoutumance des micro-organismes au produit décontaminant, l'alternance de deux décontaminants est parfois appliquée sans que le bénéfice de cette démarche ne soit clairement établi. Quand un seul décontaminant est utilisé et que l'on suspecte l'émergence de souches résistantes, c'est en général une mauvaise maîtrise des paramètres de la décontamination qui est cause et non pas la résistance des souches au produit décontaminant utilisé.

- On trouve souvent des **associations** de molécules; Ces associations peuvent être **synergiques** (2 amphotères, un ammonium quaternaire et un amphotère) ou améliorer la **stabilité** des produits (péroxyde d'hydrogène et acide péracétique).

- On utilise de plus en plus des produits qui ne sont **pas toxiques** pour les utilisateurs et qui **respectent l'environnement**; les réglementations sont de plus en plus strictes (formol, phosphates).

Dans cette optique, les techniques **enzymatiques** commencent à se développer, essentiellement en milieu hospitalier, mais pas encore au niveau industriel.

3- Démarche de la validation

3-1- Conditions préalables à la validation du nettoyage

La validation du nettoyage est une opération **longue et coûteuse**; elle représenterait en moyenne 5 à 15% du coût d'un équipement (13). Mais c'est une opération **nécessaire**; il faut donc **rationaliser** la validation du nettoyage pour garantir **la sécurité et la qualité au moindre coût**. La validation doit être considérée comme une opération rentable. Cette philosophie est la clef du succès pour une société dans ses relations avec la FDA (13). Faire le minimum requis pour l'inspection ou faire ce que la FDA jugera acceptable conduira à un échec. Les inspecteurs de la FDA attendent des sociétés qu'elles comprennent leur process et qu'elles sachent quels résultats elles peuvent attendre de leurs équipements.

La démarche doit être menée avec la volonté de **comprendre le procédé** et de le **maintenir sous contrôle**. Le but essentiel de la validation est de garantir la qualité du produit pendant toute sa durée de vie, l'efficacité du traitement et la sécurité du patient (17).

La validation doit être considérée comme un processus **continu** et non pas comme une activité ponctuelle. Après la validation initiale, le procédé doit rester sous contrôle de manière à s'assurer qu'il reste maîtrisé (13).

Le premier paramètre à définir est le **niveau de propreté à atteindre** car il permet de déterminer les **moyens** les mieux adaptés à la mise en oeuvre de la validation;

Il faut décrire la configuration des locaux et des équipements, il faut connaître les points critiques et les surfaces difficilement accessibles; Ces aspects doivent être documentés : schémas et repérage des locaux, des équipements, des flux, des canalisations, identification des points critiques.

3-2- Pourquoi valider le nettoyage du matériel?

Le nettoyage est un processus essentiel de la fabrication et doit à ce titre, comme toutes les étapes du processus, être validé (13).

La validation du nettoyage assure que l'application des méthodes de nettoyage permet d'obtenir un matériel propre, de façon reproductible. Elle permet de diminuer le risque de contamination croisée entre lots d'un même produit ou entre lots de produits différents.

Cette démarche peut être déclenchée pour satisfaire une exigence après inspection.

C'est l'occasion d'une remise à plat de l'activité de nettoyage au sein de l'unité, ce qui permet de réorganiser et améliorer l'activité nettoyage.

La validation valorise l'activité nettoyage (22).

3- 3- Choix du type de validation

La validation peut être **prospective** dans le cas d'une nouvelle installation, du lancement d'un nouveau produit ou au stade du développement.

La FDA recommande la validation du nettoyage de tout nouveau produit.

La validation peut être **concomitante** pour des produits existants; dans ce cas, l'approche doit être pragmatique de manière à regrouper les équipements, les produits et à déterminer le cas le plus pénalisant afin, si possible, d'éviter de tester les autres produits utilisant le même équipement et la même méthode de nettoyage (1, 6, 10, 17).

La contamination chimique est représentée par les **principes actifs**, les **excipients**, les **agents de nettoyage**, les **produits de neutralisation** ou leurs **produits de dégradation**. Si la recherche de

tous les contaminants chimiques ne peut être réalisée (pour des raisons de coût, de temps, de planning ou autre), il est possible de regrouper ces contaminants selon :

- des critères pharmacologiques ou toxicologiques,
- des critères de solubilité,
- des critères de facilité de nettoyage,
- des critères de facilité de dosage.

L'étude pourra porter sur la molécule la plus toxique, la moins soluble ou sur les deux afin de se placer dans les conditions **les plus défavorables**; un nettoyage difficile peut aussi être pris en compte même si c'est un paramètre subjectif.

Ainsi, la validation du nettoyage pour l'élément d'un groupe entraîne celle de l'ensemble des éléments de ce groupe.

La **formulation** est un point important car la validation du nettoyage concerne non seulement les principes actifs mais aussi les excipients. Ainsi, regrouper une crème et une pommade parce qu'elles contiennent le même principe actif n'est pas la bonne stratégie, du fait des différences de solubilité (6).

Une autre erreur qui est parfois faite est de considérer essentiellement les "**produits-phares**" fabriqués à grands volumes ou sur lesquels repose le chiffre d'affaires. Or le fait de négliger certains "**petits produits**" peut justement mettre en péril la qualité de ces produits. La démarche doit donc prendre en compte l'ensemble des produits (6).

Le **traceur** est la molécule qui va être recherchée ou dosée et pour laquelle des critères d'acceptation ont été fixés; il peut s'agir d'une substance pharmacologiquement active, d'un excipient ou d'un agent de nettoyage.

Le traceur est choisi en fonction de certains critères qui sont (16) :

- un caractère toxique particulier,
- un seuil de détection bas, un fort pouvoir odorant ou colorant,
- une faible solubilité,
- une forte concentration,

- un nettoyage particulièrement difficile (résidu dur, gommeux).

La faculté d'**adsorption des résidus à la surface** est un paramètre supplémentaire qui devrait être pris en compte; en effet, comme le décrit J.M. Smith (15) pour les substances qui entrent dans la composition des détergents, ce n'est pas nécessairement celui qui est présent en plus grande quantité ou le moins soluble qu'il faut rechercher mais celui qui va être le plus difficile à rincer du fait de son adsorption au support (4, 9).

Une fois le traceur déterminé, il faut se mettre dans les **conditions les plus défavorables au nettoyage** : concentration la plus élevée en principe actif traceur, équipement le plus difficile à nettoyer, produit suivant dont la taille de lot est la plus petite à être produite sur l'équipement, processus le plus contaminant...

Les critères de production pour un produit "traceur" sont résumés ci-dessous.

Tableau X : Conditions les plus défavorables en fonction du type de contamination (23).

Contamination successive	Contamination simultanée
Produit difficile à éliminer (solubilité)	Unité opératoire importante Fabrication de <u>longue durée</u>
Processus utilisant un matériel difficile à nettoyer	Processus estimé le plus "poussiéreux" (parmi ceux que l'on a)

Les **équipements** du même type et dont les fonctions sont communes peuvent aussi faire l'objet d'un **regroupement**, si l'état et l'accessibilité des surfaces sont les mêmes (6, 10).

Si deux cuves strictement identiques ont des fonctions différentes, l'une étant utilisée pour des suspensions, l'autre pour des pommades, leur nettoyage doit, bien sûr, être validé individuellement.

Le principe du cas le plus défavorable reste valable.

3- 4- Organisation de la validation

Il est indispensable de pouvoir dégager suffisamment de **temps** (opérateurs et encadrement) et de **moyens matériels** pour mettre en place un programme de validation du nettoyage au sein d'une unité (7).

Il est également nécessaire de nommer un **responsable de projet** qui coordonne la mise en place et le suivi du programme de validation.

Les responsabilités doivent être bien définies pour chacun des intervenants : responsable de la qualification, responsable de la validation, responsable de l'assurance qualité, responsable du contrôle qualité, opérateurs en charge des prélèvements et opérateurs en charge des contrôles (22).

Un **planning** doit être établi.

La charge de travail est estimée à un technicien pendant un mois à temps complet. C'est un ordre de grandeur pour la mise au point des prélèvements et de la méthode analytique, pour une substance donnée, sur une ligne de matériel de production, y compris la rédaction des documents correspondants (23).

3- 4- 1- Protocole de validation

Le protocole est écrit en accord avec la procédure générale de validation du site; il décrit les conditions de mise en oeuvre de la validation (6).

Il est établi et soumis à l'approbation scientifique et technique de personnes connaissant bien le processus. Chaque point doit être débattu et doit pouvoir être justifié de manière rationnelle.

Il devra comprendre les informations suivantes (7, 17, 22).

1- La démarche de la validation, le motif de la validation, l'équipe de validation, les principes de la démarche et le calendrier, ainsi que la définition des objectifs à atteindre.

2- Des informations sur le procédé de nettoyage et son environnement :

- Environnement : plans de l'équipement, type d'équipement, caractéristiques de l'équipement, nature des surfaces.
- Produits pharmaceutiques fabriqués, type de produits à nettoyer (nature, solubilité, réactivité...).
- Procédés de nettoyage : références des procédures, délai maximum à respecter avant nettoyage, conditions de stockage avant nettoyage, délai et conditions de stockage après nettoyage avant réutilisation de l'équipement.
- Dans le cas d'une station de nettoyage en place, l'équipement et le fonctionnement de l'automate devront être décrits; les paramètres critiques liés au nettoyage seront spécifiés, en particulier la concentration en détergent, la température, la pression ou la durée des cycles; Pour un nettoyage manuel, c'est la formation et l'aptitude des opérateurs qui doivent être documentées.

3- Description des tests à effectuer

- Contrôles visuels de tous les points critiques identifiés : si tous les résultats des contrôles sont conformes, l'étape suivante est possible; si des résultats sont non conformes, il faut revoir la méthode de nettoyage et reconstrôler avant de passer à l'étape suivante.

- Prélèvements :

Le plan de prélèvement doit être aussi précis que possible (schéma, photographie); il est défini dans un souci de représentativité des surfaces prélevées et d'obtention d'une bonne récupération tenant compte de toutes les zones de contamination possibles, en se plaçant dans les conditions les plus défavorables.

Les conditions de prélèvement, type et références des supports de prélèvement, délai entre le prélèvement et l'analyse, nature du contenant, ainsi que la méthode de prélèvement doivent être

décrites avec précision.

- Critères d'acceptation (Voir le chapitre 7, "Critères d'acceptation", p77).

- Méthodes de traitement et d'analyse des échantillons.

Le rendement de récupération et la limite de détection doivent être connus; la linéarité et la reproductibilité de la méthode doivent être vérifiées.

4- Documents d'enregistrement de la validation

Des formulaires pré-imprimés pour la qualification des équipements, des fiches récapitulatives des résultats... peuvent être prévus pour faciliter l'enregistrement des données de validation.

3- 4- 2- Rapport de validation

Il est établi après la validation. Il reprend les principes de la validation et les critères d'acceptation (7).

Tout **écart** par rapport au protocole de validation doit y être **justifié**, que ces écarts portent sur le planning, sur les personnes en charge de la validation ou sur les conditions opératoires.

Le rapport de validation **présente les résultats** de façon synthétique et donne lieu à une **analyse** des données brutes par rapport aux critères requis.

Les **conclusions** du rapport doivent être claires et objectives; elles doivent conduire à des propositions et des recommandations pour améliorer, changer ou entériner les procédures de nettoyage.

3- 4- 3- Suivi et actions correctives

Le suivi est l'étape qui suit la validation; il permet de surveiller que les procédés et les paramètres sont appliqués et maintenus (7).

Pour le suivi, il est possible de faire des contrôles à intervalles de temps réguliers; ces contrôles de routine sont simplifiés et allégés par rapport aux contrôles de validation puisque le procédé de nettoyage est déjà validé.

Pour ces contrôles plus rapides, moins coûteux, moins fréquents ou moins nombreux, l'enregistrement des résultats doit néanmoins être tout aussi minutieux. Leur analyse doit permettre de dégager une **tendance**.

En plus des contrôles, le suivi repose sur des **audits du nettoyage** (6) qui portent non pas sur les résultats du procédé mais sur les procédés eux-mêmes. L'audit permet de vérifier que les moyens humains et matériels sont toujours opérationnels par un suivi de la qualification du matériel et de la formation du personnel.

Un calendrier précis des audits doit être établi.

Là encore, l'enregistrement et l'analyse des résultats sont indispensables.

Si le suivi de la validation met en évidence des **dérives**, une enquête doit être menée de manière à proposer et mettre en oeuvre des actions correctives adaptées.

Des actions préventives pourront également être mises en place pour éviter la récurrence des dérives.

Si les dérives portent sur le procédé, il suffit de faire une "piqûre de rappel" de manière à ce que le procédé initialement validé soit appliqué et éventuellement de renforcer le suivi.

En revanche, si les dérives portant sur les résultats amènent à modifier le procédé lui-même, changement de matériel ou d'agent de nettoyage, modification de certains paramètres, il faut alors procéder à une nouvelle validation.

3-4-4- **La revalidation**

Les modifications qui occasionnent une revalidation sont précisées dans le **protocole de validation**.

Tout changement significatif durable ayant une incidence sur la qualité du nettoyage doit déclencher une revalidation (1, 5, 17).

Les changements peuvent porter sur la **production** du produit à nettoyer :

- Modification, ou remplacement d'un équipement de fabrication. L'usure du matériel n'est pas un évènement ponctuel mais un phénomène continu qui a néanmoins de lourdes conséquences sur la qualité du nettoyage.
- Modification de la formule du produit à nettoyer.
- Modification du process de fabrication, de la taille des lots.

Les changements peuvent porter sur le **nettoyage** ou la **désinfection** :

- modification ou remplacement d'un équipement de nettoyage,
- modification de la formule du produit de nettoyage ou de désinfection, ou changement de la concentration utilisée,
- changement des consommables utilisés dans le nettoyage (tissus d'essuyage...),
- modification de la méthode de nettoyage (ordre des séquences, démontages préalables, durée des temps de contact...),
- modification de la qualité des fluides utilisés dans le nettoyage (eau, air comprimé, vapeur...) à l'occasion d'un changement dans le mode d'obtention par exemple,
- modification du délai avant nettoyage,
- changement de personnel pouvant occasionner des modifications dans la mise en oeuvre des procédures, surtout quand il s'agit d'un nettoyage manuel.

Les changements peuvent porter sur l'**environnement** :

- Température, hygrométrie.
- Contamination particulaire et microbienne de l'air, pressions différentielles des locaux, renouvellement et traitement de l'air (débit, filtres, propreté des conduits d'air).
- Méthode de récupération, stockage, transport, élimination des déchets.

En dehors de tout changement, la revalidation peut être programmée à **intervalles de temps réguliers**.

C'est notamment un moyen d'envisager les conséquences de l'**usure** sur la qualité du nettoyage, aussi bien l'usure du matériel à nettoyer que celle du matériel de nettoyage.

Cette approche déjà ancienne laisse la place à des stratégies plus pragmatiques qui visent à déclencher une revalidation suite à un changement pouvant avoir des conséquences sur la qualité du nettoyage (17). C'est le domaine du "**change control**" ou "**maîtrise du changement**" qui définit des personnes responsables en charge d'approuver les changements et d'évaluer leur impact sur les validations initiales (17).

C'est sans doute une meilleure utilisation des ressources en vue d'une efficacité maximale. Cette structure décidera de la nécessité ou non d'une revalidation complète ou partielle.

D'après S.W. Harder (5), pour les liquides et les semi-solides, surtout lorsqu'ils sont sensibles au développement microbien, la revalidation doit être effectuée au moins une fois par an jusqu'à ce qu'un historique fiable soit établi.

Pour les formes sèches, les revalidations peuvent être moins fréquentes si la validation initiale et les contrôles qui ont suivi ont donné entière satisfaction.

C'est une démarche ambitieuse qu'il ne sera pas facile de respecter.

Pour J. Agalloco (1), la revalidation périodique peut se faire selon un rythme à définir et la fréquence pourra être augmentée en cas de problèmes pour un meilleur suivi.

4- Aspect réglementaire

4- 1- Contexte américain (17)

Le guide des GMP (Good Manufacturing Practice) américain indiquait déjà en 1963 que "les équipements doivent être maintenus propres et rangés". Dès 1978, ce guide prend en compte la notion de **prévention** : la propreté des équipements doit permettre d'éviter les risques de contamination et d'altération des produits.

Puis la FDA (Food Drug Administration) s'est intéressée aux problèmes de contamination dus à des nettoyages insuffisants ou à un entretien défailant des équipements ou des installations.

Avec la manipulation de produits très actifs tels que les antibiotiques ou les hormones, la maîtrise du risque de contamination croisée est devenue incontournable et la validation du nettoyage a pris énormément d'importance.

Les exigences sont allées croissantes du fait d'un certain nombre de problèmes :

Certains lots de produit potentiellement ou réellement contaminés par des pénicillines ont été rappelés dans les années 70.

En 1988 la FDA mesure le risque de contamination croisée faute de procédures adaptées; un lot de cholestyramine est rappelé du fait de sa contamination par des produits intermédiaires et de dégradation d'un pesticide agricole alors que l'industrie pharmaceutique ne fabriquait aucun pesticide.

La cuve de fabrication était contaminée. Des bidons pour solvant de récupération semblent en cause. Ils auraient été contaminés par des solvants issus de la fabrication de pesticides et réutilisés pour des solvants entrant dans la fabrication de la cholestyramine.

La contamination provient d'un manque de contrôle sur la réutilisation

des bidons, d'un manque de contrôle sur les solvants et du fait que les procédures de nettoyage des bidons n'étaient pas validées.

Après l'étape de séchage du lot contaminé, c'est le sac du séchoir à lit fluidisé qui s'est trouvé contaminé et à l'origine de plusieurs autres lots contaminés.

En 1992, la FDA a refusé des lots de produits présentant un risque de contamination par des produits stéroïdiens du fait que la production des médicaments stéroïdiens et non stéroïdiens utilisaient les mêmes équipements; le fabricant débutait alors seulement un programme de validation du nettoyage au moment de l'inspection; ce programme a été jugé insuffisant par la FDA. L'une des raisons était que la recherche portait uniquement sur le produit initial, alors que, parmi les données brutes obtenues par le fabricant, un chromatogramme sur couche mince sur les eaux de rinçage mettait en évidence des produits de dégradation.

En 1993, la FDA a rédigé un **guide** à l'usage de ses inspecteurs spécifiquement axé sur la validation du nettoyage et décrivant les grandes lignes d'une démarche de validation.

Avec la mondialisation de l'industrie pharmaceutique, la prise en compte d'un tel guide est devenue incontournable.

4- 2- Guide d'inspection de la validation des procédés de nettoyage, à l'usage des inspecteurs de la FDA (17)

Ce guide traite uniquement des **résidus chimiques** au niveau du **matériel en contact avec les médicaments**. Les procédés de nettoyage doivent être **validés** et leur validation repose sur l'obtention d'un ensemble de données scientifiques qui garantissent que le résultat obtenu est effectivement celui escompté.

La FDA attend des fabricants qu'ils aient des **procédures écrites** détaillant les procédés de nettoyage des différentes pièces d'équipement dans les différents cas de figure (nettoyage de fin de lot, nettoyage de fin de campagne, nettoyage des matières hydrosolubles et des hydrophobes en précisant dans quels cas on utilise l'une ou l'autre).

Un matériel particulièrement difficile à nettoyer peut être **réservé** à un produit donné (sac des séchoirs à lit fluidisé).

Les résidus liés à l'étape de **nettoyage** elle-même (détergents, solvants..) doivent aussi être éliminés.

Des procédures générales doivent décrire comment les procédés de nettoyage seront validés, précisant qui sont les responsables de la réalisation et de l'approbation de l'étude de validation, quels sont les critères d'acceptation et dans quelles conditions la revalidation est nécessaire.

Le protocole de validation doit être écrit à l'avance en précisant le mode de prélèvement, les techniques analytiques utilisées et leur sensibilité.

Le protocole doit être respecté et les résultats doivent être documentés.

Ces derniers doivent être conservés et un rapport final de validation, approuvé par les responsables, doit conclure si le procédé de nettoyage est validé ou non, sur la base de données qui montrent que les résidus sont présents à un niveau acceptable.

Une **propreté visuelle** est suffisante entre plusieurs masses opératoires d'un même produit ou plusieurs lots issus d'une même masse. Dans ce cas, la validation n'est pas nécessaire.

Les points essentiels à intégrer dans la démarche sont les suivants :

- Pour chaque stade du nettoyage, il faut s'interroger sur la nécessité de l'étape, il faut définir l'efficacité attendue, évaluer l'efficacité obtenue en intégrant les risques de variations, surtout pour les opérations manuelles, que ce soit un nettoyage entre deux lots d'un même produit ou entre deux produits différents.

- Les plans des équipements doivent être disponibles, les zones difficiles à nettoyer doivent être bien identifiées et toutes les mesures doivent être prises pour que le nettoyage reste maîtrisé et que les points critiques soient gérés. La documentation doit être explicite quant à ces points critiques et le personnel doit en être informé et spécialement formé pour pallier toute perte de maîtrise.

- Les délais entre la fin de la fabrication puis, entre chaque étape du nettoyage, doivent être définis et respectés. Si les résidus sèchent avec le temps, la qualité du nettoyage peut en être affectée.

- Le risque de contamination microbiologique des équipements doit être pris en compte; il s'agit essentiellement d'éviter en amont cette contamination, c'est à dire d'empêcher le développement microbien plutôt que d'éliminer les micro-organismes après leur prolifération; ainsi, les équipements devront être séchés avant leur stockage et il ne devra jamais rester d'eau stagnante à leur niveau.

- La spécificité et la sensibilité des méthodes analytiques devront être déterminées. Du fait des progrès effectués dans le domaine analytique, les résidus peuvent être détectés à de très faibles quantités. S'ils sont en quantité trop faible pour être détectés, il ne faut pas en conclure qu'ils sont absents mais seulement qu'ils sont présents en quantité inférieure au seuil de quantification ou à la sensibilité de la méthode analytique.

Le pourcentage de résidus quantifiés par le dosage par rapport à la quantité de résidus réellement présents à la surface de l'équipement doit être déterminé; ceci intègre non seulement l'efficacité de la méthode de dosage mais aussi celle de la méthode de prélèvement. Il faudra en tenir compte dans le calcul final de la contamination résiduelle.

- Parmi les différentes méthodes de prélèvement, deux méthodes sont jugées acceptables : la méthode **par contact direct** avec la surface des équipements et celle qui utilise les **eaux de rinçage**.

La méthode par contact direct est celle qui doit être utilisée de préférence (Voir Chapitre 5).

Pour la méthode par rinçage, il ne suffit pas de tester la qualité de l'eau de rinçage mais il faut rechercher des contaminants potentiels dans cette eau.

Il existe des contrôles de routine in process, basés sur des mesures indirectes comme celle de la conductivité; ces méthodes peuvent être utilisées une fois que le nettoyage est validé. Encore faut-il prouver qu'un équipement mal nettoyé conduit à des résultats non conformes.

La méthode placebo doit nécessairement être complétée par une méthode par contact direct ou par les eaux de rinçage.

La méthode qui consiste à tester des échantillons jusqu'à obtenir des taux résiduels acceptables ne doit pas être utilisée; elle révèle plutôt que la technique n'est pas validée puisqu'elle met en évidence des traces de résidus à des taux inacceptables.

- Les limites d'acceptation doivent être établies par les entreprises au cas par cas, de manière rationnelle. Elles peuvent porter sur les principes actifs mais en fonction des produits, il faudra parfois rechercher les produits de dégradation en particulier s'ils présentent une certaine activité ou toxicité. De même il ne faut pas se focaliser sur le contaminant en plus grande quantité s'il en existe un autre particulièrement difficile à éliminer. Un screening préalable est parfois nécessaire.

La recherche de résidus pourra également porter sur les produits de nettoyage.

4- 3- Contexte français et européen

En 1978, la première version des bonnes pratiques de fabrication (BPF) française est diffusée, inspirée des GMP. Il s'agit alors d'une instruction ministérielle qui ne confère pas un caractère réglementaire aux BPF.

L'évolution de ce texte compte plusieurs étapes; en 1988, le décret du 6 mai, repris par l'article R.5115-9 du code de la santé publique, donne un cadre juridique aux BPF. Les établissements pharmaceutiques visés à l'article L.596 doivent se doter de bonnes pratiques de fabrication.

La CEE s'est dotée en 1989 d'un guide des bonnes pratiques de fabrication des médicaments.

La directive 91/356/CEE de juin 1991 fait référence à ce guide et prévoit son application par tous les états membres à partir du 1er janvier 1992.

L'article L. 600 du code de la santé publique a été modifié le 8 décembre 1992 de manière à ce que la fabrication des médicaments et des produits mentionnés à l'article L 658-11 soit réalisée en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication.

La portée juridique des BPF se trouve ainsi renforcée au stade de l'assise législative.

Le guide européen a été transcrit en droit interne; élaborée par l'agence du médicament, c'est actuellement la cinquième version du guide de bonnes pratiques de fabrication éditée en 1995 et rééditée en 1998 qui est en vigueur.

La première exigence des BPF est que le médicament fabriqué réponde aux critères de l'autorisation de mise sur le marché; ainsi, le médicament doit être **dépourvu de substances étrangères**, ce qui conduit à la notion d'élimination des résidus après nettoyage, qu'il s'agisse de résidus liés à l'étape de nettoyage elle-même ou de résidus du produit précédent, persistant du fait d'un nettoyage insuffisant.

