



HAL
open science

Contribution à l'étude et à la validation d'un procédé de stérilisation par la chaleur humide

Dominique Rovarch

► **To cite this version:**

Dominique Rovarch. Contribution à l'étude et à la validation d'un procédé de stérilisation par la chaleur humide. Sciences pharmaceutiques. 1994. dumas-02117896

HAL Id: dumas-02117896

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02117896>

Submitted on 2 May 2019

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>

2^e exemplaire



115 016111 4

UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I

Sciences Technologie Médecine

U.F.R. de PHARMACIE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE : 1994

N° d'ORDRE : 7058

**CONTRIBUTION A L'ETUDE ET A LA VALIDATION D'UN
PROCEDE DE STERILISATION PAR LA CHALEUR HUMIDE**

THESE

Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE 1
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Monsieur ROVARCH Dominique

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 14 décembre 1994

Devant :

Monsieur le professeur C.JEANNIN

Monsieur G.LEQUIEN

Monsieur D.VIDAL

Monsieur G.MORTHA

Président du Jury

Pharmacien industriel

Chef unité microbiologie CRSSA

Maître de conférences



UNIVERSITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I

Sciences Technologie Médecine

U.F.R. de PHARMACIE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE : 1994

N° d'ORDRE : 7058

**CONTRIBUTION A L'ETUDE ET A LA VALIDATION D'UN
PROCEDE DE STERILISATION PAR LA CHALEUR HUMIDE**

THESE

**Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE 1
pour obtenir le grade de : DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Monsieur ROVARCH Dominique

[Données à caractère personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 14 décembre 1994

Devant :

Monsieur le professeur C.JEANNIN

Monsieur G.LEQUIEN

Monsieur D.VIDAL

Monsieur G.MORTHA

Président du Jury

Pharmacien industriel

Chef unité microbiologie CRSSA

Maître de conférences

A Monsieur le professeur C.JEANNIN

Professeur de Pharmacie galénique
Faculté de pharmacie, Grenoble

Pour la confiance que vous m'avez témoignée en acceptant la présidence de cette thèse, veuillez accepter mes remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur G.LEQUIEN

Pharmacien responsable
Laboratoires SYNTHELABO, Quétigny (21)

Pour les précieux conseils que vous m'avez transmis durant ces quelques mois de stage et pour votre gentillesse, veuillez recevoir avec mes remerciements l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur G.MORTHA

Maître de conférences, laboratoire de Pharmacie galénique et industrielle
Faculté de pharmacie, Grenoble

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette étude.

Pour les précieuses explications que vous m'avez transmises durant cette étude et pour votre disponibilité exemplaire, veuillez recevoir avec mes remerciements l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur D.VIDAL

Chef de l'unité de microbiologie
C.R.S.S.A., Grenoble

Pour avoir accepté d'apporter votre compétence à la critique de cette thèse, veuillez accepter l'expression de mes sentiments les meilleurs.

A Messieurs A.RICHARD, P.WENTZLER, R.PINELLE

Au personnel des laboratoires SYNTHELABO
Laboratoire SYNTHELABO, Quétigny (21)

Pour m'avoir, durant mon stage au sein des laboratoires SYNTHELABO, conseillé, aidé, encouragé dans cette étude, veuillez accepter l'expression de mes sentiments les meilleurs.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1.HISTORIQUE	17
2.DEFINITION	18
3.LES METHODES DE STERILISATION	19
3.1.STERILISATION PAR LA CHALEUR	19
3.1.1.Stérilisation par la chaleur sèche	19
3.1.2.Stérilisation par la chaleur humide	20
3.2.STERILISATION PAR FILTRATION	20
3.3.STERILISATION PAR CONTACT GAZEUX	21
3.3.1.Stérilisation par l'oxyde d'éthylène	21
3.4.STERILISATION PAR RAYONNEMENTS IONISANTS	22
4.LES PROCEDES DE STERILISATION	23
4.1.SYSTEME FERME	23
4.2.SYSTEME CONTINU OU OUVERT	23
5.LA DESTRUCTION DES MICROORGANISMES	24
5.1.INTRODUCTION	24
5.2.COURBE DE SURVIE	24
5.3.COURBE D'EFFICACITE	25
5.4.COURBE DE RESISTANCE THERMIQUE	27
5.5.COMPARAISON DES MODELES DE BALL ET BIGELOW AVEC CELUI D'ARRHENIUS	28
5.6.L'EFFET LETAL	29
6.LE CONTROLE DE STERILITE	33
6.1.LES INDICATEURS BIOLOGIQUES DE STERILITE	33
6.1.1.Introduction	33
6.1.2.Domaine d'application	34
6.1.3.Qualités requises pour le microorganisme utilisé	

dans la préparation des indicateurs biologiques	34
6.1.3.1. <i>Essai de validation</i>	34
6.1.3.2. <i>Essai de routine</i>	34
6.1.4. Précautions d'utilisation	35
6.1.4.1. <i>Préparations commerciales</i>	35
6.1.4.2. <i>Validation de l'indicateur</i>	35
6.1.5. Un exemple de préparation d'un indicateur biologique :	
le bacillus stearotherophilus	35
6.1.6. Conclusion	35
6.2. LES INDICATEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE STERILITE	37
6.2.1. Introduction	37
6.2.2. Etude d'un indicateur physico-chimique : Thermalog S®	37
6.2.2.1. <i>Présentation</i>	37
6.2.2.2. <i>Avantages</i>	38
6.2.2.3. <i>Conclusion</i>	38
6.3. LES PAPIERS TEMOINS DE STERILITE	38
6.3.1. Introduction	38
6.3.2. Papier pour la stérilisation à la chaleur humide	39
6.3.2.1. <i>Papier crêpé</i>	39
6.3.2.2. <i>Papier lisse</i>	39
6.4. PAPIERS D'EMBALLAGE, INDICATEURS DE STERILITE	39
6.4.1. Résistance mécanique suffisante	39
6.4.2. Perméabilité à l'agent stérilisant	40
6.4.3. Barrière contre les microorganismes	40
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE	41
1. INTRODUCTION	42

2.DESCRPTION D'UNE CHAINE DE FABRICATION D'AMPOULES INJECTABLES AU SEIN DES LABORATOIRES SYNTHELABO	42
2.1.SALLE DE FABRICATION DE LA SOLUTION A CONDITIONNER	42
2.2.SALLE DE REMPLISSAGE	42
3.POURQUOI UTILISER UNE STERILISATION FINALE ?	43
3.1.CONCEPTIONS DES SALLES PROPRES DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE	43
3.1.1.Objectifs de conceptions des installations	43
3.1.2.Implantation des salles propres	44
3.2.STERILISATION FINALE	45
4.POINTS SUR LE CAHIER DES CHARGES D'UN AUTOCLAVE A CHALEUR HUMIDE	45
4.1.INTRODUCTION	45
4.2.OBJET ET DESTINATION D'UN AUTOCLAVE	46
4.2.1.Que peut-on stériliser ?	46
4.2.2.Volume du contenant et du lot	46
4.2.3.Implantation de l'autoclave	47
4.2.4.Procédé d'autoclavage et cycle de stérilisation	47
4.3.SPECIFICATIONS FONCTIONNELLES DE L'AUTOCLAVE	47
5.PREPARATIFS POUR LA QUALIFICATION DE L'AUTOCLAVE FEDEGARI FOF6®	48
5.1.INTRODUCTION	48
5.2.DEROULEMENT D'UN CYCLE DE STERILISATION	48
5.3.CONTROLE DES DIFFERENTS PARAMETRES LORS D'UN CYCLE DE STERILISATION	49
5.3.1.Contrôle de la température	51
5.3.2.Contrôle de la pression	51
5.3.3.Contrôle du temps	51
5.4.LES APPAREILS DE CONTROLE POUR LA QUALIFICATION	51

5.4.1.L'enregistreur YOKOGAWA®	51
5.4.2.L'enregistreur SPEEDOMAX®	52
5.4.3.Thermomètre à aiguille	52
5.4.4.Chronomètre manuel	52
6.QUALIFICATION DE L'AUTOCLAVE FEDEGARI FOF6	52
6.1.INTRODUCTION	52
6.2.LE TEST DE BOWIE ET DICK	53
6.2.1.Introduction	53
6.2.2.But du test	53
6.2.3.Matériel utilisé pour le test	53
6.2.4.Déroulement du test	54
6.3.REPARTITION DE LA CHALEUR DANS L'ENCEINTE DE L'AUTOCLAVE	55
6.3.1.Introduction	55
6.3.2.Matériel	55
6.3.2.1. <i>Chariots et ampoules</i>	55
6.3.2.2. <i>Les sondes et enregistreurs</i>	55
6.3.3.Méthode	56
6.4.CHALLENGE BACTERIEN	58
6.4.1.Introduction	58
6.4.2.Matériel	58
6.4.3.Méthode	58
6.4.3.1. <i>Dénombrement de la population initiale de spores et de la population résiduelle après exposition à 121 °C pendant 30 mn</i>	58
6.4.3.2. <i>Détermination de la valeur D</i>	59
6.4.3.3. <i>Détermination de la valeur stérilisatrice par la méthode de la fraction négative</i>	59
6.5.PENETRATION DE LA CHALEUR DANS LES AMPOULES INJECTABLES LORS DE LA STERILISATION	60

6.5.1.Introduction	60
6.5.2.Etude d'une loi de transfert de chaleur pour décrire la pénétration de la chaleur au sein des ampoules	60
6.5.2.1.Approche théorique	60
6.5.2.2.Approche par la recherche d'un coefficient de transfert de chaleur global entre milieu extérieur et intérieur des ampoules	62
6.5.3.Matériel et méthode	63
6.5.3.1.Expériences en bain d'huile	63
6.5.3.2.Etude de K dans l'autoclave lors d'un cycle de stérilisation	64
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	68
1.TEST DE BOWIE ET DICK	69
1.1.RAPPEL DU MODE OPERATOIRE	69
1.2.RESULTATS	69
2.REPARTITION DE LA CHALEUR DANS L'ENCEINTE DE L'AUTOCLAVE	70
2.1.RAPPELS DU BUT ET DU DEROULEMENT DE L'ETUDE	70
2.1.1.But	70
2.1.2.Déroulement de l'étude	70
2.2.RESULTATS	70
2.3.DISCUSSION	76
2.3.1.Températures des sondes durant la phase de chauffage	76
2.3.2.Températures du plateau de stérilisation	76
2.3.3.Durée du plateau de stérilisation	77
3.CHALLENGE BACTERIEN	78
3.1.BUT	78
3.2.RESULTATS	78

3.2.1.Valeur de D et dénombrement de la population de l'échantillon	78
3.2.2.Résultats de la surdestruction bactérienne	79
3.2.2.1. <i>Localisation des échantillons</i>	79
3.3.DISCUSSION	81
4.PENETRATION DE LA CHALEUR	82
4.1.BUT	82
4.2.RESULTATS ET DISCUSSION	83
4.2.1.Résultats des expériences en bain d'huile	83
4.2.2.Discussion des expériences en bain d'huile	85
4.2.3.Résultats de l'étude de K dans l'autoclave	86
4.2.4.Etude d'une méthode de simulation	93
CONCLUSION GENERALE	99
BIBLIOGRAPHIE	100

RECAPITULATIF DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : courbe de survie	25
Figure 2 : courbe d'efficacité	26
Figure 3 : courbe de résistance thermique	27
Figure 4 : modèle d'Arrhénius	28
Figure 5 : courbe de l'effet léthal	32
Figure 6 : implantation d'une salle propre	44
Figure 7 : position des sondes pour la qualification	57
Figure 8 : gradients de température à l'intérieur d'une ampoule à la suite d'une élévation de la température extérieure	61
Figure 9 : définition d'un coefficient de transfert de chaleur	62
Figure 10 : schéma de l'expérience en bain d'huile	63
Figure 11 : appareillage étanche pour le pilotage et le contrôle de la stérilisation des ampoules	66
Figure 12 : appareillage étanche pour le pilotage en routine de la stérilisation des ampoules	67
Figure 13 : profils des températures dans l'autoclave lors de la phase de chauffage	70
Figure 14 : plan des chariots dans l'autoclave	79
Figure 15 : chariot légendé	79
Figure 16 : détermination de K pour une ampoule de 5 ml à T final = 60 °C	83
Figure 17 : détermination de K pour une ampoule de 20 ml à T final = 60 °C	84
Figure 18 : détermination de K pour un flacon de 10 ml à T final = 60 °C	84
Figure 19 : détermination de K pour un flacon de 20 ml à T final = 60 °C	85
Figure 20 : variation de K pour une ampoule de 2 ml	87
Figure 21 : évolutions des températures d'une ampoule de 2 ml et de l'autoclave	87
Figure 22 : variation de K pour une ampoule de 5 ml	88
Figure 23 : évolutions des températures d'une ampoule de 5 ml et de l'autoclave	88
Figure 24 : variation de K pour une ampoule de 20 ml	89

Figure 25 : évolutions des températures d'une ampoule de 20 ml et de l'autoclave	89
Figure 26 : variation de K pour un flacon de 10 ml	90
Figure 27 : évolutions des températures d'un flacon de 10 ml et de l'autoclave	90
Figure 28 : variation de K pour un flacon de 20 ml	91
Figure 29 : évolutions des températures d'un flacon de 20 ml et de l'autoclave	91
Figure 30 : Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des ampoules de 2 ml	94
Figure 31 : Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des ampoules de 5 ml	94
Figure 32 : Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des ampoules de 20 ml	95
Figure 33 : Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des flacons de 10 ml	95
Figure 34 : Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des flacons de 20 ml	96
Tableau 1 : variations de F_T en fonction de la température ($T_{réf} = 120\text{ °C}$)	29
Tableau 2 : variations de L en fonction de la température	30
Tableau 3 : variations des taux de létalité et des temps équivalents en fonction de la température	31
Tableau 4 : fiche de réglage d'un autoclave : valeurs nominales des paramètres variables à régler par l'opérateur	50
Tableau 5 : résultats des tests de Bowie-Dick	69
Tableau 6 : résultats d'un cycle à vide	71
Tableau 7 : résultats d'un cycle ampoules 2 ml pleine charge	72
Tableau 8 : résultats d'un cycle ampoules 2 ml demi-charge	73
Tableau 9 : résultats d'un cycle ampoules 5 ml pleine charge	74
Tableau 10 : résultats d'un cycle ampoules 5 ml demi-charge	75
Tableau 11 : résultats de la valeur de D	78
Tableau 12 : localisation des ampoules chargées de bacillus stearothermophilus	80
Tableau 13 : résultats du challenge bactérien	81
Tableau 14 : valeurs de Fo calculées par fraction négative	82
Tableau 15 : valeurs de K	85
Tableau 16 : résultats des valeurs de K pour les différents contenants	92

symboles	signification	unité
T	température	°C, K
t	temps	h, mn, s
No	nombre initial de spores	-----
N	nombre final de spores	-----
k_T	constante de vitesse de la loi cinétique de destruction des microorganismes à la température T	s^{-1}
D	temps de réduction décimale	mn
F	temps équivalent à une température T	mn
z	valeur de destruction thermique	°C
A	facteur de fréquence	s
Ea	énergie d'activation	$J.mol^{-1}$
R	constante des gaz parfaits	$J.mol^{-1}.K^{-1}$
L	taux de léthalité	%
Fo	valeur stérilisatrice	mn
h	coefficient de transfert de chaleur	$Watt.m^{-2}.K^{-1}$
ϕ	flux de chaleur	Watt
S	surface	m^2
Q	quantité de chaleur	J
m	masse	kg
Cp	capacité calorifique	$J.kg^{-1}.K^{-1}$
K	coefficient de transfert de chaleur global	J^{-1}
Gr	nombre de Grashoff	adimension.
d_H	diamètre hydraulique	m
ρ	masse volumique	$kg.m^{-3}$
g	accélération de la pesanteur	$m.s^{-2}$
μ	viscosité dynamique	Pa.s
β	coefficient d'expansion volumique	K^{-1}
λ	conductivité thermique	$Watt.m^{-1}.K^{-1}$
γ	viscosité cinématique	$m^2.s^{-1}$
Pr	nombre de Prantl	adimension.

INTRODUCTION

L'industrie pharmaceutique considère la stérilisation de ses produits comme l'une des étapes de fabrication les plus critiques. Le but universellement recherché est l'obtention d'une assurance de stérilité adéquate. Pour les produits thermorésistants bénéficiant d'une stérilisation terminale, on s'accorde à rechercher, en fonction de la biocharge du produit (flore bactérienne présente dans le produit avant stérilisation), un niveau de stérilité garantissant qu'au maximum une unité de produit sur un million pourrait être non stérile.

Pour répondre à ces exigences, la stérilisation par la chaleur humide est le procédé qui, selon la Pharmacopée Française (4), doit être retenu en priorité chaque fois que le matériel à stériliser est compatible avec un traitement thermique. Ce choix est justifié par son efficacité et l'innocuité totale espérée. Aucun résidu d'un agent stérilisant indésirable ne peut en effet persister sur les objets traités, et présenter de ce fait, comme avec l'oxyde d'éthylène ou le formaldéhyde, un risque potentiel de toxicité aiguë ou chronique pour les malades ou le personnel de stérilisation.

Cependant, avant l'utilisation d'un tel appareillage de stérilisation, l'autoclave doit être qualifié, c'est à dire qu'il doit présenter les résultats attendus pour l'usage auquel il est destiné. Dans le cas d'un stérilisateur par chaleur humide, quatre points de qualification doivent être étudiés et validés :

- test de BOWIE et DICK (contrôle du vide dans l'autoclave) ;
- répartition ou distribution uniforme de la chaleur dans l'autoclave ;
- challenge bactérien ;
- pénétration ou transfert de la chaleur dans les ampoules.

De ces quatre opérations étudiées dans ce mémoire, le transfert de chaleur dans les ampoules lors de la stérilisation sera la partie expérimentale dont nous exploiterons au mieux les résultats, afin de mettre au point un système de pilotage de l'autoclave à l'aide d'une sonde thermique placée au centre de la solution à stériliser. Grâce à cette méthode, nous pourrions alors déclarer un lot d'ampoules stérile (8) en sachant exactement la quantité de chaleur qu'aura reçue la solution, et non grâce aux indications des capteurs thermiques placés dans l'enceinte de l'autoclave.

**PREMIERE PARTIE : PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1.HISTORIQUE (17).

L'histoire de la stérilisation est quasiment aussi vieille que l'Humanité, mais elle n'a pris son véritable essor qu'au siècle dernier.

Les conserves ont été produites pour la première fois, de façon industrielle, par Nicolas APPERT en 1804 ; il décrit d'ailleurs son procédé dans un traité "l'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales". Il déclarait alors que "l'action du feu détruit ou au moins neutralise tous les ferments qui, dans la marche ordinaire de la nature, produisent ces modifications qui, en changeant les parties constituantes des substances animales et végétales, en altèrent les qualités". La chaleur, pour ce chercheur, joue un rôle essentiel.

A la même époque GAY-LUSSAC prétendait, en se trompant, que "l'on peut se convaincre en analysant l'air des bouteilles dans lesquelles les substances (boeuf, mouton) ont été bien conservées, qu'il ne contient plus d'oxygène et que l'absence de gaz est, par conséquent, une condition nécessaire pour la conservation des substances animales et végétales". Il ignorait alors, que des microorganismes anaérobies pouvaient se développer en l'absence d'oxygène.

En 1882 PASTEUR s'intéressa à la génération dite spontanée ; il devenait ainsi le fondateur de la microbiologie.

CHAMBERLAND fit construire le premier autoclave en 1879 pour étudier la destruction des spores par l'eau, eau qu'il voulait porter à une température aussi haute que possible et bien entendu au-delà de 100 °C.

Les résultats et les équations qui vont être écrits dans la suite de ce mémoire ne sont que le résultat de travaux effectués par trois générations de chercheurs après CHAMBERLAND, chercheurs qui ont mis au point de façon scientifique la mesure de l'effet stérilisant, appelée valeur stérilisatrice.

2.DEFINITION.

Selon une étude comparative (4), effectuée en 1982, les Pharmacopées restent prudentes sur la définition de la stérilité.

En effet, la Pharmacopée Nordique spécifie que les produits stériles devront être préparés et stérilisés dans des conditions telles que dans un million d'unités il n'y ait au maximum qu'un microorganisme vivant. C'est en outre la seule Pharmacopée qui introduise une notion de quantité dans sa définition.

Pour sa part, la Pharmacopée Helvétique ne parle pas de stérilité, mais de traitement antimicrobien : "Par traitement antimicrobien la Pharmacopée entend l'utilisation de procédés par lesquels on vise à obtenir un état où les médicaments, adjuvants, ustensiles ou récipients ne contiennent pas de microorganismes contaminants."

La Pharmacopée Française, quant à elle, prend position en indiquant que "les préparations pour usage parentéral sont élaborées par une méthode qui assure leur stérilité et évite la présence de contaminants et de pyrogènes ainsi que la croissance de microorganismes."

Enfin, la Pharmacopée Belge précise que chaque type de produit aura une méthode de stérilisation préférentielle : "le mode de stérilisation à appliquer aux substances ou objets doit être approprié à leur nature."

3.LES METHODES DE STERILISATION.

Ces méthodes (18) doivent être, comme nous venons de le voir, adaptées aux caractéristiques du produit à stériliser. Les principaux produits concernés sont :

- les préparations injectables;
- les collyres;
- les préparations topiques;
- les pansements;
- le matériel médico-chirurgical.

Les méthodes de stérilisation sont généralement regroupées sous quatre rubriques :

- par la chaleur;
- par filtration;
- par contact gazeux;
- par rayonnements ionisants.

3.1.STERILISATION PAR LA CHALEUR (2,21).

3.1.1.Stérilisation par la chaleur sèche (44).

Cette désignation regroupe toutes les méthodes de stérilisation utilisant comme agent stérilisant l'oxygène de l'air. Efficace dès 100 °C, l'oxydation des protéines bactériennes par l'oxygène de l'air est généralement pratiquée entre 160 °C et 180 °C dans des étuves POUPINEL. Bien que cette méthode soit très efficace, si elle est utilisée dans de bonnes conditions, elle présente quelques désavantages parmi lesquels :

- le temps de traitement est long en comparaison du temps de traitement à la vapeur.
- le bilan énergétique est médiocre et très inférieur à celui de la stérilisation par la vapeur d'eau.
- utilisé le plus souvent pour la stérilisation des instruments, ce mode de stérilisation n'est pas sans inconvénients, en particulier, parce qu'il émousse les tranchants.

Les étuves POUPINEL sont en général ventilées en circuit fermé, sinon le gradient de température, même pour un petit volume, pourrait être important.

Lorsqu'on utilise de tels stérilisateurs, il ne faut pas oublier que :

- l'air véhicule peu de calories.
- le temps de chauffage des charges importantes est long.
- l'emballage ainsi que le mode de chargement s'opposent à la libre circulation du gaz stérilisant.

Etant donné que les étuves POUPINEL conduisent parfois à des résultats incertains, elles sont généralement utilisées pour la stérilisation des instruments et de la verrerie.

Il est à noter que le flamage est aussi une méthode de stérilisation à la chaleur sèche, employé notamment en bactériologie pour les instruments et le scellage des ampoules.

3.1.2. Stérilisation par la chaleur humide (45).

La stérilisation par la vapeur d'eau saturante est la technique la plus sûre et la moins coûteuse.

Pendant la période de chauffage, la vapeur au contact de l'objet à stériliser est toujours à une température plus élevée que celui-ci, par conséquent elle se condensera sur ce dernier. A l'équilibre thermique, en fin de période de chauffage, le poids de la vapeur contenue dans le stérilisateur est faible. Cette eau condensée est environ mille fois plus dense que la vapeur. Cette densité beaucoup plus élevée de la phase liquide autorise des transferts de chaleur pour assurer l'effet sporicide en quelques minutes.

Si la présence d'eau, en phase liquide, permet d'obtenir un effet sporicide rapide, l'utilisation de l'eau, en phase vapeur, permet de mettre à profit deux propriétés essentielles des gaz :

- leur possibilité de diffuser dans toutes les directions;
- la très grande quantité de chaleur libérée lors de la condensation des gaz (enthalpie de vaporisation), ce qui accélère énormément l'élévation de température des objets sur lesquels se condense le gaz (vapeur d'eau).

Ces stérilisateurs à vapeur d'eau sont appelés "autoclave" et sont très utilisés dans les milieux hospitaliers et industriels.

3.2. STERILISATION PAR FILTRATION (24,27).

La filtration stérilisante est utilisée lorsque les produits à stériliser sont thermosensibles.

Les filtres membranes utilisés sont en général en fluorure de polyvinylidène, ester de cellulose, P.T.F.E., nylon 6.6[®] et la Pharmacopée britannique rappelle que les filtres d'amianté sont à bannir ou que, si l'on est contraint de les utiliser, il faudra faire suivre cette filtration d'une deuxième opération de filtration sur un filtre susceptible de retenir les fibres éventuelles.

L'utilisation de la filtration stérilisante nécessite de vérifier l'intégrité des filtres, de recueillir le filtrat dans des récipients déjà stérilisés.

3.3.STERILISATION PAR CONTACT GAZEUX.

3.3.1.Stérilisation par l'oxyde d'éthylène (14).

L'activité bactéricide de cet agent gazeux utilisé pour cette méthode, est due à une réaction chimique : l'alkylation, qui consiste à transformer en fonction alcool, l'hydrogène actif de certaines fonctions (nitrile, sulfone, etc...) des acides nucléiques des noyaux des cellules.

L'utilisation de l'oxyde d'éthylène comme agent stérilisant demande des précautions d'utilisation drastiques. En effet ce gaz est inflammable dans l'air pour toutes les concentrations supérieures à 3 %; sa grande stabilité à l'état pur le rend très dangereux car l'inflammation présente un caractère explosif.

Pour éviter ces dangers, l'oxyde d'éthylène est dilué dans des gaz de supports à des taux de dilution tels que tous les mélanges avec l'air soient ininflammables. Ces diluants sont en général l'anhydride carbonique et le fréon 12[®] (18). Ces mélanges sont conservés, sous forme liquide, dans des bouteilles d'acier. Un cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène se présente de la façon suivante :

- purge d'air au début du cycle;
- humidification de l'enceinte par évaporation d'eau ou injection de vapeur (degré hygrométrique environ de 60 %);
- entrée du gaz jusqu'à la concentration désirée généralement comprise entre 600 mg/l et 800 mg/l (la concentration bactériostatique se situe aux environs de 25 mg/l);
- contact gazeux de l'ordre de 2 à 3 heures suivant la température de fonctionnement (en général T=55 °C);
- purge du gaz par rinçages répétés alternant les mises sous vides et les rentrées d'air;
- sortie de l'objet stérilisé;
- désorption.

3.4. STÉRILISATION PAR RAYONNEMENTS IONISANTS (18).

La radiostérilisation est un des seuls procédés qui permette de traiter un article conditionné dans son emballage définitif sans le chauffer. Ce procédé de stérilisation met en oeuvre l'effet bactéricide des rayonnements ionisants découvert par Minck en 1896.