4- 4- Guide des B.P.F. (16)

Plusieurs aspects en relation avec le nettoyage sont abordés :

- La formation (Chapitre 2 - Personnel)

Le personnel doit recevoir initialement, puis de façon répétée, une **formation théorique et pratique** sur le concept d'**assurance de la qualité** et sur les **bonnes pratiques de fabrication**.

Le fabricant doit assurer la formation de tout le personnel appelé à pénétrer dans les zones de production, y compris le personnel affecté aux opérations de nettoyage.

Le personnel travaillant en zone propre recevra une formation spéciale; or c'est là que s'effectue en général le nettoyage des équipements en contact direct avec les produits pharmaceutiques.

- Les équipements (Chapitre 3 - Locaux et matériel)

Leur plan, leur agencement, leur conception et leur utilisation doivent tendre à permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'**éviter les contaminations**, dont les contaminations **croisées**, et le dépôt de

poussières ou de saletés.

Le matériel de fabrication doit être **conçu** de façon à permettre un nettoyage **facile et minutieux**. Il doit être nettoyé selon des **procédures écrites détaillées** et rangé dans un endroit propre et sec.

Le matériel de lavage et de nettoyage doit être choisi et utilisé de manière à ne pas être une source de contamination.

- Particularités liées aux liquides, aux crèmes et aux pommades
(Ligne directrice particulière N°3)

Ces produits ont comme caractéristique d'être particulièrement vulnérables aux diverses contaminations, notamment microbienne.

C'est pourquoi les réservoirs, les récipients, les canalisations et les pompes doivent être conçus et installés de sorte qu'ils puissent être facilement nettoyés et, si nécessaire, désinfectés. En particulier, le matériel doit être conçu de manière à comporter un minimum de bras morts et d'emplacements où des résidus s'accumulent et contribuent à la prolifération microbienne.

- Documentation (Chapitre 4)

Pour la mise en service du matériel important, le nettoyage à réaliser doit être décrit dans les instructions de fabrication, ou du moins, la référence de la méthode à utiliser doit être mentionnée.

Des procédures écrites et, le cas échéant, les comptes rendus des mesures prises et des résultats obtenus, doivent être établis pour le nettoyage et la désinfection.

Le "cahier de route" qui accompagne les équipements importants doit mentionner, entre autres, les opérations de nettoyage avec les dates et le nom des personnes ayant effectué ce nettoyage.

- Prévention des contaminations (chapitre 5 - Production)

Des produits différents ne doivent pas faire l'objet d'opérations de fabrication consécutives dans le même local à moins qu'il n'existe aucun risque de contamination.

La contamination d'un produit par un autre doit être évitée. Ce risque de contamination croisée peut avoir pour origine des résidus provenant du matériel.

Parmi les contaminants les plus dangereux, on trouve les substances hautement sensibilisantes, les préparations biologiques contenant par exemple des organismes vivants, certaines hormones, les cytotoxiques ou d'autres médicaments hautement actifs. Les médicaments pour lesquels une contamination croisée revêt probablement une importance majeure sont les médicaments injectables et les médicaments administrés à fortes doses ou pendant une longue période.

Avant de commencer toute opération de fabrication, il convient de s'assurer de la propreté du matériel.

Des mesures techniques ou une organisation appropriée doivent pouvoir limiter la contamination croisée, comme par exemple

- . l'utilisation de procédures de nettoyage et de décontamination d'efficacité connue; un nettoyage insuffisant du matériel est une source habituelle de contamination croisée.
- . la vérification de l'absence de résidus et l'usage d'étiquettes mentionnant le statut "nettoyé" ou "non nettoyé" du matériel.

Les mesures prises pour prévenir la contamination croisée ainsi que leur efficacité doivent être contrôlées périodiquement selon des procédures prévues.

- La validation (chapitre 5 - Production)

Les études de validation doivent être menées conformément à des procédures définies. Les résultats et les conclusions doivent être consignés.

Les procédés et les procédures doivent être périodiquement soumis à une nouvelle validation critique en vue de confirmer leur aptitude à conduire aux résultats escomptés.

- Auto-inspection (chapitre 9)

La formation du personnel, le matériel, les documents doivent être examinés à intervalles réguliers, suivant un programme préétabli, de façon à vérifier leur conformité avec les principes d'assurance de la qualité.

4- 5- Champ d'application de la validation du nettoyage du matériel

La validation s'applique (18) :

- au matériel en contact avec le produit,
- au matériel nettoyé selon des modes opératoires semi-automatiques ou automatiques (machines à laver, NEP, système haute pression),
- au matériel commun à plusieurs produits.

Réglementairement, elle ne s'applique pas :

- au matériel nettoyé manuellement,
- au matériel réservé à un seul produit.

Les services concernés sont :

- les services de production et de mise sous forme pharmaceutique,
- les services de développement concernés par la préparation de lots cliniques.

Elle ne s'applique pas aux services de recherche, aux services de contrôle, ni aux services de développement non concernés par la préparation de lots cliniques.

5-Contamination et échantillonnage

5-1- Théorie de la contamination, de la dispersion et points critiques

Ces théories sont exposées par J. Agalloco (1).

5- 1- 1- Théorie de la contamination

Elle décrit comment les résidus sont présents au niveau d'un équipement, aussi bien avant, qu'après l'étape du nettoyage; la réalité se situe entre deux cas extrêmes, le cas de résidus solubles se rapprochant du "best case" alors que des résidus relativement insolubles se rapprocheront plutôt du "worst case".

"**Best case**", le meilleur des cas, distribution **uniforme** sur tout l'équipement, correspond à des résidus parfaitement solubles, libres de se répartir uniformément tel un film uniforme à la surface de l'équipement, si bien que l'échantillonnage de n'importe quelle surface est représentatif de la totalité de la surface de l'équipement.

"**Worst case**", le pire des cas, la distribution des résidus n'est pas uniforme à la surface de l'équipement; il faut donc sélectionner les surfaces à échantillonner avec beaucoup de précaution pour vérifier la propreté de l'équipement.

5- 1- 2- Théorie de la dispersion

Elle décrit comment la contamination résiduelle va se disperser dans un prochain lot; là encore, aucun des deux cas n'est représentatif de la réalité. La dispersion de résidus solubles dans des formulations du type solution se rapproche du "best case" alors que celle de petites quantités de

contaminants dans des formes solides va se rapprocher du "worst case".

"**Best case**", le meilleur des cas, la contamination résiduelle est **complètement dispersée** dans le prochain produit en contact avec la surface contaminée, il en résulte un faible niveau de contamination, croisée au sein du produit.

"**Worst case**", le pire des cas, la contamination résiduelle n'est pas dispersée uniformément dans le prochain produit en contact avec la surface contaminée mais la contamination se retrouve **concentrée dans certaines fractions du produit**, dans une seule unité de prise dans le cas extrême, ce qui implique des limites très serrées pour la contamination résiduelle.

5- 1- 3- **Points critiques**

Un point critique est une zone ou emplacement dans un système soumis à nettoyage où la perte de la maîtrise peut entraîner un risque de contamination et/ou un risque inacceptable pour la sécurité (opérateur, produit, équipement, environnement). Les points critiques sont déterminés par raisonnement et/ou par expérience. Ils ne sont pas figés et la validation peut nous enseigner une meilleure connaissance des points critiques (6).

- Au niveau des équipements :

- . Zones à **forte concentration de contaminants** telles que les fonds de cuve, les organes d'agitation...
- . Zones **difficiles à nettoyer** (ex. : grilles, cannes de barbotage, flexibles) = "hot spot".
- . Zones qui, si elles sont contaminées, peuvent entraîner une **contamination inacceptable** d'une unité de prise ou d'une partie d'un lot (trappes de vidange, poinçons, aiguilles de remplissage) = "critical site".

Exemples :

- . Un poinçon est un "critical site" mais pas un "hot spot".
- . Une hélice de mélangeur est un "hot spot" mais pas un "critical site" car la contamination résiduelle potentielle sera diluée.
- . Une aiguille de répartition est un "hot spot" et un "critical site".

D.W. Mendenhall (10) utilise l'expression "pockets of residual" où les résidus peuvent être retenus et insiste sur le fait que le risque essentiel réside dans un relargage de ces résidus à un état non dilué dans le produit suivant. La solution est dans la procédure de nettoyage qui doit par une attention particulière, éventuellement par un démontage supplémentaire, éviter ce risque.

- Au niveau de l'environnement : Il s'agit de zones dont la contamination présente un risque pour le produit telles que :

- . les plafonds des zones affectées aux formes sèches,
- . les siphons de sol,
- . les grilles de reprise d'air.

5- 2- Les méthodes d'échantillonnage

On distingue trois types de prélèvement, ayant chacun des avantages et des inconvénients (1,6, 7, 10, 16, 17).

5- 2- 1- Prélèvement de surface direct

C'est la méthode préconisée par la FDA.

Elle se subdivise en deux types de méthodes :

- Par essuyage ou écouvillonnage d'une surface délimitée, à sec ou avec un solvant.
- Par contact, d'une surface imbibée d'un solvant ou une empreinte gélosée d'une surface délimitée; la surface gélosée est appliquée sur la surface à analyser pendant un temps et avec une pression définie.

La méthode par essuyage ou écouvillonnage est difficile à standardiser pour les raisons suivantes : Force de frottement non constante (prélèvement manuel), geste et vitesse d'exécution peu reproductibles, risque de "redéposition" du contaminant prélevé.

La méthode par contact est plus facile à standardiser car les seules variables sont le temps de contact et la force d'application.

Il faut vérifier que ni le solvant, ni le support de prélèvement n'interfèrent sur les analyses ultérieures.

Il faut s'assurer, en particulier, que le support de prélèvement (tissu d'essuyage, écouvillon, ...) ne relarguera pas de substances capables d'interférer avec le contaminant recherché.

Le **solvant** est choisi pour son pouvoir de dissolution vis-à-vis du contaminant recherché mais aussi en fonction de la nature de la surface à prélever (PVC, silicone, acier inox...), du support de prélèvement utilisé et de sa facilité et de sa sécurité de manipulation; il peut s'agir d'eau de qualité équivalente à celle utilisée pour le rinçage final ou d'un solvant organique qui ne devra pas être un contaminant supplémentaire des surfaces.

Dans le cas d'un prélèvement bactériologique, l'écouvillon peut servir à ensemercer directement une boîte de Pétri ou les germes peuvent aussi être mis en suspension dans un milieu de recueil tamponné avant analyse.

Quand les résidus sont séchés ou insolubles, l'**action physique** liée au

frottement vient compléter l'action chimique du solvant de prélèvement pour aider à détacher les résidus de leur support.

Cette méthode s'applique aux **surfaces générales** comme aux **équipements**, dès lors que ces surfaces sont suffisamment accessibles.

La surface échantillonnée doit être bien délimitée; l'utilisation d'un gabarit est un moyen d'y parvenir.

L'échantillonnage porte sur une surface minimale telle que la quantité de contaminant récupérée entre dans les limites de détection ou de quantification de la méthode analytique.

Les surfaces les plus difficiles à nettoyer peuvent faire l'objet d'un prélèvement si elles sont suffisamment accessibles; on peut ainsi prélever et évaluer zone par zone la contamination : cette méthode permet donc une cartographie chiffrée de la contamination qui tient compte de l'hétérogénéité de la contamination.

Cette méthode ne permet pas de prendre en compte la contamination de la totalité des surfaces pour de grands équipements ou de grandes surfaces; l'interprétation passe donc par l'extrapolation du résultat obtenu pour la surface délimitée prélevée à la surface totale; ceci suppose la **détermination préalable de la surface totale** et la **maîtrise de la surface échantillonnée**, la contamination étant considérée comme proportionnelle à la surface.

Les surfaces échantillonnées doivent donc être choisies avec soin de manière à être représentatives de l'ensemble.

Il faut déterminer l'efficacité du prélèvement; il faut déterminer quelle proportion d'une quantité donnée de résidus présents sur une surface donnée se retrouve sur le support de prélèvement.

Ceci va bien sûr dépendre du protocole de prélèvement; il doit donc être décrit avec un maximum de précisions, afin d'être le plus reproductible possible.

Avant d'appliquer la technique de dosage, le contaminant est libéré du support; là aussi, seule une certaine proportion de contaminant va être dosée.

Le prélèvement ne permet pas de récupérer la totalité des résidus présents sur la surface échantillonnée mais seulement un certain pourcentage de ces résidus; il existe donc un **rendement de prélèvement**.

De même, la réponse obtenue après le traitement de l'échantillon ne correspond pas exactement à la quantité de résidus prélevée mais seulement à un pourcentage de cette quantité; il existe un **rendement de traitement de l'échantillon**.

La résultante de ces deux rendements est le **rendement de récupération**. Son évaluation est une étape obligatoire, effectuée en laboratoire, en se plaçant dans des conditions aussi proches que possible des conditions de prélèvement. Il faudra tenir compte de ce résultat dans l'évaluation de la contamination résiduelle.

Avec cette technique, la contamination peut être surévaluée par rapport à ce qu'elle serait dans le produit suivant entrant en contact avec la surface contaminée car le solvant utilisé, choisi de manière à être un très bon solvant des résidus recherchés, est particulièrement performant pour extraire les résidus de la surface, bien plus que le produit susceptible d'être contaminé.

La limite de cette méthode est que les surfaces facilement accessibles sont aussi les plus faciles à nettoyer.

Les zones moins accessibles sont plus difficiles à échantillonner et plus difficiles à nettoyer; ainsi, on ne prend pas en compte le pire des cas, la situation la plus défavorable au nettoyage, celle où la probabilité de mettre en évidence une contamination est maximale.

Cette technique a été adaptée par James M. Smith (14) à la recherche de traces de détergent dans les systèmes soumis à un nettoyage en place. Cette adaptation porte sur la recherche de traces d'un détergent à base d'acide phosphorique à la surface d'une plaque en acier inox type 316; la méthode s'avère juste et reproductible avec un haut niveau de récupération au moment du prélèvement puis au moment du dosage. Dans ce cas, le support de prélèvement est du papier filtre soumis à une "digestion" par de l'acide sulfurique concentré, étape qui permet une bonne "libération" des phosphates depuis le support, d'où leur prise en compte par la méthode de dosage.

La nature du support peut varier, tissu d'essuyage, écouvillon... , mais elle doit permettre de retenir les résidus au moment du prélèvement et de les libérer au moment du dosage.

W.K. Gavlick et collaborateurs (4) ont obtenu avec des écouvillons en polyester des rendements de récupération de 95 à 98 %. Il s'agit de détergents alcalins déposés sur des plaques en acier inoxydable écouvillonnées, le prélèvement est ensuite analysé par la méthode du carbone organique total.

Le prélèvement et le dosage se faisant avec des rendements inférieurs à 100%, il convient de chiffrer ces rendements, de se fixer un rendement de prélèvement minimum et un rendement de traitement de l'échantillon minimum, et de tenir compte dans le calcul de la contamination d'un rendement de récupération qui est la résultante de ces deux rendements.

En ce qui concerne les prélèvements bactériologiques, du fait des faibles rendements de récupération par écouvillonnage ou par contact, la méthode par brossage-lavage-récupération a été développée; à l'intérieur d'un cylindre, la surface est brossée en présence d'un milieu tamponné pouvant contenir de la trypsine. Sous l'action mécanique et enzymatique, les amas bactériens sont dissociés et se retrouvent en suspension dans le liquide de récupération.

5- 2- 2- La méthode par rinçage

Le prélèvement de solution de rinçage s'applique essentiellement aux **équipements** mais pas aux surfaces générales.

La méthode par rinçage est particulièrement adaptée aux **surfaces difficilement accessibles** notamment au sein d'équipements qui ne sont pas démontables.

Le prélèvement peut porter sur la surface totale d'un équipement, ce qui supprime la nécessité de mesurer cette surface totale puisqu'il n'y aura pas d'extrapolation à faire à partir d'une surface déterminée représentative comme dans la méthode par contact.

Cette technique est jugée acceptable par la FDA même si la méthode par contact direct reste préférable.

Cette méthode est très simple et ne nécessite pas le développement d'une méthode analytique complexe pour quantifier les résidus en solution; l'échantillon peut directement être dosé sans extraction préalable depuis une matrice ayant servi de support au prélèvement.

On peut réaliser une prise d'essai directe si le prélèvement est suffisamment concentré; sinon, une étape de concentration est nécessaire (extraction, évaporation, reprise par un volume minimum d'un solvant approprié, après évaporation à siccité).

Cette technique est particulièrement intéressante quand ce solvant entre dans la fabrication du produit suivant susceptible d'être contaminé.

Le dernier solvant de rinçage, en général de l'eau, est analysé pour déterminer le niveau résiduel de contaminant.

L'utilisation d'un autre solvant d'extraction est possible : on utilise un solvant choisi en fonction de son pouvoir dissolvant pour les résidus recherchés, mais aussi en fonction de la nature de la surface à prélever (silicone, PVC, acier inox..), de sa facilité et de sa sécurité d'emploi et de son coût.

Pour les pâteux, les résidus sont en général peu solubles dans l'eau et un rinçage avec un solvant adapté à la matrice pâteuse peut être envisagé mais c'est une démarche lourde de conséquence car il faut ensuite maîtriser les résidus de solvant...

Tout se passe comme si on réalisait un dernier rinçage avec ce solvant.

Quel que soit le solvant, dernière eau de rinçage ou solvant d'extraction approprié, le volume utilisé pour ce dernier "rinçage" devra être parfaitement connu de manière à calculer la quantité totale de contaminant d'après la teneur en résidus dans ce volume. L'interprétation reste délicate; la courbe suivante (Figure n°1) illustre la difficulté de déterminer d'après une teneur en principes actifs ou en détergents, dans les eaux de lavage ou de rinçage, la teneur résiduelle sur l'équipement.

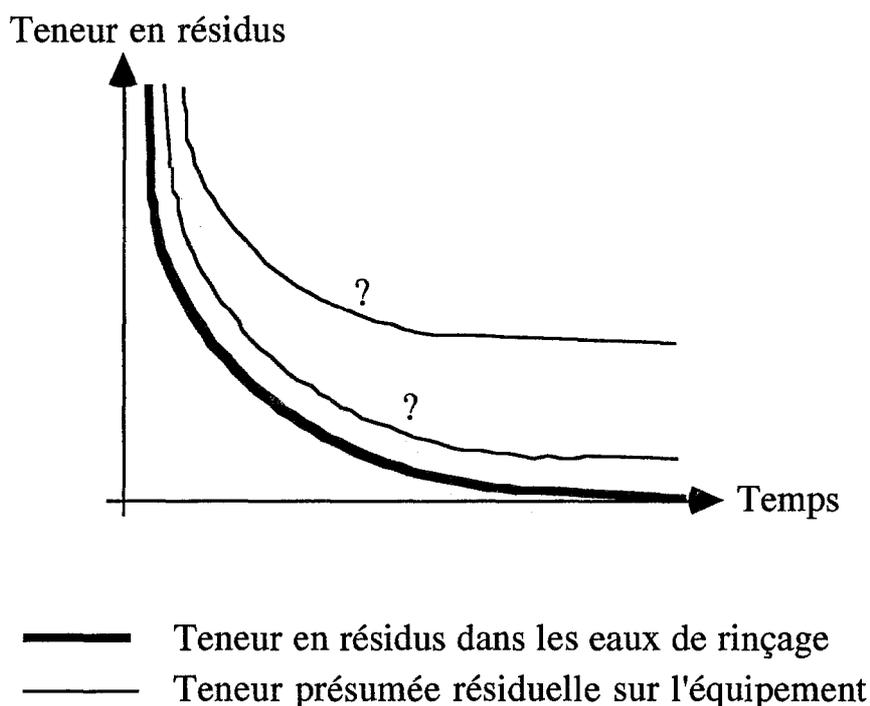


Figure n°1 : Décroissance de la concentration d'un contaminant dans les eaux de rinçage et à la surface de l'équipement.

La teneur décroît en fonction du temps, mais comment passer de ce qui est en solution à ce qui est en surface?

Les autres limites de cette méthode sont une dissolution insuffisante des résidus et le fait que les résidus puissent être trop dilués notamment dans les dernières eaux de rinçage.

Si le résidu n'est pas soluble dans l'eau, pour les résidus séchés ou retenus physiquement à la surface de l'équipement, il est insuffisant de se baser sur les derniers fluides de rinçage, il faut nécessairement évaluer l'état de la surface.

Le risque est trop grand de conclure à un nettoyage faussement correct; l'action physique du frottement ne vient pas compléter le pouvoir dissolvant du fluide de rinçage comme dans les méthodes par contact.

Il est insuffisant de tester les paramètres de l'eau en suivant par exemple une monographie de type Pharmacopée. Il faut rechercher les résidus ou

contaminants potentiellement présents dans l'eau de rinçage.

Les trois méthodes les plus utilisées sont :

- par remplissage, agitation si possible ou circulation pendant un temps suffisant pour entraîner les contaminants, puis vidange.
- par trempage des pièces, petit matériel dans un volume de solvant précis pendant un temps donné.
- par rinçage d'un matériel dans des conditions définies.

En pratique, cette méthode est à réserver à des cas particuliers tels que des solutés aqueux.

Il est souhaitable d'établir un parallèle avec les méthodes par prélèvement de surface.

5- 2- 3- La méthode placebo

Cette méthode consiste à effectuer des prélèvements sur un placebo préparé dans les mêmes conditions et les mêmes équipements, nettoyés selon la méthode à valider.

La méthode est inutilisable pour les surfaces qui n'entrent pas directement en contact avec le produit.

Deux types de placebo peuvent être utilisés :

- placebo réel : formule du produit sans principe actif,
- placebo spécifique : formule contenant un nombre limité d'excipients (exemple : eau distillée pour les injectables aqueux).

Elle peut être utile pour déterminer quelle quantité de résidus de surface peut être solubilisée ou épuisée par entraînement dans un lot de produit placebo. Ceci permet de se placer dans les conditions exactes du process, de tester le risque de contamination en se plaçant dans les conditions réelles du process.

Un échantillon du placebo est ensuite analysé pour déterminer son niveau de contamination résiduelle. Connaissant le facteur de dilution, la quantité totale de résidus pour un lot de taille déterminée peut être calculée d'après les valeurs obtenues pour l'échantillon.

Si cette méthode semble donner la quantité réelle de résidus dans le produit suivant, elle est beaucoup plus **complexe d'un point de vue analytique** ; la préparation des échantillons sera similaire à celle des analyses de routine, les résultats pourront être faussés du fait notamment de la trop grande dilution du contaminant au sein du placebo et de l'hétérogénéité de la distribution du contaminant dans le placebo.

En effet, la contamination n'est pas uniformément répartie au niveau de l'équipement et ne le sera pas non plus au sein du lot placebo; par exemple, les résidus d'une vanne de décharge vont essentiellement contaminer la première fraction du lot placebo.

Pour pallier ce problème, l'échantillonnage doit être effectué en conséquence.

Ainsi, par exemple, pour une cuve de fabrication, trois prélèvements sont à prévoir : lors de la vidange, au début, au milieu et à la fin; la contamination de la vanne sera principalement récupérée dans l'échantillon du début.

Des indications sur des contaminations résiduelles situées dans les valves et tuyaux seront mises en évidence.

De plus, le pouvoir de récupération du pseudo-produit varie d'une formulation à l'autre et il est très difficile de déterminer les conditions les plus propices à une contamination (worst case), conditions à prendre en compte dans le cadre de la validation.

Ainsi, il faudrait prendre en compte plusieurs pseudo-formulations faute de trouver laquelle vaut pour les autres, ce qui rallonge la démarche de validation.

De plus, la mise en oeuvre du process pour la réalisation du placebo coûte cher (mobilisation du matériel, énergie). C'est donc une méthode relativement coûteuse.

Cette méthode n'est pas préconisée par la FDA pour qui elle ne doit être utilisée que conjointement à la méthode par prélèvement direct des surfaces ou à la méthode par rinçage.

6- Traitement de l'échantillon

6- 1- Méthodes physico-chimiques

La méthode analytique idéale doit être (7, 23) :

- simple, facile à mettre en oeuvre,
- peu onéreuse, faisant appel à du matériel disponible,
- quantitative,
- spécifique vis-à-vis de la substance recherchée,
- validée,
 - . Exactitude, robustesse et sensibilité vérifiées,
 - . Seuils de détection et de quantification de la substance recherchée connus,
 - . Au voisinage de la limite tolérée, la linéarité est vérifiée et la précision (répétabilité, reproductibilité) est déterminée,
 - . La quantification minimale doit être de l'ordre du microgramme sur le prélèvement analysé,
- adaptée à la méthode de prélèvement.

Les méthodes analytiques sont plus ou moins complexes.

Parmi les plus simples et les plus rapides, on trouve les méthodes basées sur les paramètres suivants :

- **Caractères organoleptiques.**

La recherche d'une odeur est un bon test qualitatif, la détection visuelle, éventuellement à l'aide d'un microscope, est subjective et n'est pas quantitative mais elle est assez sensible (1 à 4 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$).