Du point de vue physico-chimique, la radiostérilisation ne fait pas appel à un agent chimique extérieur (oxydant, hydrolysant ou alkylant). Le rayonnement provoque des réactions d'ionisation qui altèrent les molécules constitutives des protéines et des acides nucléiques, leur faisant perdre ainsi leur faculté de reproduction biologique.

Actuellement deux types de rayonnements ionisants sont utilisés en radiostérilisation industrielle :

- le rayonnement γ : rayonnement électromagnétique de très courte longueur d'onde, inférieure à celle des rayons X. La source de rayonnement est en général le Cobalt 60. Ces rayons pénètrent la matière sous plusieurs dizaines de centimètres.

- le rayonnement β produit par des accélérateurs électriques de forte puissance, environ 10 MeV.

Cette méthode de stérilisation est généralement utilisée pour le matériel médico-chirurgical jetable.

4.LES PROCEDES DE STERILISATION.

4.1.SYSTEME FERME.

Le système fermé ou type "batch" est utilisé pour la stérilisation à la chaleur humide, à l'oxyde d'éthylène et à la radiostérilisation. C'est un système qui se déroule dans une enceinte close soit :

- par deux portes.: existence d' une ouverture dite non stérile (chargement des produits à stériliser) et d'une ouverture dite stérile (déchargement des produits stérilisés).

- soit par une porte : le chargement et le déchargement des produits à stériliser s'effectuent par une ouverture non stérile.

Le contrôle du procédé s'effectue à l'aide des paramètres suivants : température, pression, humidité relative et temps.

4.2.SYSTEME CONTINU OU OUVERT.

Le système continu est parfois utilisé pour la stérilisation à la chaleur sèche, cas, par exemple, de la dépyrogénéisation des ampoules avant remplissage. Ce procédé se déroule dans un tunnel où les ampoules reposent sur un tapis roulant. Les ampoules entrent par une ouverture non stérile, puis sont exposées à une température de l'ordre de 300 °C pendant environ 8 à 9 minutes, enfin sortent directement en zone stérile dans la salle de remplissage.

Le contrôle du procédé repose sur les paramètres suivants : température, temps d'exposition et vitesse de déroulement du tapis.

5.LA DESTRUCTION DES MICROORGANISMES (17,20,28).

5.1.INTRODUCTION.

La validation d'un procédé de stérilisation consiste à démontrer que la probabilité d'avoir au maximum une unité non stérile pour 10^6 unités (objectif fixé (4) pour déclarer tout un lot stérile) est atteinte. L'évaluation quantitative de l'efficacité d'un procédé de stérilisation fait appel à la notion de valeur stérilisatrice. La détermination de cette valeur biologiquement fondée ne se fait pas en mesurant la décroissance bactérienne, mais de façon indirecte par la mesure de la température. Avant de définir cette valeur, il est important de suivre le comportement des germes bactériens placés à des températures suffisantes pour provoquer leur destruction. Nous définissons ainsi N comme le nombre de microorganismes viables.

Selon GALTIER (17), si l'on considère qu'au départ nous avons un grand nombre de spores bactériennes (10^6) par unité testée, quelques approximations permettent de simplifier l'approche du problème et de lui donner une signification concrète au niveau moléculaire. Supposons que la mort de chaque spore soit effective quand une simple molécule de chaque spore est dégradée ou inactivée. Il n'y a qu'une seule et même de ces molécules par spore et sa destruction entraîne la mort du microorganisme. Par voie de conséquence, la destruction bactérienne liée à la dégradation de cette molécule, suivra les lois de la cinétique d'une réaction chimique. La résistance plus ou moins grande des spores dépendra en fait de la résistance plus ou moins grande de la dénaturation thermique des molécules vitales qui le composent.

5.2.COURBE DE SURVIE.

Il a été trouvé qu'à température létale constante, le nombre de microorganismes de souche pure et homogène décroît logarithmiquement en fonction du temps, au cours du traitement thermique. Il peut donc être écrit :

$$\frac{dN}{dt} = -k_T N$$

$$\text{ou } \frac{dN}{N} = -k_T dt$$

en intégrant, nous obtenons :

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k_T \int_0^t dt$$

avec $N = N_0$ à $t = 0$, d'où :

$$\ln \left(\frac{N}{N_0} \right) = -k_T t \quad \text{ou} \quad \frac{N}{N_0} = e^{-k_T t}$$

N_0 = nombre initial de spores;

N = nombre final de spore au temps t ;

k_T = constante de vitesse de la loi cinétique de destruction des microorganismes à la température T ;

t = temps.

A partir de ces relations, nous montrons que le nombre de microorganismes survivants décroît d'une façon exponentielle. Si nous portons sur un graphique $\log N$ en fonction du temps à une température donnée, nous obtenons une droite appelée "courbe de survie".

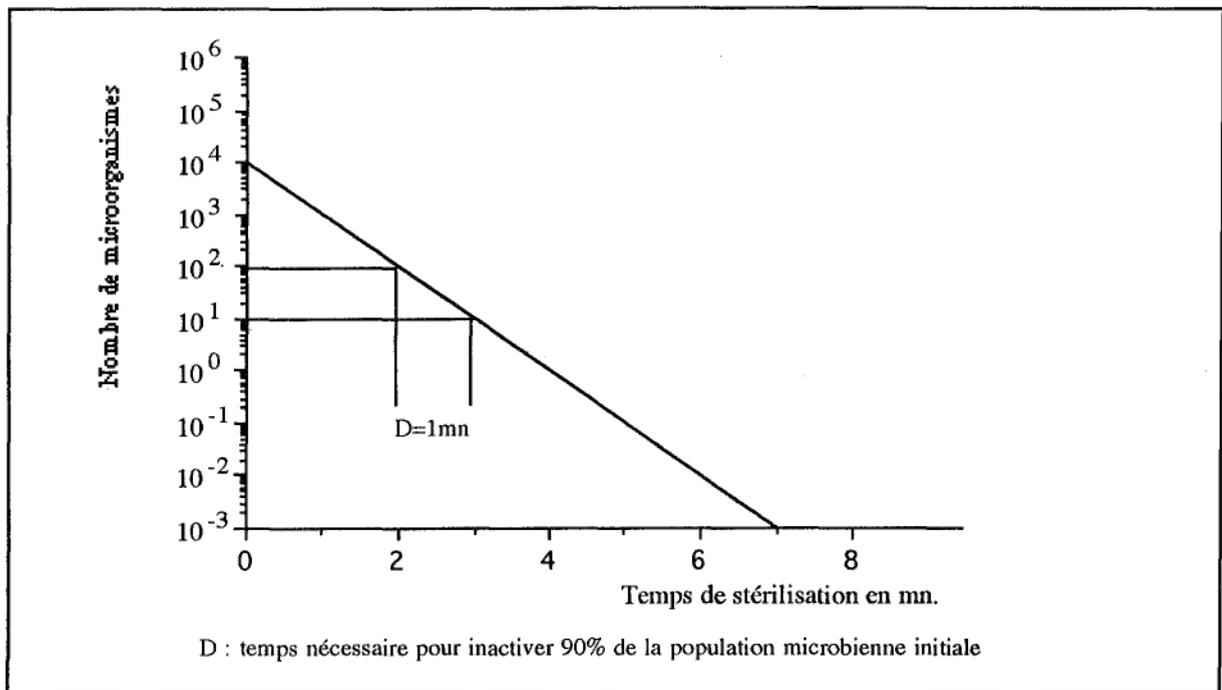


Fig 1.Courbe de survie.

A partir de cette courbe de survie, nous définissons l'inverse de la pente comme le temps de réduction décimale D_T : temps à la température T nécessaire pour inactiver 90 % de germes ou encore réduire au dixième de sa valeur la population initiale.

D_T s'exprime en minutes et sert à évaluer la thermorésistance du microorganisme ; plus sa valeur sera élevée, plus la souche sera résistante au traitement thermique.

5.3.COURBE D'EFFICACITE.

A partir de ces éléments, nous voyons qu'il est possible d'exprimer l'efficacité d'un procédé de stérilisation pour une bactérie de résistance donnée. En imaginant une contamination

initiale de 10^3 germes avec un D_T de 1 minute, la mesure de l'efficacité s'effectue de la façon suivante :

- avec $1D_T (=1mn)$, nous passons à 10^2 germes;
- avec $3D_T (=3mn)$, nous n'avons plus qu'un seul germe;
- au-delà de $3D_T$, nous obtenons des puissances négatives que nous exprimerons en probabilités de survie.

En écrivant, d'après les relations vues précédemment, que :

$$\log N = \frac{1}{2,303} * k_T t + \log N_0$$

Nous obtenons la courbe d'efficacité :

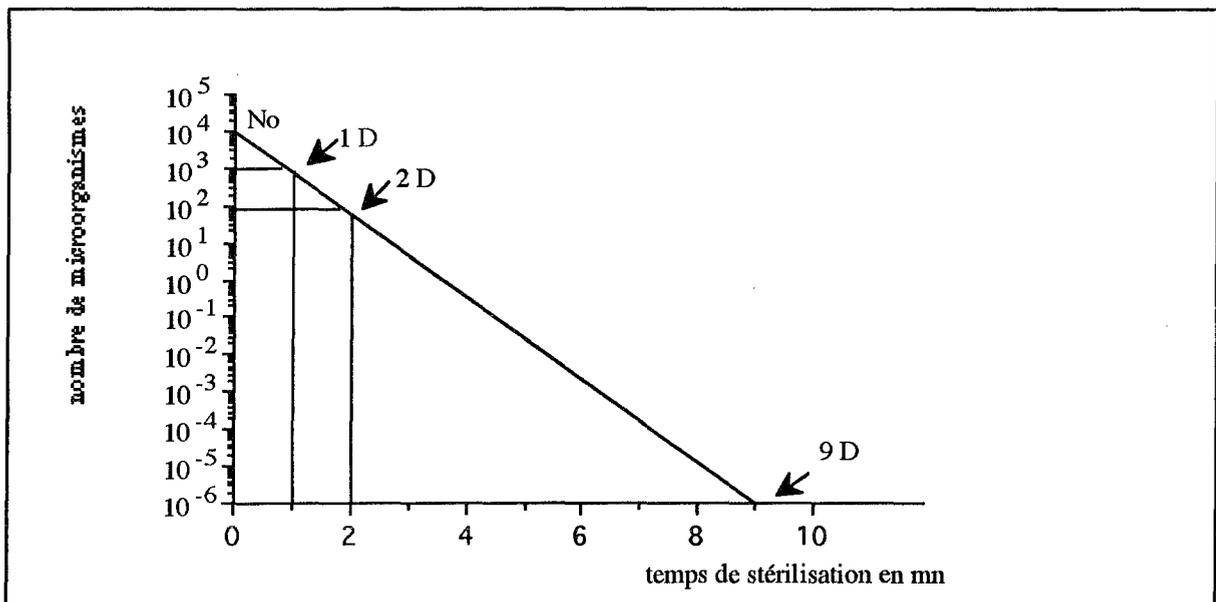


Fig 2. Courbe d'efficacité.

En posant $k'_T = \frac{1}{2,303} * k_T$

nous avons : $\log N = -k'_T t + \log N_0$

qui équivaut à $\frac{N}{N_0} = 10^{-k'_T t}$

or, nous avons vu que $D_T = \frac{2,303}{k_T}$, soit $D_T = \frac{1}{k'_T}$

D'où $\log N = -\frac{t}{D_T} + \log N_0$

Si nous remplaçons "t" dans cette équation par F_T que nous définissons comme étant le temps équivalent à une température donnée T et qui donnera le modèle final qui sera utilisé au cours de l'étude de la destruction microbienne, nous obtenons :

$$\log N = -\frac{F_T}{D_T} + \log N_0$$

$$\text{d'où } F_T = D_T * \log \left(\frac{N_0}{N} \right).$$

F_T est appelé "valeur stérilisatrice" à la température T et traduit l'efficacité du procédé.

5.4.COURBE DE RESISTANCE THERMIQUE.

La courbe de résistance thermique d'un microorganisme est la courbe qui traduit les valeurs de D_T à différentes températures. Cette courbe peut être assimilée à une droite, selon BALL et BIGELOW (18) dans certaines zones de température et se traduira par l'équation :

$$\log D_T = \frac{1}{z} * (T_{\text{réf}} - T) + \log D_{\text{réf}}$$

$$\text{soit } z = \frac{T_{\text{réf}} - T}{\log \frac{D_T}{D_{\text{réf}}}}$$

La valeur z , appelée "valeur de destruction thermique" est l'inverse de la pente de cette droite (fig.3).

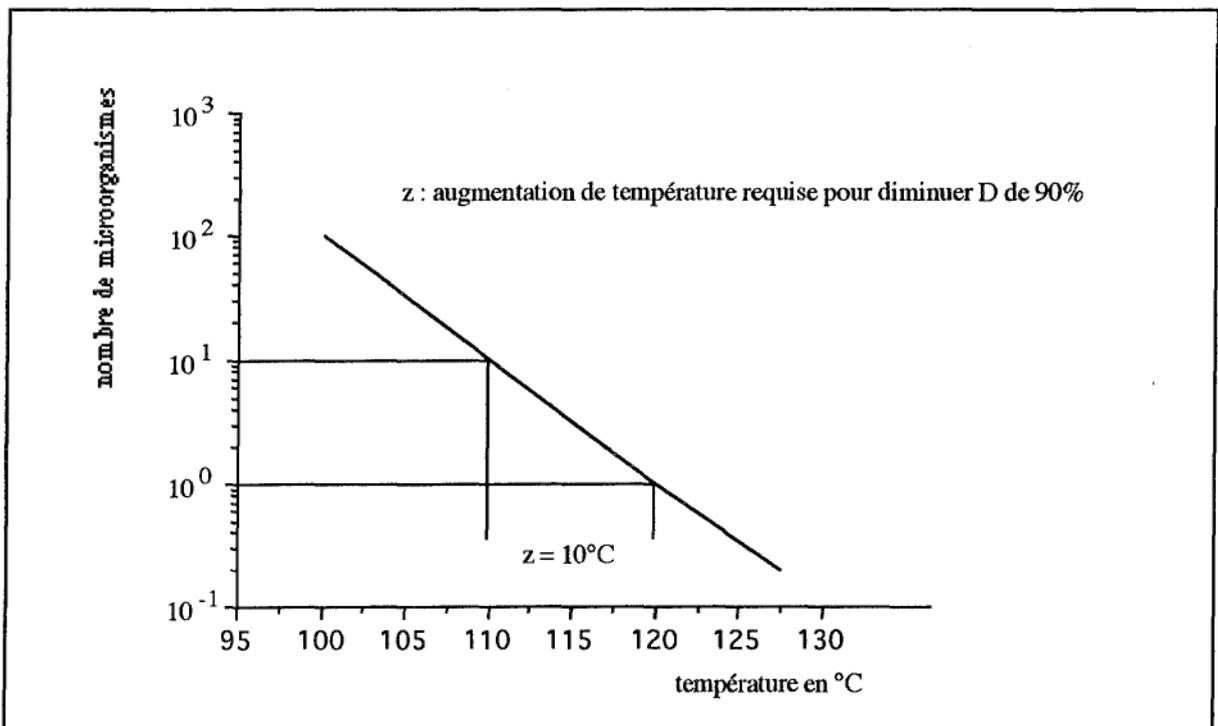


Fig.3.Courbe de résistance thermique.

La valeur z s'exprime en degré Celsius, elle est l'augmentation de température nécessaire pour faire varier le temps létal d'un facteur de 10, ou encore l'augmentation de

température qui multiplie par 10 la vitesse de destruction des microorganismes, ou enfin l'augmentation de température requise pour diminuer D_T de 90%.

5.5.COMPARAISON DU MODELE DE BALL ET BIGELOW AVEC CELUI D'ARRHENIUS.

Selon GALTIER, le modèle ainsi décrit par BALL et BIGELOW est à rapprocher dans l'intervalle de températures classiquement utilisé 100-150 °C de celui d'ARRHENIUS.

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

La loi d'ARRHENIUS est représentée par le graphique ci-après :

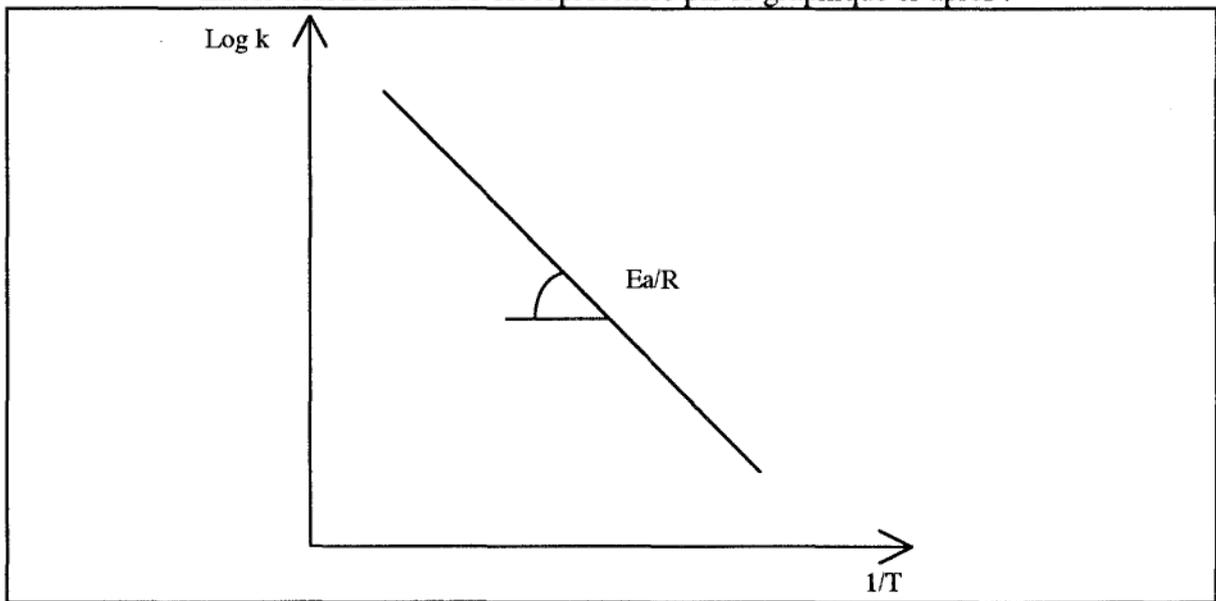


Fig.4.Modèle d'ARRHENIUS.

k : vitesse de la réaction en seconde⁻¹

A : facteur de fréquence exprimé en seconde

E_a : énergie d'activation en joule/ mole

R : constante des gaz parfaits en joule/ mole

T : température absolue en °K.

Le modèle d'Arrhénius conduit à une relation $\ln(k_T) = f\left(\frac{1}{T}\right)$ linéaire :

$$-\ln \frac{k_T}{k_{T_{\text{réf}}}} = -\frac{E_a}{R} * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{réf}}}\right)$$

En revanche, le développement du modèle de BALL et BIGELOW conduit à :

$$-k'_T = \frac{1}{D_T} \quad \text{et} \quad \ln \frac{k'_T}{k'_{T_{\text{réf}}}} = \frac{2,303}{Z} * (T - T_{\text{réf}})$$

soit une relation : $\ln k'_T = f(T)$ linéaire.

Cependant, GALTIER (18) a montré que, dans l'intervalle de 100 °C-150 °C, ces modèles concordent à moins de 1 %.

Ceci permet de dire, même si la réalité biologique est beaucoup plus complexe, que la destruction des spores par l'eau peut être globalement attribuée à une réaction chimique d'hydrolyse qui est du premier ordre.

La stérilisation s'opère dix fois plus vite, chaque fois que la température est accrue d'une valeur ΔT égale à z et le temps D_T devient alors dix fois plus court. Une valeur de z standard a été recherchée, par référence à un microorganisme sporulé le *Bacillus stearothermophilus* pour lequel le plus grand degré de résistance à la température a été trouvé. Dans le cas du bacille, la valeur expérimentale de z est de 9,5 °C, et il a été choisi par commodité $z = 10$ °C comme valeur de référence, laquelle correspondrait à un microorganisme un peu plus thermo-résistant au-delà de 120 °C.

La valeur de $z = 10$ °C implique donc que 100 minutes à 100 °C produisent le même effet que 10 minutes à 110 °C et que 1 minute à 120 °C, température choisie comme référence.

Ainsi à chaque température T est lié un temps de destruction thermique, F_T , appelé aussi temps équivalent, car il est équivalent au temps qui aurait été nécessaire pour produire le même effet de stérilisation à la température de référence 120 °C.

F_T : Temps équivalent en mn	Température T en °C
100	100
10	110
1	120
0,1	130
0,01	140

tableau.1. Variations de F_T en fonction de la température (température de référence égale à 120 °C).

5.6.L'EFFET LETHAL.

L'effet léthal est l'inverse du temps équivalent, en effet il se définit comme suit :

$$\text{Effet léthal} = \frac{1}{F_T} = \frac{1}{\text{temps équivalent}}$$

Pour additionner les effets stérilisants, on se sert plutôt d'un nombre sans dimension qui est le taux de léthalité L_{Tz} défini par le rapport :

$$L_{Tz} = \frac{\text{effet léthal à la température } T}{\text{effet léthal à la température de référence } T_{\text{réf}}}$$

ou
$$L_{Tz} = \frac{F_{T_{\text{réf}}}}{F_T}$$

Le taux de léthalité s'exprime en %.

Par exemple, pour une température de référence de 120 °C, l'effet léthal à 110°C est :

$$L = \frac{\left(\frac{1}{10}\right) \text{ mn}}{1 \text{ mn}} = 0,1 = 10\% \text{ de celui obtenu pendant le même temps à } 120^\circ\text{C}.$$

Le taux de léthalité est multiplié par dix chaque fois que la température s'accroît de 10°C, ce que nous pouvons résumer dans le tableau suivant :

T en °C	L en %
100	1
110	10
120	100
130	1000
140	10000

tableau.2.Variations de L en fonction de la température.

Un traitement stérilisant à 100°C n'aura contribué que pour 1% au traitement de même durée à 120°C. La contribution sera de 10% à 110°C.

Les valeurs numériques exposées dans le tableau ci-dessous sont calculées à partir de la formule suivante :

$$L_{Tz} = \frac{F_{T_{\text{réf}}}}{F_T} = 10^{\frac{T - T_{\text{réf}}}{z}}$$

en posant $z = 10^\circ\text{C}$ et $T_{\text{réf}} = 120^\circ\text{C}$, nous obtenons :

$$L_{T,z=10} = 10^{\frac{T - 120^\circ\text{C}}{10^\circ\text{C}}}$$

Par conséquent, à chaque traitement, il va être possible de faire correspondre sa contribution à l'effet stérilisant. En effet, voici quelques valeurs démonstratives :

Température en °C	Taux de létalité en %	Temps équivalent en mn
110	0,1	10
120	1	1
126	4	0,25
134	25	0,04
140	100	0,01

tableau.3. Variations des taux de létalité et des temps équivalents en fonction de la température.

D'après ce tableau, nous voyons qu'une minute de stérilisation à 134°C produit le même effet stérilisant que vingt cinq minutes à 120°C.

Nous définissons la valeur stérilisatrice F d'un traitement de stérilisation comme la somme des effets accumulés pendant chaque intervalle de temps Δt :

$$F = \int_0^t L_{Tz} dt$$

La valeur stérilisatrice F représente le temps équivalent à la température de référence d'une stérilisation ayant eu lieu à températures T variables au cours du temps.

Supposons que nous ayons effectué un traitement de stérilisation. En reportant à chaque instant t, le taux de létalité correspondant aux températures successives du cycle de chauffage et de refroidissement, nous obtiendrons un graphe dont l'allure pourra être la suivante :

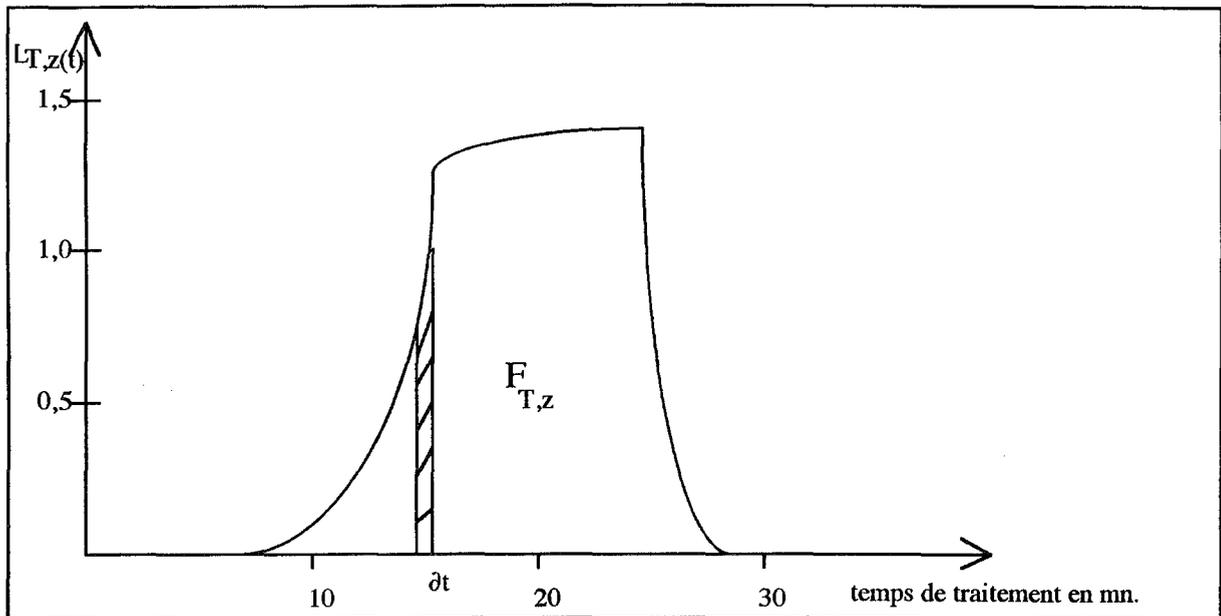


Fig.5. Courbe de l'effet léthal.

L'intégrale F est représentée par l'aire située sous la courbe $L = f(t)$. Dans la pratique, cette aire est calculée par la méthode des trapèzes.

Par convention F_0 est le temps, en minutes, de la valeur stérilisatrice lorsque la température est de $121,1^\circ\text{C}$ et $z = 10^\circ\text{C}$. Cette valeur est très utilisée pour le pilotage des autoclaves dans l'industrie pharmaceutique et notamment pour la validation des cycles de stérilisation.

6.LE CONTROLE DE STERILITE.

Les Pharmacopées sont beaucoup plus à l'aise dans ce domaine que dans celui d'une éventuelle définition de la stérilité. En effet, nous pouvons penser que la stérilité est définie par la conformité aux essais de stérilité. Voici comment les Pharmacopées Européennes et Françaises situent les problèmes de contrôle de stérilité :

" L'essai s'applique aux substances, préparations et objets qui doivent être stériles. Mais un résultat favorable signifie seulement qu'aucun microorganisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné dans les conditions de l'essai.

L'extension de ce résultat à tout lot de produits nécessite la certitude que toutes les unités qui le composent ont été préparées de façon que chacune ait également satisfait à l'essai avec une grande probabilité ; il est évident que cela dépend des précautions prises au cours de la fabrication. Pour les produits soumis à un procédé de stérilisation dans leurs récipients finaux et scellés, la preuve physique, biologiquement fondée et basée sur un document établi automatiquement, qui témoigne du déroulement correct du traitement stérilisant dans toute l'étendue d'un lot donné, est d'une fiabilité supérieure à l'essai de stérilité. Ce dernier reste cependant la seule méthode analytique dont puissent disposer les différentes instances amenées à contrôler la stérilité d'un produit."

6.1.LES INDICATEURS BIOLOGIQUES DE STERILITE(3,6,10,11).

6.1.1.Introduction.

La Pharmacopée Française rappelle un certain nombre de précautions élémentaires destinées à obtenir des résultats fiables. Il en est ainsi des précautions contre les contaminations microbiennes lors des essais de stérilité. Il est également recommandé de vérifier la stérilité, les propriétés nutritives du milieu de culture à utiliser, de même que la fertilité des milieux en présence et en l'absence de la substance à examiner.

L'U.S.P rappelle également que la constatation de l'absence de contamination sur un nombre limité d'unités prélevées dans un lot d'unités similaires stérilisées ensemble, signifie seulement que la probabilité de la présence d'unités contaminées est inférieure au niveau que le plan d'échantillonnage permet de déceler. Ceci ne permet pas d'affirmer avec certitude qu'aucune des unités restantes et n'ayant pas fait l'objet d'un essai de stérilité n'est contaminée.

Les indicateurs biologiques (22) sont des préparations contenant des microorganismes sélectionnés, utilisés pour confirmer l'efficacité d'un processus stérilisant. Cette définition concerne :

- l'essai "de routine" pour contrôler le bon déroulement d'une stérilisation. D'ailleurs dans ce cas, la Pharmacopée Européenne précise que "la croissance des microorganismes après exposition au procédé de stérilisation montre que la méthode est insuffisante. "Il s'agit donc d'un essai du tout ou rien."

- l'essai de qualification d'un appareil ou d'une installation.

- l'essai de validation d'un cycle de stérilisation.

6.1.2. Domaine d'application.

Les indicateurs biologiques concernent :

- les stérilisations par la chaleur sèche;

- les stérilisations par la chaleur humide;

- les stérilisations par les rayonnements ionisants;

- les stérilisations par les gaz.

6.1.3. Qualités requises pour le microorganisme utilisé dans la préparation des indicateurs biologiques.

6.1.3.1. Essai de validation.

Pour les essais de validation :

- l'espèce retenue doit être la plus résistante possible, car il est nécessaire, pour obtenir une bonne précision dans les dénombrements, de réduire autant que possible la quantité de spores présentes initialement (No).

- les indicateurs ne sont plus de simples réactifs, et ils sont manipulés par des microbiologistes. L'absence de pouvoir pathogène et les caractères microbiologiques originaux, s'ils restent souhaitables, ne sont plus obligatoires.

6.1.3.2. Essai de routine (23).

Pour l'essai de routine, les espèces bactériennes retenues doivent présenter :

- une résistance élevée au procédé utilisé, cette résistance étant supérieure à celle des espèces pathogènes connues, ainsi qu'à celle des bactéries habituellement présentes dans les médicaments à stériliser. La résistance est souvent appréciée par le calcul de la valeur D, mais il

faut garder à l'esprit que cette notion n'est pas générale, et n'a de signification que dans des conditions expérimentales bien définies.

- une absence de pouvoir pathogène, l'indicateur biologique étant le plus souvent utilisé comme un simple réactif, sans précautions particulières.
- des caractères microbiologiques originaux, afin de bien les distinguer de ceux des contaminants habituels des atmosphères.
- une facilité de culture pour la révélation des éventuels survivants. Les spores doivent germer facilement, sur milieu non enrichi, et sans nécessiter des techniques complexes d'incubation.

A ce propos, l'essai de stérilité du produit à examiner peut être conduit suivant deux techniques :

- la filtration sur membrane (30), qui doit être préférée chaque fois que la nature du produit le permet.
- l'ensemencement direct du milieu de culture.

Le premier procédé est utilisé pour les solutions aqueuses, les poudres solubles, les huiles et solutions d'huile, les pommades et crèmes. Le deuxième procédé sera aussi utilisé pour les liquides huileux, les pommades et les crèmes.

6.1.4. Précautions d'utilisation.

6.1.4.1. Préparations commerciales.

De nombreuses préparations commerciales, présentées parfois comme pouvant convenir même en validation, sont d'une très mauvaise qualité. Certains fabricants ne précisent même pas le nombre de spores présentes et ne donnent aucune fiche de contrôle. Dans l'entreprise pharmaceutique, le dénombrement de spores doit être effectué si ce cas se présente.

6.1.4.2. Validation de l'indicateur.

La validation de l'indicateur et de son utilisation constituent la première condition de sa fiabilité. Il s'agit de réactifs biologiques dont le caractère vivant s'oppose à une absolue standardisation. La valeur D ne concerne que les spores présentes dans l'indicateur à un instant donné. La récupération des spores et leur germination sont aussi des causes d'imprécision. L'utilisation d'homogénéisateur comme celui à ailette du type VIRTIS permet de révéler jusqu'à trois fois plus de spores revivifiables ; l'ensemencement des spores peut également modifier les résultats finaux.

6.1.5. Un exemple de préparation d'un indicateur biologique : le *Bacillus stearothermophilus* (23).

Le bacillus stearothermophilus est ensemencé dans un bouillon de sporulation :

- vitamine assay casamino 0,50g
- extrait de levure 0,50g
- glucose 1g
- $MnSO_4$ 0,05g
- $FeSO_4$ 0,25g
- eau distillée q.s.p. 500 ml
- pH = 6,8

Stérilisation pendant 20 mn à 110 °C.

Après une culture de 15 jours à 47 °C sous agitation rotative, la suspension est centrifugée 10 mn à 4200 tours/mn. Le surnageant est éliminé et les culots sont remis en suspension dans une solution pour lavage de spores :

- vitamine assay casamino 5g
- $MnSO_4$ 0,5g
- NaCl 4,5g
- eau distillée q.s.p. 1000 ml
- pH = 6,0

Stérilisation pendant 15 mn à 120 °C.

L'opération est répétée trois fois. Après une reprise des spores ainsi traitées par 11 ml de cette solution et une remise en solution, un dénombrement des spores revivifiées est réalisé. La suspension est alors ajustée par dilution de telle façon que l'on ait une concentration de $5 \cdot 10^6$ spores par ml. La suspension est ensuite inoculée dans des ampoules contenant la solution à stériliser; ces dernières sont ainsi prêtes pour le challenge bactérien.

6.1.6. Conclusion.

Le modèle actuel de bonne utilisation des indicateurs biologiques est constitué par la monographie de la Pharmacopée Française. Elle précise que pour la stérilisation à la chaleur humide, deux paramètres prédominent quant à l'efficacité du traitement :

- la température en vapeur saturante ou à une humidité relative donnée;
- la durée du traitement.

Ces deux paramètres pouvant être mesurés et enregistrés, le rôle de l'indicateur biologique devient réduit. Il n'est souvent qu'un moyen pratique, en routine, de vérifier qu'en tout point de la charge, la température a bien été atteinte avec une humidité suffisante, mais il ne peut jamais constituer à lui seul une méthode de validation. Par conséquent, sans données analytiques concernant le nombre initial de spores présentes N_0 , le temps de réduction décimale D et la valeur d'inactivation thermique z , les indicateurs biologiques sont toujours moins fiables et donc moins intéressants que les indicateurs physico-chimiques, dont certains en particulier intègrent la valeur stérilisatrice.

6.2.LES INDICATEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE STERILITE.

6.2.1.Introduction.

Il existe plusieurs indicateurs physico-chimiques, à la disposition des entreprises Pharmaceutiques, commercialisés par différents laboratoires : Incheque (3M[®]), O.K test (Propper[®]), Steam Star (Bioser[®]), T.S.T. (Browne[®]), Stericontrol (Eschmann[®]) et Thermalog S (Negrier[®]).

Les cinq premiers réagissent en fonction des paramètres de la stérilisation par un changement de couleur (virage) des produits chimiques dont ils sont saturés. La réponse de Thermalog est observée après fusion et migration d'un réactif chimique le long d'une bandelette recouverte d'un film polymère partiellement perméable à la vapeur d'eau.

6.2.2.Etude d'un indicateur physico-chimique : Thermalog S[®] (12).

Le Thermalog S[®] (31) est présenté comme un réactif capable d'intégrer véritablement la valeur stérilisatrice. Cette caractéristique le distingue nettement des autres indicateurs physico-chimiques qui sont en général capables d'évaluer seulement une température maximale de traitement ou la durée d'un palier de stérilisation à une température donnée.

6.2.2.1.Présentation.

Le Thermalog S[®] se présente sous la forme d'une bandelette cartonnée de 10 cm de long dont l'une des extrémités comporte un réservoir de cire bleue. La cire, chargée d'éthoxy-2-benzamide, voit son point de fusion abaissé par la présence de vapeur d'eau, ce qui lui permet de migrer le long d'un papier de chromatographie. La migration sur une plage d'au moins 50 mm représente la limite "safe" et garantit la stérilisation. Ce principe de

fonctionnement original permet au Thermalog S® de contrôler les trois paramètres de la stérilisation à la chaleur humide (temps, température et humidité relative).

6.2.2.2. Avantages.

Les principaux avantages de cet indicateur sont :

- une lecture immédiate, facile et sans ambiguïté puisque l'on mesure une longueur de migration;
- indication immédiate d'une insuffisante ou d'une excessive stérilisation;
- une variation sur la lecture des indications données acceptables;
- une bonne linéarité de migration en fonction du temps;
- une capacité, dans le cas de grosses charges difficiles à stériliser, d'intégrer la valeur stérilisatrice Fo;
- aucune condition de stockage, aucune durée de validité.

6.2.2.3. Conclusion.

L'emploi d'intégrateurs de la valeur stérilisatrice du type Thermalog S® permet aux utilisateurs de posséder un indicateur de la stérilisation fiable et d'emploi facile, mais qui reste limité aux stérilisations effectuées en-dessous de 130 °C.

6.3. LES PAPIERS TEMOINS DE STERILITE (19).

6.3.1. Introduction.

La Pharmacopée Française définit , en plus du papier crêpé, un papier de type A pour la stérilisation par l'oxyde d'éthylène ou par les rayonnements ionisants, et un papier du type B pour la stérilisation à la vapeur d'eau. Ces deux types de papier sont très semblables d'aspect mais possèdent intrinsèquement des qualités différentes qui limitent leur emploi au seul mode de stérilisation prévu.

Tous les papiers de stérilisation décrits à la Pharmacopée Française sont constitués de fibres de cellulose blanchie de "première utilisation", ce qui correspond à la meilleure qualité de papier. Ils ne doivent pas contenir de lignine, très peu d'hémicelluloses et un maximum de cellulose. Ils ne doivent en aucun cas être constitués de papiers recyclés et peuvent être imprimés.

Les papiers enduits ont une enduction sur une seule face. Lorsqu'elle est partielle, elle se présente en grille ou en croisillons ou sur les bords. L'enduction est constituée par des polymères, par exemple le polypropylène, le copolymère propylène éthylène ou leur mélange. Elle est entièrement extractible par le toluène, et doit résister au procédé de stérilisation. Le rôle de l'enduction peut être triple : scellage, pelabilité et imperméabilité. En cas d'enduction sur les bords, seules les propriétés de scellage et de pelabilité sont conservées.

6.3.2.papier pour la stérilisation à la chaleur humide.

6.3.2.1.papier crêpé.

Il se présente sous forme de feuille ou de rouleaux blanc ou teinté dans la masse par des colorants. Il n'est employé que sous double épaisseur, à l'aide d'un pliage approprié, pour le linge médical, le matériel médico-chirurgical et les articles de pansements. Il n'est pas réutilisable.

6.3.2.2.papier lisse.

Ces papiers sont utilisés comme protecteurs de stérilité et entrent dans la constitution des sachets ou des gaines. Il existe trois qualités différentes de papier selon le grammage et le mode d'enduction :

- 60g/m² type B;
- 60g/m² type B enduit sur les bords;
- totalement enduit de type B.

6.4.PAPIERS D'EMBALLAGE, INDICATEURS DE STERILITE (19).

Certains papiers sont utilisés en emballage et possèdent une encre incorporée indicatrice de stérilité. Ces papiers doivent répondre à certains critères de qualité :

- résistance mécanique suffisante;
- perméabilité à l'agent stérilisant;
- barrière contre les microorganismes.

6.4.1.résistance mécanique suffisante.

Le papier doit pouvoir résister aux agressions extérieures pour assurer la protection du produit emballé et constituer une barrière efficace à la pénétration de microorganismes jusqu'à péremption, sous réserve de bonnes conditions de stockage et de manutention.

Les propriétés de résistance mécanique du papier résultent principalement de la résistance des liaisons entre les fibres de cellulose (hydrogène et Van Der Waals). La nature des fibres, leur nombre, leur répartition homogène concourent à renforcer la résistance mécanique.

6.4.2.perméabilité à l'agent stérilisant.

Tous les papiers sont traversés par les rayonnements et plus ou moins par les gaz. Cette dernière propriété est nécessaire pour chasser l'air avant toute stérilisation, puis permettre l'action stérilisante du gaz et sa désorption s'il s'agit de l'oxyde d'éthylène.

Les facteurs modifiant la perméabilité des papiers peuvent résulter de la fabrication ou de l'enduction. Une enduction en grille diminue fortement la perméabilité d'un papier. Un papier vapeur doit être très perméable à l'air, beaucoup plus qu'un papier pour l'oxyde d'éthylène, les molécules d'eau liées entre elles par des liaisons de type hydrogène formant des amas dont le diamètre apparent est supérieur à celui des molécules d'eau isolées.

6.4.3.barrière contre les microorganismes.

Afin de constituer une barrière efficace contre les microorganismes, les papiers doivent présenter des caractéristiques de porosité et d'épaisseur adaptées, ainsi qu'une certaine résistance à la pénétration de l'eau, principal vecteur des microorganismes au travers d'un papier.

**DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET
METHODES.**

1.INTRODUCTION.

La première partie de cette thèse, nous a permis de définir quels étaient les méthodes, les procédés de stérilisation, et les moyens de contrôle de la stérilité.

Dans cette deuxième partie, nous allons mieux comprendre la nécessité d'une stérilisation finale, puis nous nous attacherons à la qualification proprement dite de l'autoclave.

2.DESCRPTION D'UNE CHAINE DE FABRICATION D'AMPOULES INJECTABLES AU SEIN DES LABORATOIRES SYNTHELABO (5,15,16,29,36,43).

2.1.SALLE DE FABRICATION DE LA SOLUTION À CONDITIONNER (7).

Les laboratoires SYNTHELABO, sur le site de Quétigny, disposent de deux chaînes de fabrication et de remplissage disposées en parallèle au sein d'une même unité. En effet l'utilisation de la première chaîne permet le nettoyage de la deuxième, il y a ainsi possibilité de produire des ampoules injectables tous les jours avec une qualité de propreté, requise par les Bonnes Pratiques de Fabrication (37), validée.

Les principes actifs sous forme de poudre et les solutions (acide chlorhydrique, acide sulfurique, hydroxyde de sodium,...) sont pesées et conditionnées dans des sacs ou flacons en centrale de pesée ; leur masse est vérifiée par l'opérateur chargé de la fabrication de la solution. Après le nettoyage et l'aseptisation de la cuve de fabrication effectués la veille de l'opération, le dispositif de production est prêt à l'emploi. L'opérateur introduit une quantité prédéterminée d'eau pour préparation injectable (eau.p.p.i.) à 40 °C dans une cuve de 2000 litres azotée ; l'azotage évite l'oxydation précoce de la solution. Les poudres ainsi que les solutions sont incorporées dans la cuve et la cinétique de dissolution est augmentée grâce à un agitateur fixe placé au centre de la solution. A la fin de la dissolution complète des matières premières, l'opérateur ajuste le volume de solution final à l'aide d'eau.p.p.i et contrôle le pH du produit. La solution est ainsi prête à être conditionnée en ampoules de 2ml, 5ml ou 20ml dans la salle de remplissage.

2.2.SALLE DE REMPLISSAGE (35).

Avant le remplissage proprement dit des ampoules, la solution de remplissage est filtrée à travers deux filtres de 0,5 μm et 0,22 μm stérilisés en forme de cartouche puis transférée au

fur et à mesure dans une cuve tampon de 20 litres stérile. Le test d'intégrité du filtre 0,22 μm est effectué avant le début du remplissage et en fin de remplissage à l'aide de la solution fabriquée.

Les ampoules pour le remplissage sont lavées à 85 °C dans de l'eau.p.i., puis dépyrogénéisées à 300 °C pendant environ 8 minutes dans un tunnel à chaleur sèche. Ces ampoules arrivent sous un flux laminaire de classe A et sont remplies, à l'aide d'aiguilles, de la solution fabriquée.

Les ampoules remplies et scellées sont rangées dans des chariots et prêtes à être stérilisées dans un autoclave à chaleur humide.

Beaucoup de paramètres de conduite sont contrôlés tout au long de la chaîne de remplissage afin d'obtenir un produit semi-ouvré conforme à la technique de fabrication décrite dans le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché. Ces paramètres, contrôlés par les opératrices, sont par exemple : la température du tunnel de dépyrogénéisation, la densité et le volume de solution entreposée dans les ampoules, le scellage et la propreté de ces dernières. Le taux de principe actif et la contamination bactérienne de la solution sont déterminés par le laboratoire de contrôle et d'analyse.

3.POURQUOI UTILISER UNE STERILISATION FINALE ?

3.1.CONCEPTIONS DES SALLES PROPRES DANS L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE (1,25,38,39).

La préparation des injectables s'effectue dans deux types de zones de process : zone stérile (classe A ou B (normes Européennes) suivant le lieu) et zone de la stérilisation finale. Lorsque le produit est stable à la chaleur, il sera normalement l'objet d'une stérilisation finale. Ces produits présenteront donc un faible risque bactériologique pour les patients. Cependant, lorsque le produit injectable ne peut subir une stérilisation finale pour des raisons d'instabilité (cas des hormones ou des vaccins), il devra être fabriqué en ambiance aseptique (40). Dans ce cas, une classe A est impérative dans la zone où le produit est exposé et cela implique de disposer d'un flux unidirectionnel à l'intérieur d'une salle propre conventionnelle.

3.1.1.Objectifs de conceptions des installations.

Les objectifs de conception des installations sont :

- exclure de la salle propre tout ce qui n'est pas nécessaire;
- évaluer ou diluer la contamination provenant du process;
- évacuer ou diluer la contamination provenant du personnel en activité;

- se protéger des risques provenant du produit;
- maîtriser les contaminations croisées entre produits;
- protéger le personnel;
- maîtriser et gérer les flux de matière, à chaque étape du process, avec une implantation adaptée;
- maîtriser et gérer les mouvements du personnel en optimisant l'implantation et les accès entre les pièces;
- renforcer la sécurité des opérations par le contrôle des entrées et sorties du personnel et des matières;
- optimiser les conditions de confort pour le personnel;
- organiser le process et ses équipements pour assurer la sécurité et la facilité ainsi qu'un bon accès pour la maintenance.

Toutes ces fonctions sont importantes et on ne saurait concevoir une suite de salles propres sans qu'elles s'organisent et fonctionnent correctement.

3.1.2. Implantation des salles propres.

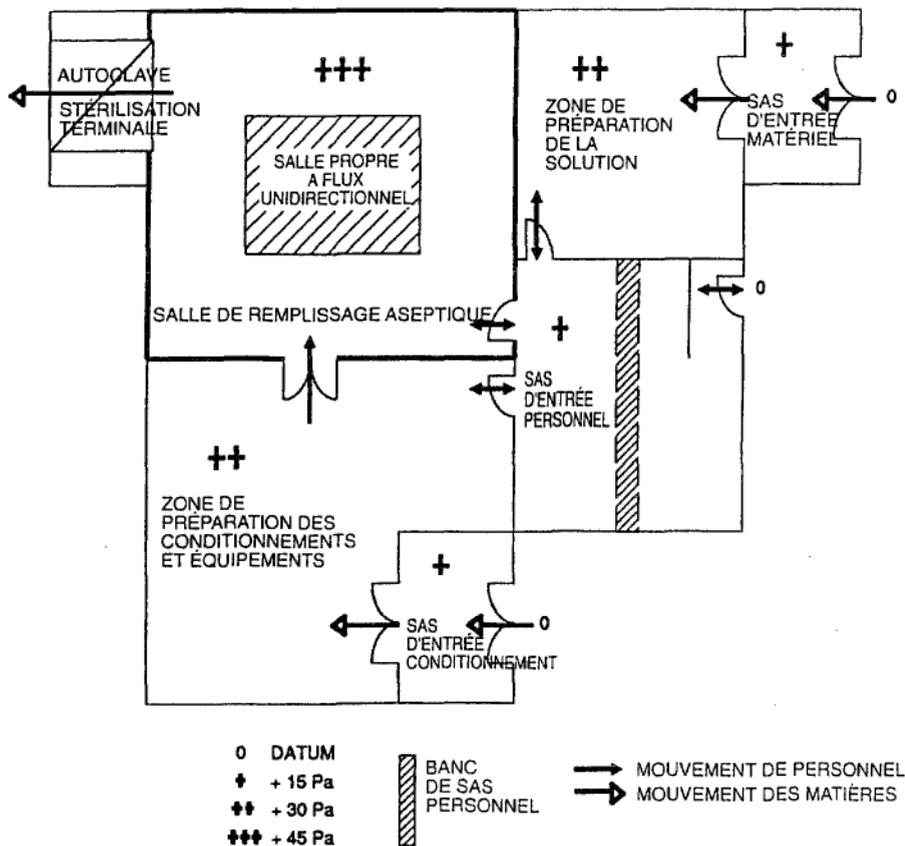


fig.6. Implantation d'une salle propre.

La figure 6 nous montre une suite classique de salles propres destinées à répondre aux spécifications, vues précédemment, d'une fabrication de produits injectables avec stérilisation terminale, cas des opérations effectuées dans les laboratoires SYNTHELABO. Le personnel de production devra, pour entrer dans la salle propre, passer par le sas personnel. Dans ce cas, les vêtements habituels sont enlevés, les mains lavées et des tenues spécifiques aux salles propres seront revêtues. Les solutions sont préparées dans le local de fabrication (cf II.1.1.1.) et sont ensuite transférées par tuyau dans la zone propre de remplissage. Les ampoules sont préparées et nettoyées dans le local laverie et transférées par un convoyeur vers le remplissage. Les conditionnements sont remplis et scellés sous un flux unidirectionnel dans la zone "remplissage propre". après le remplissage et le scellage, les produits conditionnés quittent la salle propre via la stérilisation finale par autoclave. Le travail accompli, le personnel quitte la salle propre en passant par le sas personnel où il enlèvera sa tenue de salle propre.

3.2.LA STERILISATION FINALE.

A travers ce descriptif non exhaustif des objectifs de conception de travail en salle propre, il est en effet possible, vu les consignes de travail et d'implantation de locaux drastiques, de se poser la question d'un choix d'une stérilisation finale.

Le risque "zéro" de contamination bactérienne, malgré toutes les recommandations des Bonnes Pratiques de Fabrication (37) quant au mode de fonctionnement des salles propres, n'existe pas. Même si le personnel de production a reçu une formation adaptée au travail en salle propre, il reste tout de même un apport supplémentaire au niveau de l'empoussièrement et bactériologique. Une panne dans le système de production amène l'intervention du personnel de maintenance, qui malgré toutes les précautions, est encore un apport supplémentaire de contamination. Une stérilisation finale en autoclave est préconisée dans l'industrie pharmaceutique pour tout produit non thermosensible, mais aussi et surtout pour parer aux contaminations humaines (à défaut d'un mode de production entièrement automatisé) et avoir l'assurance d'une stérilité finale des produits au-delà des normes requises par la Food and Drug Administration (45).

4.POINTS SUR LE CAHIER DES CHARGES D'UN AUTOCLAVE A CHALEUR HUMIDE (34).

4.1.INTRODUCTION.

La réalisation industrielle de stérilisation de produits nécessitent que ces cycles soient validés lors de la mise au point. En fonction de la mise au point de ces impératifs, le cahier des

charges peut être établi dans l'entreprise. L'ensemble des caractéristiques et des exigences doivent être connues du constructeur et il devra optimiser l'appareil à partir de ces bases et en tirer les paramètres d'exploitation. Les opérations de qualification de l'appareillage sont effectuées dans l'entreprise en collaboration avec le constructeur. Les vérifications des organes, des fonctions, puis des cycles complets, permettent de :

- tester l'appareil proposé;
- vérifier que tous les produits peuvent être stérilisés à un F_0 requis et que les cycles sont reproductibles;
- déterminer les durées et les consommations de chaque phase.

4.2.OBJET ET DESTINATION D'UN AUTOCLAVE.

Avant d'investir dans l'achat d'un autoclave, il faut déterminer les besoins de l'entreprise quant à son utilisation, mais aussi prévoir son emplacement, la spécificité des produits à stériliser, ainsi que les paramètres de conduite de l'appareil et ses possibilités.

4.2.1. Que peut-on stériliser ?

Les produits à stériliser doivent être définis à la fois par leur contenant mais aussi par leur contenu. Exemples de contenants :

- verre;
- plastique;
- papier d'emballage;
- seringue.

Exemples de contenus :

- nature des solutions;
- stabilité des produits à la chaleur;
- linge;
- instrumentation.

4.2.2. Volume du contenant et du lot.

- flacons de 125ml, 250ml, 500ml, ...
- ampoules de 2ml, 5ml, 20ml, ...
- poches de 0,5l; 1l; 1,5l; ...
- nombre d'ampoules par cristalliseur;

- nombre de chariots par autoclavage.

4.2.3.Implantation de l'autoclave.

- entrée directe depuis la salle de remplissage et sortie du côté conditionnement.
- ou entrée et sortie indifférenciées suite à la ligne de remplissage (cas des laboratoires SYNTHELABO).

4.2.4.Procédé d'autoclavage et cycle de stérilisation.

Différents modes de stérilisation peuvent être utilisé :

- vapeur pure;
- mélange vapeur/air;
- ruissellement d'eau surchauffée;
- immersion totale.

Chaque produit peut avoir un cycle de stérilisation prédéterminé en fonction de paramètres comme la température, le Fo, le temps mais dans tous les cas le constructeur doit garantir à l'utilisateur :

- un calcul de Fo à 10% près au-dessus de la valeur de consigne et à 0% près pour une valeur inférieure ou égale à la valeur de consigne;
- une reproductibilité des cycles suivant des tolérances établies.