- **pH.**

- **Résistivité ou conductivité.**

- **Résidu à l'évaporation.**

- **Dosage acide/base qui permet une quantification précise avec un seuil de détection satisfaisant.**

- **Analyse de l'eau.**

Le test consiste à comparer la qualité de l'eau ou du solvant avant et après nettoyage; toutes les méthodes sont utilisables, en particulier celles décrites dans les monographies de la Pharmacopée Européenne.

- **Spectrométrie UV et visible.**

Les méthodes suivantes sont plus complexes :

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)**, qualitative ou semi-quantitative, avec un seuil de détection parfois insuffisant.

- **Chromatographie liquide haute performance (CLHP)**, quantitative. Sa mise en oeuvre nécessite un appareil et un personnel qualifiés. Elle permet la mise en évidence de produits de dégradation.

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**, ses caractéristiques sont les mêmes que pour la CLHP mais elle est plus rarement employée.

- **Méthodes biochimiques.**

Il existe des kits de dosage enzymatique de composés organiques dont la spécificité et le seuil de détection sont très bons.

- Carbone organique total (C.O.T.).

C'est une méthode particulièrement sensible avec des seuils de détection de l'ordre du ppb. La quantification n'est pas spécifique. Elle n'est utilisable que pour les échantillons aqueux. L'appareillage est coûteux.

Le tableau ci-dessous présente les caractéristiques essentielles des principales méthodes.

Tableau XI : Caractéristiques des principales méthodes d'analyse physicochimique (1, 6, 7).

	Sensibilité	Spécificité	Identification	Rapidité résultat	Simplicité mise en oeuvre	Coût
Caract. organolept.	+	+	non	+++	+++	+
Résistiv./conductiv.	++	+	non	+++	+++	++
pH	++	+	non	+++	+++	++
Dosage acide/base	++	+	oui	++	++	++
Perte dessiccation	++	+	oui	++	++	+
Spectrophotométrie	+++	++	oui	++	+++	++
CCM	++	+++	oui	++	++	++
CLHP	+++	+++	oui	++	+	+++
CPG	+++	+++	oui	++	+	+++
Biochimie	+++	+++	oui	++	++	++
COT	+++	non	oui	++	++	+++

+ : Faible

++ : Moyen

+++ : Elevé

Tableau XII : Domaines d'application (1, 6, 7).

	Résidu chimique	Excipient	Agent de nettoyage	Application type	Remarques
Caract. organol.	oui	oui	oui	*	
Résistiv./ conductiv.	non	non	oui	détergents	Possibilité de contrôle en ligne (préparation minimale de l'échantillon et résultat immédiat).
pH	non	non	oui	détergents acides ou basiques	Possibilité de contrôle en ligne (préparation minimale de l'échantillon et résultat immédiat). Résidus aqueux uniquement.
Dosage acide/base	non	non	oui	détergents	
Perte dessiccation	oui	oui	oui	*	Résidus organiques et inorganiques
Spectropho- métrie	oui	oui	non	*	Echantillonnage par écouvillonnage ou par rinçage. Utilisable pour les produits biopharmaceutiques. Lecture directe possible, quantification moins spécifique.
CCM	oui	oui	non	*	Echantillonnage par écouvillonnage ou par rinçage.
CLHP	oui	oui	non	*	Echantillonnage par écouvillonnage ou par rinçage. Utilisable pour les produits biopharmaceutiques.
CPG	oui	oui	oui	CV	
Biochimie	oui	oui	non	*	
COT	oui	oui	oui	protéines	Large spectre limité aux produits organiques. Utilisable pour les produits biopharmaceutiques. Echantillons aqueux uniquement. Possibilité de contrôle en ligne (préparation minimale de l'échantillon et résultat immédiat). Echantillonnage par écouvillonnage (support synthétique : polyuréthane ou polyester) ou par rinçage.

* : Tout type d'application

CV : Composés volatils

6- 2- Méthodes microbiologiques

Des méthodes rapides mises au point dans l'industrie agro-alimentaire viennent s'ajouter aux méthodes décrites à la Pharmacopée Européenne.

Les méthodes décrites à la pharmacopée européenne sont les suivantes :

- Filtration sur membrane.

Elle ne convient qu'aux échantillons sous forme liquide.

- Ensemencement direct.

Elle convient aux échantillons solides ou liquides. Elle peut dispenser d'un prélèvement pour le petit matériel.

- Test LAL.

Il existe des méthodes qualitatives et quantitatives.

Un résultat positif peut témoigner d'une contamination microbiologique ancienne. Ce test, applicable uniquement aux formes stériles, constitue un complément aux méthodes de dénombrement des germes vivants.

D'autres méthodes, plus rapides, sont peu sensibles et sont par conséquent utilisables uniquement pour des échantillons très contaminés (10^3 à 10^5 cellules / ml, 10^3 à 10^4 germes /cm²); avec une incubation préalable, ces techniques deviennent beaucoup plus sensibles mais leur temps de réponse devient similaire à celui des méthodes décrites à la Pharmacopée Européenne et elles perdent alors beaucoup de leur intérêt.

- L'ATP-métrie.

Cette méthode repose sur le dosage de l'ATP, première source d'énergie pour les organismes vivants. En mesurant la quantité d'ATP endocellulaire préalablement libérée des cellules vivantes de l'échantillon, les taux d'ATP étant constants pour une trentaine de micro-organismes, on en déduit le nombre de micro-organismes dans l'échantillon.

A l'aide d'un photomètre, on mesure l'émission lumineuse consécutive à la réaction entre la luciférine, la luciférase et

l'ATP.

Le résultat est exprimé en unité de bioluminescence (URL) et non en comptage direct : il faut donc le corrélérer à une quantité de cellules.

C'est une méthode semi-quantitative dont les résultats peuvent être faussés par l'ATP des substances organiques et l'ATP des micro-organismes morts.

Les nombreux faux positifs et faux négatifs ne permettent pas une bonne corrélation avec les méthodes des pharmacopées.

- **L'épifluorescence.**

Cette technique repose sur la coloration à l'acridine orange des acides nucléiques (l'ADN en vert, l'ARN en orange) des bactéries préalablement retenues sur une membrane filtrante.

Les signaux émis par les micro-organismes sont fonction de leur activité métabolique.

Le microscope à épifluorescence peut être couplé à un système de comptage automatique d'analyse d'images.

C'est une méthode quantitative. Théoriquement, cette méthode permet de ne détecter que les micro-organismes viables, mais certains micro-organismes non viables émettent une fluorescence et sont donc pris en compte.

Les nombreux faux positifs ne permettent pas une bonne corrélation avec les méthodes des pharmacopées.

- **L'impédancemétrie** est une méthode plus sensible (environ 100 germes / cm²) et donne assez rapidement des résultats. Cette technique est fondée sur la mesure des variations d'impédance d'un milieu de culture, liées au métabolisme bactérien.

La mesure de ces variations permet de tracer des courbes spécifiques dont le point d'inflexion est d'autant plus court que la quantité initiale de micro-organismes est élevée.

Tableau XIII : Caractéristiques des principales méthodes d'analyse bactériologique (7).

	C	E	R	RMC	Fiabilité	Identification	Rapidité résultat	Simplification	Automatisation	Coût
Incubation d'une gélose										
- boîte contact	X				+++	oui	2-5 j	+++	non	+
- film à réhydrater	X		X		++	oui	2-5 j	++	non	+
Ensemencement direct	X	X		X	+++	oui	14 j	+++	non	+
Filtration sur membrane			X	X	+++	oui	7 j	+++	non	+
ATP-métrie			X	X	+	non	3-5 mn	+++	non	++
Epifluorescence			X	X	++	oui*	1-2 h	++	oui	+++
Impédancemétrie		X	X	X			4-20 h	++		++
Test LAL			X		+++	non	qqes h	++	oui	++

C : Contact

E : Ecouvillonnage

R : Prélèvement stérile des eaux de rinçage

RMC : Répartition de milieux de culture

+ : Faible

++ : Moyen

+++ : Elevé

* : Pour quelques germes

7- Critères d'acceptation

Il n'existe pas d'exigences réglementaires des critères d'acceptation; ces critères doivent être fixés au cas par cas en fonction de l'activité. Ils doivent résulter d'une démarche rationnelle scientifique qui garantit leur pertinence.

7- 1- Paramètres influençant les critères d'acceptation

Un certain nombre de paramètres sont à prendre en compte pour la détermination des critères d'acceptation.

7- 1- 1- Paramètres liés au contaminant

De manière générale, plus la molécule est **active ou toxique à faible dose**, plus la limite sera **basse**.

Au stade de la fabrication industrielle, les paramètres suivants sont connus et déterminants pour une limite :

- la dose thérapeutique,
- la dose pharmacologique,
- la dose minimale ayant un effet thérapeutique ou la dose maximale sans effet toxique,
- la dose unitaire,
- la plus petite dose commercialisée.

En revanche, au stade de la recherche et du développement, le seul critère dont on dispose est souvent la **dose létale 50**.

Pour des substances qui ne sont pas pharmacologiquement actives, telles que les produits de nettoyage, on se réfère à la **dose toxique**.

Pour les molécules allergisantes, le **risque allergique** existe pour des **doses très faibles**; ce paramètre prévaut sur les précédents. Comme pour les produits très toxiques, les limites devront être tellement basses qu'il peut être préférable de **dédier** une partie de l'équipement ou l'équipement complet par produit plutôt que d'essayer de valider leur nettoyage; c'est parfois le site lui-même qui est dédié (6, 17).

La **stabilité** de la molécule est un point important puisque l'étude portera sur le métabolite prépondérant actif ou non si la molécule est dégradée par le nettoyage.

7- 1- 2- Paramètres liés à l'équipement : Surfaces en contact avec le produit, points critiques

Plus la surface en contact avec les produits est importante et plus le risque de contamination est grand donc plus la contamination de la surface devra être réduite.

Pour estimer le risque sur le produit final, il faut prendre en compte l'ensemble des équipements et des surfaces en contact avec les produits. Cependant, on peut raisonner équipement par équipement, notamment en recherche et développement où l'utilisation du matériel est beaucoup plus aléatoire qu'au cours d'un process industriel; les limites fixées par équipement doivent tenir compte de l'**accumulation** des contaminations sur chaque équipement.

7- 1- 3- Paramètres liés au lot suivant : Taille du lot, unité de prise, prise journalière

Plus la taille du lot suivant est grande et plus l'effet de **dilution** de la contamination résiduelle joue, autorisant des critères d'acceptation moins stricts.

En revanche, plus l'unité de prise du produit suivant est importante et plus la prise journalière est importante, plus le risque d'absorption de contaminant est grand, ce qui va vers des exigences plus strictes.

7- 1- 4- **Facteur de sécurité**

Il permet de tenir compte des conditions les plus défavorables et notamment du fait que la répartition du contaminant ne soit pas parfaitement uniforme (8).

Le facteur de sécurité est souvent égal à 1000 (3).

Le premier facteur 10 correspond au fait que les molécules médicamenteuses sont souvent considérées comme non actives à un dixième de leur dose normalement prescrite.

Le deuxième facteur 10 est un facteur de sécurité.

Le troisième facteur 10 correspond au fait que le programme de validation doit être robuste et rester acceptable dans un monde où les exigences croissent rapidement.

Parfois, il ne s'agit pas d'un coefficient multiplicateur mais d'une réduction logarithmique.

Pour de nouveaux produits, les facteurs de sécurité doivent être particulièrement sévères, mais ils pourront être revus quand suffisamment d'informations concernant la toxicité et les risques liés à ces nouveaux produits auront pu être accumulées.

7- 2- **Critères d'acceptation physico-chimiques**

7 - 2- 1 - **Critère visuel**

Même s'il est préférable d'utiliser une méthode quantitative, le critère visuel a son importance.

La propreté visuelle doit être **préalable** à toute autre méthode de détermination des résidus.

Pour un équipement affecté à un seul produit, le contrôle visuel après nettoyage peut tenir lieu de critère de validation.

Des études montrent que les substances actives de la plupart des produits sont visibles sur une plaque en acier inoxydable de 25 cm² jusqu'à environ 100 µg / 4 pouces² soit 4 µg / cm² selon G.L.Fourman *et al* (3). Selon K.M. Jenkins *et al* (6), en travaillant sur une plaque en acier inoxydable de 225 cm², des substances actives, des sels tamponnés et des agents de nettoyage, la limite est de 1 µg / cm².

C'est une évaluation subjective qui dépend des conditions d'éclairage et de la surface observée, la sensibilité étant plus importante pour une surface plus grande.

Cette limite peut être suffisante pour les produits peu toxiques, les équipements dédiés, les équipements qui ne sont pas en contact direct avec le produit ou pour le nettoyage en cours de campagne.

7- 2- 2 - Limite de détection

Ce type de limite pose problème du fait des constants progrès des techniques analytiques; sans corrélation avec l'activité thérapeutique ou la toxicité, cette limite ne devrait pas être retenue.

Elle ne dépend que de la technique analytique choisie. L'absence de détection ne signifie pas l'absence de résidus mais une **quantité de résidus inférieure au seuil de détection**. Il faut impérativement s'assurer que la technique est suffisamment **sensible** (1, 8).

Du fait que les seuils de quantification diminuent nettement, il faut admettre la notion de quantité-seuil sans effet néfaste pour le consommateur; c'est un concept difficile à faire accepter du grand public (19). La présence du résidu est avérée, elle est même chiffrable et bien qu'acceptable, elle est difficilement acceptée.

7- 2- 3 - Limites basées sur des formules faisant intervenir les paramètres énoncés au chapitre 7-1

Les paramètres sur lesquels vont reposer les limites d'acceptation sont nombreux (1, 6, 8, 17). Les limites peuvent être exprimées dans plusieurs unités; leur ordre de grandeur est fonction du mode

d'expression. Elles ne peuvent donc pas être comparées sans précautions préalables (8).

A est le produit à nettoyer et B le produit suivant.

La quantité de résidu peut s'exprimer en unité de masse du produit A ou en unité de masse du principe actif contenu dans le produit A.

La quantité de résidu peut être exprimée :

- en unité de masse du résidu; il s'agit de la quantité limite de résidu pouvant être présente à la surface totale de l'équipement ou dans le volume total de la solution utilisée pour le prélèvement par rinçage.

Limite = m

- en unité de masse du résidu par unité de masse du produit B;
Limite = m / masse du produit B (%m/m, ppm...).

- en unité de masse du résidu par unité de volume de la solution utilisée pour le prélèvement par rinçage; c'est la concentration limite de la solution utilisée pour le prélèvement par rinçage.

Limite = m / volume de solution utilisée pour le prélèvement par rinçage (%m/v, ppm...).

- en unité de masse du résidu par unité de surface de l'équipement

Limite = m / surface de contact (mg/cm², g/100 cm²...)

- en unité de masse du résidu par prélèvement de surface écouvillonnée

Limite = m . surface écouvillonnée / surface de contact (mg/prélèvement)

Exemples de limites les plus souvent citées :

- ≤ 1 ppm de principe actif de A dans le produit B

Le nombre de ppm fixé est **arbitraire**, mais 1 ppm ou 10 ppm sont des critères souvent rencontrés pour des molécules actives sans toxicité particulière.

Dans les équations ci-dessous, les limites sont exprimées en fonction de divers paramètres liés au produit A précédant le nettoyage, au produit B qui suit le nettoyage et à l'équipement.

On définit les paramètres suivants :

- FS est un facteur de sécurité.
- D est une dose en principe actif de A liée à l'activité du produit.
- C est la capacité de l'équipement considéré, la taille de lot du produit B.
- P est l'unité de prise du produit B.
- J est le nombre d'unités de prise par jour du produit B.
- L est la surface de contact commune à A et B.
- M est la surface de prélèvement écouvillonnée.

Certaines limites sont en relation avec un paramètre relatif à l'**activité** ou à la **toxicité** de A et intègrent un **facteur de sécurité arbitraire**. La limite peut être exprimée par unité de prise P du produit B.

- Limite en unité de masse du principe actif de A par unité du produit B $(P) = FS \cdot D$

En intégrant les **paramètres liés au produit suivant** que sont l'**unité de prise** de B et la **taille de lot** de B, la limite n'est plus exprimée par unité de prise de B, mais en **contamination totale**.

- Limite en unité de masse du principe actif de A pouvant contaminer la surface de contact totale et se retrouver dans un lot de produit B $= (FS \cdot D) \cdot (C/P)$

La même limite peut être retenue, non pas dans P, l'unité de prise du produit B, mais dans la **quantité maximale journalière (P.J)** de produit B.

En intégrant les paramètres liés au produit suivant que sont l'**unité de prise** de B et la **taille de lot** de B, la limite n'est plus exprimée par unité de prise de B, mais en contamination totale.

- Limite en unité de masse du principe actif de A pouvant contaminer la surface de contact totale et se retrouver dans un lot de produit B = $(FS \cdot D) \cdot C/(P \cdot J)$

En intégrant les paramètres liés à la **surface de contact**, on peut exprimer cette limite par unité de surface.

- Limite = $(FS \cdot D) / L$

En intégrant la **surface de prélèvement**, on peut établir des limites exprimées en quantité de contaminant dans l'échantillon.

- Limite = $(FS \cdot D) \cdot (M/ L)$

Pour se placer dans les conditions les plus défavorables, D est une dose minimum en principe actif de A, C est la taille du plus petit lot fabriqué dans l'équipement considéré, P est l'unité de prise maximale du produit B et J le nombre maximal d'unités de prise par jour.

FS	D	
1/1000	DU	Dose unitaire
	DMTJ	Dose minimale thérapeutique journalière
	DJPA	Dose journalière pharmacologique active

Une autre approche consiste à se baser sur les **points critiques** pour se placer dans le cas du scénario le plus défavorable, déterminer des limites en fonction de ces points critiques et les appliquer à toutes les surfaces. Il est cependant plus judicieux de définir pour ces points critiques des **limites spécifiques** indépendantes des limites fixées pour l'ensemble des surfaces.

7- 2- 4 - Démarche rationnelle basée sur la détermination de plusieurs limites

C'est ce que propose Fourman *et al* (3); la quantité résiduelle est telle que les trois critères suivants sont respectés :

- Aucune trace de résidus n'est visible à l'oeil à la surface de l'équipement.
- Pas plus d'1 millième de la dose journalière minimale en principe actif d'un produit se retrouve dans la dose journalière maximale d'un autre produit (facteur de sécurité = 1000).

Equation 1 : Limite = $I/J \cdot K/L \cdot M$

où

I est égal à 1/1000 DJMA

J est le nombre d'unités de prise par jour du produit B.

L est la surface de contact commune à A et B.

M est la surface de prélèvement écouvillonnée.

Il s'agit de la limite 1/1000 DJMA proposée au chapitre précédent exprimée par prélèvement.

Cette quantité limite en principe actif du produit A se retrouve dans une quantité (P. J) de produit B.

Pour se ramener à la contamination totale, la limite devient $(1/1000 \cdot DJMA) \cdot C/(P \cdot J)$

Pour se ramener à la contamination par échantillon de surface écouvillonnée, la limite devient

$(1/1000 \cdot DJMA) \cdot C/(P \cdot J) \cdot M/L$

En posant $K = C/P$, la limite devient $I \cdot K/J \cdot M/L$

- Pas plus de 10 ppm d'un produit se retrouvent dans un autre produit.

Equation 2 : Limite = $10 \cdot C \cdot M/L$

où

C est la capacité de l'équipement considéré, donc la taille du lot du produit B.

Un certain nombre de produits répondent aux 2 dernières exigences et restent pourtant visibles tels que les comprimés de chlorure de sodium USP.

Tableau XIV : Influence des principaux paramètres sur la détermination des limites d'acceptation.

	Produit 1	Produit 2 Dosage faible	Produit 2 Dosage fort	Produit 3	Produit 4
D : Plus faible dosage (mg)	50	15	15	200	1 000
J : Nombre maximum d'unités par jour	1	6	3	4	8
K : Nombre d'unités par lot	40 000	65 000	90 000	30 000	35 000
M : Masse d'une unité (mg)	400	200	400	500	750
C : Masse d'un lot (kg)	16	13	36	15	26
Surface d'équipement en pouces ² -> S = Surface commune					
Tamis : 2000	x		x		
Broyeur : 1000		x			x
Mélangeur : 3000	x	x	x	x	x
Presse : 1500	x	x	x	x	x
Enrobeur : 2000			x		x
Limite résiduelle selon le critère visuel = 0,100 mg/prélèvement					
APRES LE PRODUIT 1					
Limite selon équation 1		0,481	0,923	0,333	0,194
Limite selon équation 2		0,116	0,222	0,133	0,233
APRES LE PRODUIT 2 A FAIBLE DOSAGE					
Limite selon équation 1	0,533		0,400	0,100	0,048
Limite selon équation 2	0,142		0,320	0,133	0,189
APRES LE PRODUIT 2 A FORT DOSAGE					
Limite selon équation 1	0,369	0,144		0,100	0,040
Limite selon équation 2	0,098	0,116		0,133	0,160
APRES LE PRODUIT 3					
Limite selon équation 1	7,111	1,925	5,333		0,778
Limite selon équation 2	0,142	0,115	0,320		0,231
APRES LE PRODUIT 4					
Limite selon équation 1	35,555	7,878	18,461	6,667	
Limite selon équation 2	0,142	0,095	0,222	0,133	

Après avoir calculé les 2 premières limites et en prenant **100 µg / 4 pouces²** comme limite pour une **propreté visuelle**, on retiendra comme critère de la validation celui qui est le plus exigeant.

Le produit 1 peut être suivi par le produit 2 à deux dosages différents, par le produit 3 ou le produit 4. On détermine les deux premiers critères; le troisième critère restant inchangé, égal à 100 µg / 4 pouces². On doit sélectionner le **critère le plus restrictif**.

On pratique de même pour chaque produit pouvant à son tour être suivi par tous les autres produits.

Le critère de validation du nettoyage après le produit 1 doit être 100 µg / prélèvement (critère visuel).

En procédant de même après le produit 2, c'est le produit 4 dans l'équation 1 qui donne la limite la plus restrictive soit 48 µg / prélèvement.

Après le produit 2 à fort dosage, la limite est 40 µg / prélèvement.

Après le produit 3, la limite est 100 µg / prélèvement.

Après le produit 4, la limite est 95 µg / prélèvement.

La prise en compte de la cumulation des surfaces dans le calcul des limites est importante car elle permet d'éviter que le lot ne se charge en fractions de limites à chaque étape du process et accumule assez de fractions pour dépasser la limite totale avant la fin du processus.

7-2-5- Limite exprimée en nombre d'unités du produit suivant à éliminer (8)

Ce type de limite est utile quand la contamination n'est pas uniforme.

Pour une limite de 0,3 µg / cm² sur une surface de 5000 cm² et des unités de 5 ml, si toute la contamination se retrouve dans une seule unité de prise, la contamination dans la première unité sera la suivante :

$$(0,3 \times 5000) / 5 = 300 \text{ µg / ml soit } 300 \text{ ppm}$$

Si la limite exprimée en quantité de résidu dans le produit suivant est de

5 ppm, il faut détruire 60 unités au démarrage du produit B. Des études complémentaires peuvent permettre de réduire ce nombre d'unités en faisant passer un placebo après nettoyage et en vérifiant à partir de quelle unité remplie la concentration en résidu devient inférieure à 5 ppm.

7- 3- Critères d'acceptation bactériologiques

Comme pour la contamination physico-chimique, il n'existe pas de norme et les limites doivent être définies en interne par les entreprises en fonction des produits et des équipements. Dans ce cas, les limites sont encore plus difficiles à établir.

On ne peut pas espérer l'absence complète de micro-organismes sauf après stérilisation ou après sanétisation. Or, un seul micro-organisme va pouvoir occasionner une contamination microbienne beaucoup plus importante dans le produit suivant.

Des entérobactéries du type *Escherichia coli* ou *Enterococcus* ne sont pas acceptables (8).

L.A. Dell, comme le cite S.W. Harder (5), propose une limite de :

- moins de 2 CFU / cm² pour les bactéries.
- moins de 1 CFU / cm² pour les moisissures.

(CFU : Colony Forming Unit)

La validation du nettoyage d'un point de vue bactériologique n'est pas facile du fait de la difficulté à interpréter statistiquement les résultats (5). Cependant, un programme complet doit permettre de définir la contamination moyenne, de définir les limites acceptables et des contaminations nécessitant des contrôles complémentaires ou plus fréquents jusqu'au retour à des contaminations définies comme "normales" (11).

2ème partie :

Mise au point du protocole de validation du nettoyage après production du Baume Algipan

1- Procédure générale de validation-qualification

Cette procédure générale s'applique aux équipements, aux installations et aux procédés utilisés sur le site UCB de Limay; le nettoyage se situe dans le groupe des procédés, au même titre que les procédés de fabrication et les méthodes analytiques.

1-1- Processus de la validation d'une méthode ou d'un procédé

Le processus se décompose en 4 phases qui sont les suivantes :

1-1-1- Phase 0 : Rédaction des documents

C'est l'étape de rédaction des modes opératoires de nettoyage internes.

1-1-2- Phase 1 : Constitution de l'équipe de validation

L'équipe de validation est constituée dès le démarrage du projet par le service assurance qualité, en collaboration avec le chef du service production.

En plus des responsables assurance qualité, contrôle qualité et production, l'équipe se compose de l'assureur qualité production, d'un technicien du service contrôle qualité et d'un opérateur de production.

1-1-3- Phase 2 : Protocole de validation

Le protocole de validation est rédigé par le service assurance qualité et approuvé par les services concernés (contrôle qualité et production).

Il comprend :

- le plan d'échantillonnage (nombre de prélèvements nécessaires, quantités prélevées),
- la planification des essais,
- la détermination des points critiques à valider,
- les méthodes d'analyses utilisées,
- les critères d'acceptation des résultats.

1-1-4- Phase 3 : Validation proprement dite

Elle permet de fournir la preuve que le procédé utilisé aboutit à des résultats conformes aux limites préétablies.

Elle se traduit par des essais en dynamique selon un protocole bien défini.

Toutes les données brutes sont archivées.

En ce qui concerne la fréquence, la validation s'effectue :

- lors de la première utilisation du procédé,
- en rétrospectif sur les anciens procédés,
- après tout changement sur le procédé, tel que
 - . la transformation notable des équipements décrits dans le procédé,
 - . l'utilisation de nouveaux équipements,
 - . d'importants travaux d'entretien sur le matériel ou les installations utilisées dans le procédé,
- lorsque les résultats des contrôles de qualité sur le produit révèlent des anomalies,
- à périodicité constante fixée lors de la première validation.

1-1-5- Phase 4 : Exploitation des résultats, rédaction du rapport de validation

L'ensemble des résultats de la validation est à consigner dans un rapport référencé dans le système documentaire d'assurance qualité.

Il comprend :

- une page de visas (opérateurs, chefs des services concernés),
- le protocole de validation,
- les résultats,
- l'exploitation statistique des résultats (si nécessaire),
- une conclusion donnant la décision, les améliorations souhaitées (révisions éventuelles des documents existants), les points critiques à surveiller en routine, la périodicité de revalidation.

1-2- Traitement des écarts, améliorations

1-2-1- Résultats sortant des critères d'acceptation

L'équipe de validation se réunit pour déterminer si le procédé est validé ou non, quelles sont les actions correctives immédiates à mener, quelles sont les actions correctives à planifier, et s'il est possible ou non de continuer à utiliser ce procédé.

1-2-2- Résultats manquants ou documents manquants

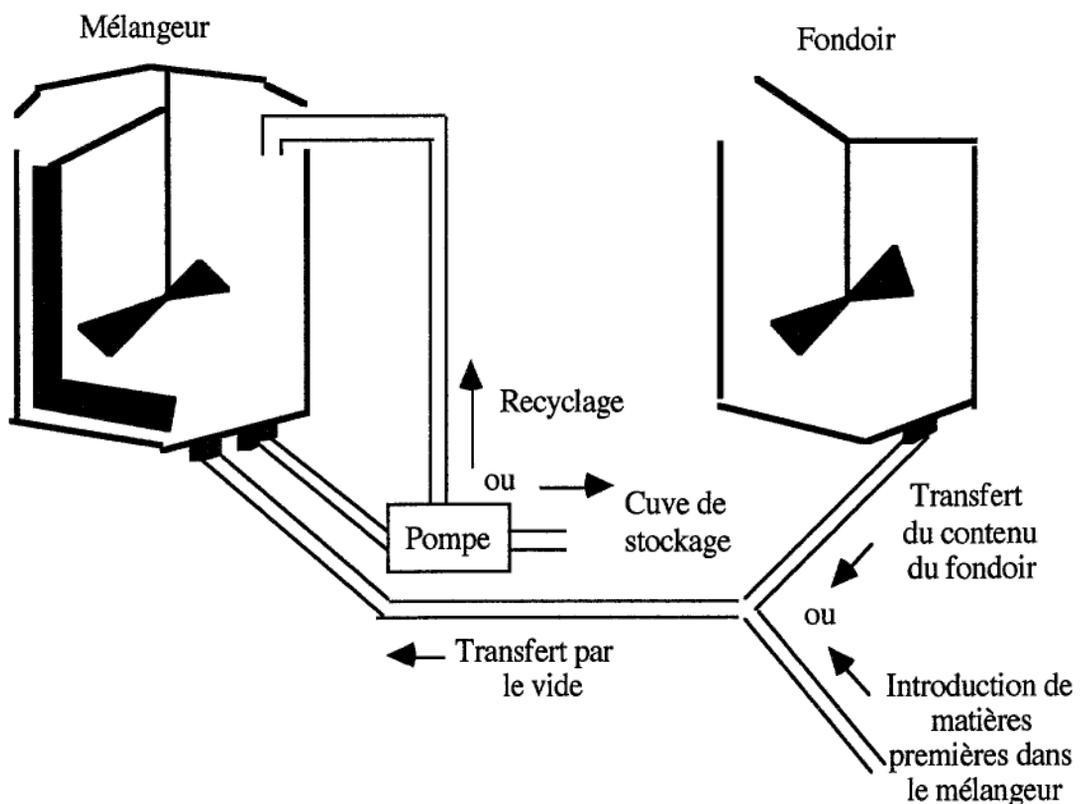
Le service assurance qualité effectue la démarche par note interne ou courrier extérieur pour récupérer les informations manquantes auprès des personnes concernées.

2- Matériel de production et méthode de nettoyage après production du Baume Algipan

2-1- Process de fabrication et de conditionnement

2-1-1- Matériel utilisé pour la fabrication

Figure N°2 : Schéma des équipements de fabrication.



Ce matériel est situé dans un atelier desservi par le circuit d'eau purifiée.

Mélangeur Olsa MPEF d'une capacité de 500 litres

L'appareil est constitué d'une cuve à double enveloppe avec couvercle; la cuve, la double enveloppe et le couvercle sont en acier inoxydable.

La cuve est soutenue par un bâti au moyen d'axes permettant le basculement.

Le mélangeur est muni d'un agitateur lent de type planétaire avec un élément d'agitation satellitaire et un racloir qui racle la paroi latérale et le fond du mélangeur.

L'agitateur rapide ou "émulseur" est situé en fond de cuve et actionné par un moteur en prise directe sur une turbine renfermée dans un stator. Sur le couvercle de la cuve se situe un orifice de chargement avec couvercle mais c'est en faisant le vide dans le mélangeur que l'on incorpore les poudres, les liquides ou le contenu du fondoir, par une des deux vannes qui se situent sous la cuve.

L'autre vanne sert au transfert du produit semi-ouvré en cuve de stockage et au recyclage.

Fondoir Olsa

Il est constitué d'une cuve double enveloppe en acier inoxydable de 500 litres avec une vanne de fond de cuve quart de tour; le système est muni d'un programmateur de température (Chauffage : Marche/Arrêt) et d'un agitateur (Marche/Arrêt).

Système de transfert entre le fondoir et le mélangeur

Le fondoir est relié au mélangeur par un tuyau souple, spécifique à chaque produit.

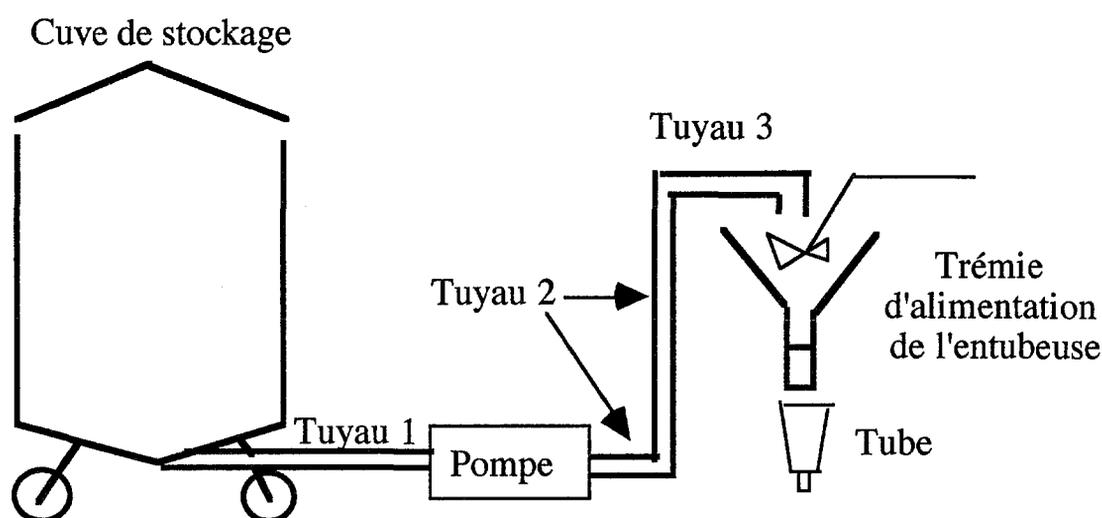
Système de recyclage et de transfert entre le mélangeur Olsa et la cuve de stockage

Les parties en contact avec le produit sont les suivantes :

- Le corps de pompe.
- Le tuyau souple d'entrée de la pompe.
- Le tuyau souple de sortie de la pompe.

2-1-2- Matériel utilisé pour le stockage et le conditionnement

Figure N°3 : Schéma des équipements de stockage et de conditionnement.



Ce matériel est situé dans une zone à atmosphère contrôlée qui **n'est pas encore desservie par le circuit d'eau purifiée** mais seulement par un circuit d'eau adoucie.

La cuve de stockage

Il s'agit d'une cuve mobile de 500 litres en acier inoxydable sans système d'agitation, munie d'une vanne de fond de cuve et d'un couvercle.

Système de transfert entre la cuve de stockage et la remplisseuse

Les parties en contact avec les produits sont les suivantes :

- Le corps de pompe.
- Le tuyau souple d'entrée de la pompe (tuyau 1).
- Le tuyau rigide de sortie de la pompe (tuyau 2).
- Le tuyau rigide d'alimentation de la trémie (tuyau 3).

Remplisseuse Kalix

Les parties en contact avec le produit sont les suivantes :

- La surface intérieure de la trémie d'alimentation.
- L'agitateur de la trémie d'alimentation.
- Le piston doseur et la canule de distribution.

2-1-3- Risques de contamination liés aux équipements

Le mélangeur, le fondoir, le système de transfert vers la cuve de stockage, la cuve de stockage ainsi que le matériel utilisé pour le transfert vers la remplisseuse et la remplisseuse elle-même sont des équipements **multi-produits**; ils sont donc soumis au risque de contamination croisée du produit suivant par des traces d'Algipan.

A l'inverse, il existe une canalisation de transfert entre le fondoir et le mélangeur **spécifique** pour chaque produit; elle n'est donc pas soumise au risque de contaminations croisées.

Le nettoyage est **manuel** sauf pour les **cuves de stockage**; pour ces cuves, il existe un **système de nettoyage semi-automatique qui n'est pas encore qualifié**. En effet, ce système étant installé dans un atelier qui n'est pas encore desservi en eau purifiée, il fonctionne actuellement uniquement avec de l'eau adoucie alors qu'il est prévu de l'alimenter en eau purifiée. Pour des raisons économiques et de priorité, l'équipement ne sera pas qualifié tant qu'il ne sera pas installé de manière définitive. Des travaux importants sur la boucle d'eau purifiée sont nécessaires pour réaliser cette alimentation en eau purifiée. Une démarche de validation n'est pas possible sur un équipement non qualifié mais en attendant, il faut tout de même assurer la maîtrise du nettoyage.

Quel que soit l'équipement, des produits de nettoyage, de désinfection et de désodorisation sont utilisés. Même si leur rinçage est vérifié systématiquement, il doit être validé par vérification sur les trois lots de validation.

Le risque de contamination bactériologique concerne l'ensemble des

équipements, tout particulièrement ceux dont la dernière eau de rinçage est de l'eau adoucie. Il s'agit des cuves de stockage et du matériel de conditionnement.

2-1-4- Processus de fabrication et de conditionnement

L'unité opératoire standard est de 400 kg.

Les principes actifs du baume Algipan sont les suivants :

- Salicylate de glycol 5%
- Dichlorhydrate d'histamine 0,1%
- Méphénésine 10%
- Nicotinate de méthyle 1,5%

Le monostéarate de glycérol, l'éther stéarylique polyoxyéthyléné et le sorbitol à 70% non cristallisé sont parmi les excipients présents en plus grande quantité.

Le parfum lavande n'est pas présent en grande quantité, mais son odeur étant très persistante, une étape de désodorisation est nécessaire en plus du nettoyage et de la décontamination.

La fabrication consiste en la réalisation d'une émulsion huile dans eau.

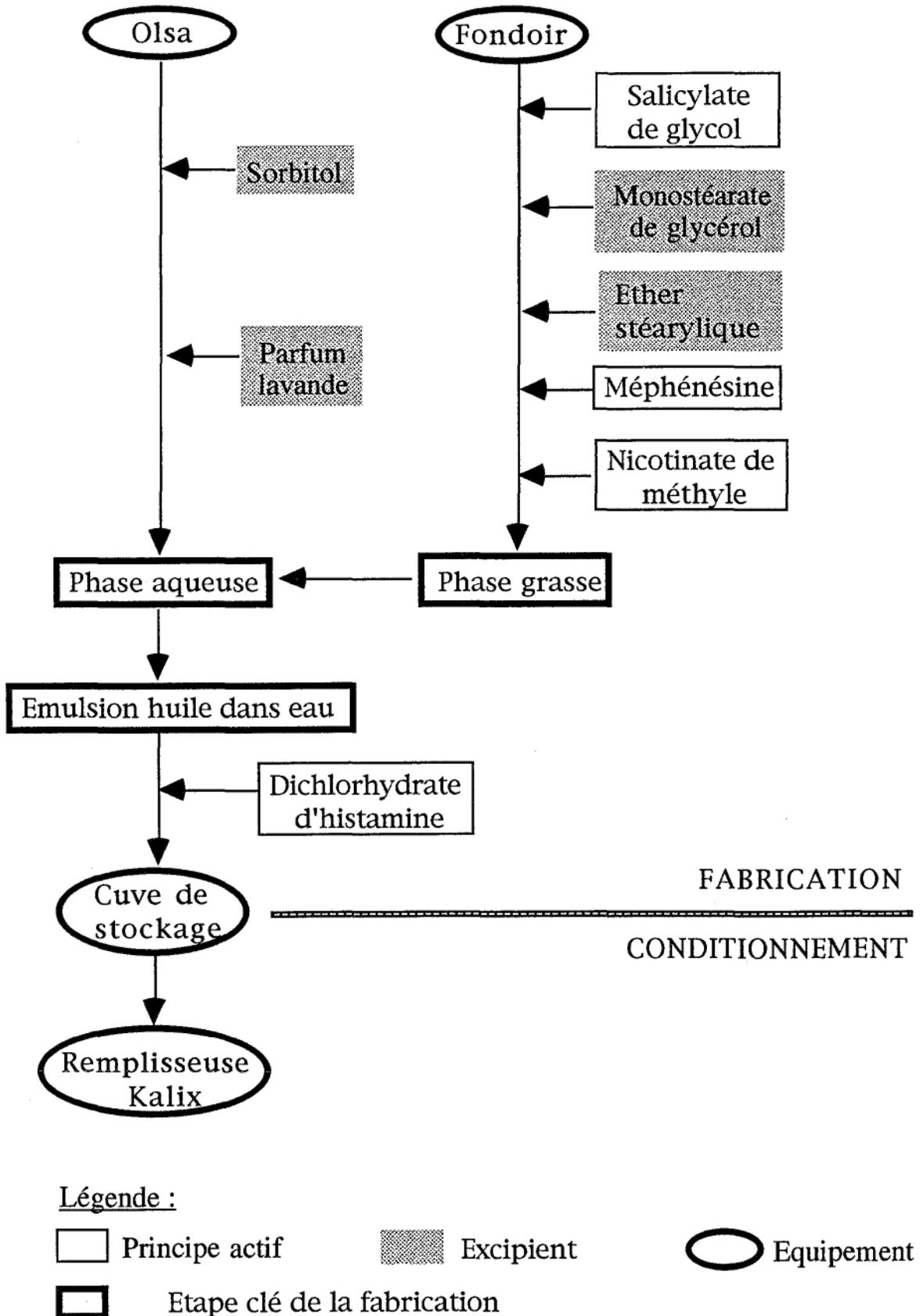
La phase grasse est réalisée dans le fondoir alors que la phase aqueuse est réalisée dans le mélangeur Olsa. L'émulsion est ensuite réalisée dans le mélangeur Olsa, après transfert de la phase grasse.

En fin de fabrication, le vrac est transféré dans une cuve de stockage mobile en vue de son conditionnement. La cuve mobile est reliée à la trémie d'alimentation de la remplisseuse.

Le vrac est réparti en tubes de 80g.

La figure N°4 résume le processus de fabrication du baume Algipan.

Figure N°4 : Schéma du processus de production du baume Algipan situant l'incorporation des principes actifs et des principaux excipients.



2-2- Procédé de nettoyage, de désodorisation et de désinfection

L'enchaînement des étapes de nettoyage, de désodorisation et de décontamination est décrit, en précisant pour chacune d'elles, le produit ou le type d'eau utilisée (Voir le chapitre 2-3- "Choix des produits", p100).

2-2-1- Matériel de fabrication

Eau adoucie chaude	Pré-rinçage.
Solution à 2% d'anios 255002 dans l'eau adoucie chaude	Nettoyage.
Eau adoucie chaude	Rinçage.
Eau purifiée	Rinçage.
Solution à 5 % d'anios DSA dans l'eau purifiée	Désodorisation, SAUF POUR LE FONDOIR ET LE TUYAU SOUPLE ENTRE LE FONDOIR ET LE MELANGEUR.
Eau purifiée	Rinçage.
Solution à 0,5% d'oxy-anios dans l'eau purifiée	Décontamination.
Eau purifiée	Rinçage.
Alcool à 70°	Passage à l'alcool et séchage du matériel.

2-2-2- Matériel de stockage et de conditionnement

Eau adoucie chaude	Pré-rinçage.
Solution à 2% d'anios 255002 dans l'eau adoucie chaude	Nettoyage.
Eau adoucie chaude	Rinçage.
Solution à 5 % d'anios DSA dans l'eau adoucie	Désodorisation SAUF POUR LA CUVE DE STOCKAGE.
Eau adoucie	Rinçage.
Solution à 0,5% d'oxy-anios dans l'eau adoucie	Décontamination.
Eau adoucie	Rinçage.
Alcool à 70°	Passage à l'alcool et séchage du matériel.

2-3- Choix des produits

2-3-1- Le produit de nettoyage

L'anios 255002 est un détergent alcalin à propriétés séquestrantes. L'action détergente se manifeste vis-à-vis des matières lipidiques et hydrosolubles; son action séquestrante élimine les minéraux.

Sa composition qualitative est la suivante : Hydroxyde de sodium, agents séquestrants et dispersants.

Le pH du produit pur est de 13,5 +/- 0,5; en dilution à 1%, le pH se situe autour de 11,75.

La recherche de traces de ce produit alcalin se fait à l'aide de bandelettes indicatrices du pH; les bandelettes Merck, référence 9543 sont utilisables pour un pH compris entre 6,5 et 10.

On procède par comparaison entre la coloration développée par la bandelette trempée dans les eaux de rinçage et une bandelette trempée dans l'eau du réseau représentant le témoin blanc.

Si les colorations ne sont pas identiques, il faut continuer le rinçage car le pH des eaux de rinçage est encore trop élevé.

La coloration attendue est jaune foncé, ce qui correspond à un pH de 6,5 à 7.

Avec cette méthode, le seuil de détection est d'environ 3 ppm en matières actives.

2-3-2- Le produit désinfectant

L'Oxy-anios est un désinfectant de contact des surfaces et matériels pouvant entrer en contact avec les denrées alimentaires.

Il se compose d'acide peracétique en présence de peroxyde d'hydrogène.

Le pH du produit pur est de 2 +/- 0,5; pour une dilution à 1%, il se situe autour de 4,5.

Il est soluble dans l'eau et les solvants organiques.

La recherche de traces de ce produit repose sur une réaction chimique entre l'acide péracétique et une amine aromatique qui constitue le réactif de la bandelette.



Amide, Coloration

La bandelette plongée une seconde dans l'eau de rinçage et secouée pour éliminer l'excédent de liquide développe une coloration bleue à comparer après 5 secondes de temps de réaction à la gamme fournie par le fournisseur.

Le seuil de détection est de 1 ppm d'acide peracétique.

2-3-3- Le produit désodorisant

Ce produit désodorisant est utilisé pour le matériel en contact avec le parfum lavande, sauf la cuve de stockage dont le nettoyage et la décontamination semi-automatique suffisent à éliminer l'odeur de lavande.

Le fondoir et le tuyau de transfert entre le fondoir et le mélangeur ne sont pas en contact avec le parfum lavande qui est introduit directement dans le mélangeur; ils ne sont pas soumis à l'action de l'Anios DSA.

Ce produit, dont le composant majoritaire est le formaldéhyde, était par le passé utilisé comme bactériostatique et bactéricide; de manière empirique, des propriétés désodorisantes lui ont été attribuées et il est aujourd'hui préconisé pour éliminer certaines odeurs, notamment de menthe. Il s'est avéré efficace contre l'odeur de lavande.

Les traces d'Anios DSA peuvent être recherchées dans les eaux de rinçage en utilisant le réactif de Nessler, réactif n°3B, référence 464231-Carlo Erba.

Ce réactif contient de l'iodomercurate de potassium en milieu alcalin. Le

mercure Hg^{2+} est réduit par le formaldéhyde en mercure sous forme métallique qui précipite.

Tableau N°XV : Recherche de traces du produit désodorisant.

Tubes	A : Témoin	B : Dosage	C : Etalon
Eau distillée	10 ml	0 ml	0 ml
Eau de rinçage	0 ml	10 ml	0 ml
Anios DSA	0 ml	0 ml	10 ml
Réactif n° 3B	10 gouttes	10 gouttes	10 gouttes

L'observation des tubes doit être immédiate.

Les résultats attendus sont les suivants :

Tube A : Aucune coloration à jaune pâle (coloration du réactif 3B).

Tube C : Coloration jaune orangé (développement d'un précipité noir dans le cas de fortes concentrations).

Tube B : La coloration doit être identique à celle du tube A.

Le seuil de détection est de 0,2 ppm en formaldéhyde.

2-3-4- L'alcool à 70°

Il est obtenu par dilution d'éthanol absolu conforme à la Pharmacopée Européenne dans l'eau purifiée.

2-3-5- Les fluides de nettoyage

L'eau adoucie

L'eau adoucie est obtenue en traitant l'eau de ville conforme au journal officiel par permutation; la résine échangeuse de cations est composée d'une matrice polystyrénique sur laquelle sont greffés des groupements à caractère acide (SO_3H) sous forme de sels de sodium. Elle a plus d'affinité pour les ions alcalino-terreux (calcium et magnésium)

constituant la dureté de l'eau, que pour le sodium.

Mise en contact avec une eau dure, elle fixe facilement les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et cède en échange les ions sodium dont elle est porteuse. L'eau s'appauvrit en calcium et en magnésium et s'enrichit parallèlement en sodium.

Quand la résine est saturée, elle est régénérée avec une solution concentrée de chlorure de sodium de grande pureté.

Le titre hydrotimétrique (TH) de l'eau de ville à l'usine varie entre 30°F et 50°F. En sortie d'adoucisseur, le TH doit être inférieur à 0,5°F.

L'eau purifiée

Elle est obtenue par osmose inverse à partir de l'eau adoucie dont le fouling index (FI) doit être inférieur à 5 pour éviter le colmatage.

Un prétraitement de l'eau sur charbon actif vise à éliminer le chlore de l'eau qui va alimenter les membranes d'osmose, puis une adjonction de soude permet de transformer le CO_2 dissous dans l'eau en carbonates, éliminés par l'osmose inverse. Le chlore occasionnerait une destruction irréversible des membranes d'osmose qui sont en polyamide. Par ailleurs, le pH optimal pour obtenir la plus grande résistivité après la double osmose se situe entre 9 et 9,5.

En sortie d'osmoseur, l'eau doit répondre aux caractéristiques de la monographie "Eau purifiée" de la Pharmacopée Européenne. La résistivité est supérieure à 500 000 Ω/cm .

Le FI ne devra pas dépasser 3.

Une sanétisation chimique (acide peracétique) permet de décontaminer toutes les parties de la boucle primaire en contact avec l'eau, ainsi que les résines échangeuses d'ions.

Une sanétisation thermique (4 heures à 80°C) permet de décontaminer la boucle d'eau purifiée, y compris la cuve de stockage.

3- Démarche de la validation

En fonction des risques de contamination décrits au chapitre 2-1-3, les contrôles vont porter sur les trois principaux types de contamination :

- La contamination chimique croisée du produit suivant par des traces d'Algipan.
- La contamination par les traces de produit de nettoyage, de désodorisation et de désinfection.
- La contamination bactériologique.

3-1- Recherche des résidus d'Algipan et de la contamination microbiologique : Prélèvements par écouvillonnage

3-1-1- Prélèvements par écouvillonnage

Les prélèvements par écouvillonnage sont particulièrement indiqués dans la validation du nettoyage des **pâteux** .