4.3.SPECIFICATIONS FONCTIONNELLES DE L'AUTOCLAVE.

Toutes les spécifications qui suivent doivent être vérifiées par l'utilisateur avant le choix final de l'investissement ; toute anomalie doit être signalée au constructeur afin qu'il puisse y remédier. Quelques exemples de spécifications :

- capacité de l'autoclave défini par l'utilisateur en fonction de la taille des lots de fabrication;
- choix de l'ouverture et de la fermeture des portes : coulissantes ou battantes, une ou deux portes;
- températures et pressions d'utilisation : températures maximales et minimales, pression maximale (en cas de fonctionnement de l'autoclave avec de la vapeur pure les paramètres température et pression sont liés physiquement);
- homogénéité de la répartition de la température dans le chargement (nous y reviendrons dans le cadre de la qualification de l'autoclave);
- mise sous vide;

- surpression d'air comprimé;
- refroidissement;
- lavage, rinçage, séchage des ampoules;
- commande et programmation de l'ordinateur gérant les paramètres du cycle d'autoclavage.

Le cahier des charges est le livret de confiance entre le constructeur et l'utilisateur de l'autoclave. Il permet à l'utilisateur d'exiger des spécifications fonctionnelles et caractéristiques d'un appareil dont le constructeur est le garant dans la limite d'une utilisation adaptée. Il permet aussi à l'utilisateur de connaître tous les paramètres sur lesquels il peut travailler et ainsi maîtriser le bon déroulement d'un cycle de stérilisation.

5.PREPARATIFS POUR LA QUALIFICATION DE L'AUTOCLAVE FEDEGARI F0F6® (9).

5.1.INTRODUCTION.

Après avoir soigneusement lu et signé le cahier des charges, l'utilisateur doit qualifier son appareil en l'occurrence ici l'autoclave FEDEGARI F0F6®. La qualification d'un tel appareillage est découpée en cinq rubriques, à savoir :

- étalonnage des appareils de contrôle et de régulation, fonctionnement satisfaisant de la console de commande et du système de régulation, contrôle des différents paramètres pendant un cycle de stérilisation;
- test de BOWIE & DICK;
- répartition uniforme de la chaleur dans l'autoclave lors d'un cycle;
- pénétration ou transfert de la chaleur au sein de la solution à stériliser;
- challenge bactérien.

5.2.DEROULEMENT D'UN CYCLE DE STERILISATION.

Le déroulement du cycle de stérilisation qui suit, est appliqué pour des ampoules de 2ml, 5ml et 20ml. Ce cycle durant la qualification de l'autoclave devra être reproductible.

Cycle de stérilisation :

- préparation autoclave : bilan de l'état de l'autoclave avant le cycle;

- vide initial;
- vide temporisé et injection de vapeur;
- chauffage;
- stérilisation;
- vide et test d'étanchéité des ampoules;
- vide temporisé;
- refroidissement grâce à de l'eau déminéralisée;
- évacuation de l'eau;
- lavage des ampoules;
- rinçage des ampoules;
- évacuation de l'eau;
- séchage;
- vide;
- vide temporisé;
- mise en pression atmosphérique;
- fin du cycle.

Nous voyons à travers cette énumération qu'un cycle de stérilisation est découpé en six phases : vide (contrôle de l'absence de poches d'air par le test de BOWIE & DICK), chauffage, stérilisation, refroidissement, lavage et séchage. Les quatre premières phases sont les points de contrôle incontournables lors de l'utilisation d'un autoclave.

5.3. CONTROLE DES DIFFERENTS PARAMETRES LORS D'UN CYCLE DE STERILISATION.

La première des opérations à effectuer pour la qualification d'un autoclave est de vérifier le bon fonctionnement des appareils de contrôle (décrits lors du chapitre "répartition de la chaleur") et de régulation, le bon fonctionnement de la console de commande et des alarmes, et enfin le contrôle des différents paramètres intervenant lors d'un cycle de stérilisation. Nous ne décrirons que cette dernière obligation car elle nous semble être la plus intéressante pour la suite de notre travail.

En effet, l'utilisateur de l'autoclave doit définir tous les paramètres de fonctionnement d'un cycle et connaître les valeurs maximales et minimales de ces paramètres afin de pouvoir, le cas échéant, les modifier pour optimiser le cycle de stérilisation. Cette vérification a été conduite et les résultats de cette opération ont été les suivants :

description de la phase	unité	valeur d'utilisation	valeur mini. d'utilisation	valeur maxi. d'utilisation
durée de vide temporisé	min	5	3	30
temps maxi.de chauffage	min	30	1	120
vide test ampoule	bar	0,30	0,20	0,30
durée de vide test ampoule	min	3	0	10
température de refroidissement	°C	80	40	100
durée spray eau de rinçage	min	5	5	60
durée de séchage	min	1	1	10
durée de séchage sous vide	min	10	1	999
vide	bar	0,15	0,08	0,20
temps maxi.de descente en vide	min	15	1	20
température de stérilisation	°C	121	102	133
tolérance tempé. de stérilisation	°C	1	1	6
Fo	min	30	1	99
tempé. début calcul Fo	°C	100	90	133
coefficient z pour Fo		10	5	20

tableau.4.Fiche de réglage d'un autoclave : valeurs nominales des paramètres variables à régler par l'opérateur.

N.B : Pression atmosphérique = 1 bar ; 1 bar = 10^5 Pascal.

Nous n'avons reporté dans ce tableau que les paramètres majeurs que l'utilisateur pourra faire varier afin d'optimiser le cycle de stérilisation. A travers ces résultats, nous voyons que l'ordinateur "pilote" de l'autoclave gère trois données physiques essentielles pendant le déroulement de la stérilisation : la température, la pression et le temps.

5.3.1. Contrôle de la température.

L'autoclave FEDEGARI FOF6[®] est équipé de six sondes Pt 100 reliées directement à l'ordinateur appelé SPECTRA[®], cinq sondes sont réparties dans l'habitacle (cf. chapitre "répartition de la chaleur") et une sonde est disposée dans la double enveloppe. Seules quatre des cinq premières sondes servent au pilotage et au contrôle de la température lors de l'autoclavage, la cinquième reste une sonde de sécurité au service des alarmes.

Une sonde Pt 100 est une sonde à résistance constituée par un fil de platine, enroulé dans la céramique et rattaché à deux pattes de raccordement en métal commun. Le fil conduit 100 ohms à 0°C et 138,5 ohms à 100°C.

Deux types de sondes thermiques peuvent être employés dans un autoclave :

- sonde Pt 100 d'un emploi facile, d'une bonne linéarité de réponse; mais volumineuse et présentent parfois des problèmes d'étanchéité au niveau de l'élément sensible.

- thermocouples (Fe-CuNi ou NiCr-Ni) pratiques pour explorer des petits volumes mais exigeant une attention toute particulière lors de leur utilisation du fait de leur conception.

Les sondes Pt 100 utilisées pour l'autoclave FEDEGARI FOF6[®] restent très fiables et d'une très bonne maniabilité.

5.3.2. Contrôle de la pression.

Ce contrôle s'effectue grâce à un capteur de pression directement relié à la commande de bord.

5.3.3. Contrôle du temps.

Il s'effectue directement par l'ordinateur de commande.

5.4. LES APPAREILS DE CONTRÔLE POUR LA QUALIFICATION.

5.4.1. L'enregistreur YOKOGAWA[®].

Cet appareil est destiné à enregistrer et à tracer sur un papier quadrillé, pendant la qualification mais aussi en routine, la température à l'intérieur de l'autoclave en parallèle du

SPECTRA®. Il est équipé de quatre sondes Pt 100; trois de ces sondes sont placées dans l'enceinte de l'appareil à côté de celles du SPECTRA® (en routine, pour la qualification elles sont placées dans la charge à stériliser suivant un plan déterminé cf. "répartition de la chaleur") et la quatrième est plongée dans un bain d'huile à 121,0°C, moyen de référence et de lecture rapide sur le graphe pour l'utilisateur.

5.4.2.L'enregistreur SPEEDOMAX®.

L'enregistreur SPEEDOMAX® est employé uniquement pour la qualification de l'autoclave. Muni de douze sondes Pt 100, il permet de déterminer la température de l'autoclave tout au long du cycle de stérilisation en parallèle des autres enregistreurs, ces sondes sont placées dans la charge suivant le plan de qualification.

5.4.3.Thermomètre à aiguille.

Un thermomètre à aiguille dont la partie active est entreposée à l'intérieur de l'autoclave, permet à l'opérateur un contrôle supplémentaire de la température de stérilisation.

5.4.4.Chronomètre manuel.

L'utilisateur de l'autoclave devra utiliser un chronomètre manuel pour chaque cycle, afin de vérifier le bon fonctionnement du décompte du temps par le SPECTRA.

6.QUALIFICATION DE L'AUTOCLAVE FEDEGARI FOF6®.

6.1.INTRODUCTION.

Qualifier un matériel de fabrication (9), c'est contrôler son aptitude à exécuter une ou plusieurs opérations pharmaceutiques selon des modalités préalablement définies. Dans le cas d'un appareil neuf, la qualification revêt deux aspects :

- aspect statique : vérification de la conformité au cahier des charges en ce qui concerne la réalisation et l'implantation du matériel;
- aspect dynamique : mesure des performances de l'appareil en fonctionnement (valeur stérilisatrice, mesure des durées des cycles, mesure des écarts de températures, mesure des consommations d'énergie et de fluides).

L'autoclave FEDEGARI FOF6® est prêt à être qualifié vu que les appareils de contrôle et de régulation ont été étalonnés par un service spécialisé et que leur fonctionnement a été

déclaré satisfaisant. La qualification que nous allons relater s'est déroulée suivant quatre étapes :

- test de BOWIE et DICK;
- répartition de la chaleur dans l'enceinte de l'autoclave;
- challenge bactérien;
- pénétration de la chaleur dans les ampoules lors de l'autoclavage.

6.2.LE TEST DE BOWIE-DICK(42).

6.2.1.Introduction.

Afin de s'assurer que l'autoclave est en bon état de fonctionnement avant un cycle de stérilisation, il faut chaque matin vérifier que la vapeur admise dans l'enceinte pénètre correctement dans les chargements. C'est pour apporter la preuve de la bonne pénétration de la vapeur que nous avons effectué le test de BOWIE- DICK. Il a été rendu obligatoire par la Direction de l'Hygiène et de la Sécurité Sociale de Grande Bretagne, à la suite d'un grave accident survenu en Angleterre (10 morts).

6.2.2.But du test.

Il ne pourra se produire une pénétration correcte et rapide de la vapeur dans la charge d'un autoclave contenant une charge que si une quantité suffisante d'air et de gaz incondensables a été évacuée de l'enceinte et de la charge avant que la vapeur ne soit introduite pour la phase de stérilisation. Si l'air et les gaz incondensables ne sont pas éliminés, ils peuvent rester emprisonnés dans la charge. Cet incident empêcherait la pénétration de cette partie du chargement par la vapeur et, par conséquent, les conditions de stérilisation ne seraient pas réalisées. C'est pour démontrer qu'il y a une bonne pénétration de la vapeur dans la charge que le test de BOWIE & DICK a été instauré.

Ce test ne donne aucune assurance en ce qui concerne les conditions de stérilisation du chargement. Il prouve simplement si oui ou non, la pénétration de la vapeur dans le paquet test a bien été correct et rapide et qu'il n'y avait pas d'air ou de gaz incondensables dans le paquet test lors de l'essai.

6.2.3.Matériel utilisé pour le test.

Les laboratoires 3M[®] ont commercialisés un packaging pour le test de BOWIE & DICK. Il se compose de trois éléments :

- LANTOR CUBE 1229 B[®] qui est constitué de deux blocs de feuilles en non tissé maintenues par un film transparent;

- CLAMP 1229 C[®] qui est constitué de plaques carrées; une possède un système de ressorts permettant une compression et des fixations qui viennent maintenir la plaque inférieur;

- FEUILLE TEST 1229 S[®] qui comprend une encre indicatrice et qui permet de vérifier la pénétration uniforme de la vapeur à travers les deux blocs de feuilles lors du test.

En plus de ce paquet-test, nous plaçons dans l'enceinte de l'autoclave les sondes Pt 100 volantes du SPECTRA[®] et du YOKOGAWA[®] afin de suivre le déroulement de l'opération. Le calcul du plateau de stérilisation en temps est piloté par la sonde du SPECTRA[®] présente dans la purge, point le plus bas en température de l'autoclave comme nous le verrons dans le chapitre "répartition de la chaleur".

6.2.4. Déroulement du test.

La feuille test est placée entre les deux blocs de feuilles, blocs qui sont maintenus par le clamp. Le paquet test ainsi constitué est placé au centre de l'autoclave vide à 10 cm du sol de l'enceinte. Un cycle de stérilisation est lancé avec pour normes de température et de temps : 133 °C en plateau de stérilisation pendant 3 minutes et 30 secondes. Le test dans les laboratoires SYNTHELABO est effectué à 126 °C en plateau de stérilisation pendant 12 minutes (18) (l'autoclave utilisé a une sécurité de température jusqu'à 133 °C). La stérilisation s'effectue avec en parallèle l'enregistrement du temps et de la température du plateau de stérilisation par le SPECTRA[®] mais aussi par l'appareil de contrôle en l'occurrence le YOKOGAWA[®]. En effet, grâce à ces deux enregistrements, nous sommes certains du bon déroulement du cycle (en temps et température) et pouvons nous appuyer sur de bonnes bases pour l'interprétation du test; un cycle non contrôlé ne pourrait aucunement être déclaré positif ou négatif vu l'absence de preuves concernant la conduite des paramètres de stérilisation.

A la suite du cycle la feuille test est examinée; pour que le test soit positif, c'est à dire qu'il n'y a pas eu formation de poches d'air dans l'autoclave lors de la stérilisation, la feuille doit être uniformément noire sans tâches brunes. Un test négatif montrerait une couleur noire discontinue.

Le test positif donne la possibilité à l'utilisateur de stériliser avec toutes les garanties, au niveau de la bonne pénétration de la vapeur dans la charge, le(s) lot (s) de production de la journée. En cas de test négatif, l'autoclave doit être révisé par le service maintenance et ne doit être en aucun cas utilisé avant un nouveau test positif de BOWIE & DICK.

6.3.REPARTITION DE LA CHALEUR DANS L'ENCEINTE DE L'AUTOCLAVE (32).

6.3.1.Introduction.

Après avoir vérifié la positivité et la validation du test de BOWIE et DICK, il est intéressant pour la qualification de l'autoclave de connaître la répartition de la chaleur dans l'enceinte de l'autoclave tout au long du cycle, afin de savoir si les produits à stériliser l'ont été de manière uniforme et s'ils ont bien tous reçu la même quantité de chaleur. Cette étape importante permettra de mettre en évidence la présence éventuelle de points froids, mais permettra aussi de démontrer la reproductibilité des cycles de stérilisation. Cette étape de la qualification est longue mais nécessaire pour l'optimisation des cycles de stérilisation en routine.

6.3.2.Matériel.

6.3.2.1.Chariots et ampoules.

Le matériel utilisé pour l'étude de la répartition de la chaleur dans l'enceinte de l'autoclave est l'ensemble d'un matériel de routine et d'un matériel employé spécifiquement pour la qualification. L'étude s'effectue à l'intérieur d'un autoclave de 6 m³ en acier inoxydable.type "batch". Cet appareil contient en capacité volumique quatre chariots dans lesquels sont entreposés des cristallisoirs métalliques renfermant des ampoules. Le nombre d'ampoules par cristallisoir varie suivant le volume de ces dernières à savoir :

- ampoule de 2 ml : 330 ampoules par cristallisoir;
- ampoule de 5 ml : 188 ampoules par cristallisoir;
- ampoule de 20 ml : 80 ampoules par cristallisoir.

Les chariots qui contiennent 196 cristallisoirs, sont placés dans l'enceinte de l'autoclave grâce à un système de rails. Leurs entrées et sorties sont effectuées avec l'aide d'un crochet déclenché par l'opérateur.

6.3.2.2.Les sondes et enregistreurs.

Les sondes employées pour la qualification sont comme nous l'avons vu auparavant, des sondes Pt 100 volantes raccordées à différents enregistreurs à savoir :

- 5 sondes Pt 100 sont raccordées au SPECTRA[®], organe de pilotage de l'autoclave FEDEGARI FOF6 (une des cinq sondes ne sert qu'à la sécurité de l'appareil);

- 3 sondes Pt 100 sont raccordées à l'enregistreur YOKOGAWA[®], appareil de contrôle utilisé également en routine.

- 12 sondes Pt 100 sont raccordées à l'enregistreur SPEEDOMAX[®], appareil de contrôle employé uniquement pour la qualification.

L'enregistrement de l'évolution de la température au cours du cycle, pour les appareils YOKOGAWA[®] ET SPEEDOMAX[®], se fait grâce à une impression d'encre sur un papier quadrillé, papier dont le déroulement est de 50 cm/h. L'utilisateur peut également suivre l'évolution de la température grâce à un affichage digital pour chaque sonde.

En ce qui concerne le suivi de l'opération par le SPECTRA[®], l'impression de la température au dixième de degré près s'exécute toutes les vingt secondes. Le relevé de l'ordinateur détermine également, en parallèle des températures, la pression dans l'enceinte et le calcul de la valeur stérilisatrice Fo.

6.3.3.Méthode.

La qualification d'un autoclave à chaleur humide doit être effectuée pour des chargements en nombre de chariots et en volume d'ampoules différents. En effet, nous devons procéder à des cycles de stérilisation pour des volumes de chargement ainsi définis :

- à vide c'est à dire sans chariot;
- en demi-charge c'est à dire avec deux chariots;
- en pleine charge c'est à dire avec quatre chariots.

Chaque type de cycles doit avoir lieu trois fois pour être validé et ceci pour les ampoules de 2ml et de 5 ml remplies d'eau (le chargement avec des ampoules de 20 ml n'a pas été effectué).

Le but de l'étude de la répartition de la chaleur est de montrer que chaque point à l'intérieur de l'enceinte de l'autoclave a bien reçu la même quantité de chaleur que ses voisins. Ainsi, afin de vérifier ces propos, nous avons mis au point un plan de qualification sur lequel a été tracé l'emplacement des vingt sondes utilisées. Il y aura au minimum quatre sondes par chariot et deux sondes dans la purge. Sur chaque chariot nous disposerons des sondes en haut, en bas et au centre de la masse d'ampoules (voir plan de qualification figure 7) :

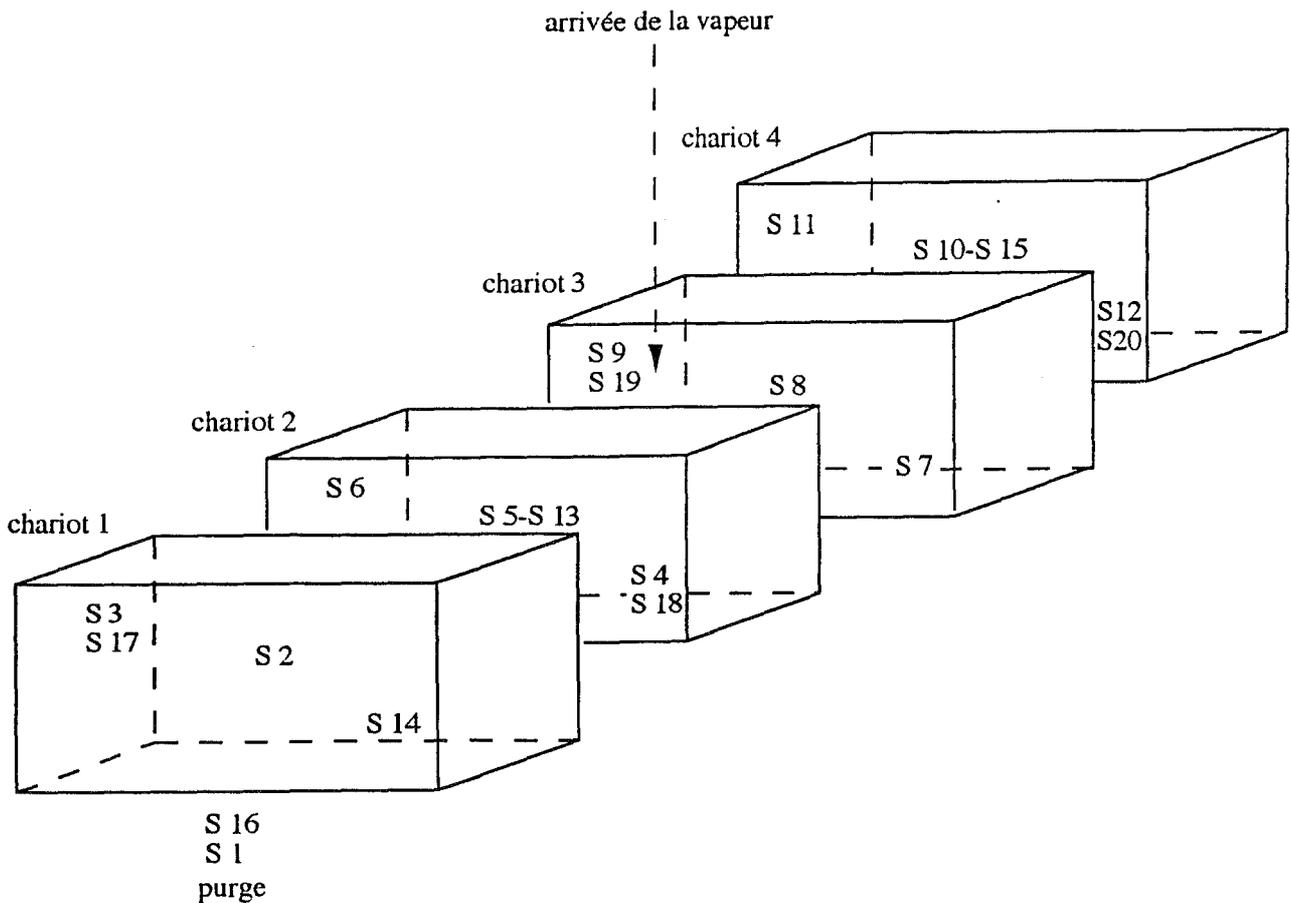


Fig.7. Position des sondes pour la qualification.

Sondes SPEEDOMAX® : S1 à S12

Sondes YOKOGAWA® : S13 à S15

Sondes SPECTRA® : S16 à S19.

Après chaque cycle de qualification, nous calculerons le temps de montée en température, la durée et la température pour chaque sonde du plateau de stérilisation, et enfin le temps de refroidissement du cycle. Pour que la reproductibilité des cycles soit confirmée, il serait souhaitable de retrouver les mêmes temps de montée et de descente en température pour chaque stérilisation; mais pour que ceci se fasse l'autoclave doit être froid (20-30 °C) avant chaque qualification. Une variation du temps de montée en température viendra du fait que plus un autoclave est "chaud" avant une stérilisation plus la phase de chauffage est écourtée.

Les paramètres qui conduisent les cycles de stérilisation pour la qualification sont ceux que nous avons vus au chapitre II.4.3. Les plus importants pour nous sont :

- plateau de stérilisation : 30 mn;
- Fo = 30 mn;
- température du plateau de stérilisation : 121,0 +/- 1°C;
- écart entre les sondes inférieur à 1°C.

Tous les calculs et résultats seront reconduits dans des tableaux à partir desquels nous pourrons interpréter chaque cycle de stérilisation, et déclarer la qualification de l'autoclave positive ou non. Un écart par rapport aux normes fixées devra être justifié et dans ce cas nous devrons mettre en place une action correctrice afin de parer à toute autre éventualité.

6.4. CHALLENGE BACTERIEN(13,41).

6.4.1. Introduction.

L'emploi d'indicateurs biologiques pour la qualification d'un autoclave, a pour buts de déterminer la valeur stérilisatrice d'un cycle de stérilisation et de vérifier que ce cycle effectué à la chaleur humide conduit bien à une stérilisation. Ce mode de qualification est en général complété par des indicateurs physico-chimiques étudiés en parallèle; dans notre cas nous n'avons utilisé que des indicateurs biologiques renfermant le *Bacillus stearothermophilus*.

6.4.2. Matériel.

La suspension de *Bacillus stearothermophilus* est commercialisée par France Adhésif[®], entre autres, dans des fioles de 10 ml. Les spores sont injectées, sous hotte à flux laminaire vertical, dans des flacons en verre étiré de 8 ml, préalablement stérilisés avec bouchons et capsules à 120°C pendant 30 mn. Nous rajoutons dans chacun 5 ml de chlorure de sodium à 9 pour mille. Chaque flacon bouché et capsulé est identifié grâce à un numéro et une série. La conservation des flacons pour une durée supérieure à une heure s'effectue à + 4°C.

En ce qui concerne le matériel de stérilisation, nous retrouvons l'autoclave FEDEGARI FOF6[®] ainsi que tous les matériels de conduite et de contrôle décrits dans le chapitre "répartition de la chaleur".

6.4.3. Méthode.

6.4.3.1. dénombrement de la population initiale de spores et de la population résiduelle après exposition à 121°C pendant 30 mn.

Dans les deux cas, un flacon de 8 ml, préparé comme précédemment, contenant le chlorure de sodium ainsi que les spores, est décapsulé et nettoyé à l'alcool absolu. La solution présente est récupérée puis diluée à l'aide de chlorure de sodium 0,9%, le diluat est filtré sur une membrane 0,45 μm . Cette membrane est recueillie dans une boîte de Pétri avec un milieu de culture : gélose trypticase soja dont la fertilité a été vérifiée. Ces boîtes sont mises dans une jarre anaérobie dans une étuve à 58 °C pendant 48 heures. Au-delà ce temps, le comptage microbien est réalisé sur chaque membrane et nous pouvons ainsi déterminer soit la population initiale de spores, soit la population résiduelle de *Bacillus stearothermophilus*. Il est à noter que le fournisseur donne généralement le dénombrement de la population initiale qu'il vend, mais une vérification systématique est opérée par le laboratoire acheteur.

6.4.3.2. détermination de la valeur D.

Cette détermination s'effectue grâce à la connaissance de la population initiale de spores inoculée dans les flacons et de la population résiduelle de spores après une exposition de 30 mn à 121 °C. Ainsi nous pouvons tracer la courbe :

$$\log (N) = f (t).$$

N : nombre de spores à t;

t : temps d'exposition à 121 °C.

La courbe tracée, la détermination de la valeur D effective s'opère de la façon suivante :

$$D = t_2 - t_1.$$

t_1 et t_2 sont deux valeurs entières décroissantes successives de $\log (N)$. Grâce à cette détermination, nous pourrions comparer d'une part notre valeur à celle du fournisseur, et d'autre part calculer la valeur stérilisatrice par la méthode de la fraction négative.

6.4.3.3. détermination de la valeur stérilisatrice par la méthode de la fraction négative.