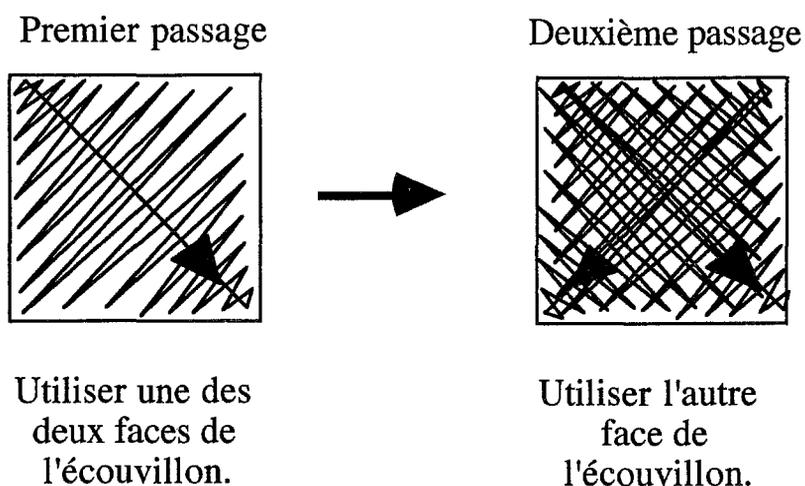
De part leur structure, les résidus de pâteux restent accrochés aux surfaces des équipements et l'**action mécanique** de l'écouvillonnage permet une véritable récupération des résidus alors que la méthode par rinçage risque de conduire à un résultat faussement négatif du fait que les résidus ne seront pas entraînés par le liquide de rinçage mais resteront accrochés à la surface de l'équipement.

Le prélèvement pour la recherche de traces de principes actifs se fait à l'aide d'écouvillons Conformat TX 714 A.

Le prélèvement bactériologique par écouvillonnage se fait à l'aide d'écouvillons COPAN COP155C.

L'écouvillon est simplement passé à la surface de l'équipement, sans exercer de pression particulière mais en respectant le schéma ci-dessous.

Figure N°5 : Schéma de prélèvement par écouvillonnage.



En ce qui concerne l'écouvillonnage destiné à l'étude microbiologique, toutes les précautions doivent être prises afin d'éviter la contamination de l'échantillon lors du prélèvement :

- Port de gants stériles et d'un masque.
- Gabarits en papier sulfurisé, emballés dans une pochette de papier sulfurisé et passés à l'autoclave.
- Pot de diluant-neutralisant utilisé dans la limite d'une demi-heure après son ouverture.

Un écouvillonnage par zone suffit pour la recherche de traces d'Algipan mais il faut 3 écouvillonnages pour l'étude microbiologique :

- 1 écouvillonnage pour la recherche de la flore totale
- 1 écouvillonnage pour la recherche des levures et moisissures
- 1 écouvillonnage pour la recherche des germes spécifiés

Les zones soumises à l'écouvillonnage sont ensuite essuyées avec une chiffonnette non tissée, imbibée d'alcool à 70°.

Les zones soumises au prélèvement sont les suivantes :

- **Mélangeur**
 - . couvercle du mélangeur
 - . haut de la cuve du mélangeur
 - . bas de la cuve du mélangeur

- . fond de la cuve du mélangeur
- . émulseur
- . mélangeur planétaire
- . racleur
- . vanne d'introduction
- . vanne de vidange

- **Fondoir**
 - . couvercle du fondoir
 - . haut de la cuve du fondoir
 - . bas de la cuve du fondoir
 - . fond de la cuve du fondoir
 - . vanne de fond de cuve du fondoir

- **Pompe de recyclage et de transfert vers la cuve de stockage**
 - . corps de pompe

- **Cuve de stockage**
 - . couvercle de la cuve
 - . paroi de la cuve
 - . vanne de fond de cuve

- **Pompe de transfert vers la remplisseuse**
 - . corps de pompe
 - . tuyau d'entrée de la pompe : tuyau 1
 - . tuyau de sortie de la pompe : tuyau 2
 - . tuyau d'alimentation de la trémie : tuyau 3

- **Entubeuse Kalix**
 - . trémie Kalix
 - . piston doseur Kalix

3-1-2- Déterminations préalables à l'interprétation des résultats des prélèvements par écouvillonnage

Rendement de récupération

Une quantité connue de la molécule à rechercher ou de germes est déposée sur une surface de même type que le matériel à écouvillonner.

En respectant un protocole préétabli et qui sera reproduit sur le matériel à écouvillonner, le prélèvement est effectué.

La méthode de dosage physico-chimique ou bactériologique aboutit à un résultat qui, comparé à la quantité connue déposée, permet d'établir un pourcentage de récupération qui sera ultérieurement appliqué aux résultats obtenus par écouvillonnage du matériel.

Coefficient multiplicateur pour l'extrapolation des résultats aux surfaces totales des équipements

Les surfaces écouvillonnées et les surfaces qu'elles représentent sont indiquées dans le tableau XVI ainsi que les coefficients multiplicateurs permettant l'extrapolation.

Tableau XVI : Surfaces écouvillonnées et représentées et coefficients multiplicateurs.

Equipement	Surfaces représentées	Ecouvillonnage bactériologique		Ecouvillonnage bactériologique	
		Surfaces écouvillonnées	Coefficients multiplicateurs	Surfaces écouvillonnées	Coefficients multiplicateurs
Mélangeur = 56 217 cm ²					
Haut	7 090 cm ²	100 cm ²	71	100 cm ²	71
Bas	19 397,5 cm ²	100 cm ²	194	100 cm ²	194
Fond	19 397,5 cm ²	100 cm ²	194	100 cm ²	194
Couvercle	7 090 cm ²	100 cm ²	71	100 cm ²	71
Emulseur	150 cm ²	75 cm ²	2	25 cm ²	6
Planétaire	1 740 cm ²	100 cm ²	17,5	100 cm ²	17,5
Racleur	1 200 cm ²	100 cm ²	12	100 cm ²	12
Vanne d'introduction	80 cm ²	20 cm ²	4	20 cm ²	4
Vanne de vidange	72 cm ²	18 cm ²	4	18 cm ²	4

Equipement	Surfaces représentées	Ecouvillonnage principe actif		Ecouvillonnage bactériologique	
		Surfaces écouvillonnées	Coefficients multiplicateurs	Surfaces écouvillonnées	Coefficients multiplicateurs
Fondoir = 39 528 cm ²					
Couvercle	5 672 cm ²	100 cm ²	57	100 cm ²	57
Haut	14 012 cm ²	100 cm ²	140,5	100 cm ²	140,5
Bas et fond	19 684 cm ²	100 cm ²	197	100 cm ²	197
Vanne	160 cm ²	40 cm ²	4	40 cm ²	4
Pompe et tuyaux de recyclage et de transfert vers la cuve de stockage = 9 621 cm ²					
Corps de pompe	7 821 cm ²	100 cm ²	78,5	100 cm ²	78,5
Tuyaux de transfert	1800 cm ²				
Cuve de stockage = 43 492 cm ²					
Couvercle	5 672 cm ²	100 cm ²	57	100 cm ²	57
Paroi latérale et fond	37 700 cm ²	100 cm ²	377	100 cm ²	377
Vanne	120 cm ²	30 cm ²	4	30 cm ²	4
Pompe de transfert vers la remplisseuse = 6 707 cm ²					
Tuyau 1 d'entrée souple	1 716 cm ²	85 cm ²	20,5	85 cm ²	20,5
Tuyau 2 rigide de sortie	2 519 cm ²	75 cm ²	34	75 cm ²	34
Tuyau 3 rigide d'alimentation	2 142 cm ²	75 cm ²	29	75 cm ²	29
Corps de pompe	330 cm ²	165 cm ²	2	55 cm ²	6
Entubeuse Kalix = 6325 cm ²					
Trémie	5 072 cm ²	100 cm ²	51	100 cm ²	51
Piston doseur	1 253 cm ²	626 cm ²	2	313 cm ²	4
Total					
Coefficient multiplicateur	161 890 cm ²		1 623		1754

3-1-3- Les limites du prélèvement par écouvillonnage

L'inconvénient de ce procédé est que les surfaces inaccessibles ne sont pas prises en compte.

Les surfaces inaccessibles sont les suivantes :

- **L'agitateur et le fond du fondoir**
- **Le tuyau souple de transfert entre le fondoir et le mélangeur**

Il est spécifique par produit et autoclavé à chaque fabrication après avoir été nettoyé et décontaminé.

Dans la mesure où les traces de baume vont faciliter le développement microbien, il faut en fait maîtriser ces résidus d'Algipan même sur un équipement mono-produit.

- **Le bas et le fond de la cuve de stockage**
- **Le tuyau souple de transfert entre le mélangeur et la pompe de transfert et de recyclage et le tuyau souple de transfert entre cette pompe et la cuve de stockage**

Ces tuyaux sont multi-produits, ils sont nettoyés et décontaminés en même temps que le mélangeur grâce à un recyclage des solutions détergente, désodorisante et désinfectante.

Seules les extrémités de ces tuyaux sont accessibles; même si un écouvillonnage des extrémités est possible, les résultats ne seront pas représentatifs du reste de la surface interne des tuyaux.

- **Les petites pièces de l'entubeuse, de type canule, les joints, le piston**

Concernant les zones inaccessibles, on leur applique arbitrairement le taux résiduel d'une surface de contact accessible; c'est une démarche critiquable car rien ne permet de présumer que ces surfaces inaccessibles se comporteront comme des surfaces accessibles, d'autant plus que les matériaux constitutifs sont différents, acier inox 316L pour les cuves, tuyau tricoclair pour le tuyau de transfert et de recyclage. C'est une des raisons pour lesquelles il est préférable d'utiliser des tuyaux spécifiques pour chaque produit mais le coût est tel que ce n'est pas systématique.

3-2- Recherche des résidus d'Algipan et de la contamination microbiologique : Prélèvements par rinçage

Pour pallier les insuffisances du prélèvement par écouvillonnage, on effectue des prélèvements par rinçage; il ne s'agit pas du prélèvement de la dernière eau de rinçage mais d'une étape supplémentaire qui ne fait pas partie du nettoyage. Le prélèvement se fait sur le matériel propre, passé à l'alcool et séché, prêt à être réutilisé.

Le matériel est rincé avec de l'eau **purifiée** qui sera recueillie en vue d'être analysée :

- recherche de traces d'Algipan,
- analyse bactériologique (flore totale, levures et moisissures, germes spécifiés).

En ce qui concerne les échantillons destinés à l'analyse microbiologique, toutes les précautions doivent être prises afin d'éviter la contamination de l'échantillon lors du prélèvement :

- Port de gants stériles et d'un masque.
- L'eau est recueillie dans un récipient stérile.

3-2-1- Matériel de fabrication

L'ensemble des équipements de fabrication est rincé avec 20 litres d'eau purifiée.

20 litres d'eau purifiée sont introduits dans le fondoir en prenant soin de bien rincer le couvercle, l'arbre d'agitation et les parois du fondoir.

Le fondoir est relié au mélangeur par le tuyau de transfert spécifique à l'Algipan. Le vide est fait dans le mélangeur de manière à transférer l'eau du fondoir qui passe par la vanne de fond du fondoir vers le mélangeur.

Afin que la vanne de transfert du mélangeur, la pompe de transfert et de recyclage et que les tuyaux d'entrée et de sortie de la pompe soient également rincés, on réalise pendant 2 minutes le recyclage de l'eau purifiée dans le mélangeur.

L'eau de rinçage est récupérée et soumise à la recherche de traces d'Algipan et à l'étude microbiologique.

3-2-2- Matériel de stockage

La cuve de stockage est rincée avec 10 litres d'eau purifiée en prenant soin de bien rincer le haut de la cuve, les parois de la cuve, et l'eau passe par la vanne de fond de cuve.

L'eau de rinçage récupérée est soumise à la recherche de traces d'Algipan et à l'étude microbiologique.

3-2-3- Matériel de conditionnement

L'ensemble du matériel de conditionnement démonté est placé dans la trémie d'alimentation de la kalix de manière à ce qu'en versant 3 litres d'eau purifiée dans cette trémie, l'ensemble du matériel en contact avec le produit soit rincé par l'eau.

L'eau de rinçage récupérée est soumise à la recherche de traces d'Algipan et à l'étude microbiologique.

3-3- Recherche de traces des produits de nettoyage, de désodorisation et de désinfection : Prélèvement des eaux de rinçage

Ces produits très **hydrosolubles** se prêtent très bien à un prélèvement par rinçage, puisque les résidus vont facilement se solubiliser dans l'eau de rinçage et ne vont pas avoir tendance à rester accrochés aux parois des équipements.

Cette recherche se fait selon les méthodes préconisées par les fournisseurs de ces produits.

L'absence de traces est vérifiée au cours de la validation mais le rinçage, qui est manuel, est **suivi en routine** car ses paramètres sont **difficilement reproductibles**.

Le prélèvement des eaux de rinçage se fait sur les dernières eaux de rinçage .

Pour le matériel de fabrication, l'eau est prélevée :

- En sortie du tuyau souple de transfert entre le fondoir et le mélangeur ce qui permet d'apprécier le rinçage du fondoir, de la vanne de fond du fondoir, et de ce tuyau de transfert.
- En sortie du tuyau de sortie de la pompe de recyclage et de transfert, ce qui permet d'apprécier le rinçage du mélangeur, de la vanne de transfert du mélangeur, du tuyau souple d'entrée, de la pompe et du tuyau souple de sortie.

Pour le matériel de stockage, l'eau est prélevée par la vanne de fond de cuve.

Pour le matériel de conditionnement, l'eau est prélevée dans le bac de trempage.

3-4- Récapitulatif des contrôles à effectuer

Le tableau XVII résume, par groupes d'équipements, les types de contrôles qui seront effectués.

Tableau XVII : Récapitulatif des contrôles à effectuer.

	Matériel de fabrication sauf le fondoir et le tuyau de transfert entre le fondoir et le mélangeur	Fondoir et tuyau de transfert entre le fondoir et le mélangeur	Cuve de stockage	Matériel de conditionnement
Dosage de traces d'Algipan	Eau de rinçage et écouvillonnage	Eau de rinçage et écouvillonnage	Eau de rinçage et écouvillonnage	Eau de rinçage et écouvillonnage
Recherche de contamination microbiologique	Eau de rinçage et écouvillonnage	Eau de rinçage et écouvillonnage	Eau de rinçage et écouvillonnage	Eau de rinçage et écouvillonnage
Recherche de traces du produit de nettoyage (Anios 255002)	Sur la dernière eau de rinçage	Sur la dernière eau de rinçage	Sur la dernière eau de rinçage	Sur la dernière eau de rinçage
Recherche de traces du produit désodorisant (Anios DSA)	Sur la dernière eau de rinçage	Non applicable, équipement non désodorisé	Non applicable, équipement non désodorisé	Sur la dernière eau de rinçage
Recherche de traces du produit désinfectant (Oxy-anios)	Sur la dernière eau de rinçage	Sur la dernière eau de rinçage	Sur la dernière eau de rinçage	Sur la dernière eau de rinçage

3-5- Détermination d'une molécule traceur pour la recherche des traces d'Algipan

La molécule traceur devrait être :

- La plus toxique.
- La moins soluble.
- La plus difficile à nettoyer.
- Présente en plus grande quantité.
- La plus facilement récupérable par écouvillonnage.
- Celle ayant le plus petit seuil de quantification.
- Celle faisant l'objet d'une technique de dosage spécifique mettant en évidence d'éventuels produits de dégradation.

Le traceur idéal n'existe pas, il faut donc faire des **compromis**.

C'est un principe actif qui sera retenu ici pour tenir compte du risque de **toxicité**.

Pour éviter un développement analytique long et coûteux, l'objectif est d'utiliser les **méthodes de dosage de routine** ce qui permettra de traiter les échantillons en même temps que les contrôles de routine.

Le choix d'un principe actif comme traceur est conforté par le fait que seuls les principes actifs et les conservateurs sont dosés en routine; mais ces derniers sont présents en petite quantité, 0,12% au plus.

Trois des quatre principes actifs sont dosés simultanément par une technique de **CLHP** qui permet également le dosage des conservateurs.

La CLHP répond au souci de **spécificité** et de **mise en évidence de produits de dégradation éventuels**.

Le quatrième principe actif est le dichlorhydrate d'histamine dosé par fluorimétrie. Ce principe actif est de plus présent en très petite quantité, seulement 0,1%.

C'est donc un des trois autres principes actifs qui va être choisi comme traceur.

Tableau XVIII : Paramètres déterminants dans le choix de la molécule traceur.

	Salicylate de glycol	Méphénésine	Nicotinate de méthyle
Quantité présente dans le baume (% m/m)	5	10	1,5
Seuil de quantification par la technique HPLC utilisée pour le dosage en routine (%)	1	2	0,3
Solubilité	1 part soluble dans 110 parts d'eau, très soluble dans l'alcool	1 part soluble dans 85 parts d'eau ou dans 8 parts d'alcool	1 part soluble dans 0,7 part d'eau ou d'alcool
Réponse attendue par la technique de dosage, en routine (Surface)	5923571	2226014	2786223
Réponse attendue par la technique de dosage, en routine (surface) / 1 g de principe actif	1 184 714	222 601	1 857 482

Les techniques de dosage doivent être **validées** en interne; il existe un planning des validations à faire.

La validation de la technique de dosage par HPLC des 3 principes actifs et des conservateurs de l'Algipan n'a pas encore été réalisée; en effet, cette AMM a été rachetée par UCB en avril 1997 et les techniques analytiques déposées dans le dossier d'AMM n'ont pas encore été revalidées par UCB. A défaut, on se base sur le **seuil de quantification déposé dans le dossier d'AMM.**

Le nicotinate de méthyle a l'avantage de présenter le **seuil de quantification le plus bas**, mais c'est aussi le **plus soluble**, donc le **plus nettoyable.**

La méphénésine est présente en plus grande quantité mais son **seuil de quantification est le plus élevé** et la réponse est moins importante

que pour les deux autres principes actifs.

Le salicylate de glycol présent en quantité intermédiaire a un seuil de quantification intermédiaire.

Il donne la **réponse la plus importante pour une quantité donnée de pommade** même si, ramené à une quantité donnée de principe actif, il ne donne qu'une réponse intermédiaire, du même ordre que celle obtenue avec le nicotinate de méthyle.

Mais surtout, le salicylate de glycol est **le moins soluble, donc le moins nettoyable**.

C'est a priori le **salicylate de glycol** qui doit être retenu comme traceur.

La seule limite éventuelle à ce choix est le **rendement de récupération** qui sera obtenu avec ce principe actif.

3-6- Suivi des paramètres critiques du nettoyage

Pour assurer le suivi des modes opératoires de nettoyage-décontamination, les tableaux suivants doivent être remplis pour chaque lot de validation.

Les **paramètres critiques** du nettoyage et de la désinfection que sont la **durée** et la **température** sont enregistrés par écrit.

Les résultats doivent être conformes.

Pour le mélangeur Olsa (et la pompe) et pour le fondoir :

	Nettoyage				Désodorisation (sauf fondoir)		Décontamination		Résultat
	Brossage		Trempage		Trempage		Trempage		
	Résultat	Norme	Résultat	Norme	Résultat	Norme	Résultat	Norme	
Durée (mn)		quelques mn		30		20		20	
Tempé- rature (°C)		40-45		60-80		environ 20		environ 20	

Pour la remplisseuse Kalix et la pompe (avec les tuyaux) :

	Nettoyage		Désodorisation		Décontamination		Résultat
	Brossage (goupillons et lingettes)		Trempage		Trempage		
	Résultat	Norme	Résultat	Norme	Résultat	Norme	
Durée (mn)							
Température (°C)							

4- Validation du prélèvement par écouvillonnage et détermination du rendement de récupération

4-1- Ecouvillonnage pour la recherche de traces de salicylate de glycol

4-1-1- Principe

Le principe de la validation est de déposer sur une surface en acier inoxydable 316L de 100 cm² une quantité connue de produit semi-ouvert dont on connaît la teneur en principe actif, d'écouvillonner la surface et de doser le produit récupéré afin de calculer le pourcentage de récupération de l'écouvillon.

L'écouvillonnage est réalisé comme décrit au chapitre 3-1-1- "Prélèvements par écouvillonnage".

4-1-2- Méthode

Sur un carré de parafilm d'environ 25 cm², une quantité de pommade Algipan est pesée. La pommade est déposée sur une plaque inox préalablement nettoyée, rincée, passée à l'éthanol et séchée.

Le parafilm est pesé après dépôt pour déterminer la quantité exacte déposée.

L'écouvillon Conformat TX 714 A est humidifié avec le solvant d'analyse et la surface est écouvillonnée.

L'écouvillon est placé dans un tube à essai contenant 5 ml du solvant d'analyse; le tube contenant l'écouvillon et le solvant est passé au Vortex pendant 2 mn à la puissance maximale de l'appareil. La solution ainsi obtenue est dosée.

Pour chaque dépôt d'environ 4,5, 6 et 7,5 mg, on réalise 3 essais.

Le solvant d'analyse est un mélange à 70 volumes de méthanol et 30 volumes d'eau; après que les prélèvements soient effectués à la surface de l'équipement, il faudra rincer abondamment la surface prélevée pour éliminer les traces de méthanol.

4-1-3- Résultats obtenus

Le pourcentage de récupération est calculé selon la formule :

$$\text{Pourcentage de récupération} = \frac{\text{Quantité de principe actif récupérée}}{\text{Quantité de principe actif déposée}} * 100$$

Tableau XIX : Détermination des rendements de récupération.
(Salicylate de glycol)

Quantité de salicylate de glycol déposée (g)	Quantité de salicylate de glycol déposée récupérée (g)	Rendement de récupération (%)
5,1.10 ⁻⁴	4,19.10 ⁻⁴	82,18
4,55.10 ⁻⁴	3,24.10 ⁻⁴	71,16
4,3.10 ⁻⁴	3,17.10 ⁻⁴	73,62
6,6.10 ⁻⁴	5,24.10 ⁻⁴	79,44
5,25.10 ⁻⁴	4,4.10 ⁻⁴	83,87
5,25.10 ⁻⁴	4,48.10 ⁻⁴	85,42
7,55.10 ⁻⁴	7,79.10 ⁻⁴	103,23
7,75.10 ⁻⁴	5,41.10 ⁻⁴	69,78
7,1.10 ⁻⁴	6,29.10 ⁻⁴	88,56

4-1-4- Interprétation statistique des résultats, calcul du rendement de récupération

L'étude statistique des résultats permet de vérifier qu'**aucune des valeurs obtenues n'est aberrante** et qu'elles peuvent donc toutes être prises en compte.

Elle met en évidence l'existence d'une **dépendance entre la quantité de salicylate de glycol déposée et la quantité de salicylate de glycol récupérée**; elle montre, de plus, que cette relation répond au modèle de l'**ajustement linéaire**.

Enfin, elle montre qu'il **n'existe pas d'effet concentration** c'est-à-dire que le rendement est identique, quelle que soit la quantité récupérée par écouvillonnage, qu'il est indépendant de la quantité récupérée.

Elle permet de définir l'intervalle de confiance au risque d'erreur de 5% du rendement final pour l'écouvillonnage du salicylate de glycol R_{SG}.

$$\mathbf{R_{SG} = 81,92\% \pm 7,93}$$

Le rendement utilisé pour l'interprétation des résultats sera donc de 81,92%. D'après les critères de F. Laban (7), c'est un **rendement satisfaisant** : il est supérieur à 50 % et le coefficient de variation est inférieur à 10 %.

L'analyse statistique des résultats de la recherche de traces de salicylate de glycol est détaillées en Annexe 1.

4-2- Ecouvillonnage pour l'étude microbiologique

4-2-1- Principe

Le principe de la validation est de déposer sur une surface en acier inoxydable 316L de 100 cm², une quantité connue de germes, d'écouvillonner la surface et de déterminer la quantité de germes récupérés afin de calculer le pourcentage de récupération de l'écouvillon. L'écouvillonnage est réalisé comme décrit au chapitre 3-1-1- "Prélèvements par écouvillonnage".

4-2-2- Méthode

Une préculture est effectuée 24 heures avant l'essai sur gélose trypticase-soja à 32,5°C à partir d'une souche d'*E. coli*, référence CIP 53 126. Une suspension à environ 10⁸ cellules par ml est préparée, ce qui correspond à une suspension pour laquelle la lumière transmise mesurée au spectrophotomètre à 620 nm est de 70% + ou - 10%. Le solvant utilisé est une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,9%.

A partir de la suspension à 10⁸ cellules par ml, des dilutions successives permettent d'obtenir des suspensions à 2.10², 1.10² et 5.10¹ germes par ml.

300 µl de chaque suspension sont prélevés et dilués dans 10 ml de solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,9%. Chaque suspension obtenue est filtrée sur membrane. Le tube à essai est rincé avec 2 fois 10 ml de solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,9%. La membrane est déposée sur une gélose trypticase-soja et incubée. Après incubation, les germes sont dénombrés.

Par ailleurs, pour chaque suspension, 300 µl sont déposés à l'aide d'une pipette stérile sur une plaque en acier inoxydable 316L de 100 cm².

L'écouvillon est humidifié avec le diluant-neutralisant de la Pharmacopée puis la surface de la plaque est écouvillonnée après séchage.

Les micro-organismes prélevés sur l'écouvillon sont ensuite remis en solution dans 10 ml de diluant-neutralisant de la Pharmacopée; il faut agiter mais sans utiliser le Vortex qui pourrait détériorer la souche. Le contenu du tube est filtré sur membrane.