Des ampoules de 2 ou 5 ml sont remplies d'eau puis inoculées sous flux laminaire vertical de 10^6 spores, spores provenant d'une solution titrante de 10^6 spores/ 0,1 ml. Ces ampoules sont scellées à la flamme puis réparties dans l'autoclave et sur l'ensemble de la charge suivant un plan de qualification établi par le laboratoire de microbiologie. A la suite du cycle de stérilisation, à savoir plateau de stérilisation de 30 mn à 121 °C, les ampoules essais sont incubées pendant sept jours à 55-60 °C. Une lecture des pousses éventuelles est effectuée tous les jours ; une bonne stérilisation ne montrera aucune pousse bactérienne.

Le calcul de la valeur stérilisatrice par la méthode de la fraction négative s'effectue ainsi :

$$F_0 = D * (\log_{10}A - 2,303 * \log_{10}\frac{n}{q}) \quad ;$$

A = 10⁶ spores par ampoule;

n = nombre d'ampoules, ici n = 10;

q = nombre d'ampoules n'ayant aucune pousse après 7 jours.

Par convention, nous noterons q = 9 si les 10 ampoules sont négatives au bout de sept jours.

Ces trois méthodes de calcul appliquées aux indicateurs biologiques permettent de vérifier d'une part les notifications du vendeur à l'égard des bactéries qu'il commercialise (valeur D et population initiale) et d'autre part de calculer la valeur stérilisatrice permettant à l'utilisateur de confirmer ou d'infirmer une assurance de la stérilité du lot.

6.5.PENETRATION DE LA CHALEUR DANS LES AMPOULES INJECTABLES LORS DE LA STERILISATION.

6.5.1.Introduction.

L'étude de la pénétration de la chaleur ou transfert de chaleur, dans les ampoules injectables lors de la stérilisation, a pour but de mettre en évidence les différences notables entre les valeurs de température et de Fo indiquées par l'ordinateur de pilotage de l'autoclave (26), valeurs qui sont détectées ou calculées à l'intérieur de l'enceinte et non au coeur de la solution à stériliser, et des valeurs que l'on peut trouver au cours de ces cycles à l'intérieur des ampoules remplies de solution à stériliser. Cette méthode d'étude permet de corriger les valeurs "temps, température du plateau de stérilisation ainsi que le calcul du Fo" par l'opérateur, et ainsi démontrer que la stérilisation du produit a bien été effectuée à l'intérieur de la solution suivant les consignes préalablement décrites. Il sera par la suite intéressant d'essayer de mettre au point un système permettant de piloter les cycles de l'autoclave non plus à l'aide de sondes disposées dans l'enceinte de l'autoclave, mais à l'aide de sondes thermiques placées à l'intérieur de la solution.

6.5.2.Etude d'une loi de transfert de chaleur pour décrire la pénétration de la chaleur au sein des ampoules (33).

6.5.2.1.Approche théorique.

Le phénomène moteur du transfert de chaleur est l'existence de gradients de température en différentes zones de l'ampoule à stériliser ; la figure suivante décrit schématiquement une ampoule, et permet de distinguer 3 zones :

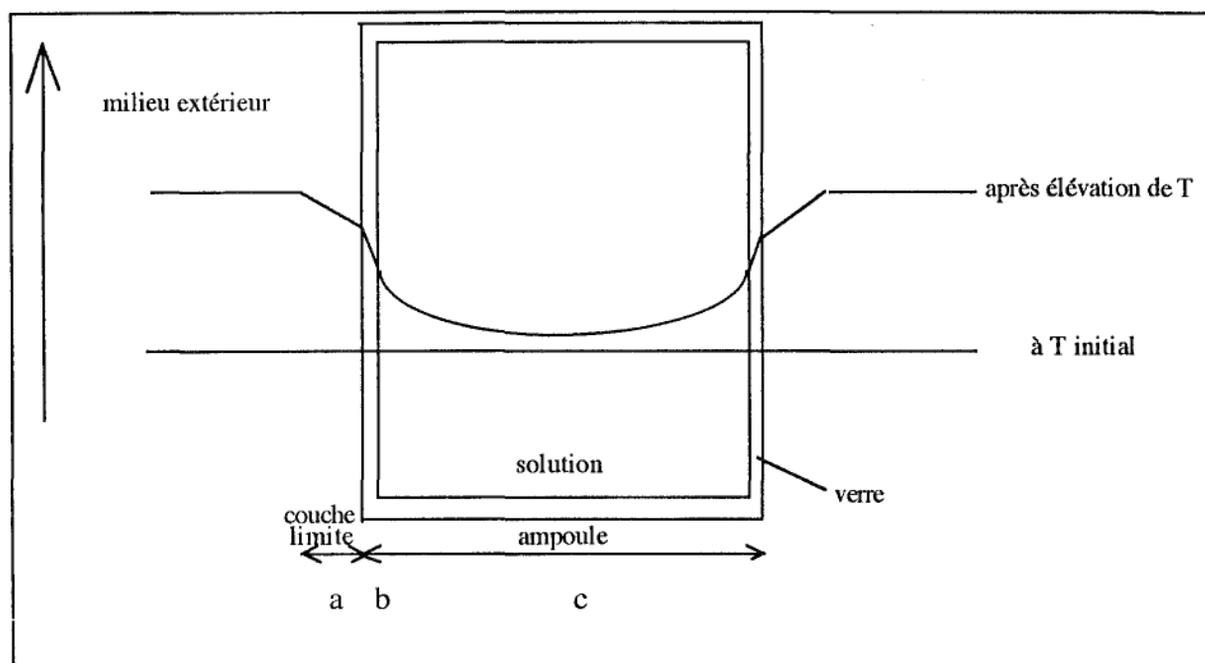


fig.8. Gradients de températures à l'intérieur d'une ampoule à la suite d'une élévation de la température extérieure.

- zone a : couche limite de transfert de chaleur externe.
- zone b : épaisseur du verre.
- zone c : solution contenue dans l'ampoule.

Après un temps de stockage de l'ampoule à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nous avons une uniformité des températures : $T_a, T_b, T_c = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Maintenant, si nous provoquons une élévation de la température extérieure soit $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, nous allons créer un gradient de température au niveau des zones étudiées induit par la température extérieure. Ainsi, tout de suite après l'élévation de température, nous relèverons que $T_{\text{ext}} > T_a > T_b > T_c$, sachant qu'à l'intérieur de chaque zone il existe aussi un gradient de température.

Ces gradients de température sont fonction de plusieurs paramètres auxquels ils faut s'attacher si l'on veut définir mathématiquement le phénomène observé. Ces paramètres sont :

- la géométrie de l'ampoule;
- la nature du verre de l'ampoule;
- la capacité calorifique des éléments constitutifs (verre, solution) ;
- la masse des éléments constitutifs ;
- la conductivité thermique des éléments constitutifs ;
- la masse volumique des éléments constitutifs.

Malheureusement, étant donné la géométrie complexe d'une ampoule et le nombre de paramètres intervenant dans le problème posé, il faudrait une résolution numérique complexe pour donner une solution à peu près exacte au problème. Ainsi, nous avons décidé d'apporter une approche réaliste à ce cas.

6.5.2.2. Approche par la recherche d'un coefficient de transfert de chaleur global entre milieu extérieur et intérieur des ampoules.

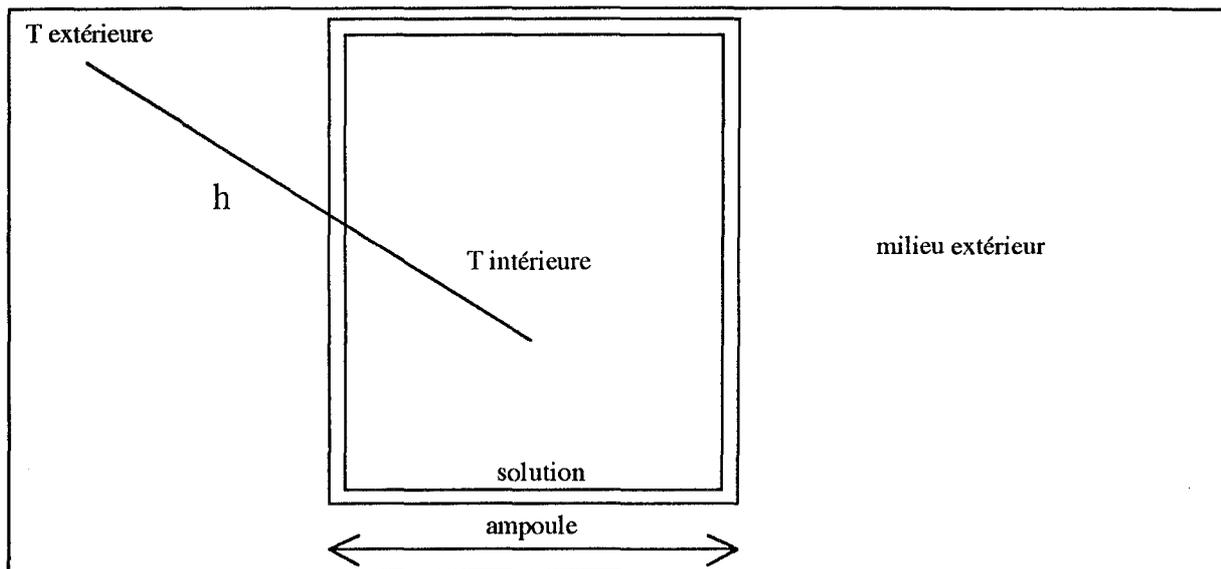


fig.9. Définition d'un coefficient de transfert de chaleur.

h : coefficient de transfert de chaleur.

Ce coefficient de transfert de chaleur h englobe les trois zones de transfert citées auparavant. Il semble alors que l'approche du problème devienne plus facile à étudier.

En effet, le flux de chaleur à un instant donné est proportionnel à la surface interfaciale d'échange et à l'écart de température entre l'extérieur et l'intérieur des ampoules :

$$(1) \quad \Phi = h * S * (T_{ext} - T_{amp}) \quad (33)$$

Φ : flux de chaleur

S : surface de l'ampoule

T_{ext} : température extérieure

T_{amp} : température à l'intérieure des ampoules

h : coefficient de transfert de chaleur.

Par ailleurs, le flux de chaleur transféré s'exprime par :

$$(2) \quad \Phi = \frac{dQ}{dt} = a * \frac{dT_{amp}}{dt} \quad , \text{ avec } a = \sum_{i=1}^n m_i C_{p_i}$$

Q : quantité de chaleur transférée à l'instant t

t : temps

m_i, C_{p_i} : masse et capacité calorifique du $i^{\text{ème}}$ constituant.

Nous déduisons de (1) et (2) :

$$(3) \quad \frac{dT_{amp}}{dt} = K * (T_{ext} - T_{amp}) \quad \text{avec } K = \frac{h * S}{a}$$

Relation qui exprime sous forme d'équation différentielle, la loi de variation de la température interne des ampoules en fonction de la température extérieure.

6.5.3. Matériel et méthodes.

Avant d'effectuer l'étude décrite auparavant dans l'autoclave au cours d'un cycle de stérilisation, nous avons décidé d'effectuer cette même étude dans un bain d'huile thermostaté afin de voir d'une part si le coefficient de transfert de chaleur global K variait énormément avec la température croissante de l'huile et d'autre part si le modèle "bain d'huile" pouvait se confondre avec le modèle réel à savoir l'autoclave.

L'étude a été effectuée pour des ampoules de 5 et 20 ml ainsi que pour des flacons de 10 et 20 ml. En effet, dans le but de piloter l'autoclave avec une sonde Pt100 à l'intérieur de la solution à stériliser, nous avons choisi de comparer la variation de K entre des ampoules et des flacons. Le modèle "flacon" a été retenu pour le pilotage pour l'unique raison de sa robustesse dans une pratique journalière; en effet une ampoule serait souvent cassée et une perte de temps au niveau de la production s'en ferait ressentir. Maintenant, seuls les résultats que nous obtiendrons par la suite pourront nous témoigner du bon ou du mauvais choix d'un tel modèle.

6.5.3.1. Expériences en "bain d'huile".

Afin d'étudier ce modèle pour les raisons invoquées auparavant, nous avons utilisé un bain d'huile thermostaté (huile de qualité utilisée pour la calibration des sondes thermiques Pt 100), des ampoules de 5 et 20 ml et des flacons de 10 et 20 ml remplis d'eau, des sondes thermiques Pt 100 avec une tête active de 3 cm de long et de 0,5 cm d'épaisseur, ainsi que l'enregistreur SPEEDOMAX auquel étaient directement reliées les sondes thermiques.

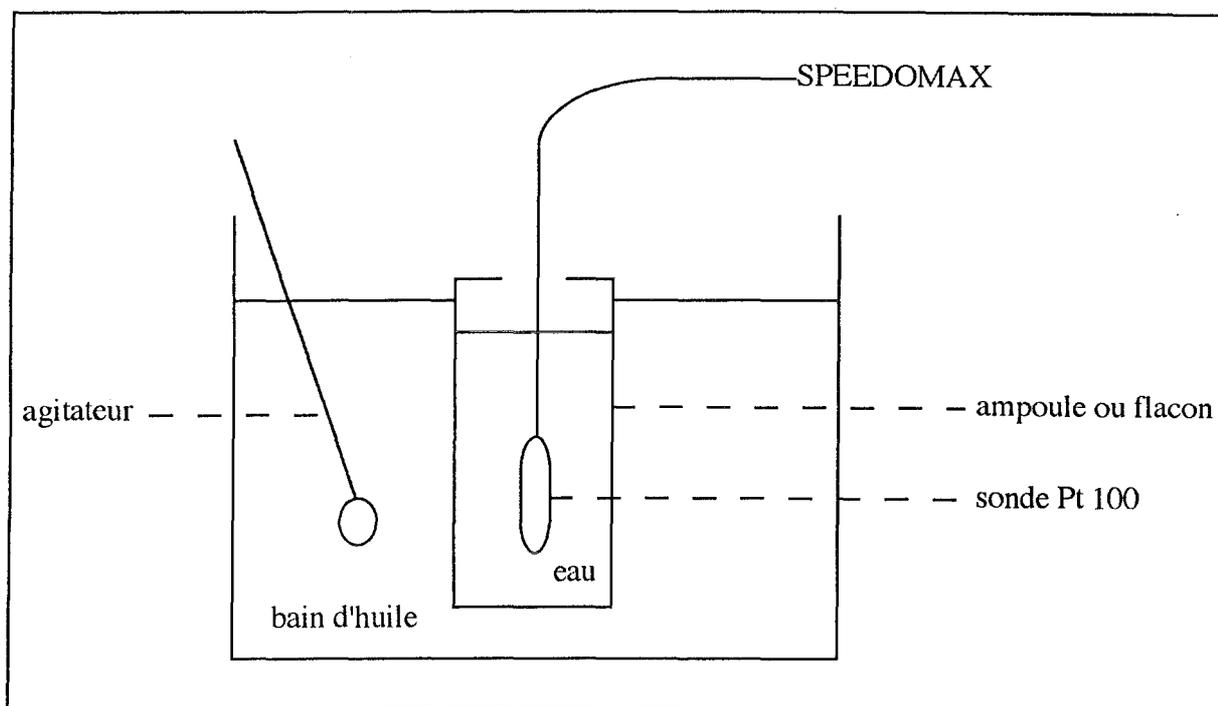


fig.10. Schéma de l'expérience en bain d'huile.

Pour cette étude, nous avons fait varier la température du bain d'huile de 50 °C à 80 °C par paliers de 10 °C. Le déroulement d'une expérience s'est effectuée de la façon suivante : les ampoules de 5 ou de 20 ml et les flacons de 10 et 20 ml sont remplis d'eau, les sondes thermiques sont plongées au coeur de la solution de façon à ce que la tête active de la sonde se situe au centre de l'eau ; le système maintenu par des potences est plongé dans le bain d'huile dont la température est définie et stabilisée préalablement. Ce choc thermique provoque une montée en température de la solution, température enregistrée ainsi que celle du bain d'huile par le SPEEDOMAX®. Nous obtenons ainsi un graphe représentant la variation de la température de la solution, confrontée à une augmentation brutale de la température extérieure, en fonction du temps.

Grâce à cet enregistrement, nous avons pu étudier la variation du K suivant les différentes températures du bain d'huile et pour les différents contenants utilisés suivant les relations suivantes :

$$K = \frac{h * S}{a}$$

$$\frac{d T_{amp}}{dt} = - K * (T_{amp} - T_{ext})$$

$$\text{d'où : } \text{Ln} \left(\frac{T_{amp} - T_{ext}}{T_0 - T_{ext}} \right) = - K * t$$

T_0 : température de la solution avant l'expérience.

D'après cette relation, nous pouvons déterminer le K en traçant la variation de :

$$\text{Ln} \left(\frac{\Delta T}{\Delta T_{max}} \right) = f(t)$$

Les valeurs de K obtenues seront comparées aux valeurs trouvées dans l'autoclave, pour les différents contenants étudiés.

6.5.3.2. Etude de K dans l'autoclave lors d'un cycle de stérilisation.

L'étude de K dans les conditions d'utilisation en routine de l'autoclave a demandé la mise au point d'un appareillage spécial afin de pouvoir conserver l'intégralité de la solution à stériliser. En effet, elle est soumise à des conditions de pression de l'ordre de 0,15 bar (vide provoqué en début de cycle) et de température de 122 °C (pression alors de 2,12 bars) pendant le plateau de stérilisation, alors que l'ampoule n'est pas scellée puisque nous devons placer une sonde thermique à l'intérieur de la solution. Les schémas qui suivent nous montrent l'appareillage mis au point en tenant compte de tous les paramètres préalablement évoqués (figures 11 et 12). Les avantages de cet appareil sont qu'il est étanche, que la sonde est maintenue au centre de la solution grâce aux joints étanches, que l'ampoule ou le flacon ne sont en contact avec aucun matériau conducteur (du moins dont la conductivité thermique est

inférieure à celle du verre), facile d'emploi et pouvant être utilisé en routine avec des résultats d'étanchéité reproductibles.

L'étude de K dans l'autoclave a été réalisée pour des ampoules de 2, 5, 20 ml et des flacons de 10 et 20 ml ; pour les ampoules nous plaçons au niveau du col un bouchon en caoutchouc, percé en son centre afin de laisser passer la sonde thermique, qui permet d'augmenter l'étanchéité du système ; les flacons sont fermés à l'aide d'un bouchon en caoutchouc percé en son centre puis sont sertis. Pour la réalisation des tests, nous avons placé l'appareillage près de la purge de l'autoclave, lieu où la température est la plus basse, afin d'être dans le cas le plus défavorable vis à vis de la stérilisation et ainsi pouvoir prétendre que les ampoules présentes dans l'enceinte auront reçu une quantité de chaleur au moins égale à notre référence. La sonde placée dans la solution (eau) est une sonde Pt 100 raccordée à l'enregistreur SPEEDOMAX® ; la partie active de cette sonde se situe au centre de la solution et ne touche en aucun cas le verre de l'ampoule. Afin de nous placer dans les conditions d'utilisation normale de l'autoclave, nous avons disposé à l'intérieur de l'enceinte des chariots d'ampoules de 2 ou de 5 ml représentant ainsi la quantité volumique et massique à stériliser. L'appareillage étanche contenant soit une ampoule soit un flacon est maintenu droit à l'aide de colliers. Afin de réduire le nombre de tests, nous avons placé deux systèmes étanches en parallèle. Comme nous l'avons vu dans la description du mode de fonctionnement de l'autoclave en qualification, les dix sondes thermiques du SPEEDOMAX® ont été disposées suivant le plan décrit dans le chapitre "répartition de la chaleur"; ainsi il sera aisé de suivre les variations de température dans l'enceinte de l'autoclave au cours de la stérilisation.

Une fois le dispositif mis en place, nous démarrons un cycle de stérilisation décrit précédemment. A la fin de l'épreuve, pour valider nos résultats, nous vérifions que l'ampoule ou le flacon renferme le volume exact déposé initialement.

Les courbes obtenues, grâce à l'enregistreur, nous permettent de déterminer K directement en suivant la variation de :

Tauto : température de l'autoclave;

Tamp : température au sein de l'ampoule ou du flacon suivant le cas.

Grâce à la détermination de K, nous pourrons comparer nos résultats avec ceux trouvés lors des expériences en "bain d'huile".

Le suivi de la température au sein des ampoules en fonction du temps, nous permettra de calculer le Fo réel, c'est à dire celui se trouvant à l'intérieur de la solution à stériliser, et nous pourrons ainsi le comparer à celui calculé par l'ordinateur de l'autoclave.

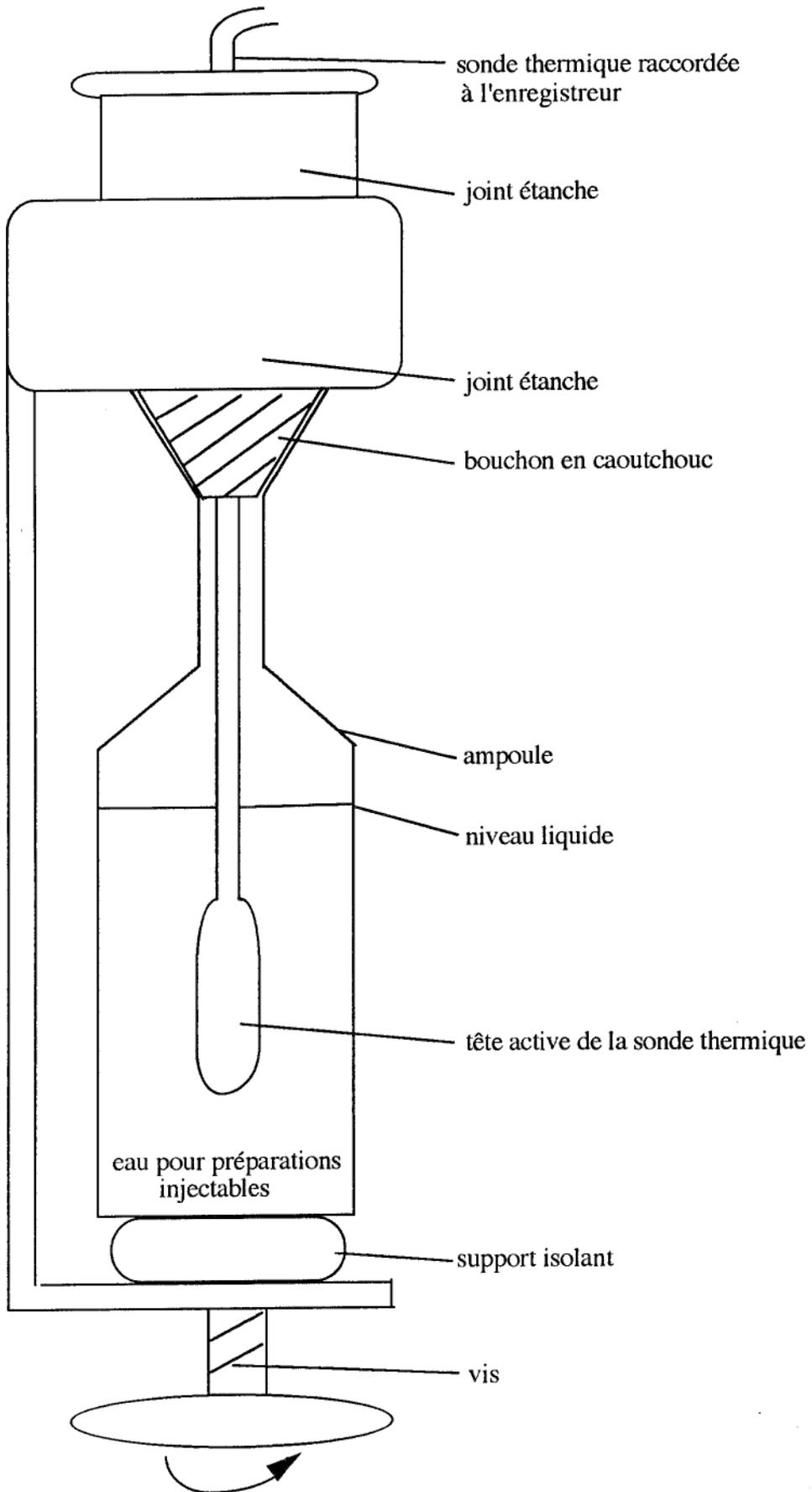


Fig.11.Appareillage étanche pour le pilotage et le contrôle de la stérilisation des ampoules

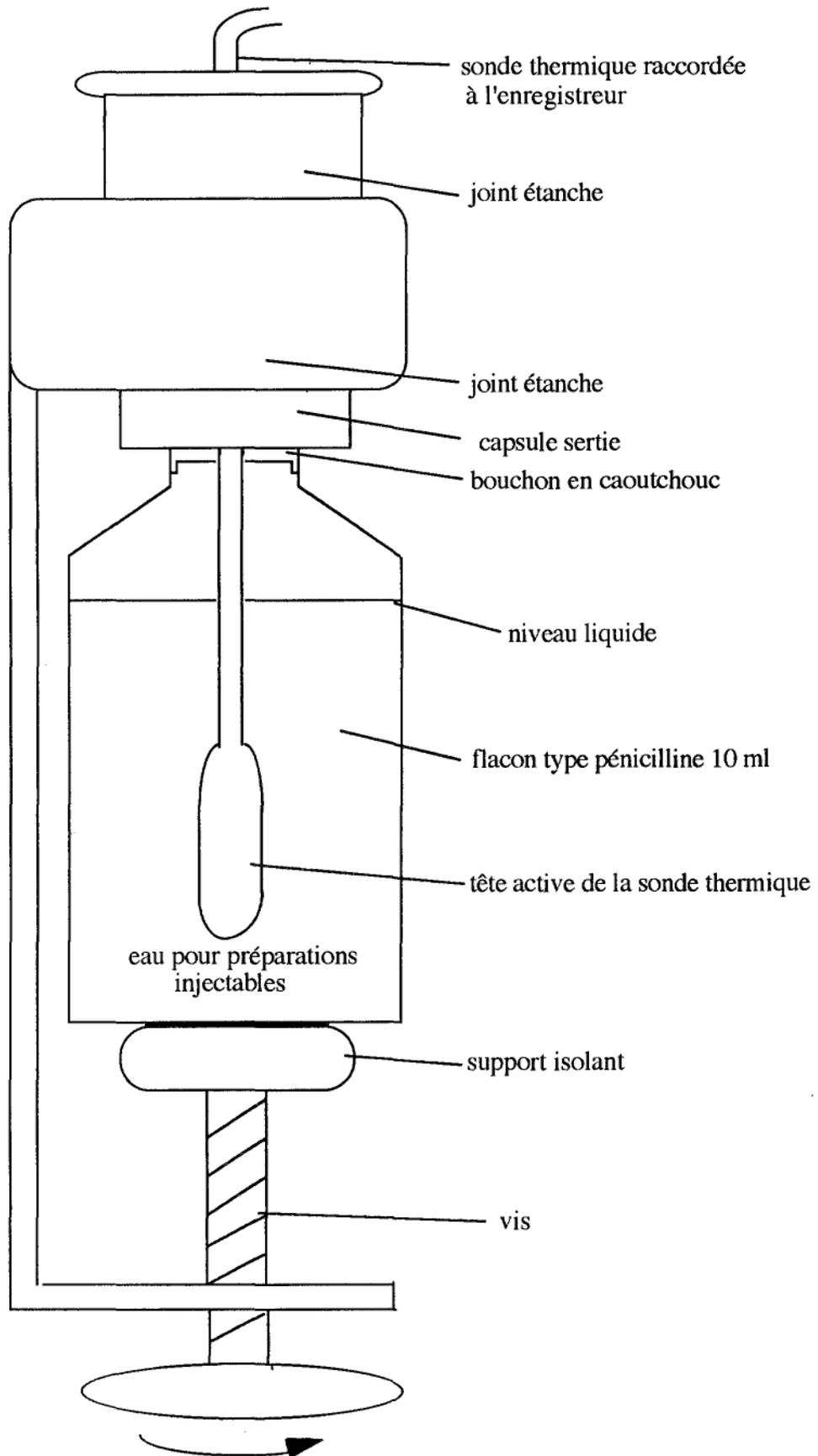


Fig.12. Appareillage étanche pour le pilotage en routine de la stérilisation des ampoules

**TROISIEME PARTIE : RESULTATS
ET DISCUSSION**

1. TEST DE BOWIE ET DICK.

1.1. RAPPEL DU MODE OPERATOIRE.

Une feuille possédant un film d'encre spéciale est disposée entre deux blocs de feuilles maintenus par un clamp. Ce bloc est placé au centre de l'autoclave vide. Après un cycle de stérilisation avec pour plateau de stérilisation $T = 126\text{ °C}$ et $t = 12$ minutes, nous retirons la feuille test et examinons sa couleur afin de valider ou non le test (les temps et températures sont relevés grâce aux deux enregistreurs SPECTRA® pour le pilotage de l'autoclave et YOKOGAWA® pour le contrôle).