Le tube à essai est rincé avec 10 ml de diluant-neutralisant. Son contenu est filtré; un nouveau rinçage suivi d'une filtration est effectué. La membrane est déposée sur une gélose trypticase-soja et mise à incuber.

Après incubation, les germes écouvillonnés sont dénombrés.

Chaque essai est réalisé 3 fois.

On peut alors déterminer le rendement d'écouvillonnage.

$$\text{Rendement d'écouvillonnage} = \frac{\text{Quantité de germes récupérée}}{\text{Quantité de germes déposée}} \cdot 100$$

L'écouvillon de prélèvement étant imbibé de diluant-neutralisant propice au développement microbien, quand les prélèvements seront effectués à la surface de l'équipement, il faudra ensuite rincer abondamment la surface prélevée et la passer à l'alcool pour éviter tout risque de développement microbien ultérieur.

4-2-3- Résultats obtenus

Tableau XX : Détermination des rendements de récupération (*E. coli*).

Quantité de germes déposée	Quantité de germes récupérée	Rendement écouvillon (%)
74	18	24,32
74	6	8,11
74	11	14,86
36	0	0
36	2	5,56
36	3	8,33
23	9	39,13
23	1	4,35
23	3	13,04

4-2-4- Interprétation statistique des résultats, calcul du rendement de récupération

L'étude statistique des résultats permet de vérifier **qu'aucune des valeurs obtenues n'est aberrante** et qu'elles peuvent donc toutes être prises en compte.

Elle met en évidence l'existence d'une **dépendance entre la quantité de germes déposés et la quantité de germes récupérés**; elle montre de plus que cette relation répond au modèle de l'**ajustement linéaire**.

Enfin, elle montre qu'il **n'existe pas d'effet concentration** c'est à dire que le rendement est identique quelle que soit la quantité récupérée

par écouvillonnage, qu'il est indépendant de la quantité récupérée. Elle permet de définir l'intervalle de confiance au risque d'erreur de 5% du rendement final pour l'écouvillonnage bactériologique R_B .

$$R_B = 13,08\% \pm 9,25$$

Le rendement utilisé pour l'interprétation des résultats sera donc de 13,0%.

C'est un **rendement faible** et le **coefficient de variation** est **élevé**.

Les résultats obtenus par écouvillonnage devront être complétés par ceux obtenus à partir des prélèvements par rinçage.

L'analyse statistique des résultats microbiologiques est détaillée en Annexe 2.

5- Critères d'acceptation, résultats obtenus, interprétations

5-1- Critères d'acceptation

5-1-1- Produits de nettoyage, de désodorisation et de décontamination

Pour la recherche des produits de nettoyage, de désodorisation et de décontamination, le résultat attendu est l'absence de traces, soit des quantités présentes inférieures au seuil de détection des méthodes de routine utilisées.

Produit recherché	Seuil de détection
Anios 255002	3 ppm en matières actives
Anios DSA	0,2 ppm en matières aldéhydiques
Oxy-anios	1 ppm d'acide peracétique

5-1-2- Contamination microbienne

Alors que les exigences de la Pharmacopée Européenne se limitent pour l'eau purifiée à un nombre de germes viables totaux inférieur à 100 microorganismes par ml (filtration sur membrane, milieu gélosé B), les normes internes à UCB, indiquées dans le tableau XXI, sont plus strictes. Elles sont exprimées en U.F.C., c'est-à-dire en nombre d'Unités Formant des Colonies.

Tableau XXI : Normes bactériologiques internes pour l'eau purifiée.

Contrôle	Norme
Flore totale	de 0 à 50 U.F.C. / 100 ml
Levures / moisissures	de 0 à 50 U.F.C. / 100 ml
<i>Escherichia coli</i>	Absence dans 1 ml
<i>Staphylococcus aeruginosa</i>	Absence dans 1 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence dans 1 ml
Salmonelles	Absence dans 10 ml
Entérobactéries et autres Gram négatif	Absence dans 1 ml
Endotoxines bactériennes	< 0,5 U.I. / ml

Il en découle des normes internes, présentées dans le tableau XXII, pour les prélèvements réalisés dans le cadre de la validation du nettoyage.

Tableau XXII : Normes applicables aux prélèvements bactériologiques pour la validation du nettoyage.

Contrôle	Norme
Flore totale	de 0 à 50 U.F.C. / 100 cm ² ou 100 ml
Levures / moisissures	de 0 à 50 U.F.C. / 100 cm ² ou 100 ml
<i>Escherichia coli</i>	Absence sur 100 cm ² ou 100 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence sur 100 cm ² ou 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence sur 100 cm ² ou 100 ml
Samonelles	Absence sur 100 cm ² ou 100 ml
Entérobactéries et autres Gram négatif	< 10 entérobactéries et autres Gram négatif sur 100 cm ² ou 100 ml

En ce qui concerne la norme par cm², on se place dans des conditions plus strictes que ce que l'on peut trouver dans la littérature :

- 2 U.F.C. / cm² pour les bactéries.
- 1 U.F.C. /cm² pour les moisissures.

En ce qui concerne la flore totale, les exigences sont plus strictes que ce

que prévoit la Pharmacopée Européenne pour l'eau purifiée, mais elles sont en adéquation avec la littérature qui prévoit que la dernière eau de rinçage soit de qualité identique à celle de l'eau utilisée pour le dernier rinçage.

La recherche des endotoxines bactériennes n'est pas retenue ici; cette recherche présente un intérêt notamment comme indicateur du développement éventuel d'un biofilm. En effet, si les germes peuvent rester accrochés au sein du biofilm, les déchets de microorganismes vont pouvoir être éliminés et recherchés.

Cependant, on a pu constater à plusieurs reprises que, malgré la mise en évidence d'une contamination bactérienne nette de nos équipements, le taux d'endotoxines restait inférieur au seuil de quantification. Ce paramètre n'a donc pas été retenu.

Pour le matériel rincé à l'eau adoucie, les contraintes relatives à la flore totale et aux levures et moisissures restent les mêmes, puisque le rinçage à l'alcool doit permettre d'atteindre une qualité microbiologique identique à ce qu'on obtiendrait avec un dernier rinçage à l'eau purifiée. La contrainte sur les germes pathogènes reste inchangée puisque l'eau potable doit, comme l'eau purifiée, en être dépourvue.

Compte tenu du rendement de prélèvement par écouvillonnage qui est de 13%, la limite est fixée à :

- **7 germes / 100 cm² pour la flore totale.**
- **7 germes / 100 cm² pour les levures et moisissures.**
- **2 germes / 100 cm² pour les entérobactéries et autres gram -.**

5-1-3- Résidus de salicylate de glycol

Prélèvements par écouvillonnage

On peut adopter une **démarche rationnelle basée sur 3 critères d'exigence** comme celle proposée par G.L. Fourman *et al* (3).

- **Aucune trace de résidus n'est visible à la surface de**

l'équipement.

La limite est de 0,004 mg / cm² selon G.L. Fourman.

- Pas plus d'1/10 000ème de la dose unitaire active dans une unité de prise du produit suivant.

Equation 1 :

Contamination totale limite (mg/cm²) = 1/10000.DUA(mg) . K/L(cm²)

La DUA est la dose unitaire active; elle est calculée de la manière suivante : *Dose centésimale x Unité de prise minimale.*

C'est une adaptation de l'équation 1 de G.L. Fourman : pas plus d'1/1 000ème de la dose minimale thérapeutique journalière dans la quantité maximale journalière du produit suivant.

Contamination totale limite (mg/cm²) = 1/1000.DJMA(mg)/J . K/L (cm²)

Pour le baume Algipan, il n'existe pas de DJMA bien établie; c'est le paramètre DUA qui est utilisé pour refléter l'activité du produit.

Le nombre maximal de prises par jour n'est pas bien établi et ce paramètre n'est pas retenu; néanmoins, pour tenir compte du fait qu'il peut y avoir plusieurs applications par jour, le facteur de sécurité est renforcé d'un facteur 10.

- Pas plus de 10 ppm de salicylate de glycol dans le produit suivant.

Equation 2 :

Contamination totale limite (mg/cm²) = 10 (mg/kg).C(kg) / L(cm²)

Cette limite découle directement de l'équation 2 de G.L. Fourman.

On détermine les deux premiers critères; le troisième critère restant

inchangé, égal à 0,004 mg / cm² . On doit sélectionner le critère le plus restrictif.

C est la capacité minimum de l'équipement considéré, la taille du plus petit lot du produit suivant.

$$C = 200 \text{ kg}$$

P est l'unité de prise maximale du produit suivant.

$$P = 2 \text{ g}$$

L est la surface de contact commune.

$$L = 161\,890 \text{ cm}^2$$

K est le nombre d'unités de prise par lot du produit suivant.

$$K = C/P = 200\,000 \text{ g} / 2 \text{ g} = 100\,000 \text{ unités de prise}$$

DJMA est la dose journalière minimum active.

J est le nombre maximum de prises par jour du produit suivant.

Equation 1 :

Dose centésimale en salicylate de glycol = 5%

Unité de prise minimale = 1 g

DUA = Dose centésimale . Unité de prise minimale = 50 mg

$$\begin{aligned} \text{Contamination totale limite} &= 1/10000 \cdot \text{DUA}(\text{mg}) \cdot K / L(\text{cm}^2) \\ &= \underline{\underline{0,00308 \text{ mg/cm}^2}} \end{aligned}$$

Equation 2 :

$$\begin{aligned} \text{Contamination totale limite} &= 10 (\text{mg/kg}) \cdot C(\text{kg}) / L(\text{cm}^2) \\ &= \underline{\underline{0,013 \text{ mg/cm}^2}} \end{aligned}$$

C'est l'équation 1 qui aboutit à la limite la plus restrictive; c'est la limite de **0,00308 mg/cm²** qui est retenue soit 498 mg pour la surface totale.

Il faut appliquer à cette limite le **rendement de récupération** préalablement calculé; il est de **81,92%**.

Après prélèvement et traitement des échantillons, la première condition à remplir est la suivante :

Sur la totalité de l'équipement, le taux de résidu est inférieur à **0,0025 mg/cm²**.

Pour certains prélèvements, on pourra obtenir un résultat supérieur à 0,0025 mg/cm² à condition que la contamination résiduelle moyenne reste inférieure à 0,0025 mg/cm² et que le taux résiduel sur un prélèvement ne soit pas supérieur à 2 fois le taux résiduel limite soit **0,005 mg/cm²**.

En effet, pour un taux de résidu supérieur, on peut craindre une perte de maîtrise du processus de nettoyage et il faudrait, dans ce cas, faire des investigations pour en déterminer la cause.

Prélèvements par rinçage

La contamination résiduelle limite à la surface totale de l'équipement est de **498 mg**; le volume d'eau utilisé pour le rinçage de l'ensemble de l'équipement est de **33 l** d'eau purifiée; la concentration limite devrait donc être de **0,015 mg/ml**.

Cette limite serait correcte si la totalité des résidus à la surface de l'équipement passait en solution dans l'eau de prélèvement.

Or, comme une partie seulement des résidus se solubilise, on applique un **facteur de sécurité de 10** à la valeur précédente.

La concentration limite en salicylate de glycol dans l'eau de prélèvement est de **0,0015 mg/ml** soit une contamination globale de **49,8 mg** dans la totalité de l'eau de prélèvement.

Comme précédemment, on pourra obtenir un résultat supérieur à 0,0015 mg/ml à condition que la contamination résiduelle moyenne reste inférieure à 0,0015 mg/ml et que le taux résiduel sur un prélèvement ne soit pas supérieur à 2 fois le taux résiduel limite soit **0,003 mg/ml**.

Le facteur de sécurité appliqué est **arbitraire**.

La pertinence de cette limite pourrait être vérifiée en déposant une quantité connue proche du taux résiduel limite $0,00308 \text{ mg/cm}^2$ sur une surface qui serait rincée par de l'eau de prélèvement dans des conditions similaires au prélèvement par rinçage effectué sur les équipements de production.

On pourrait alors déterminer le pourcentage de résidu qui se solubilise et remplacer le facteur de sécurité arbitraire de 10 par un **rendement de prélèvement**.

Cohérence des limites fixées avec le seuil de quantification de la méthode de dosage du salicylate de glycol

Si les résultats de tous les prélèvements sont **inférieurs au seuil de quantification**, il faut vérifier que la **contamination globale est inférieure à la limite fixée de 498 mg**.

La méthode de dosage utilisée permet de doser des quantités résiduelles de l'ordre de **$0,00001 \text{ mg/ml}$** .

Les résidus prélevés sur un écouvillon sont mis en solution dans 5 ml; si pour un écouvillon, la teneur est inférieure au seuil de quantification, la **quantité présente sur la surface écouvillonnée est inférieure à $0,00005 \text{ mg}$** .

Si tous les résultats pour la surface écouvillonnée sont inférieurs au seuil de quantification, compte tenu des coefficients multiplicateurs à appliquer et du rendement de récupération, la contamination totale sera inférieure à

$1\,623 \times 0,00005 \times 100/81,92 = \mathbf{0,099 \text{ mg}}$ ce qui est **inférieur à la limite fixée de 498 mg**.

Dans l'eau de rinçage, si tous les prélèvements ont une concentration **inférieure au seuil de quantification**, la **contamination globale sera inférieure à $33\,000 \cdot 0,00001 = 0,33 \text{ mg}$** ce qui est **inférieur à la limite fixée de 49,8 mg**.

5-2- Résultats obtenus sur le 1er lot de validation

5-2-1- Résultats obtenus pour le salicylate de glycol

Prélèvements par écouvillonnage

Equipement	Surfaces représentées	Ecouvillonnage principe actif		Résultats	
		Surfaces écouvillonnées	Coefficients multiplicateurs	Taux résiduel (mg/cm ²) Rdt = 81,92%	Taux résiduel x Coefficients multiplicateurs
Mélangeur = 56 217 cm ²					
Haut	7 090cm ²	100 cm ²	71	0	0
Bas	19 397,5 cm ²	100 cm ²	194	0	0
Fond	19 397,5 cm ²	100 cm ²	194	0	0
Couvercle	7 090 cm ²	100 cm ²	71	0,00001	0,00071
Emulseur	150 cm ²	75 cm ²	2	0,00010	0,00020
Planétaire	1 740 cm ²	100 cm ²	17,5	0,00001	0,000175
Racleur	1 200 cm ²	100 cm ²	12	0,00001	0,00012
Vanne d'introduction	80 cm ²	20 cm ²	4	0,00004	0,00016
Vanne de vidange	72 cm ²	18 cm ²	4	0,00011	0,00044
Fondoir = 39 528 cm ²					
Couvercle	5 672 cm ²	100 cm ²	57	0	0
Haut	14 012 cm ²	100 cm ²	140,5	0	0
Bas et fond	14 012 cm ²	100 cm ²	197	0	0
Vanne	Totale	1/4 de la surface	4	0,00002	0,00008
Pompe et tuyaux de recyclage et de transfert vers la cuve de stockage = 9 621 cm ²					
Corps de pompe	7 821 cm ²	100 cm ²	78,5	0	0
Tuyaux de transfert	1800 cm ²				
Cuve de stockage = 43 492 cm ²					
Couvercle	5 672 cm ²	100 cm ²	57	0	0
Paroi latérale et fond	37 700 cm ²	100 cm ²	377	0	0
Vanne	Totale	1/4 de la surface	4	0,00003	0,00012

Pompe de transfert vers la remplisseuse = 6 707 cm ²					
Tuyau 1 d'entrée souple	1 716 cm ²	85 cm ²	20,5	0,00012	0,00246
Tuyau 2 rigide de sortie	2 519 cm ²	75 cm ²	34	0,00001	0,00034
Tuyau 3 rigide d'alimentation	2 142 cm ²	75 cm ²	29	0	0
Corps de pompe	330 cm ²	165 cm ²	2	0,00002	0,00004
Entuseuse Kalix = 6 325 cm ²					
Trémie	5 072 cm ²	100 cm ²	51	0	0
Piston doseur	1 253 cm ²	626 cm ²	2	0	0
Total					
Total	161 890 cm ²		1 623		0,004805

Aucun résultat n'est supérieur à 0,0025 mg/cm², la contamination résiduelle totale est inférieure à 498 mg. Le résultat après prélèvements par écouvillonnage est conforme.

Prélèvements par rinçage

Equipement	Volume d'eau de prélèvement (ml)	Concentration dans l'échantillon (mg/ml)	Contamination résiduelle (mg)
Matériel de fabrication	20 000	0,00065	13
Matériel de stockage	10 000	0,00007	0,7
Matériel de conditionnement	3 000	0	0
	Volume total de l'eau de prélèvement = 33 000 ml	Concentration moyenne = 0,00042 mg/ml	Contamination résiduelle totale = 13,7 mg

Aucun résultat n'est supérieur à 0,0015 mg/ml, la contamination résiduelle totale est inférieure à 49,8 mg. Le résultat après prélèvements par rinçage est conforme.

5-2-2- Résultats microbiologiques

Prélèvements par écouvillonnage

	Flore totale (U.F.C./ 100 cm ²)	Levures et moisissures (U.F.C./ 100 cm ²)	Entérobactéries et autres gram- (U.F.C./ 100 cm ²)	Germes spécifiés : <i>E. Coli</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i>
Norme	7	7	2	Absence
Mélangeur = 56 217 cm ²				
Haut	0	0	0	Absence
Bas	1	0	0	Absence
Fond	1	0	0	Absence
Couvercle	2	0	0	Absence
Emulseur	48	1	0	Absence
Planétaire	0	0	0	Absence
Racleur	1	0	0	Absence
Vanne d'introduction	0	0	0	Absence
Vanne de vidange	0	0	0	Absence
Fondoir = 39 528 cm ²				
Couvercle	0	0	0	Absence
Haut	1	0	0	Absence
Bas et fond	0	0	0	Absence
Vanne	1	0	0	Absence
Pompe et tuyaux de recyclage et de transfert vers la cuve de stockage = 9 621 cm ²				
Corps de pompe	7	1	0	Absence
Tuyaux de transfert				
Cuve de stockage = 43 492 cm ²				
Couvercle	1	0	0	Absence
Paroi latérale et fond	0	0	0	Absence
Vanne	0	0	0	Absence

Pompe de transfert vers la remplisseuse = 6 707 cm ²				
Tuyau 1 d'entrée souple	0	0	0	Absence
Tuyau 2 rigide de sortie	0	0	0	Absence
Tuyau 3 rigide d'alimentation	0	0	0	Absence
Corps de pompe	0	0	0	Absence
Entubeuse Kalix = 6 325 cm ²				
Trémie	2	1	0	Absence
Piston doseur	3	0	0	Absence

La flore totale est non conforme sur l'émulseur du mélangeur et juste à la limite sur le corps de la pompe de transfert et de recyclage.

Prélèvements par rinçage

	Flore totale (U.F.C./ 100 ml)	Levures et moisissures (U.F.C./ 100 ml)	Entérobactéries et autres gram- (U.F.C./ 100 ml)	Germes spécifiés : <i>E. Coli</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i>
Norme	50	50	10	Absence
Matériel de fabrication	incomptable	incomptable	Non conforme (1)	Non conforme (2)
Matériel de stockage	0	0	0	Absence
Matériel de conditionnement	9	3	0	Absence

(1) Bacilles gram- oxydase -

Après recherche sur galerie API 20E , il s'agit d'*Acinetobacter Spp* à 79,1% et *Flavi. horyzihabitans* à 16,4%.

(2) Bacilles gram- oxydase -

Après recherche sur galerie API 20E , il s'agit d'Acinetobacter Spp à 81,3 % et Shigella Spp à 17,0%.

Acinetobacter : Ce sont des espèces de l'environnement, rencontrées dans le sol, l'eau, les eaux usées ou des commensaux de la peau, de la conjonctive, du nez, du pharynx, et du tractus gastro-intestinal de l'homme.

Les résultats sont non conformes sur le matériel de fabrication.

5-3- Interprétations, recherche de causes

5-3-1- Action corrective immédiate

Ces résultats non conformes excluent l'utilisation du matériel sans procéder à une nouvelle décontamination.

Après la deuxième décontamination, les résultats obtenus sont conformes et les équipements peuvent être remis en oeuvre.

Une démarche de recherche des causes est enclenchée.

5-3-2- Recherche de causes

Un brainstorming permet de lister plusieurs pistes :

- Les **brosses** utilisées pour les opérations de nettoyage et de décontamination seraient elles-mêmes **contaminées**.

Ce point va être vérifié expérimentalement.

- Les **procédures de nettoyage et de décontamination** seraient **mal respectées**.

Un audit sur le terrain permettra de mettre en évidence des dérives éventuelles.

- Les **consignes d'hygiène** (port des gants, tenue de travail, gestes à risques...) auraient été **mal respectées** et le préparateur lui-même est à l'origine d'une recontamination du matériel.

Ce point pourra également être vérifié lors de l'audit sur le terrain.

- Des **résidus de baume** serviraient de **support** au développement microbien.

Cette hypothèse est en contradiction avec les résultats physico-chimiques obtenus.

- Les **paramètres de la décontamination**, concentration en décontaminant et temps de contact, seraient **insuffisants**.

L'intervention d'un conseiller de chez Anios nous confirme que c'est peu probable.

- Les germes seraient **résistants** car ils seraient **sporulés** ou il y aurait **émergence d'une souche résistante**.

Il ne s'agit pas de germes résistants puisqu'ils cèdent rapidement lors d'une 2ème décontamination. De plus, seuls les équipements de fabrication sont contaminés. Pour le même produit, les équipements de stockage et de conditionnement soumis à des étapes de nettoyage et de décontamination similaires conduisent à des résultats conformes.

- **Certains points critiques ne seraient pas maîtrisés**.

Une revue des points critiques sera effectuée lors de l'audit sur le terrain. Cette hypothèse est confortée par le fait que le problème de contamination se limite au matériel de fabrication.

Brosses utilisées pour le nettoyage

Il s'agit de brosses adaptées à l'usage alimentaire, sans zone de rétention, facilement décontaminables, résistantes aux produits de nettoyage et de désinfection.

Après utilisation, les brosses sont rincées à l'eau chaude et stockées à l'abri de la poussière jusqu'à leur prochaine utilisation.

La veille de leur utilisation, elles sont rincées à l'eau adoucie chaude et

plongées dans une solution d'oxy-anios à 0,5% dans l'eau adoucie chaude. Les brosses sont utilisées uniquement pendant l'étape de nettoyage, lors de l'application du détergent alcalin (anios 255002). Elles ne sont utilisées, ni pour la désodorisation, ni pour la décontamination.

Pendant le nettoyage, elles sont plongées dans la solution détergente à 2% d'anios 255002 dans l'eau adoucie chaude.

A deux reprises, la qualité microbiologique de l'eau de rinçage de ces brosses a été vérifiée après décontamination et juste avant leur utilisation.

Les résultats obtenus sont les suivants :

	Flore totale (U.F.C./ 100 ml)	Levures et moisissures (U.F.C./ 100 ml)	Entérobactéries et autres gram- (U.F.C./ 100 ml)	Germes spécifiés : <i>E. Coli</i> , <i>Staph. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i>
Norme	50	50	10	Absence
Brosse (1er essai)	0	0	0	Absence
Brosse (2ème essai)	9	0	0	Absence

Les résultats obtenus sont conformes et **les brosses ne sont donc pas en cause.**

Pour s'affranchir de ce doute, les protocoles prévoient à l'avenir un **contrôle systématique du matériel de nettoyage et de décontamination.**

Audit sur le terrain

L'audit confirme les bons résultats physico-chimiques; on constate une

grande efficacité de l'étape de nettoyage, et la persistance de résidus de baume servant de niche à un développement microbien est exclu.

L'audit montre que l'opérateur **respecte les procédures et les consignes d'hygiène**.

Notre étude va donc se focaliser sur la recherche de **points critiques non maîtrisés**.

- En ce qui concerne le **fondoir** (voir la figure N°5) :

Le couvercle est divisé en deux; Une moitié est mobile et permet d'ouvrir le fondoir alors que l'autre moitié est fixe.

Les deux parties sont mises en contact avec les solutions de nettoyage et de décontamination par aspersion.

La moitié mobile est soumise à l'action mécanique des brosses, mais pas la partie fixe qui est difficilement accessible.