2.1. RESULTATS.

	YOGAWA®	YOGAWA®	SPECTRA®	SPECTRA®	résultats
ESSAI	temps en mn	température	temps en mn	température	feuille test
N° 1	12	125,9 °C	12	126,1 °C	noire uniforme
N° 2	12	125,8 °C	12	126,0 °C	noire uniforme
N° 3	12	125,9 °C	12	126,1 °C	noire uniforme

tableau.5. Résultats des tests de BOWIE et DICK.

D'après les résultats de ce tableau, nous voyons dans un premier temps que le test de BOWIE et DICK s'est déroulé au niveau du plateau de stérilisation comme nous le souhaitons, pour pouvoir interpréter correctement les lectures des feuilles tests, à savoir une température de stérilisation de 126 °C pendant 12 minutes.

Les trois feuilles tests ont montré une couleur noire uniforme, c'est à dire que ce résultat prouve une bonne pénétration de la vapeur en phase de stérilisation ainsi que l'absence de poches d'air dans l'enceinte de l'autoclave.

Ce test doit être normalement effectué tous les matins avant toute opération d'autoclavage. L'opérateur devra conserver les feuilles tests et noter les temps et températures du déroulement du test. Cette opération permettra de démontrer qu'en cas de mauvaise stérilisation, la cause de non stérilité n'est pas due à la présence de poches d'air.

2.REPARTITION DE LA CHALEUR DANS L'ENCEINTE DE L'AUTOCLAVE.

2.1.RAPPELS DU BUT ET DU DEROULEMENT DE L'ETUDE.

2.1.1. But.

Nous voulons montrer à travers ces essais que les produits à stériliser ont bien reçu tous la même quantité de chaleur et qu'il n'existe pas lors de la stérilisation de points froids.

2.1.2.Déroulement de l'étude.

Cinq types de tests ont été effectués dans l'autoclave FEDEGARI FOF6® :

- cycle à vide (4 chariots sans cristallisoirs) : tableau 6 ;
- cycle ampoules de 2 ml demi-charge (2 chariots) : tableau 8 ;
- cycle ampoules de 2 ml pleine charge (4 chariots) : tableau 7;
- cycle ampoules de 5 ml demi-charge : tableau 10 ;
- cycle ampoules de 5 ml pleine charge : tableau 9.

Pour chaque types de tests, les essais ont été réalisés trois fois afin de valider les résultats obtenus. L'emplacement des sondes thermiques ainsi que leurs appareils de contrôle ont été décrits lors du chapitre II.5.3.

2.2.RESULTATS.

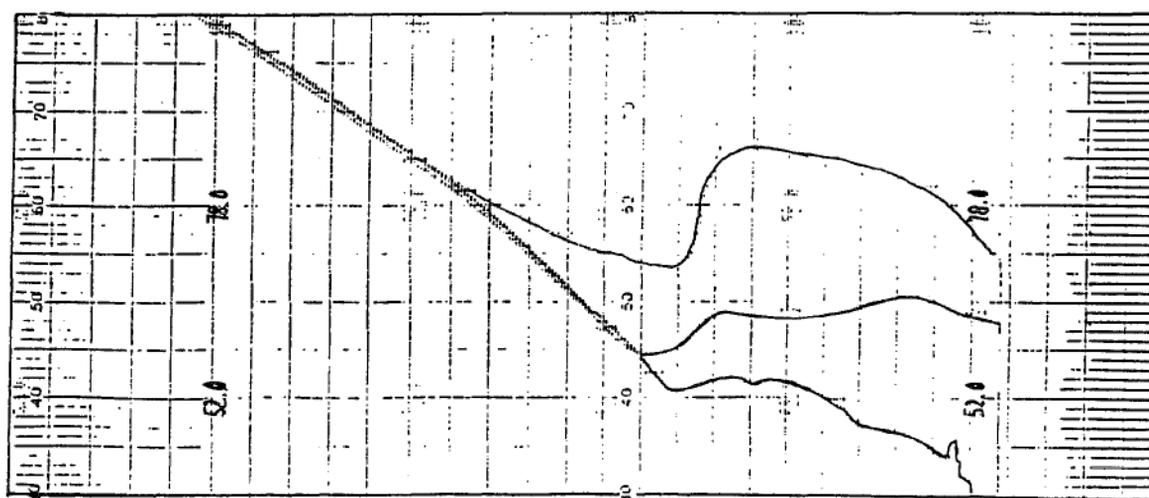


fig.13.Profils des températures dans l'autoclave lors de la phase de chauffage

Nous ne donnerons dans les tableaux de résultats qui vont suivre qu'un seul essai pour chaque type de tests.

tableaux.6.Résultats d'un cycle à vide.

SPEEDOMAX N° sonde	Température minimum °C	Température maximum °C	Température moyenne °C	Ecart par rapport à 121°C	Ecart à la moyenne
S 1	120,7	120,9	120,8	- 0,2	- 0,3
S 2	120,9	121,1	121,0	+ 0,0	- 0,1
S 3	120,8	121,2	121,0	+ 0,0	+ 0,1
S 4	120,8	121,2	121,0	+ 0,0	- 0,1
S 5	121,2	121,4	121,3	+ 0,3	+ 0,2
S 6	121,1	121,4	121,2	+ 0,2	+ 0,1
S 7	120,9	121,3	121,1	+ 0,1	0,0
S 8	121,1	121,3	121,2	+ 0,2	+ 0,1
S 9	120,8	121,3	121,0	+ 0,0	- 0,1
S 10	120,9	121,3	121,1	+ 0,1	0,0
S 11	121,0	121,3	121,2	+ 0,2	+ 0,1
S 12	120,9	121,2	121,1	+ 0,1	0,0

moyenne des douze sondes : 121,1 °C et écart-type = 0,2.

durée du plateau de stérilisation : 30 mn 21 s.

N.B. : l'écart à la moyenne est la différence entre la température moyenne de chaque sonde et la température moyenne générale.

YOKOGAWA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 13	120,9	121,5	121,2	+ 0,2
S 14	120,1	120,6	120,3	- 0,7
S 15	120,9	121,5	121,2	+ 0,2

durée du plateau de stérilisation : 30 mn 28 s.

SPECTRA N°sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 16	120,2	121,0	120,6	- 0,4
S 17	120,6	121,2	120,9	- 0,1
S 18	120,5	121,5	121,0	0,0
S 19	121,2	121,8	121,5	+ 0,5

durée du plateau de stérilisation : 30 mn 20 s.

N.B. : Les deux autres cycles à vide qui ont suivi celui-ci ont donné les mêmes résultats, à savoir un plateau de stérilisation en temps et en température, conforme aux normes fixées précédemment.

tableaux.7.Résultats d'un cycle ampoules de 2 ml pleine charge.

SPEEDOMAX N° sonde	Température minimum °C	Température maximum °C	Température moyenne °C	Ecart par rapport à 121°C	Ecart à la moyenne
S 1	120,8	121,2	121,0	0,0	- 0,2
S 2	121,0	121,3	121,1	+ 0,1	- 0,1
S 3	121,7	122,0	121,8	+ 0,8	+ 0,6
S 4	121,1	121,4	121,2	+ 0,2	0,0
S 5	121,2	121,5	121,3	+ 0,3	+ 0,1
S 6	121,3	121,6	121,4	+ 0,4	+ 0,2
S 7	121,2	121,5	121,3	+ 0,3	+ 0,1
S 8	121,2	121,4	121,3	+ 0,3	+ 0,1
S 9	121,2	121,3	121,2	+ 0,2	0,0
S 10	121,1	121,4	121,2	+ 0,2	0,0
S 11	121,2	121,6	121,3	+ 0,3	+ 0,1
S 12	120,8	121,2	121,0	0,0	- 0,2

moyenne des douze sondes : 121,2 °C et écart-type = 0,2.

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 20 s.

YOKOGAWA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 13	120,2	120,9	120,5	- 0,5
S 14	120,2	120,9	120,5	- 0,5
S 15	120,9	121,5	121,2	+ 0,2

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 10 s.

SPECTRA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 16	120,1	121,2	120,6	- 0,3
S 17	120,5	121,6	121,0	0,0
S 18	120,7	121,2	120,9	- 0,1
S 19	121,1	122,0	121,5	+ 0,5

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 20 s.

N.B. : Les deux autres cycles ampoules de 2 ml pleine charge qui ont suivi celui-ci ont donné les mêmes résultats, à savoir un plateau de stérilisation en temps et en température, conforme aux normes fixées précédemment.

tableaux.8.Résultats d'un cycle ampoules de 2 ml demi-charge.

SPEEDOMAX N ° sonde	Température minimum °C	Température maximum °C	Température moyenne °C	Ecart par rapport à 121°C	Ecart à la moyenne
S 1	120,8	121,4	121,1	+ 0,1	- 0,4
S 2	121,1	121,6	121,3	+ 0,3	- 0,2
S 3	121,7	122,1	121,9	+ 0,9	+ 0,4
S 4	121,4	121,8	121,6	+ 0,6	+ 0,1
S 5	121,3	121,7	121,5	+ 0,5	0,0
S 6	121,3	121,7	121,5	+ 0,5	0,0
S 7	121,2	121,6	121,4	+ 0,4	- 0,1
S 8	121,2	121,6	121,4	+ 0,4	- 0,1
S 9	121,2	121,5	121,3	+ 0,3	- 0,2
S 10	121,1	121,3	121,3	+ 0,3	- 0,1
S 11	121,3	121,8	121,6	+ 0,6	+ 0,1
S 12	121,4	121,8	121,6	+ 0,6	+ 0,1

moyenne des douze sondes : 121,5 °C écart-type = 0,2.

durée du plateau de stérilisation : 30 mn.

YOKOGAWA N ° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 13	120,7	121,3	121,0	0,0
S 14	120,3	120,7	120,5	- 0,5
S 15	120,6	121,1	120,9	- 0,1

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 16 s.

SPECTRA N ° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 16	120,1	121,4	120,7	- 0,3
S 17	120,5	121,7	121,1	+ 0,1
S 18	120,1	121,6	120,8	- 0,2
S 19	120,8	122,0	121,4	+ 0,4

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 20 s.

N.B. : Les deux autres cycles ampoules de 2 ml demi-charge qui ont suivi celui-ci ont donné les mêmes résultats, à savoir un plateau de stérilisation en temps et en température, conforme aux normes fixées précédemment.

tableaux.9.Résultats d'un cycle ampoules de 5 ml pleine charge.

SPEEDOMAX N° sonde	Température minimum °C	Température maximum °C	Température moyenne °C	Ecart par rapport à 121°C	Ecart à la moyenne
S 1	120,8	121,1	120,9	- 0,1	- 0,4
S 2	121,0	121,3	121,1	+ 0,1	- 0,2
S 3	121,7	122,0	121,8	+ 0,8	+ 0,5
S 4	121,0	121,4	121,2	+ 0,2	- 0,1
S 5	121,3	121,6	121,5	+ 0,5	+ 0,2
S 6	121,2	121,6	121,4	+ 0,4	+ 0,1
S 7	121,2	121,5	121,3	+ 0,3	+ 0,1
S 8	121,1	121,4	121,2	+ 0,2	- 0,1
S 9	121,0	121,3	121,2	+ 0,2	- 0,1
S 10	121,0	121,4	121,2	+ 0,2	- 0,1
S 11	121,3	121,6	121,5	+ 0,5	+ 0,2
S 12	121,2	121,6	121,4	+ 0,4	+ 0,1

moyenne des douze sondes : 121,3 °C et écart-type = 0,2.

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 12 s.

YOKOGAWA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 13	120,9	121,4	121,1	+ 0,1
S 14	120,9	121,5	121,2	+ 0,2
S 15	120,9	121,2	121,1	+ 0,1

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 04 s.

SPECTRA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 16	120,1	121,3	120,7	- 0,2
S 17	120,5	121,7	121,1	+ 0,1
S 18	120,1	121,6	120,8	- 0,2
S 19	120,8	122,1	121,4	+ 0,4

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 40 s.

N.B. : Les deux autres cycles ampoules de 5 ml pleine charge qui ont suivi celui-ci ont donné les mêmes résultats, à savoir un plateau de stérilisation en temps et en température, conforme aux normes fixées précédemment.

tableaux.10.Résultats d'un cycle ampoules de 5 ml demi-charge.

SPEEDOMAX N° sonde	Température minimum °C	Température maximum °C	Température moyenne °C	Ecart par rapport à 121°C	Ecart à la moyenne
S 1	120,9	121,2	121,0	0,0	- 0,4
S 2	121,2	121,6	121,4	+ 0,4	0,0
S 3	121,7	122,0	121,9	+ 0,9	+ 0,5
S 4	121,0	121,3	121,2	+ 0,2	- 0,2
S 5	121,2	121,7	121,4	+ 0,4	0,0
S 6	121,3	121,7	121,5	+ 0,5	+ 0,1
S 7	121,6	121,5	121,4	+ 0,4	0,0
S 8	121,1	121,4	121,3	+ 0,3	- 0,1
S 9	121,1	121,4	121,2	+ 0,2	- 0,2
S 10	121,1	121,4	121,3	+ 0,3	- 0,1
S 11	121,4	121,6	121,5	+ 0,5	+ 0,1
S 12	121,3	121,6	121,5	+ 0,5	+0,1

moyenne des douze sondes : 121,41°C et écart-type = 0,2.

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 33 s.

YOKOGAWA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 13	121,1	121,4	121,2	+ 0,2
S 14	121,1	121,6	121,4	+ 0,4
S 15	121,1	121,4	121,2	+ 0,2

durée du plateau de stérilisation : 29 mn 33 s.

SPECTRA N° sonde	Température minimum en °C	Température maximum en °C	Température moyenne en °C	Ecart par rapport à 121°C
S 16	120,5	121,4	120,9	- 0,1
S 17	120,9	121,8	121,3	+ 0,3
S 18	120,1	121,5	120,8	- 0,2
S 19	121,1	122,1	121,6	+ 0,6

durée du plateau de stérilisation : 30 mn 00 s.

N.B. : Les deux autres cycles ampoules de 5 ml demi-charge qui ont suivi celui-ci ont donné les mêmes résultats, à savoir un plateau de stérilisation en temps et en température, conforme aux normes fixées précédemment.

2.3. DISCUSSION.

2.3.1. Températures des sondes durant la phase de chauffage.

D'après le graphe décrivant l'évolution des températures des différentes sondes lors de la phase de chauffage, nous pouvons voir qu'il existe une différence significative des valeurs des températures obtenues (jusqu'à $\Delta T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) suivant le positionnement des sondes dans les chariots (fig.12.). En effet, une sonde proche de l'arrivée de vapeur aura une température supérieure à une sonde placée vers la base de l'autoclave ou vers la purge. Cet aspect se règle vers une température globale de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ et n'influence en aucun cas le calcul de F_0 puisqu'à cette température il est non significatif.

2.3.2. Températures du "plateau de stérilisation".

Pour chaque type de cycles, nous avons relevé et calculé au niveau des températures du plateau de stérilisation quatre sortes de paramètres pour chaque sonde, à savoir :

- température minimale durant le plateau de stérilisation;
- température maximale durant le plateau de stérilisation;
- température moyenne durant le plateau de stérilisation;
- écart de la température moyenne par rapport à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pour l'enregistreur SPEEDOMAX[®], nous avons aussi calculé la moyenne de température des douze sondes, ainsi que l'écart de chacune de ces sondes à la moyenne générale. Cette étude n'a pas été réalisée pour les deux autres enregistreurs vu le faible nombre de sondes pour chacun des appareils.

D'après les normes des bonnes pratiques de fabrication (37), les températures du plateau de stérilisation doivent être comprises entre $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Une tolérance est admise pour une sonde dont la valeur maximale serait légèrement supérieure à $122\text{ }^{\circ}\text{C}$, mais en aucun cas sa valeur ne devra être inférieure à $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. La température moyenne de chaque sonde doit aussi figurer dans la norme $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il est aisé de comprendre ces indications puisque comme nous l'avons vu dans la première partie de ce mémoire, le calcul du F_0 s'établit à partir de la température obtenue lors du plateau de stérilisation; le calcul du F_0 avant le plateau de stérilisation est presque négligeable. Or, si nous voulons un F_0 de 30 minutes c'est à dire en approximant un plateau de stérilisation de 30 minutes à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, il n'est pas envisageable pour la garantie de la stérilité du lot de trouver une sonde en dessous de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ et prétendre la stérilité des ampoules; par contre une sonde au-dessus de $122\text{ }^{\circ}\text{C}$ entraîne une augmentation du F_0 donc une garantie de la stérilisation. A ce sujet, en cas de produits thermosensibles, l'écart devra

rester suffisamment petit, c'est pour cette raison que nous avons calculé l'écart de la moyenne de chaque sonde par rapport à 121 °C qui doit rester compris entre 120 et 122 °C.

Les résultats des différents essais de qualification ont été satisfaisants par rapport aux normes évoquées auparavant. Malgré tout, nous pouvons faire quelques remarques par rapport à ces expériences. Il existe souvent des écarts de quelques centièmes de degré entre des sondes placées aux mêmes endroits sur les chariots. Ceci découle de deux causes essentiellement ; la première est que toutes les sondes ne sont pas reliées aux mêmes enregistreurs, ainsi le défaut de l'appareil d'enregistrement peut intervenir pour quelques centièmes de degré ; la deuxième est que même si toutes les sondes sont calibrées régulièrement, il arrive parfois qu'il existe une dérive de la sonde dans le temps et qu'elle ait un défaut ou un excès de quelques dixièmes de degré. De ce fait, une sonde thermique indiquant une trop grande différence de température par rapport aux autres, sera immédiatement recalibrée ou changée suivant son état de fonctionnement.

Même si les essais de répartition de chaleur ont été validés, il faut signaler l'absence d'une zone froide c'est à dire un endroit dans l'enceinte de l'autoclave qui aurait durant la phase de stérilisation une température en-dessous de 120 °C, mais la présence d'une zone dont la température est toujours la plus basse lors du plateau de stérilisation à savoir la purge (référence S 1 et S 16). Cette indication, qui n'est pas étonnante vu que nous nous trouvons à l'endroit où sont récupérés les condensats, va permettre à l'opérateur de placer en routine une sonde du SPECTRA qui pilotera l'autoclave c'est à dire que le calcul du Fo par l'ordinateur de bord s'effectuera toujours à l'aide de la sonde indiquant la température la plus basse.

2.3.3. Durée du "plateau de stérilisation".

Nous avons vu dans la deuxième partie de ce mémoire, que l'ordinateur de bord de l'autoclave était programmé par l'opérateur pour un Fo et une température de stérilisation déterminés ; ceci veut dire que le temps du plateau de stérilisation peut être de 30 +/- 1 minutes puisque la progression du Fo tout au long de la phase stérilisatrice ne dépendra que de la valeur de la sonde thermique la plus basse (purge). Ainsi, en calculant la durée du plateau de stérilisation, nous n'avons fait que vérifier la normalité du Fo. Il faut noter que l'entreprise FEDEGARI® a mis au point un nouvel Eprom (mémoire interne placé dans l'ordinateur de bord) permettant à l'opérateur de guider son choix de stérilisation pour une durée de plateau et de température déterminées. Nous voyons, à travers ces deux exemples, que le pilotage d'un autoclave peut être conduit suivant deux paramètres : Fo ou durée et température du plateau de stérilisation.

Nous avons aussi remarqué que les temps de chauffage de l'autoclave variaient d'un essai à l'autre, alors que les temps de refroidissement restaient proches. Ceci s'explique par le

fait que plusieurs de nos essais ont été effectués alors que l'autoclave était froid, c'est à dire d'une température à l'intérieur de l'enceinte d'environ 25 °C (l'autoclave n'avait pas fonctionné depuis 12 H), alors que d'autres essais ont été établis pour une température intérieure d'environ 60 °C (l'autoclave venait de stériliser un lot de production). En effet, pour un autoclave froid la durée du temps de chauffage sera d'autant plus longue que la température de départ est faible.

A la suite de ces résultats et de ces remarques, nous pouvons déclarer que l'autoclave au niveau de la répartition de la chaleur a été qualifié, mais ces résultats devront être confirmés par le challenge bactérien.

3. CHALLENGE BACTERIEN.

3.1. BUT.

Les résultats trouvés lors de l'étude la répartition de la chaleur doivent être confirmés par le challenge bactérien. Ainsi pour chaque cycle effectué précédemment, nous avons en parallèle déposé dans les chariots des ampoules renfermant une population connue en nombre de *Bacillus stearothermophilus*. A la fin de chaque essai, cette population devra avoir subi une réduction de six log confirmant ainsi la stérilité du lot .

3.2. RESULTATS.

3.2.1. Valeur de D et dénombrement de la population de l'échantillon.

	valeur de D à 121 °C	dénombrement
Fournisseur	1,8 minutes	2,1 10 ⁶ UFC / 0,1 ml
Laboratoire SYNTHELABO	1,8 minutes	1,99 10 ⁶ UFC / 0,1 ml

tableau.11. Résultats de la valeur de D.

3.2.2. Résultats de la surdestruction bactérienne.

A l'aide de trois plans (figures 14 et 15, tableau 12), nous pouvons répertorier de façon exacte la position des dix ampoules (chaque essai est réalisé avec 10 ampoules) dans les chariots lors des différents challenges bactériens.

3.2.2.1. Localisation des échantillon.

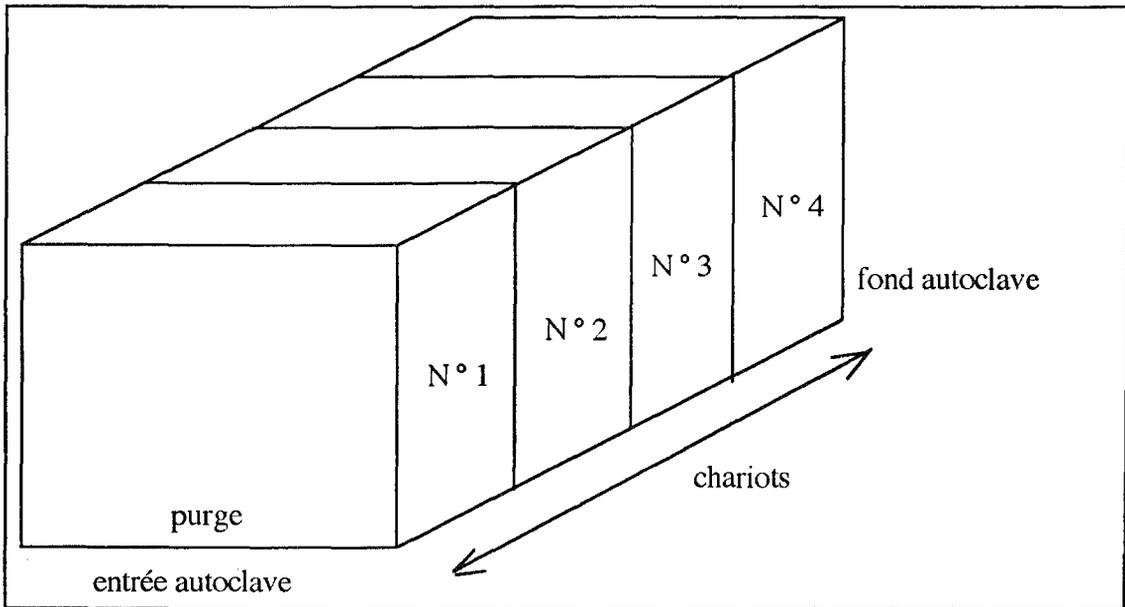


fig.14. Plan des chariots dans l'autoclave.