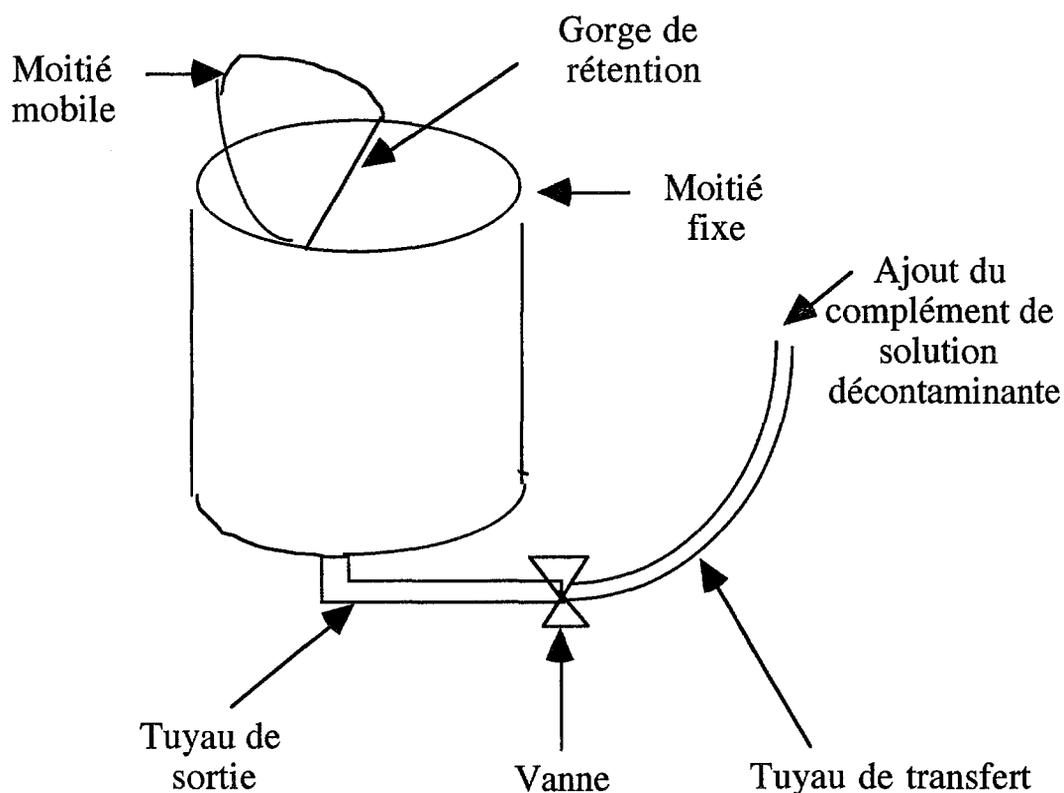
A la jonction entre les deux moitiés, il existe une sorte de gorge qui peut être une zone de rétention propice au développement microbien.

L'axe d'amélioration proposé est un **brossage de la moitié fixe et de la gorge avec des brosses à main adaptées lors de l'étape de nettoyage, et une application de la solution décontaminante mieux maîtrisée grâce à l'utilisation d'un pulvérisateur adapté**.

La décontamination du tuyau de sortie, de la vanne et du tuyau de transfert sont simultanées; le tuyau de transfert reste connecté et rempli de la solution décontaminante après la vidange du fondoir.

L'amélioration à apporter consiste à **remplir complètement le tuyau de transfert en introduisant de la solution décontaminante par l'extrémité libre de ce tuyau**.

Figure N°6 : Le fondoir



- En ce qui concerne le **mélangeur** (Voir la figure N°6) :

Le nettoyage et la décontamination du **point de piquage pour le manomètre** se font sans démontage, par l'intérieur de la cuve. De cette façon, la totalité du point de piquage n'est pas accessible.

A l'avenir, **ce manomètre sera démonté**. Ceci implique une **requalification** du manomètre après chaque remontage; il faut compter 10 minutes de requalification après chaque nettoyage - décontamination.

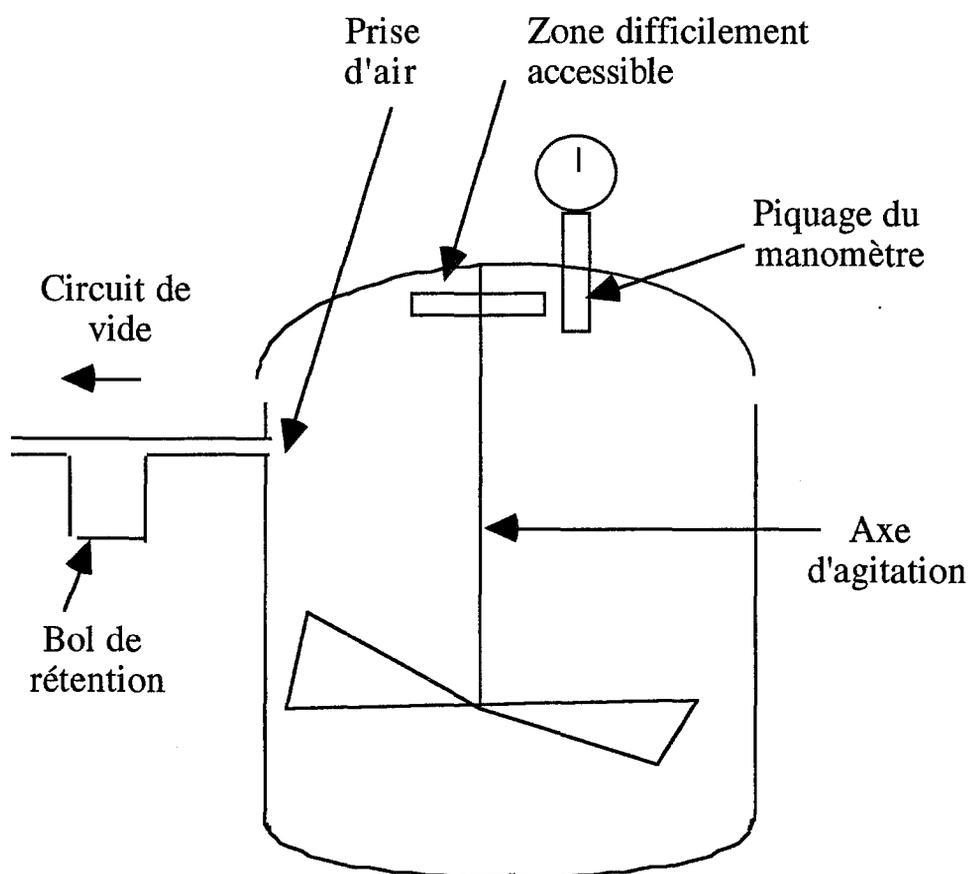
Une **zone difficilement accessible en haut de l'axe d'agitation** est mise en évidence; il s'agit de la face supérieure d'une pièce horizontale placée juste en dessous de la jonction, entre l'axe d'agitation et le couvercle du mélangeur.

Il faudra utiliser une brosse pour le nettoyage et un pulvérisateur adapté pour la mise en contact de cette zone difficilement accessible avec la solution décontaminante.

Quant au circuit de vide entre le manomètre et la pompe à vide, il n'est jamais démonté alors que si le produit atteint la prise d'air, il peut être aspiré dans ce circuit.

Il est techniquement difficile de démonter et de nettoyer ce circuit à chaque nettoyage; il sera néanmoins **décontaminé périodiquement lors de la maintenance préventive trimestrielle.**

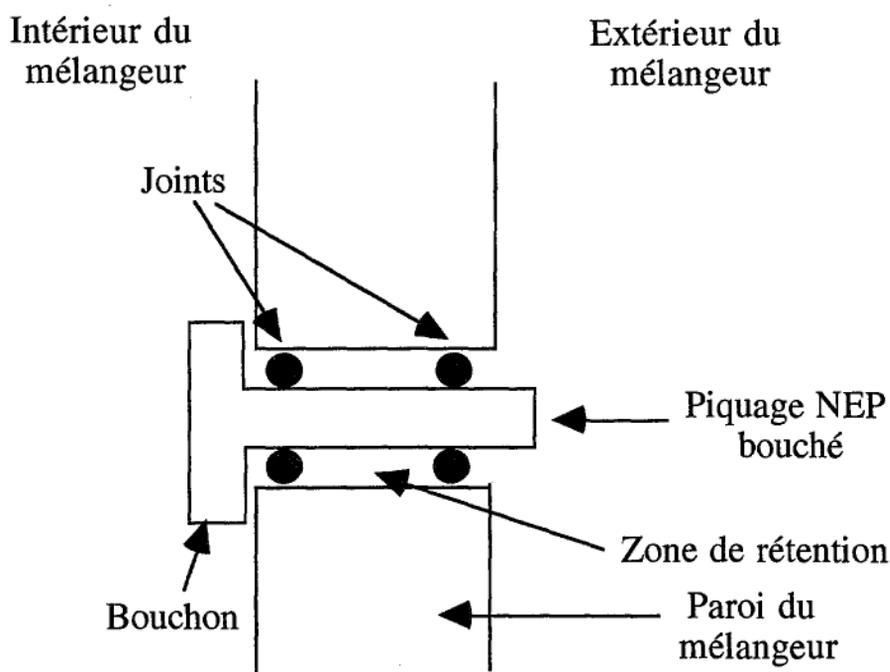
Figure N°7 : Le mélangeur



Le mélangeur est prédisposé à être nettoyé par une station de nettoyage en place. Deux **piquages NEP** (Voir la figure N°7) prévus à cet effet sont bouchés par des bouchons; deux joints doivent assurer l'étanchéité du bouchage.

Or le joint intérieur est défectueux donc il devra être **remplacé**; en attendant, les joints et la zone de rétention sont nettoyés et décontaminés puis remis en place.

Figure N°8 : Piquage NEP du mélangeur



- En ce qui concerne la **pompe de transfert et de recyclage** :

Le mode opératoire de nettoyage et de décontamination ne prévoit pas de laisser cette pompe en fonctionnement pendant les phases de nettoyage et de décontamination.

A l'avenir, elle restera en recyclage sur le mélangeur, ce qui permettra de renouveler la solution en contact avec la pompe et d'assurer la mise en contact de toutes les parties de la pompe avec les solutions de nettoyage et de décontamination.

- En ce qui concerne les **carters extérieurs des équipements** :

Ils ne sont pas décontaminés. Lors des rinçages, les carters sont aspergés et de l'eau peut contaminer l'équipement.

Il faut donc **décontaminer les parties supérieures des équipements, en même temps que l'intérieur des équipements.**

- En ce qui concerne l'**environnement** :

Il faut éliminer l'eau stagnante sur le sol. Un sol en pente avec une inclinaison vers une bouche d'élimination de l'eau facilite cette opération.

Il faut un accès facile pour le nettoyage et l'élimination de l'eau stagnante sous les équipements de fabrication.

Toutes ces conditions ne sont pas parfaitement respectées dans le box actuel de fabrication des pâteux mais elles le seront après le transfert des équipements de fabrication dans le prochain box (projet en cours).

- **Récapitulatif des actions correctives** :

Le tableau XXIII récapitule les actions correctives en séparant celles qui ont été immédiatement mises en oeuvre et celles qui devront être réalisées ultérieurement.

Tableau XXIII : Récapitulatif des actions correctives.

	Action immédiate mise en place au cours de l'audit	Action à mettre en place pour les prochains nettoyages - décontaminations
Brossage et pulvérisation de la partie fixe du couvercle du fondoir	Non réalisés	A faire après mise à disposition d'une brosse et d'un pulvérisateur adaptés
Brossage et pulvérisation de la gorge de rétention du fondoir	Nettoyage et mise en contact avec la solution décontaminante renforcés	A faire après mise à disposition d'une brosse et d'un pulvérisateur adaptés
Remplissage avec la solution décontaminante du tuyau de transfert entre le mélangeur et le fondoir	Fait	A faire
Brossage et pulvérisation sur la vasque du mélangeur	Non réalisés	A faire après mise à disposition d'une brosse et d'un pulvérisateur adaptés
Démontage du manomètre	Fait	A faire
Nettoyage du circuit de vide	Fait	A faire trimestriellement
Maîtrise du piquage NEP	Maîtrisé par le nettoyage des joints et de la zone de rétention	Changement du joint défectueux Vérification des joints et nettoyage - décontamination des piquages NEP trimestriellement
Pompe en fonctionnement lors des étapes de nettoyage et de décontamination	Fait	A faire
Décontamination des carters extérieurs des équipements	Non réalisée	A faire
Elimination de l'eau stagnante et nettoyage sous les équipements de fabrication	Raclage mais les pentes sont mal inclinées et le mélangeur n'est pas assez surélevé	Lors du transfert des équipements, les pentes seront inclinées correctement; le mélangeur devra être implanté assez haut pour un nettoyage facile sous l'équipement.

Prélèvements après audit

Les résultats obtenus sont les suivants :

Ce n'est pas le protocole complet qui est enclenché mais on réalise le contrôle d'un certain nombre de points :

Prélèvements par écouvillonnage :

	Nombre de germes /100cm ²	Norme
Couvercle fixe fondoir	31	≤7 germes/100cm ²
Couvercle mobile fondoir	0	
Corps de la pompe de transfert et recyclage	1	
Couvercle épaisseur mélangeur	0	
Piquage du manomètre du mélangeur	0	
Dessus du mélangeur	0	
Dessous du mélangeur	0	

Prélèvements par rinçage :

	Nombre de germes /100 ml	Norme
Fondoir	FT = 300 LM = 0	FT = 50 U.F.C./100 ml LM = 50 U.F.C./100 ml
Mélangeur	FT = 29 LM = 0	
Eau purifiée témoin	FT = 15 LM = 0	

FT : Flore totale

LM : Levures et moisissures

Les résultats obtenus pour le **mélangeur** sont **corrects**; c'est un réel **progrès** car d'après l'historique dont on dispose, non seulement dans le cadre de la validation du nettoyage après fabrication du baume Algipan

mais aussi après fabrication d'autres produits dans le mélangeur, les résultats n'étaient jamais corrects.

Les résultats obtenus pour la **pompe de transfert et de recyclage** sont **corrects**.

En revanche, pour le **fondoir**, les résultats obtenus **ne sont toujours pas satisfaisants**, mais plusieurs **axes d'amélioration** restent à mettre en place.

Pour les prochains nettoyages - décontaminations, il faudra, en plus, réaliser un brossage et une pulvérisation de la partie fixe du couvercle et de la gorge du fondoir.

Il faudra aussi réaliser un brossage et une pulvérisation de la vasque du mélangeur, et les joints des points de piquage NEP devront être changés. Leur nettoyage sera trimestriel, tout comme le nettoyage du circuit de vide.

Les carters extérieurs des équipements seront décontaminés et le prochain box de fabrication, mieux aménagé, permettra un nettoyage aisé sous les équipements et évitera la stagnation de l'eau sur le sol.

THESE SOUTENUE PAR : Maud BERTHIEUX

TITRE :

Validation du nettoyage des équipements de production dans l'industrie pharmaceutique : Application à la production du baume Algipan.

CONCLUSION

Dans une première partie, les problèmes de nettoyage du matériel de production dans l'industrie pharmaceutique ont été abordés de façon **théorique**.

Les différents types de contamination ont été envisagés, de même que les procédures de nettoyage - décontamination.

Les prérequis nécessaires pour pouvoir aborder la validation du nettoyage - décontamination ont été décrits, ainsi que les différents mécanismes du nettoyage et de la décontamination, les méthodes classiquement employées et les produits utilisés.

Puis, les principes de la validation du nettoyage - décontamination ont été énoncés, en précisant quel doit être le contenu du protocole de validation et celui du rapport de validation.

Les cas de nécessité de revalidation ont été cités et la validation a été replacée dans un cadre réglementaire.

La phase de réalisation pratique d'une validation a ensuite pu être envisagée, en précisant les différents modes de prélèvements avec leurs avantages et inconvénients, et les méthodes de contrôle physicochimiques et microbiologiques utilisées.

Les critères d'acceptation ont finalement été présentés.

Dans une deuxième partie, un **cas pratique** de validation du nettoyage - décontamination a été abordé.

Il s'agit de celui du matériel de production du baume Algipan, qui peut faire l'objet de contaminations croisées, d'une contamination microbienne et d'une contamination par les agents utilisés pour le nettoyage, la désodorisation et la décontamination.

Un **traceur** a été sélectionné pour la recherche de traces de baume

Algipan.

Les prélèvements ont été réalisés par **écouvillonnage** ou par **rinçage**, et les **limites** ont été fixées pour chaque type de contamination.

Deux produits étaient fabriqués depuis longtemps dans le même matériel de fabrication, sans problème particulier, d'où le caractère jugé **non prioritaire** de la validation.

Cependant, la fabrication d'un nouveau produit a accéléré cette validation.

Or, la contamination **microbiologique** de ce matériel s'est avérée **non conforme**, ce qui a exigé une **recherche des causes** de contamination et des **moyens d'y remédier**.

La nécessité de revalider l'ensemble du nettoyage du matériel de fabrication du fait de son prochain transfert de localisation a freiné pour l'instant le processus.

L'aboutissement de la démarche de validation aura un **enjeu économique** important, l'objectif recherché étant un gain de temps et une meilleure disponibilité des équipements.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN

LE PRESIDENT DE THESE

P. DEMENGE

PROFESSEUR : J. ALARY

BIBLIOGRAPHIE

Articles de périodiques :

- (1) - Agalloco J. "Points to Consider" in the Validation of Equipment Cleaning procedures. *Journ. Parenteral SC. and Tech.*, 1992, **46**, 163-168
- (2) - Cardner R.Y. Current Concepts for the Microbiological Control of Nonsterile Products : A report from the PMA Quality Control and Biologics Section, *Pharm. Technol.*, 1983, **7**, 54
- (3) - Fourman G.L. and Mullen M.V. Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations. *Pharm. Technol.*, 1993, **17**, 54-60
- (4) - Gavlick W.K., Ohlemeier L.A. and Kaiser H.J. Analytical Strategies for Cleaning Agent Residue Determination. *Pharm. Technol.*, 1995, **19**, 136-144
- (5) - Harder S.W. The validation of cleaning procedures *Pharm. Technol.*, 1984, **8**, 29-34
- (6) - Jenkins K.M. and Vanderwielen A.J. Cleaning validation : An Overall Perspective. *Pharm. Technol.*, 1994, **18**, 60-73
- (7) - Laban F., Cauwet M., Champault V. *et al* Validation des procédés de nettoyage Rapport d'une commission SFSTP. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1996, **6**, 5-40
- (8) - LeBlanc D.A. Establishing scientifically justified acceptance criteria for cleaning validation of finished drug products. *Pharmaceutical technology*, 1998, **22**, 136-148
- (9) - LeBlanc D.A. , Danforth D.D. and Smith J.M. Cleaning technology

for pharmaceutical manufacturing. *Pharmaceutical Technology*, 1993, 84-92

(10) - Mendenhall D.W. Cleaning Validation. *Drug Dev. and Industrial Pharmacy*, 1989, **15**, 2105 - 2114

(11) - Parenteral drug association environmental task force
Fundamentals of a microbiological environmental monitoring program.
J. Parent. Sci. Tech., 1990, **44**, S1

(12) - Pruvost M. Les procédures : moyen de formation à la qualité.
Sciences et techniques pharmaceutiques (STP), 1984, **13**, 439-442

(13) - Skepneck E. FDA validation and certification The right way. *STP Pharma Prat.*, 1991, **1**, 641-646

(14) - Smith J.M. A modified Swabbing Technique for Validation of Detergent Residues in Clean-in-place Systems. *Pharm. Technol.*, 1992, **16**, 60-66

(15) - Smith J.M. Selecting Analytical Methods to Detect Residue from Cleaning Compounds in Validated Process systems. *Pharm. Technol.*, 1993, **17**, 88-89

(16) - Zeller A.O. Cleaning validation and residue limits : a contribution to current discussions. *Pharmaceutical Technology Europe*, Novembre 1993, 18-27

Chapitres de livres :

(17) - McCormick P.Y. et Cullen L.F. Cleaning Validation In Berry I.R. et Nash R.A. *Pharmaceutical Process Validation*, Second Edition Revised and expanded, Dekker, New York, 1993, 319-349

Textes réglementaires et recommandations :

(18) - Bonnes pratiques de fabrication CEE, édition française, 1998

(19) - FDA, "Guide to Inspection of Validation of Cleaning Processes" (Division of Field Investigations, Office of Regional Operations, Office of Regulatory Affairs), July 1993

(20) - Guide du bionettoyage, commission centrale des marchés GPEM/SL Collection marchés publics 5670 (Journal officiel de la république française, recommandation N°E1-90) 2-36

(21) - Gestion des risques de contamination croisée dans l'industrie pharmaceutique, Guide ASEC, Paris, 1993

Comptes rendus publiés de Congrès :

(22) - J.L. Mazert (Roussel-Uclaf), A. Carpentier (SNIP), F. Christin (Parke Davis), C. Claire (Sophartex), G. Rimlinger (Sanofi Winthrop), S. Roman (Glaxo) Atelier II : Validation du nettoyage des locaux et matériels de production, Ateliers Nationaux de la Qualité, Tours, 2-3 Février 1995, 46-67

(23) - C. Martin-Delory (Laboratoires Meram), P. Trotemann (Pasteur Mérieux S&V), F. Laban (Expert Consultant en Ultra-Propreté), A. Picaut (Laboratoires Janssen), G. GHIO (Beten Ingénierie)"Le Nettoyage dans les Industries de la Santé," Séminaire IFIP du 20 Décembre 94

ANNEXES

Annexe 1 : Etude statistique des résultats de l'écouvillonnage du salicylate de glycol

Par la méthode des moindres carrés, on détermine l'équation de la droite
Quantité de salicylate de glycol récupérée = f(Quantité de salicylate de glycol déposée).

$$y = 0,9899 x - 0,0001$$

Le coefficient de corrélation R^2 est égal à 0,7873.

R^2 étant faible et les quantités de salicylate de glycol récupérées variables, une étude statistique est nécessaire pour pouvoir exploiter ces résultats.

Existe-t-il des valeurs aberrantes parmi les résultats obtenus?

On obtient pour chaque quantité de salicylate de glycol déposée une série de n résultats expérimentaux ($y_1, y_2 \dots y_n$) où n est égal à 3. Le test de Dixon est effectué sur chaque série pour rechercher des valeurs de y aberrantes éventuelles.

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'appartenance des résultats à une même population normale. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à n , $n \leq 10$, la fonction discriminante est la suivante :

$$r_1 = \frac{y_2 - y_1}{y_n - y_1} \quad \text{ou} \quad r_1 = \frac{y_n - y_{n-1}}{y_n - y_1}$$

La table donne les valeurs de $(r_1)_p$ telles que $\text{Prob}(r_1 < (r_1)_p) = P$ quand l'hypothèse H_0 est vérifiée.

Pour $n = 3$ et $P = 0,95$, $(r_1)_{0,95} = 0,941$.

Pour $n = 3$ et $P = 0,99$, $(r_1)_{0,99} = 0,988$.

Si $r_1 < (r_1)_{0,95}$, la valeur de y appartient à la loi normale.

Si $(r_1)_{0,95} < r_1 < (r_1)_{0,99}$, la valeur de y est suspecte.

Si $r_1 > (r_1)_{0,99}$, la valeur de y est aberrante.

Première série de valeurs : $4,5 \cdot 10^{-4}$ g de salicylate de glycol.

y1	y2	y3
$3,17 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$	$4,19 \cdot 10^{-4}$
$r_1 = 0,068$		$r_1 = 0,931$

Deuxième série de valeurs : $6 \cdot 10^{-4}$ g de salicylate de glycol.

y1	y2	y3
$4,4 \cdot 10^{-4}$	$4,48 \cdot 10^{-4}$	$5,24 \cdot 10^{-4}$
$r_1 = 0,095$		$r_1 = 0,904$

Troisième série de valeurs : $7,5 \cdot 10^{-4}$ g de salicylate de glycol.

y1	y2	y3
$5,41 \cdot 10^{-4}$	$6,29 \cdot 10^{-4}$	$7,79 \cdot 10^{-4}$
$r_1 = 0,370$		$r_1 = 0,630$

Aucune valeur n'est aberrante ni même suspecte.

Existe-t-il une relation linéaire entre la quantité de salicylate de glycol déposée et la quantité de salicylate de glycol récupérée?

Pour valider l'ajustement, il faut vérifier la dépendance par l'analyse des variances S^2 .

x Quantité de salicylate déposée	y Quantité de salicylate récupérée	y_{moy} $= \Sigma y/N$	y_{est} $= ax + b$	$(y_{est} - y_{moy})^2$	$(y - y_{est})^2$
$5,1 \cdot 10^{-4}$	$4,19 \cdot 10^{-4}$	4,91	$4,05 \cdot 10^{-4}$	$7,46 \cdot 10^{-9}$	$2,00 \cdot 10^{-10}$
$4,55 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$		$3,50 \cdot 10^{-4}$	$1,98 \cdot 10^{-8}$	$6,97 \cdot 10^{-10}$
$4,3 \cdot 10^{-4}$	$3,17 \cdot 10^{-4}$		$3,26 \cdot 10^{-4}$	$2,74 \cdot 10^{-8}$	$7,49 \cdot 10^{-11}$
$6,6 \cdot 10^{-4}$	$5,24 \cdot 10^{-4}$		$5,53 \cdot 10^{-4}$	$3,86 \cdot 10^{-9}$	$8,60 \cdot 10^{-10}$
$5,25 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$		$4,20 \cdot 10^{-4}$	$5,12 \cdot 10^{-9}$	$4,12 \cdot 10^{-10}$
$5,25 \cdot 10^{-4}$	$4,48 \cdot 10^{-4}$		$4,20 \cdot 10^{-4}$	$5,12 \cdot 10^{-9}$	$8,01 \cdot 10^{-10}$
$7,55 \cdot 10^{-4}$	$7,79 \cdot 10^{-4}$		$6,47 \cdot 10^{-4}$	$2,44 \cdot 10^{-8}$	$1,73 \cdot 10^{-08}$
$7,75 \cdot 10^{-4}$	$5,41 \cdot 10^{-4}$		$6,67 \cdot 10^{-4}$	$3,10 \cdot 10^{-8}$	$1,59 \cdot 10^{-08}$
$7,1 \cdot 10^{-4}$	$6,29 \cdot 10^{-4}$		$6,03 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-8}$	$6,85 \cdot 10^{-10}$
	$\Sigma y =$ $44,21 \cdot 10^{-4}$			$SCE_{reg} =$ $1,37 \cdot 10^{-7}$	$SCE_{res} =$ $3,70 \cdot 10^{-8}$

Tableau d'analyse des variances :

Origine de la fluctuation	SCE	ddl	Var	F
Pente de la droite de regression	SCE_{reg}	1	$S^2_{reg} = SCE_{reg}$	S^2_{reg} / S^2_{res} $= 25,91$
Résiduelle	SCE_{res}	$N-2 = 7$	$S^2_{res} = SCE_{res} / 7$	
Totale	SCE_t	$N-1 = 8$		

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'existence d'une dépendance entre x et y. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à N, regroupés en k classes où N est égal à 9 et k à 3, la fonction discriminante est la suivante :

Si $F_{obs} > F_{Théo}$, il existe une dépendance entre x et y.

$$F_{obs} = 25,91$$

La table de Fischer donne les valeurs de $F_{Théo}$ pour 1 ddl au numérateur, 7 ddl au dénominateur et un risque d'erreur α égal à 5%.

$$F_{\text{Théo}}(1, 7) = 5,59$$

$F_{\text{obs}} > F_{\text{Théo}}$, il y a donc dépendance entre la quantité de salicylate de glycol déposée et la quantité de salicylate de glycol récupérée.