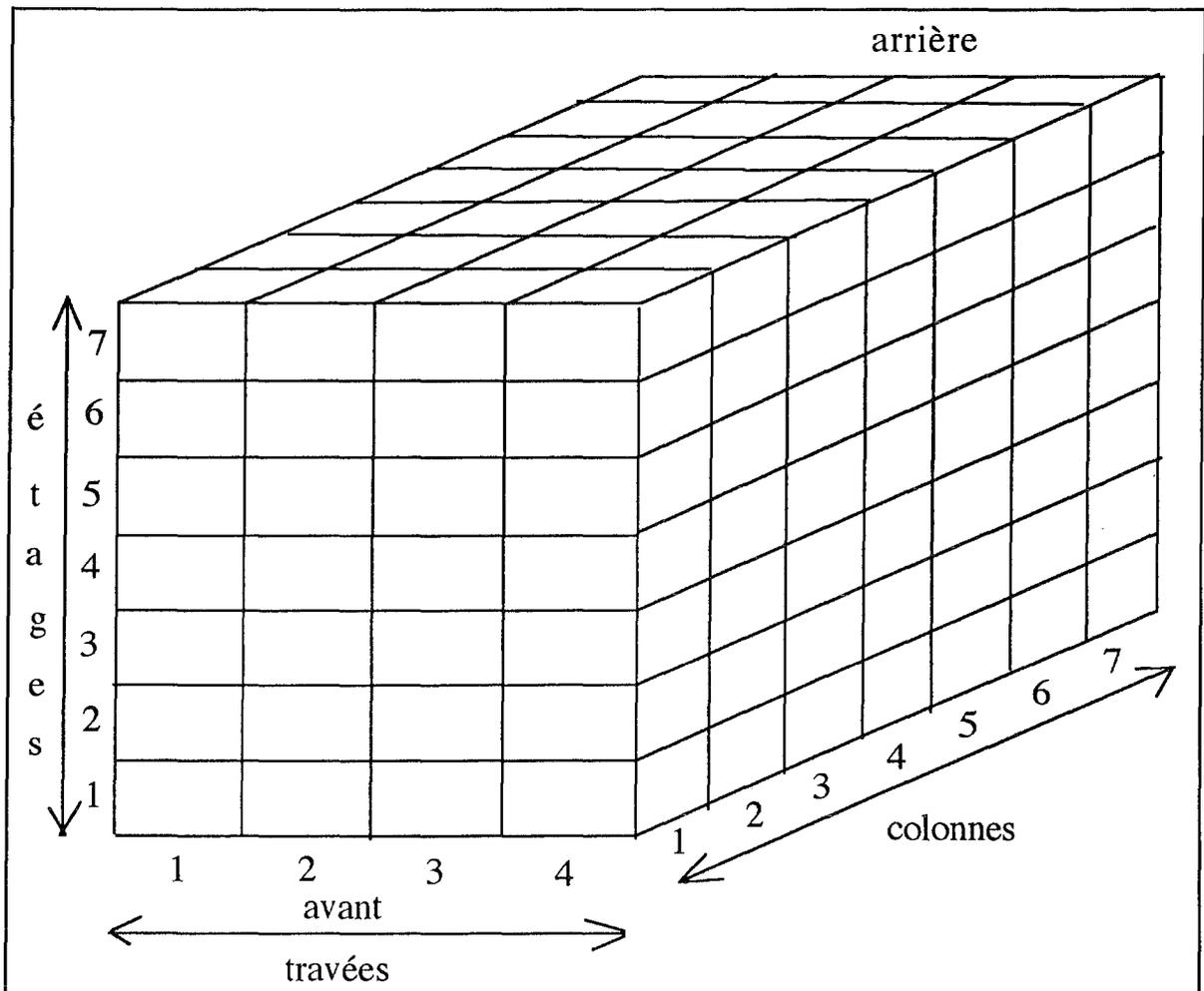


fig.15. Chariot légendé.

N ° ampoule	chariot	étage	colonne	travée
1	4	6	4	1
2	4	1	4	1
3	3	4	1	3
4	3	4	7	2
5	2	1	4	1
6	2	3	4	1
7	2	6	4	1
8 (purge)	1	1	4	1
9 (purge)	1	1	5	1
10	1	7	4	2

**tableau.12. Localisation des ampoules chargées de bacillus stearothermophilus.
(exemple d'un cycle pleine charge 2 ou 5ml)**

Nous pouvons remarquer qu'à l'endroit critique, à savoir la purge, nous avons placé deux ampoules afin de contrôler qu'une température, à ce niveau, plus basse que le reste de l'enceinte durant la phase de stérilisation, n'entraîne pas de différences significatives vis à vis des autres ampoules.

Le challenge bactérien a été réalisé pour les cycles de stérilisation, repérés alphabétiquement de A à L, des ampoules de 2 et 5 ml demi-charge et pleine charge. Il n'a pas été réalisé pour les trois cycles à vide. La solution renfermant les spores de bacillus stearothermophilus est de l'eau.

Définition de chaque challenge bactérien :

- cycles ampoules 2 ml pleine charge : cycles A, B, C;
- cycles ampoules 2 ml demi-charge : cycles D, E, F;
- cycles ampoules 5 ml demi-charge : cycles G, H, I;
- cycles ampoules 5 ml pleine charge : cycles J, K, L.

N°amp	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
2	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
3	----	----	----	----	am.cas	----	----	----	----	----	----	----
4	----	am.cas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
5	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
6	----	am.cas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
7	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
9	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
10	----	am.cas	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
té.num	2 10 ⁶	1,510 ⁶	1,810 ⁶	2,310 ⁶	1,910 ⁶	1,810 ⁶	1,910 ⁶	1,910 ⁶	2,510 ⁶	2,610 ⁶	1,710 ⁶	1,910 ⁶
té.pos.	+	N.R	N.R	+	N.R	N.R	+	N.R	N.R	+	+	N.R

tableau.13.Résultats du challenge bactérien.

am.cas. : ampoule cassée;

N.R : non réalisé;

" ---- " : négatif ou aucune pousse;

" + " : positif ou pousse bactérienne;

té.num. : témoin numération;

té. pos. : témoin positif.

Lors de nos essais, nous avons cassé malencontreusement des ampoules de spores, ainsi pour les challenges bactériens B et E, l'interprétation des résultats n'a été effectuée que sur sept et neuf ampoules respectivement.

3.3.DISCUSSION.

D'après les résultats du paragraphe III.3.2.1., nous avons vérifié que les données du fournisseur vis à vis de la population bactérienne étaient exactes : valeur de D et dénombrement de la population bactérienne initiale.

D'après les tableaux du paragraphe III.3.2.2., nous nous apercevons que les résultats obtenus lors de l'étude de la répartition de la chaleur sont confirmés par l'analyse des ampoules de spores après une phase de stérilisation $F_0 = 30$ mn à 121 °C. En effet, aucune des 116 ampoules étudiées n'a révélé une pousse bactérienne signe d'une non destruction. Ceci permet d'affirmer alors que nous avons réduit de 10^6 la population bactérienne initiale, objectif déclaré avant les essais. Les résultats compilés dans le tableau 13 nous ont permis de calculer la valeur stérilisatrice F_0 par la méthode de la fraction négative. A savoir :

$$F_0 = D * (\log_{10} A - 2,303 \log_{10} \frac{n}{q})$$

A = nombre de spores par ampoule;

n = nombre d'ampoules par essai;

q = nombre d'ampoules par essai n'ayant aucune pousse après 7 jours.

Par convention q = 9 si les 10 ampoules sont négatives après 7 jours.

	essais : A,C,D,F,G, H,I,J,K,L.	essai : B	essai : E
	n = 10 ; q = 9	n = 7 ; q = 6	n = 9 ; q = 8
F ₀	10,61 minutes	10,52 minutes	10,58 minutes

tableau.14.Valeurs de F₀ calculées par fraction négative.

D'après ce tableau, nous voyons que les valeurs de F₀ sont inscrites dans les normes fixées préalablement (F₀ > 10 minutes).

Tous les résultats obtenus lors des différents challenges bactériens sont satisfaisants, nous venons de confirmer ceux trouvés pour la répartition de la chaleur, à savoir que la stérilisation effectuée dans l'autoclave FEDEGARI FOF6® est conforme aux normes de stérilité imposées par les bonnes pratiques de fabrication. Ces essais ont été réalisés dans des ampoules remplies d'eau, mais il faut savoir que la validation de la stérilité d'un produit s'accompagne d'un challenge bactérien dont les ampoules sont remplies du produit à stériliser. En effet, toute solution visqueuse influe sur la conductivité thermique et alors diminue la cinétique de destruction bactérienne.

Nous avons, au vu des résultats, qualifié l'autoclave FEDEGARI FOF6® au point de vue du challenge bactérien. Il reste cependant à déterminer comment s'effectue la pénétration de la chaleur dans les ampoules lors de l'autoclavage, et essayer de mettre au point un système de pilotage de l'autoclave à l'aide d'une sonde à l'intérieur d'un flacon.

4.PENETRATION DE LA CHALEUR.

4.1.BUT.

L'étude de la pénétration de la chaleur dans les ampoules lors de la stérilisation, permet de suivre l'évolution de la température au sein de la solution en fonction du temps et ainsi donner à l'opérateur les véritables "F₀ et temps du plateau de stérilisation" de la solution à stériliser. Ces expériences permettront aussi de calculer l'évolution du coefficient global de

transfert de chaleur global défini auparavant ; enfin nous tenterons de piloter l'autoclave à l'aide d'une sonde thermique plongée directement dans la solution à stériliser.

4.2.RESULTATS ET DISCUSSION.

4.2.1.Résultats des expériences en "bain d'huile".

Nous avons réalisé des essais de montées en température, de 50 °C à 80 °C, pour des ampoules de 5, 20 ml et des flacons de 10, 20 ml. A partir des courbes témoins de l'évolution de la température en fonction du temps, nous avons déterminé K (figures 16 à 19) en traçant la variation de :

$$\text{Ln} (\Delta T / \Delta T_{\text{max}}) = f(t)$$

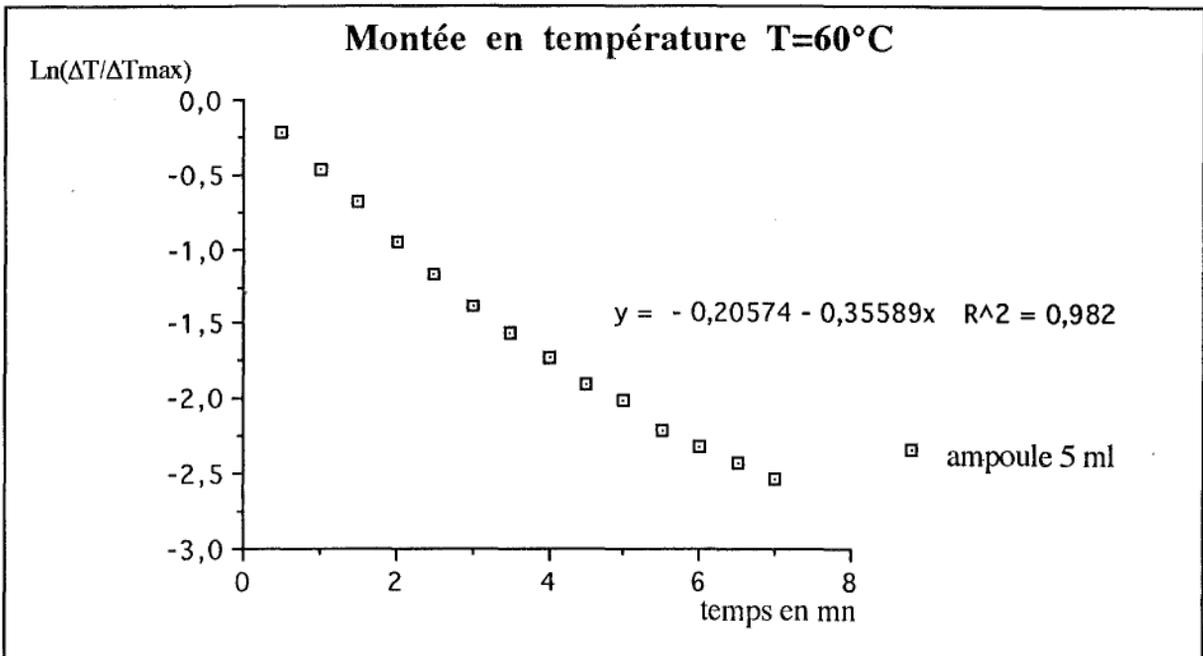


fig.16.Détermination de K pour une ampoule de 5 ml à T final = 60 °C.

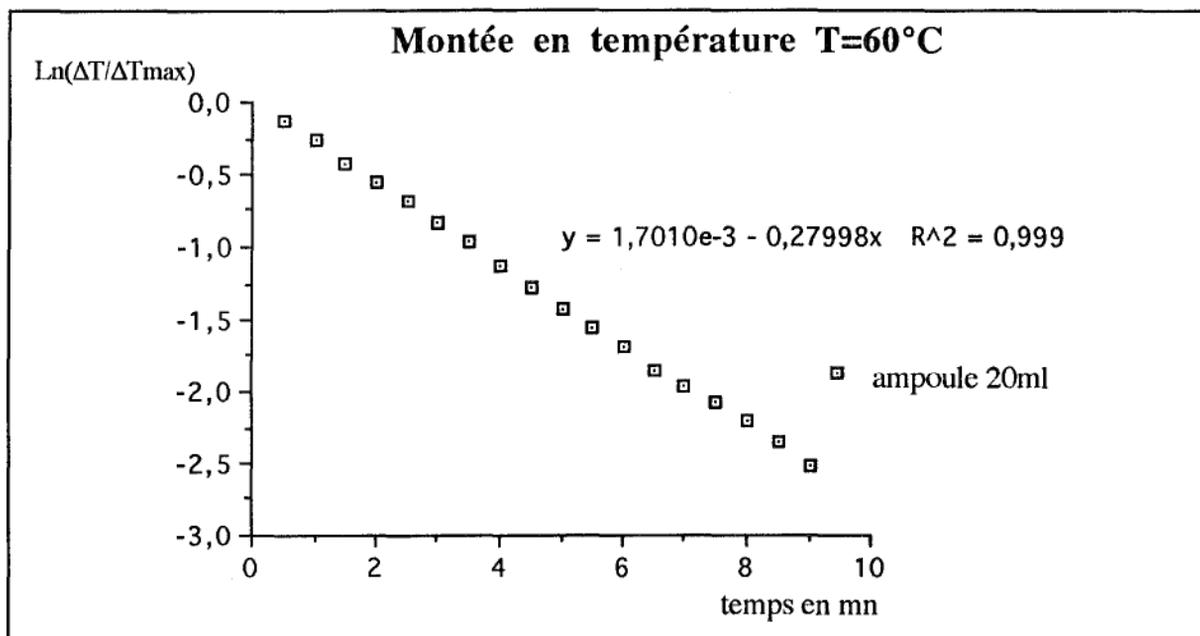


fig.17.Détermination de K pour une ampoule de 20 ml à T final = 60 °C.

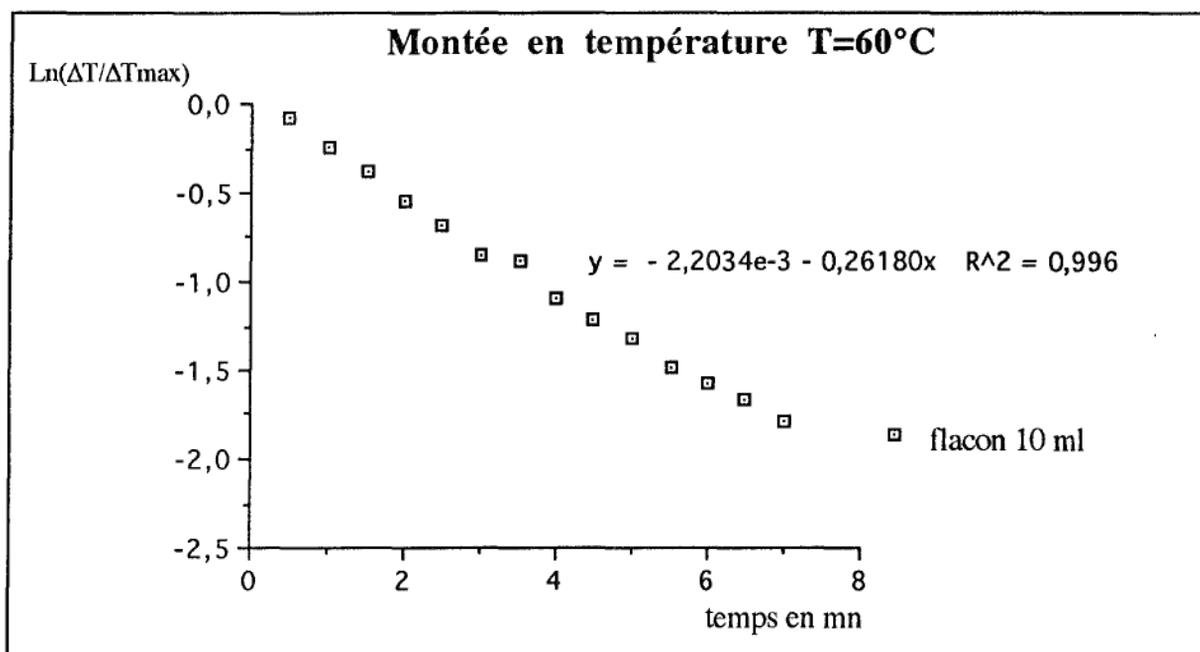


fig.18.Détermination de K pour un flacon de 10 ml à T final = 60 °C.

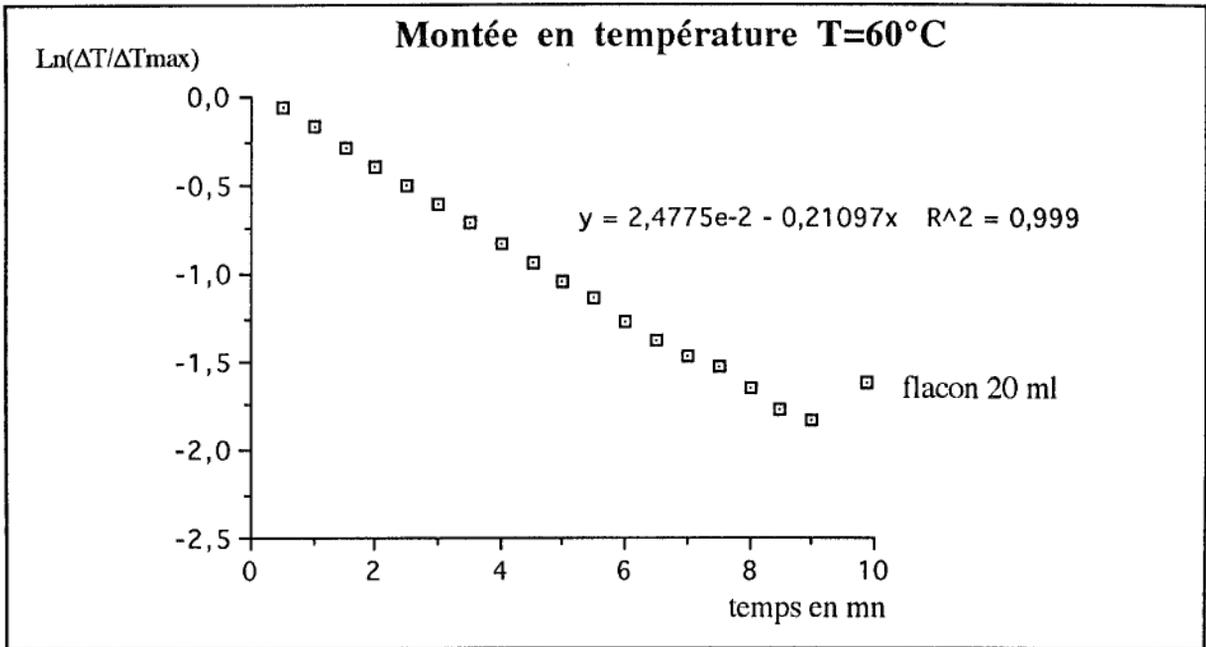


fig.19.Détermination de K pour un flacon de 20 ml à T final = 60 °C.

4.2.2.Discussion des expériences en "bain d'huile".

température du bain d'huile	K pour une ampoule 5 ml	K pour une ampoule 20 ml	K pour un flacon 10 ml	K pour un flacon 20 ml
50 °C	0,256	0,208	0,201	0,173
60 °C	0,356	0,280	0,261	0,211
70 °C	0,443	0,316	0,312	0,241
80 °C	0,380	0,356	0,299	0,262

tableau 15.Valeurs de K.

Les valeurs de K compilées dans le tableau 15, ont été calculées pour des températures du bain d'huile de 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C avec des ampoules de 5 ml, 20 ml et flacons de 10 ml, 20ml. Ces valeurs montrent que la géométrie des contenants ainsi que leurs volumes ont une très grande influence sur le K. L'analyse des courbes données en exemple ci-dessus, amène à penser que le coefficient de transfert de chaleur K est quasi-linéaire durant l'expérience, puis diminue en fin d'expérience. Le calcul d'un K moyen (pente moyenne des courbes) fait ressortir des différences importantes fonction :

- du contenant : S, Cp, m_i, varient suivant la géométrie du contenant.
- de la température : augmentation de 50 % de K entre 50 °C et 70-80 °C. Cet effet traduit la variation du coefficient de transfert de chaleur global h, effet probablement dû à l'augmentation des phénomènes de convection au sein du liquide contenu dans les ampoules ou flacons. En effet, selon la théorie des transferts de chaleur par convection libre (33), le

coefficient de transfert h est une fonction croissante des nombres adimensionnelles de Grashoff et de Prantl :

$$h = f(Gr, Pr) = a * Gr^b * Pr^c \text{ et } b \text{ et } c > 0.$$

$$- Gr : \text{nombre de Grashoff} = \frac{d_H^3 * \rho^2 * g}{\mu^2} * \beta * \Delta T$$

β : coefficient d'expansion volumique du milieu ;

d_H : diamètre hydraulique ;

ρ : masse volumique ;

g : accélération de la pesanteur ;

μ : viscosité dynamique.

variation proportionnelle à l'écart de température fluide-paroi, et inversement proportionnelle au carré de la viscosité.

$$- Pr : \text{nombre de Prantl} = \frac{\nu}{\frac{\lambda}{\rho * C_p}}$$

ρ : masse volumique ;

C_p : capacité calorifique ;

λ : conductivité thermique ;

ν : viscosité cinématique.

Nous pouvons également remarquer que la conductivité thermique du verre augmente faiblement avec la température (variation de 30 % entre 0 et 200 °C), les capacités calorifiques variant également peu.

L'objectif avoué de cette étude étant de piloter l'autoclave à l'aide d'une solution contenue dans un flacon, nous devinons d'après les différents coefficients K , que nous pouvons envisager un pilotage des ampoules de 5, 20 ml par un flacon de 10 ml. En effet, le K du flacon de 10 ml est toujours inférieur à celui des ampoules, notamment à 70 °C et 80 °C, dès lors en décidant de prendre pour pilote ce flacon, nous nous plaçons dans le cas le plus défavorable de stérilisation.

Ces premiers résultats nous donnent une idée de la forme de pilotage que nous allons pouvoir adopter ; cependant nous devons vérifier ces affirmations par l'étude que nous allons faire dans l'autoclave.

4.2.3. Résultats de l'étude de K dans l'autoclave.

Nous avons suivi dans l'autoclave, la variation de K durant une phase de chauffage et le début du plateau de stérilisation à l'aide d'une sonde thermique Pt 100 placée au centre de la solution. Le calcul de la valeur de K (figures 20 à 29) s'effectue ainsi :

$$\frac{dT_{amp}}{dt} = K \cdot (T_{auto} - T_{amp})$$

T_{amp} : température de l'ampoule;

T_{auto} : température de l'autoclave.

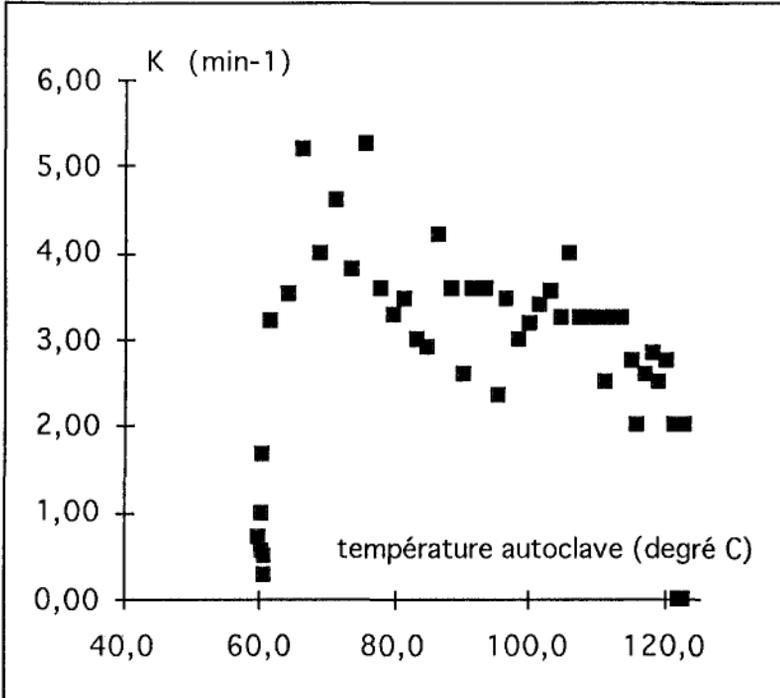


fig.20. Variation de K pour une ampoule de 2 ml.

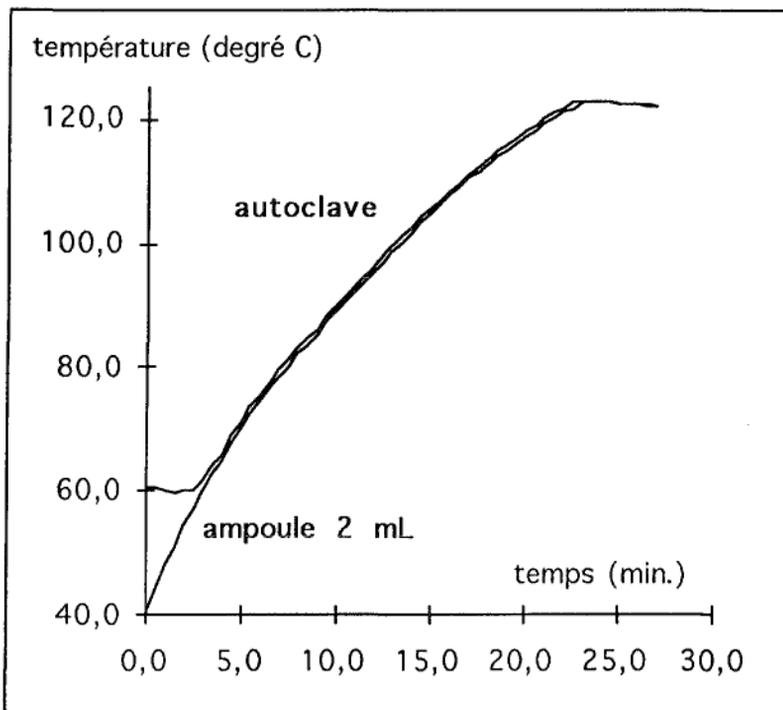


fig.21. Evolutions des températures d'une ampoule de 2 ml et de l'autoclave.