Après avoir vérifié la dépendance, il faut vérifier le modèle linéaire. Il faut au préalable vérifier l'homogénéité des variances par le test de Cochran appliqué à k variances où k est égal à 3 et le nombre de résultats n_i par classe est identique et égal à 3.

y Quantité de germes récupérés	y_{moy} = $\Sigma y/N$	Variance S_i^2
4,19.10 ⁻⁴ 3,24.10 ⁻⁴ 3,17.10 ⁻⁴	4,91.10 ⁻⁴	3,246.10 ⁻⁹
5,24.10 ⁻⁴ 4,4.10 ⁻⁴ 4,48.10 ⁻⁴		2,149.10 ⁻⁹
7,79.10 ⁻⁴ 5,41.10 ⁻⁴ 6,29.10 ⁻⁴		1,448.10 ⁻⁸
		$\Sigma S_i^2 =$ 1,987.10 ⁻⁸

$$g_{\text{obs}} = S_{\text{max}}^2 / \Sigma S_i^2 = 1,448.10^{-8} / 1,987.10^{-8} = 0,728$$

Cette valeur est comparée au $g_{\text{théo } 5\%}$ (ddl = $n_i - 1 = 2$ et $k = 3$).

$$g_{\text{théo}} = 0,8709$$

$g_{\text{obs}} < g_{\text{théo}}$, les variances sont donc homogènes.

On effectue l'étude de l'ajustement linéaire.

x Quantité de salicylate déposée	y Quantité de salicylate récupérée	YM = $\Sigma y/n$	Yest = $ax + b$	$(y-YM)^2$	$(YM-Yest)^2$
$5,1 \cdot 10^{-4}$	$4,19 \cdot 10^{-4}$	$3,533 \cdot 10^{-4}$	$3,603 \cdot 10^{-4}$	$4,316 \cdot 10^{-9}$	$4,9 \cdot 10^{-11}$
$4,55 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$	$3,533 \cdot 10^{-4}$	$3,603 \cdot 10^{-4}$	$8,585 \cdot 10^{-10}$	$4,9 \cdot 10^{-11}$
$4,3 \cdot 10^{-4}$	$3,17 \cdot 10^{-4}$	$3,533 \cdot 10^{-4}$	$3,603 \cdot 10^{-4}$	$1,318 \cdot 10^{-9}$	$4,9 \cdot 10^{-11}$
$6,6 \cdot 10^{-4}$	$5,24 \cdot 10^{-4}$	$4,707 \cdot 10^{-4}$	$4,642 \cdot 10^{-4}$	$2,841 \cdot 10^{-9}$	$4,225 \cdot 10^{-11}$
$5,25 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$4,707 \cdot 10^{-4}$	$4,642 \cdot 10^{-4}$	$9,425 \cdot 10^{-10}$	$4,225 \cdot 10^{-11}$
$5,25 \cdot 10^{-4}$	$4,48 \cdot 10^{-4}$	$4,707 \cdot 10^{-4}$	$4,642 \cdot 10^{-4}$	$5,153 \cdot 10^{-10}$	$4,225 \cdot 10^{-11}$
$7,55 \cdot 10^{-4}$	$7,79 \cdot 10^{-4}$	$6,497 \cdot 10^{-4}$	$6,391 \cdot 10^{-4}$	$1,672 \cdot 10^{-8}$	$1,1236 \cdot 10^{-10}$
$7,75 \cdot 10^{-4}$	$5,41 \cdot 10^{-4}$	$6,497 \cdot 10^{-4}$	$6,391 \cdot 10^{-4}$	$1,182 \cdot 10^{-8}$	$1,1236 \cdot 10^{-10}$
$7,1 \cdot 10^{-4}$	$6,29 \cdot 10^{-4}$	$6,497 \cdot 10^{-4}$	$6,391 \cdot 10^{-4}$	$4,285 \cdot 10^{-10}$	$1,1236 \cdot 10^{-10}$
				$SCE_{exp} =$ $3,976 \cdot 10^{-8}$	$SCE_{aj} =$ $6,108 \cdot 10^{-10}$

Tableau d'analyse des variances :

Origine de la fluctuation	SCE	ddl	Var	F
Répétabilité	SCE_{exp}	$N-k = 6$	$S^2_{exp} = SCE_{exp} / 6$	S^2_{aj} / S^2_{exp} $= 0,092$
Ajustement	SCE_{aj}	$k-2 = 1$	$S^2_{aj} = SCE_{aj}$	
Résiduelle	SCE_{res}	$N-2 = 7$		

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'existence d'une relation linéaire entre x et y. Pour un nombre de résultat expérimentaux égal à N, regroupés en k classes où N est égal à 9 et k à 3, la fonction discriminante est la suivante :

Si $F_{obs} < F_{Théo}$, l'ajustement linéaire est valide.

$$F_{obs} = 0,092$$

La table de Fischer donne les valeurs de $F_{Théo}$ pour 1 ddl au numérateur, 6 ddl au dénominateur et un risque d'erreur α égal à 5%.

$$F_{\text{Théo}}(1, 6) = 5,99$$

$F_{\text{obs}} < F_{\text{Théo}}$, l'ajustement linéaire est donc valide.

Pour vérifier l'exactitude, on recherche un effet concentration.

Il faut au préalable vérifier l'homogénéité des variances par le test de Cochran appliqué à k variances où k est égal à 3 et le nombre de résultats n_i par classe est identique et égal à 3.

$$g_{\text{obs}} = S^2_{\text{max}} / \sum S_i^2 = 281,133 / 324,225 = 0,8671$$

Cette valeur est comparée au $g_{\text{théo } 5\%}$ (ddl = $n_i - 1 = 2$ et $k = 3$).

$$g_{\text{théo}} = 0,8709$$

$g_{\text{obs}} < g_{\text{théo}}$, les variances sont donc homogènes.

x Quantité de salicylate déposée	y Quantité de salicylate récupérée	Rendement	Rendement moyen	Variance S_i^2
5,1.10 ⁻⁴ 4,55.10 ⁻⁴ 4,3.10 ⁻⁴	4,19.10 ⁻⁴ 3,24.10 ⁻⁴ 3,17.10 ⁻⁴	82,18 71,16 73,62	75,7	33,461
6,6.10 ⁻⁴ 5,25.10 ⁻⁴ 5,25.10 ⁻⁴	5,24.10 ⁻⁴ 4,4.10 ⁻⁴ 4,48.10 ⁻⁴	79,44 83,87 85,42	82,9	9,631
7,55.10 ⁻⁴ 7,75.10 ⁻⁴ 7,1.10 ⁻⁴	7,79.10 ⁻⁴ 5,41.10 ⁻⁴ 6,29.10 ⁻⁴	103,23 69,78 88,56	87,2	281,133
				$\sum S_i^2 = 324,225$

Comparaison du rendement de récupération en fonction de la quantité de salicylate de glycol déposée :

Dépôt	$4,65 \cdot 10^{-4}$	$5,70 \cdot 10^{-4}$	$7,47 \cdot 10^{-4}$	Totaux
	82,18	79,44	103,23	
	71,16	83,87	69,78	
	73,62	85,42	88,56	
m_i	75,653	82,91	87,19	
n_i	3	3	3	$n = 9$
T_i	226,96	248,73	261,57	$T_G = 737,26$
Σy_{ij}^2	17237,20	20641,47	23368,55	61247,22
T_i^2 / n_i	17170,28	20622,20	22806,29	$\Sigma T_i^2 / n_i = 60598,77$

Tableau d'analyse des variances :

Origine de la fluctuation	SCE	ddl	Var	F
Entre types de dépôts	$SCE_f = \Sigma T_i^2 / n_i - T_G^2 / N = 204,07$	$k-1 = 2$	$S^2 = SCE_f / 2 = 102,035$	$S^2 / s^2 = 0,944$
Intra-dépôts	$SCE_r = SCE_t - SCE_f = 648,45$	$N-k = 6$	$s^2 = SCE_r / 6 = 108,075$	
Totale	$SCE_t = \Sigma y_{ij}^2 - T_G^2 / N = 852,52$	$N-1 = 8$	$V^2 = SCE_t / 8 = 106,565$	

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'absence d'effet concentration. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à N , regroupés en k classes où N est égal à 9 et k à 3, la fonction discriminante est la suivante :

Si $F_{obs} < F_{Théo}$, les moyennes des rendements sont considérées comme identiques; il n'y a pas d'effet concentration.

$$F_{obs} = 0,944$$

La table de Fischer donne les valeurs de $F_{Théo}$ pour 2 ddl au numérateur, 6 ddl au dénominateur et un risque d'erreur α égal à 5%.

$$F_{\text{Théo}}(2, 6) = 5,14$$

$F_{\text{obs}} < F_{\text{Théo}}$, il n'y a donc pas d'effet concentration.

Le rendement final est la moyenne des rendements obtenus. La moyenne est estimée de la manière suivante : Soit X une variable aléatoire distribuée selon une loi de moyenne théorique μ et d'écart-type σ . μ et σ sont inconnus. Une estimation par intervalle de confiance est possible; pour $N < 30$ et si X suit une loi normale, la variable notée T définie par $T = (M - \mu) / (s' / \sqrt{N})$ suit une loi de Student-Fisher ou loi de "t" à $N-1$ degrés de liberté.

M est la variable moyenne arithmétique. s' est l'estimation de σ .

$P(-t_\alpha < T < +t_\alpha) = 1 - \alpha$ où α est le risque d'erreur consenti.

$$P(-t_\alpha < (M - \mu) / (s' / \sqrt{N}) < +t_\alpha) = 1 - \alpha$$

$$P(m - t_\alpha \cdot s' / \sqrt{N} < \mu < m + t_\alpha \cdot s' / \sqrt{N}) = 1 - \alpha$$

La valeur de t_α est lue dans la table du "t" de Student pour $N-1 = 8$ ddl et $\alpha = 0,05$.

$$t_\alpha = 2,306$$

La moyenne des rendements $m = \sum R_i / N = 81,92$

La variance est estimée par $s'^2 = V^2 = 1/(N-1) (\sum R_i^2 - (\sum R_i)^2 / N)$ soit

$$s'^2 = 1/8 (61247,224 - 60394,7008) = 106,565$$

$$s' = 10,32$$

L'intervalle de confiance à 95% de μ est :

$$[m - 2,306 \cdot s' / \sqrt{N} ; m + 2,306 \cdot s' / \sqrt{N}]$$

$$[81,92 - 2,306 \cdot 10,32/3 ; 81,92 + 2,306 \cdot 10,32/3]$$

$$[73,99 \% ; 89,85 \%]$$

$$R = 81,92\% \pm 7,93$$

Le rendement utilisé pour l'interprétation des résultats sera de 81,92%.

Annexe 2 : Etude statistique des résultats de l'écouvillonnage bactériologique

Par la méthode des moindres carrés, on détermine l'équation de la droite
Nombre de germes récupérés = f(Nombre de germes déposés).

$$y = 0,1707 x - 1,6788$$

Le coefficient de corrélation R^2 est égal à 0,45.

R^2 étant très faible et les quantités de germes récupérés variables, une étude statistique est nécessaire pour pouvoir exploiter ces résultats.

Existe-t-il des valeurs aberrantes parmi les résultats obtenus?

On obtient pour chaque quantité de germes déposés une série de n résultats expérimentaux ($y_1, y_2 \dots y_n$) où n est égal à 3. Le test de Dixon est effectué sur chaque série pour rechercher des valeurs aberrantes éventuelles de y .

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'appartenance des résultats à une même population normale. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à n , $n \leq 10$, la fonction discriminante est la suivante :

$$r_1 = \frac{y_2 - y_1}{y_n - y_1} \quad \text{ou} \quad r_1 = \frac{y_n - y_{n-1}}{y_n - y_1}$$

La table donne les valeurs de $(r_1)_p$ telles que $\text{Prob}(r_1 < (r_1)_p) = P$ quand l'hypothèse H_0 est vérifiée.

Pour $n = 3$ et $P = 0,95$, $(r_1)_{0,95} = 0,941$.

Pour $n = 3$ et $P = 0,99$, $(r_1)_{0,99} = 0,988$.

Si $r_1 < (r_1)_{0,95}$, la valeur de y appartient à la loi normale.

Si $(r_1)_{0,95} < r_1 < (r_1)_{0,99}$, la valeur de y est suspecte.

Si $r_1 > (r_1)_{0,99}$, la valeur de y est aberrante.

Première série de valeurs : 74 germes déposés

y1	y2	y3
6	11	18
$r_1 = 0,416$		$r_1 = 0,583$

Deuxième série de valeurs : 36 germes déposés

y1	y2	y3
0	2	3
$r_1 = 0,666$		$r_1 = 0,333$

Troisième série de valeurs : 23 germes déposés

y1	y2	y3
1	3	9
$r_1 = 0,25$		$r_1 = 0,75$

Aucune valeur n'est aberrante, ni même suspecte.

Existe-t-il une relation linéaire entre la quantité de germes déposés et la quantité de germes récupérés?

Pour valider l'ajustement, il faut vérifier la dépendance par l'analyse des variances S^2 .

x Quantité de germes déposés	y Quantité de germes récupérés	y_{moy} $= \Sigma y/N$	y_{est} $= ax + b$	$(y_{est}-y_{moy})^2$	$(y-y_{est})^2$
74	18	5,89	10,95	25,64	49,66
74	6		10,95	25,64	24,53
74	11		10,95	25,64	0,002
36	0		4,47	2,02	19,95
36	2		4,47	2,02	6,08
36	3		4,47	2,02	2,15
23	9		2,25	13,26	45,60
23	1		2,25	13,26	1,55
23	3		2,25	13,26	0,57
	$\Sigma y = 53$			$SCE_{reg} =$ 122,79	$SCE_{res} =$ 150,10

Tableau d'analyse des variances :

Origine de la fluctuation	SCE	ddl	Var	F
Pente de la droite de regression	SCE_{reg}	1	$S^2_{reg} = SCE_{reg}$	S^2_{res} / S^2_{reg} $= 5,73$
Résiduelle	SCE_{res}	$N-2 = 7$	$S^2_{res} = SCE_{res} / 7$	
Totale	SCE_t	$N-1 = 8$		

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'existence d'une dépendance entre x et y. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à N, regroupés en k classes où N est égal à 9 et k à 3, la fonction discriminante est la suivante :

Si $F_{obs} > F_{Théo}$, il existe une dépendance entre x et y.

$$F_{obs} = 5,73$$

La table de Fischer donne les valeurs de $F_{Théo}$ pour 1 ddl au numérateur, 7 ddl au dénominateur et un risque d'erreur α égal à 5%.

$$F_{\text{Théo}}(1, 7) = 5,59$$

$F_{\text{obs}} > F_{\text{Théo}}$, il y a donc dépendance entre la quantité de germes déposés et la quantité de germes récupérés.

Après avoir vérifié la dépendance, il faut vérifier le modèle linéaire. Il faut au préalable vérifier l'homogénéité des variances par le test de Cochran appliqué à k variances où k est égal à 3 et le nombre de résultats n_i par classe est identique et égal à 3.

y Quantité de germes récupérés	ymoy = $\Sigma y/N$	Variance S_i^2	
18 6 11	5,89	36,33	
0 2 3		2,33	
9 1 3		17,33	
		$\Sigma S_i^2 = 55,99$	

$$g_{\text{obs}} = S_{\text{max}}^2 / \Sigma S_i^2 = 36,33 / 55,99 = 0,6488$$

Cette valeur est comparée au $g_{\text{théo } 5\%}$ (ddl = $n_i - 1 = 2$ et $k = 3$).

$$g_{\text{théo}} = 0,8709$$

$g_{\text{obs}} < g_{\text{théo}}$, les variances sont donc homogènes.

On effectue l'étude de l'ajustement linéaire.

x Quantité de germes déposés	y Quantité de germes récupérés	YM = $\Sigma y/n$	Yest = $ax + b$	$(y-YM)^2$	$(YM-Yest)^2$
74	18	11,67	10,95	40,11	0,51
74	6	11,67	10,95	32,11	0,51
74	11	11,67	10,95	0,44	0,51
36	0	1,67	4,47	2,78	7,84
36	2	1,67	4,47	0,11	7,84
36	3	1,67	4,47	1,78	7,84
23	9	4,33	2,25	21,78	4,35
23	1	4,33	2,25	11,11	4,35
23	3	4,33	2,25	1,78	4,35
				SCE _{exp} = 112	SCE _{aj} = 38,098

Tableau d'analyse des variances :

Origine de la fluctuation	SCE	ddl	Var	F
Répétabilité	SCE _{exp}	N-k = 6	$S^2_{exp} = SCE_{exp} / 6$	S^2_{aj} / S^2_{exp} = 2,04
Ajustement	SCE _{aj}	k-2 = 1	$S^2_{aj} = SCE_{aj}$	
Résiduelle	SCE _{res}	N-2 = 7		

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'existence d'une relation linéaire entre x et y. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à N, regroupés en k classes où N est égal à 9 et k à 3, la fonction discriminante est la suivante :

Si $F_{obs} < F_{Théo}$, l'ajustement linéaire est valide.

$$F_{obs} = 2,04$$

La table de Fischer donne les valeurs de $F_{Théo}$ pour 1 ddl au numérateur, 6 ddl au dénominateur et un risque d'erreur α égal à 5%.

$$F_{\text{Théo}}(1, 6) = 5,99$$

$F_{\text{obs}} < F_{\text{Théo}}$, l'ajustement linéaire est donc valide.

Pour vérifier l'exactitude, on recherche un effet concentration.

Il faut au préalable vérifier l'homogénéité des variances par le test de Cochran appliqué à k variances où k est égal à 3 et le nombre de résultats n_i par classe est identique et égal à 3.

$$g_{\text{obs}} = S_{\text{max}}^2 / \sum S_i^2 = 327,66 / 412,02 = 0,7953$$

Cette valeur est comparée au $g_{\text{théo}} 5\%$ (ddl = $n_i - 1 = 2$ et $k = 3$).

$$g_{\text{théo}} = 0,8709$$

$g_{\text{obs}} < g_{\text{théo}}$, les variances sont donc homogènes.

x Quantité de germes déposés	y Quantité de germes récupérés	Rendement	Rendement moyen	Variance S_i^2
74	18	24,32	15,77	66,35
74	6	8,11		
74	11	14,86		
36	0	0,00	4,63	18,00
36	2	5,56		
36	3	8,33		
23	9	39,13	18,84	327,66
23	1	4,35		
23	3	13,04		
				$\sum S_i^2 = 412,02$

Comparaison du rendement de récupération en fonction du nombre de germes déposés :

Dépôt	74	36	23	Totaux
	24,32	0,00	39,13	
	8,11	5,56	4,35	
	14,86	8,33	13,04	
m_i	15,76	4,63	18,84	
n_i	3	3	3	$n = 9$
T_i	47,29	13,89	56,52	$T_G = 117,7$
Σy_{ij}^2	878,38	47,53	1720,23	2646,14
T_i^2 / n_i	745,68	64,30	1064,90	$\Sigma T_i^2 / n_i = 1874,88$

Tableau d'analyse des variances :

Origine de la fluctuation	SCE	ddl	Var	F
Entre types de dépôts	$SCE_f = \Sigma T_i^2 / n_i - T_G^2 / N = 335,42$	$k-1 = 2$	$S^2 = SCE_f / 2 = 167,71$	$S^2 / s^2 = 1,22$
Intra-dépôts	$SCE_r = SCE_t - SCE_f = 824,03$	$N-k = 6$	$s^2 = SCE_r / 6 = 137,34$	
Totale	$SCE_t = \Sigma y_{ij}^2 - T_G^2 / N = 1159,45$	$N-1 = 8$	$V^2 = SCE_t / 8 = 144,93$	

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'absence d'effet concentration. Pour un nombre de résultats expérimentaux égal à N , regroupés en k classes où N est égal à 9 et k à 3, la fonction discriminante est la suivante :

Si $F_{obs} < F_{Théo}$, les moyennes des rendements sont considérées comme identiques; il n'y a pas d'effet concentration.

$$F_{obs} = 1,22$$

La table de Fischer donne les valeurs de $F_{\text{Théo}}$ pour 2 ddl au numérateur, 6 ddl au dénominateur et un risque d'erreur α égal à 5%.

$$F_{\text{Théo}}(2, 6) = 5,14$$

$F_{\text{obs}} < F_{\text{Théo}}$, il n'y a donc pas d'effet concentration.

Le rendement final est la moyenne des rendements obtenus. La moyenne est estimée de la manière suivante : Soit X une variable aléatoire distribuée selon une loi de moyenne théorique μ et d'écart-type σ . μ et σ sont inconnus. Une estimation par intervalle de confiance est possible; pour $N < 30$ et si X suit une loi normale, la variable notée T définie par $T = (M - \mu) / (s' / \sqrt{N})$ suit une loi de Student-Fisher ou loi de "t" à $N-1$ degrés de liberté.

M est la variable moyenne arithmétique. s' est l'estimation de σ .

$P(-t_\alpha < T < +t_\alpha) = 1 - \alpha$ où α est le risque d'erreur consenti.

$$P(-t_\alpha < (M - \mu) / (s' / \sqrt{N}) < +t_\alpha) = 1 - \alpha$$

$$P(m - t_\alpha \cdot s' / \sqrt{N} < \mu < m + t_\alpha \cdot s' / \sqrt{N}) = 1 - \alpha$$

La valeur de t_α est lue dans la table du "t" de Student pour $N-1 = 8$ ddl et $\alpha = 0,05$.

$$t_\alpha = 2,306$$

$$\text{La moyenne des rendements } m = \Sigma R_i / N = 13,08$$

$$\text{La variance est estimée par } s'^2 = V^2 = 1/(N-1) (\Sigma R_i^2 - (\Sigma R_i)^2 / N) \text{ soit}$$

$$s'^2 = 1/8 (2698,91 - 1539,46) = 144,93$$

$$s' = 12,04$$

L'intervalle de confiance à 95% de μ est :

$$[m - 2,306 \cdot s' / \sqrt{N} ; m + 2,306 \cdot s' / \sqrt{N}]$$

$$[13,08 - 2,306 \cdot 12,04/3 ; 13,08 + 2,306 \cdot 12,04/3]$$

$$[3,82 \% ; 22,33 \%]$$

$$R = 13,08\% \pm 9,25$$

Le rendement de récupération utilisé pour l'interprétation des résultats sera de 13,08 %.



Serment des Apothicaïres

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 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 d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



RESUME :

La première partie est une revue bibliographique.

Les types de contamination rencontrés, les méthodes de nettoyage et de décontamination employées ainsi que les produits utilisés sont passés en revue.

Les indications que doivent contenir les procédures de nettoyage, le protocole de validation et le rapport de validation sont précisées.

Les pré-requis nécessaires à la validation et les principes de la démarche sont énoncés.

Cette validation est replacée dans un cadre réglementaire.

La réalisation pratique est abordée ; Les modes de prélèvement et les méthodes de contrôle physico-chimique et bactériologique sont décrits avec leurs avantages et inconvénients.

Les limites acceptables de contamination résiduelle sont présentées.

Dans une deuxième partie, un cas pratique est étudié. Les équipements de production du baume Algipan sont soumis à un risque de contaminations croisées, de contamination microbiologique et de contamination par les agents de nettoyage, de désodorisation et de décontamination.

Les prélèvements sont effectués par rinçage ou par écouvillonnage. Pour la recherche des traces de baume Algipan, un traceur est utilisé.

Après une première série de résultats non conformes, une recherche de causes est enclenchée et des actions correctives sont proposées.

MOTS-CLES :

VALIDATION – NETTOYAGE – DECONTAMINATION – PATEUX –
CONTAMINATION – CROISEE – PHYSICOCHIMIQUE –
BACTERIOLOGIQUE

ADRESSE PERSONNELLE :

[Données à caractère personnel]