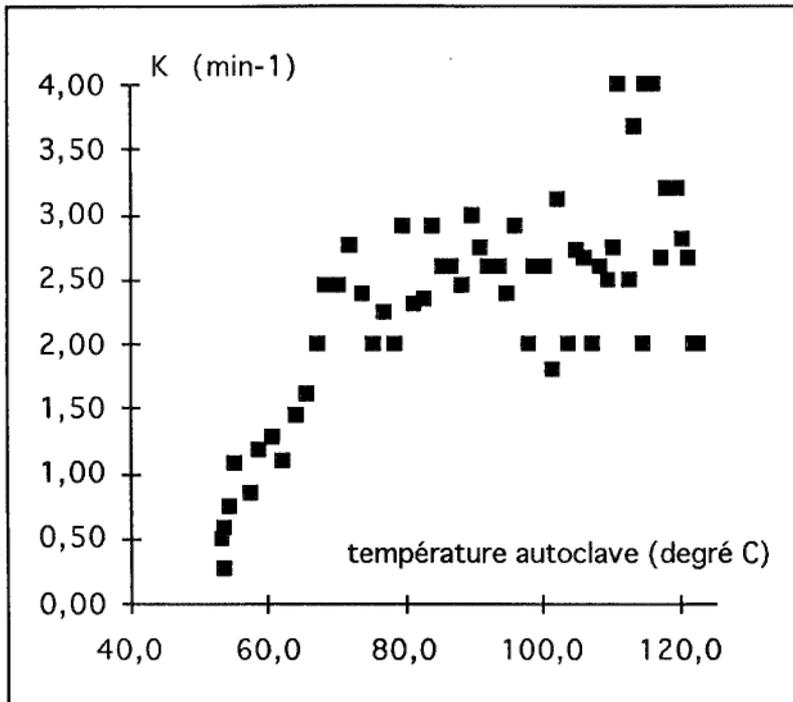


fig.22.Variation de K pour une ampoule de 5 ml.

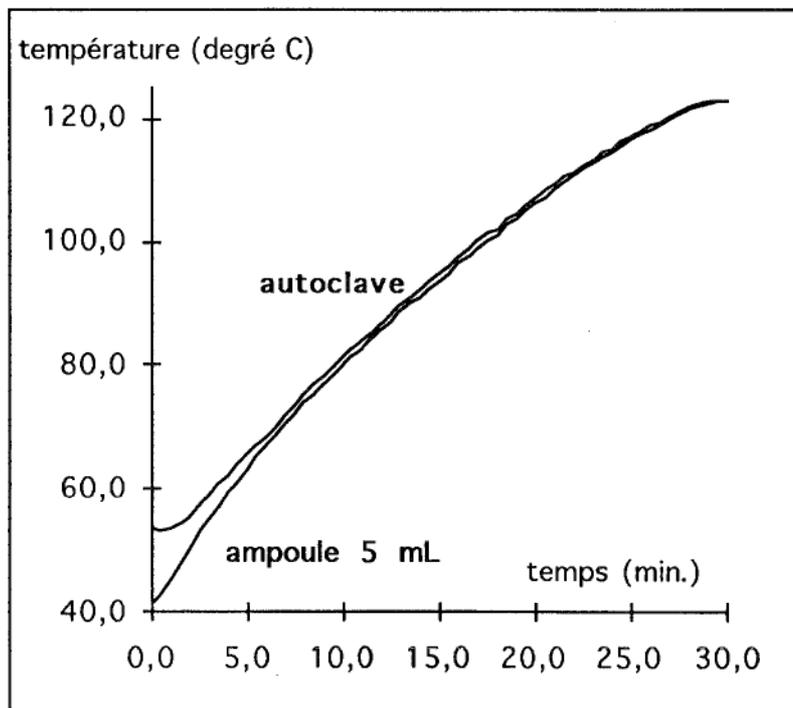


fig.23.Evolutions des températures d'une ampoule de 5 ml et de l'autoclave.

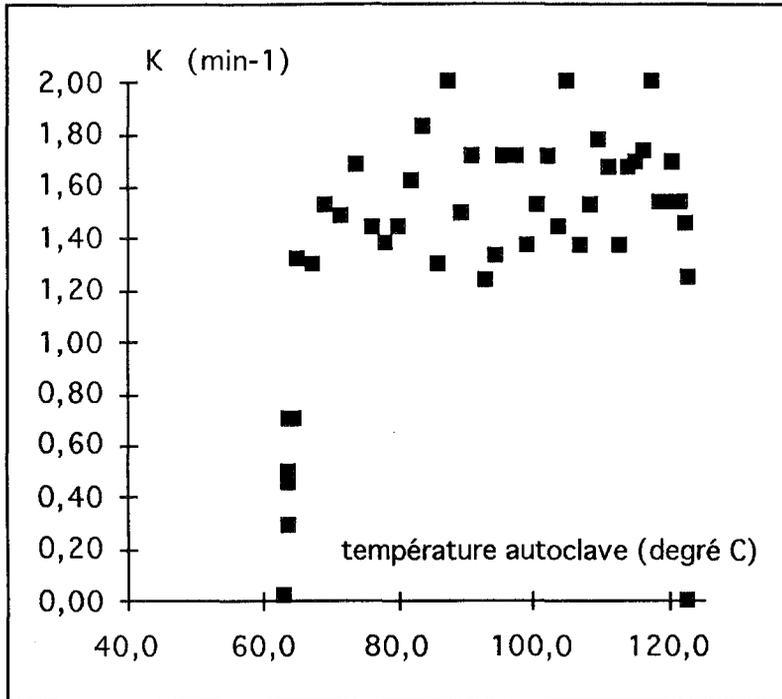


fig.24.Variation de K dans une ampoule de 20 ml.

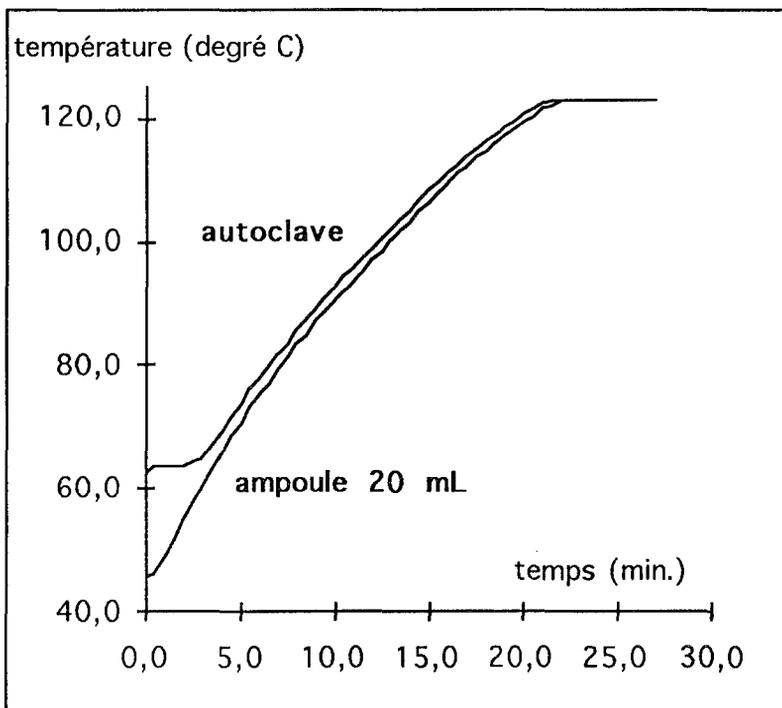


fig.25.Evolutions des températures d'une ampoule de 20 ml et de l'autoclave.

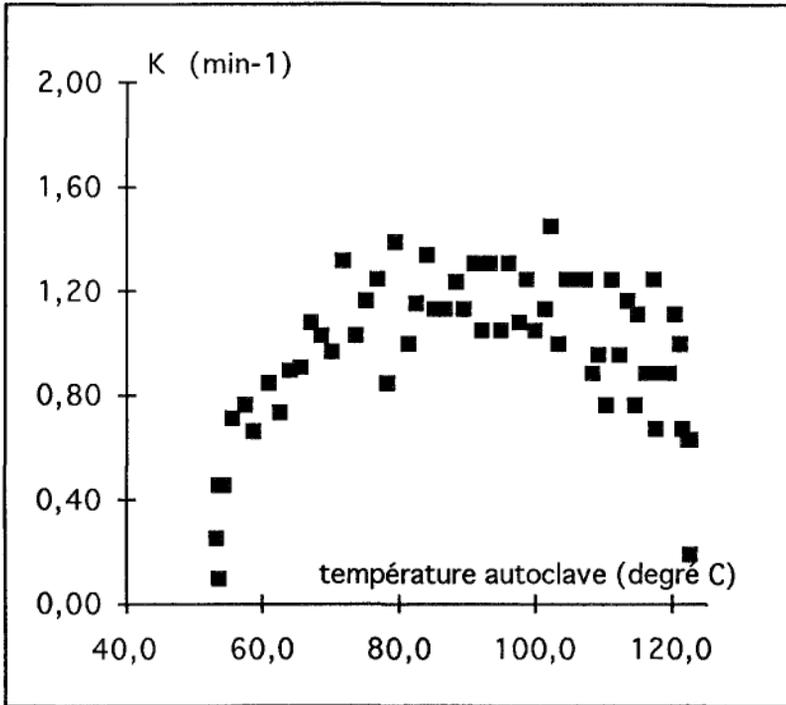


fig.26.Variation de K pour un flacon de 10 ml.

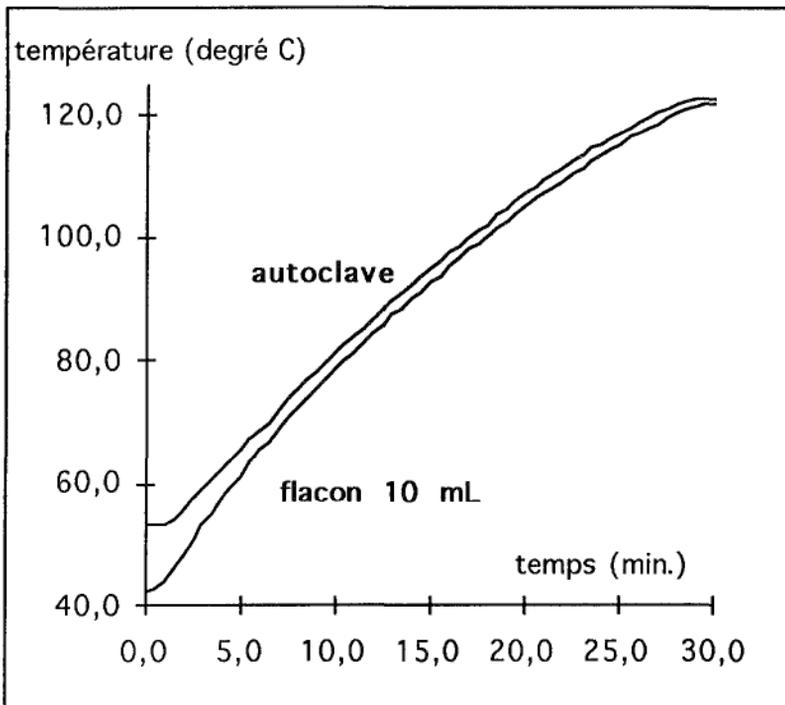


fig.27.Evolutions des températures d'un flacon de 10 ml et de l'autoclave.

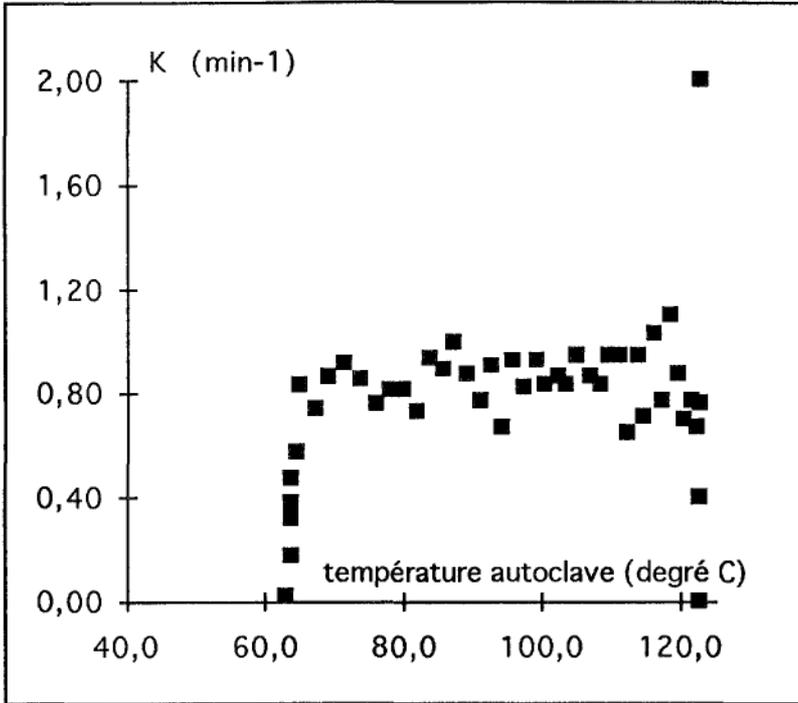


fig.28. Variations de K pour un flacon de 20 ml.

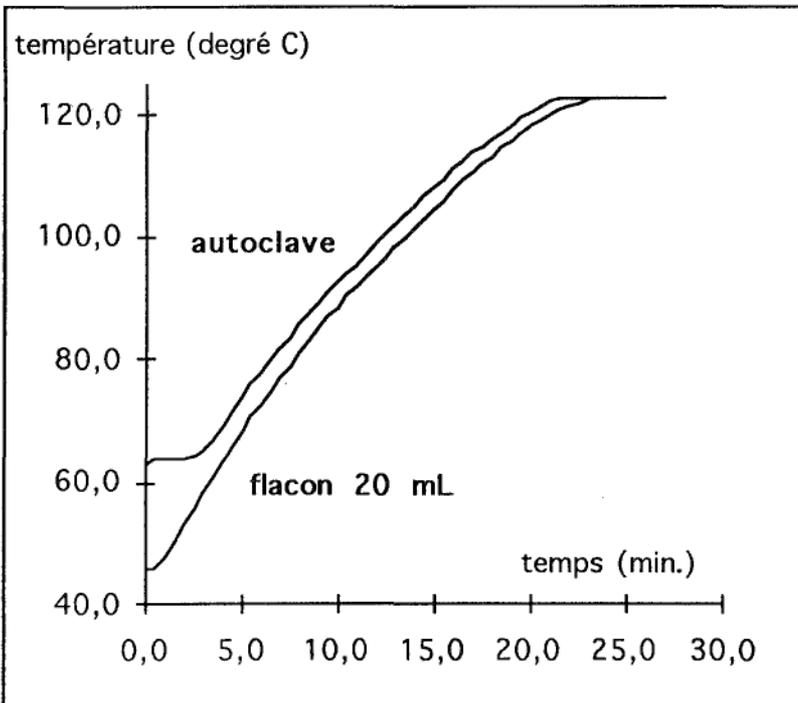


fig.29. Evolutions des températures d'un flacon de 20 ml et de l'autoclave.

	ampoule 2 ml	ampoule 5 ml	ampoule 20ml	flacon 10 ml	flacon 20 ml
K. exp n° 1	4,00	2,50	1,65	1,20	0,95
K. exp.n° 2	4,10	2,10	1,70	1,10	0,90
K. exp.n °3	3,70	2,50	1,60	1,10	0,90
moyenne	3,93	2,36	1,65	1,13	0,92

tableau.16.Résultats des valeurs de K pour les différents contenants.

D'après les graphiques "variations de K", nous voyons dans tous les cas deux évolutions de K suivant la température de l'autoclave. En effet, pour une température de l'autoclave variant de 60 °C à 70 °C le coefficient de transfert de chaleur augmente rapidement ; alors qu'à partir d'une température de l'enceinte de l'ordre de 70 °C et jusqu'à 120 °C, K semble devenir constant, traduisant l'atteinte d'un régime stationnaire de pénétration de chaleur. Ce résultat confirme les remarques faites précédemment pour le bain d'huile ; nous avons alors vu une stagnation de K à partir des valeurs de températures du bain d'huile de 70 °C et 80 °C.

Les graphiques "évolutions des températures des ampoules ou flacons et de l'autoclave durant un cycle d'autoclavage" renforcent l'idée d'une constance de K à partir de 70 °C. En effet, la différence de température entre une ampoule ou un flacon et l'autoclave est constante de 70 °C à 120 °C.

Le tableau 16, nous montre une faible variation des K pour chaque contenant (3 séries d'expérience par contenant) et confirme que les coefficients de transfert de chaleur des flacons de 10 ml sont toujours inférieurs à ceux des ampoules de 2, 5, 20 ml. Ceci nous prouve que nous avons la possibilité de piloter l'autoclave à l'aide d'un flacon de 10 ml car nous serons dans le cas le plus défavorable, et le calcul du Fo à partir de ce flacon sera toujours inférieur à celui que nous aurions trouvé dans une des ampoules ; par conséquent si la solution présente dans le flacon est déclarée stérile alors la même solution présente dans une des ampoules sera obligatoirement stérile.

Nous pouvons donc, d'après ces données expérimentales, piloter l'autoclave grâce à une sonde thermique placée au centre de la solution à stériliser dans un flacon de 10 ml.

Afin de définir s'il était obligatoire de placer dans le flacon la solution à stériliser, afin de ne pas fausser le pilotage de l'autoclave, nous avons réalisé l'expérience suivante. Deux flacons de 10 ml, l'un rempli d'eau et l'autre rempli de la solution la plus dense employée à SYNTHELABO à savoir la théophylline (le sorbitol est la solution injectable la plus dense mais sa production dans une année est très faible), ont été placés dans les systèmes étanches près de la purge. Dans chacun des flacons, nous avons introduit une sonde thermique Pt 100 reliée à l'enregistreur SPEEDOMAX®. Ces contenants ont subi un cycle complet de stérilisation durant

lequel nous avons suivi l'évolution des deux températures précitées. La densité de la solution de théophylline étant de $d = 1,062$ donc très proche de celle de l'eau, les résultats que nous avons obtenus après étude des enregistrements ont montré une similarité de montée des températures entre les deux flacons. Ceci nous amène à penser que nous pouvons pour n'importe quel produit piloter l'autoclave avec un flacon de 10 ml rempli d'eau, ce qui facilitera la tâche de l'opérateur car entre chaque lot il n'aura pas besoin de changer de flacon.

4.2.4. Etude d'une méthode de simulation.

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude du coefficient de transfert de chaleur K , nous avons décidé de montrer, pour chaque contenant, les différences significatives qu'il existe entre le calcul du F_0 dans l'enceinte de l'autoclave et celui calculé dans un contenant, ces calculs sont effectués durant le chauffage précédent le plateau de stérilisation (figures 30 à 34).

Méthode de simulation :

- nous choisissons pour chaque contenant le K moyen trouvé expérimentalement sachant que : $K = \frac{h * S}{a}$

Il peut être ainsi comparé :

- F_0 autoclave : calculé à partir des données de $T_{\text{autoclave}} = f(t)$;
- F_0 expérimental : calculé à partir des données expérimentales $T_{\text{amp}} = f(t)$;
- F_0 simulation : calculé à partir de $T_{\text{calculé par simulation}} = f(t)$.

Les valeurs de $T_{\text{calculé par simulation}}$ sont calculées à partir de K moyen pour chaque contenant étudié par intégration numérique de l'équation :

$$-\frac{dT_{\text{amp}}}{dt} = K * (T_{\text{amp}} - T_{\text{auto}}) \text{ avec } T_{\text{amp}} \text{ à } t=0 = T_{\text{amp}} \text{ expérimentale } t=0.$$

L'intégration numérique s'effectue suivant la méthode d'Euler :

$$- T_{\text{amp } t_{i+1}} = T_{\text{amp } t_i} + (dT_{\text{amp}} / dt)_{t_i} * (t_{i+1} - t_i).$$

$$\text{avec : } (dT_{\text{amp}} / dt)_{t_i} = K (T_{\text{auto } t_i} - T_{\text{amp } t_i}).$$

- le calcul de $F_{0\text{auto}}$, $F_{0\text{amp}}$, $F_{0\text{simulation}}$ s'effectue ensuite à partir des

relations :

$$-F = \int_0^t L(t) dt \text{ ce calcul est obtenu par la méthode des trapèzes suivant :}$$

$$F = \sum_{i=1}^n (L_{t_{i+1}} + L_{t_i}) * 0,5 * (t_{i+1} - t_i).$$

n = nombre de pas de temps.

- L_{t_i} est évalué au temps t_i , correspondant à la température T_i , par la relation

logarithmique :

$$L_{t_i} = \exp \left(\frac{\ln 10}{10} * (T_i - 120) \right).$$

T_i exprimé en degré Celsius, L_{t_i} sans dimension.

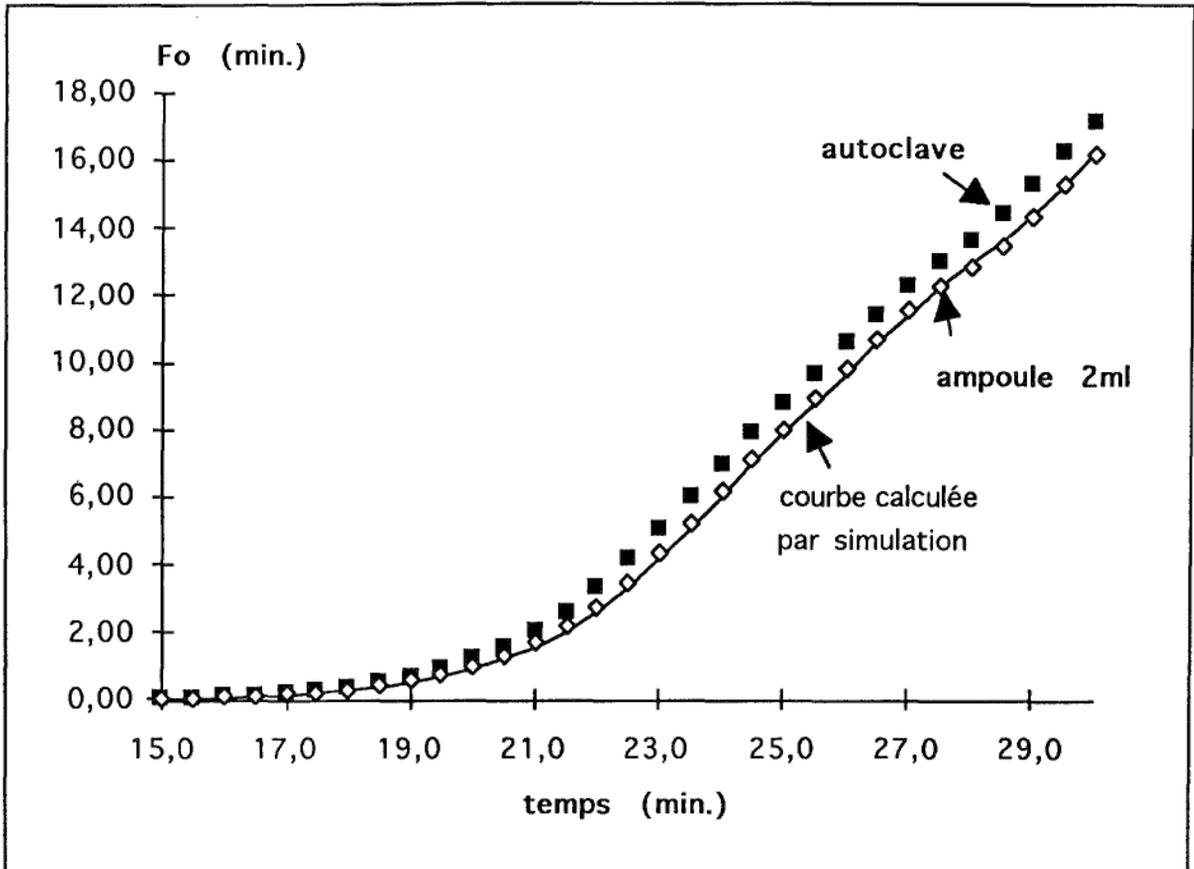


fig.30. Comparaison des $F_{o_{auto}}$, $F_{o_{exp}}$, $F_{o_{simul}}$ pour des ampoules de 2 ml.

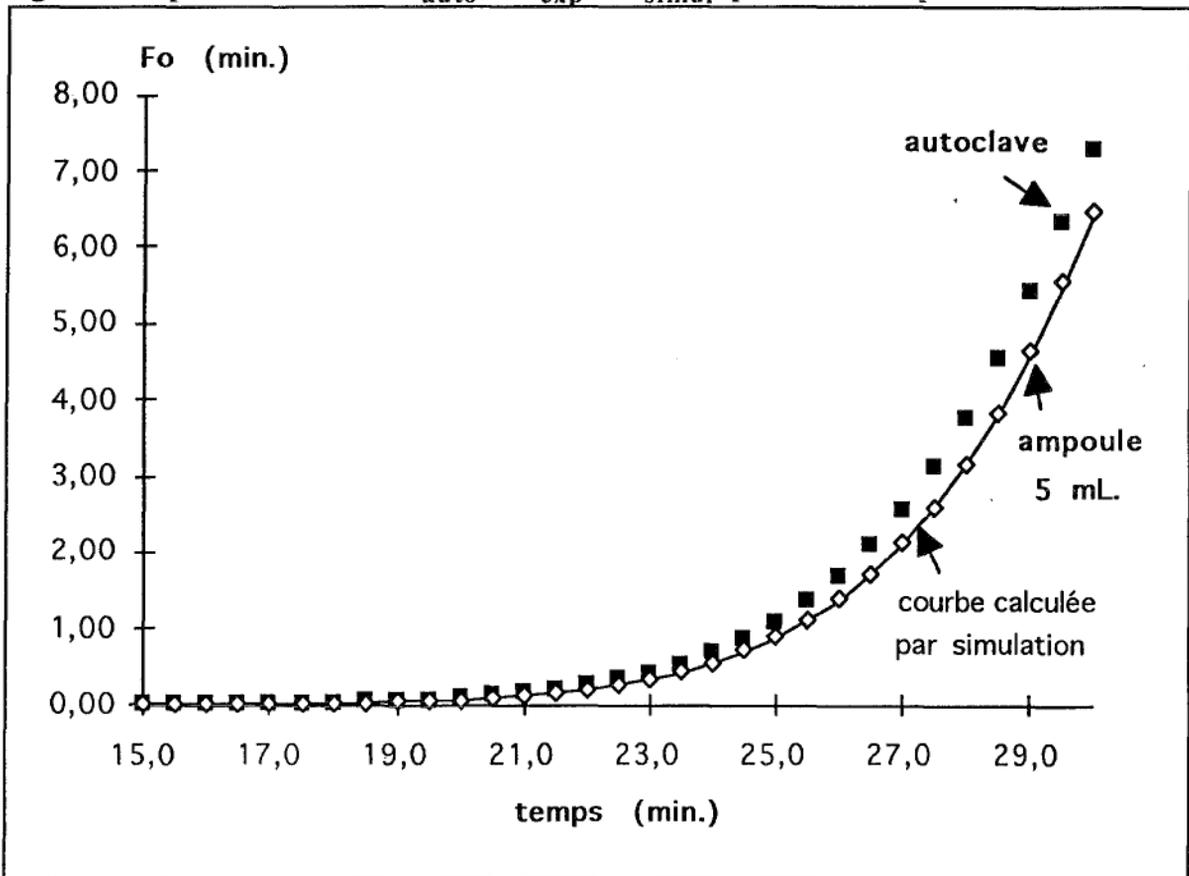


fig.31. Comparaison des $F_{o_{auto}}$, $F_{o_{exp}}$, $F_{o_{simul}}$ pour des ampoules de 5 ml.

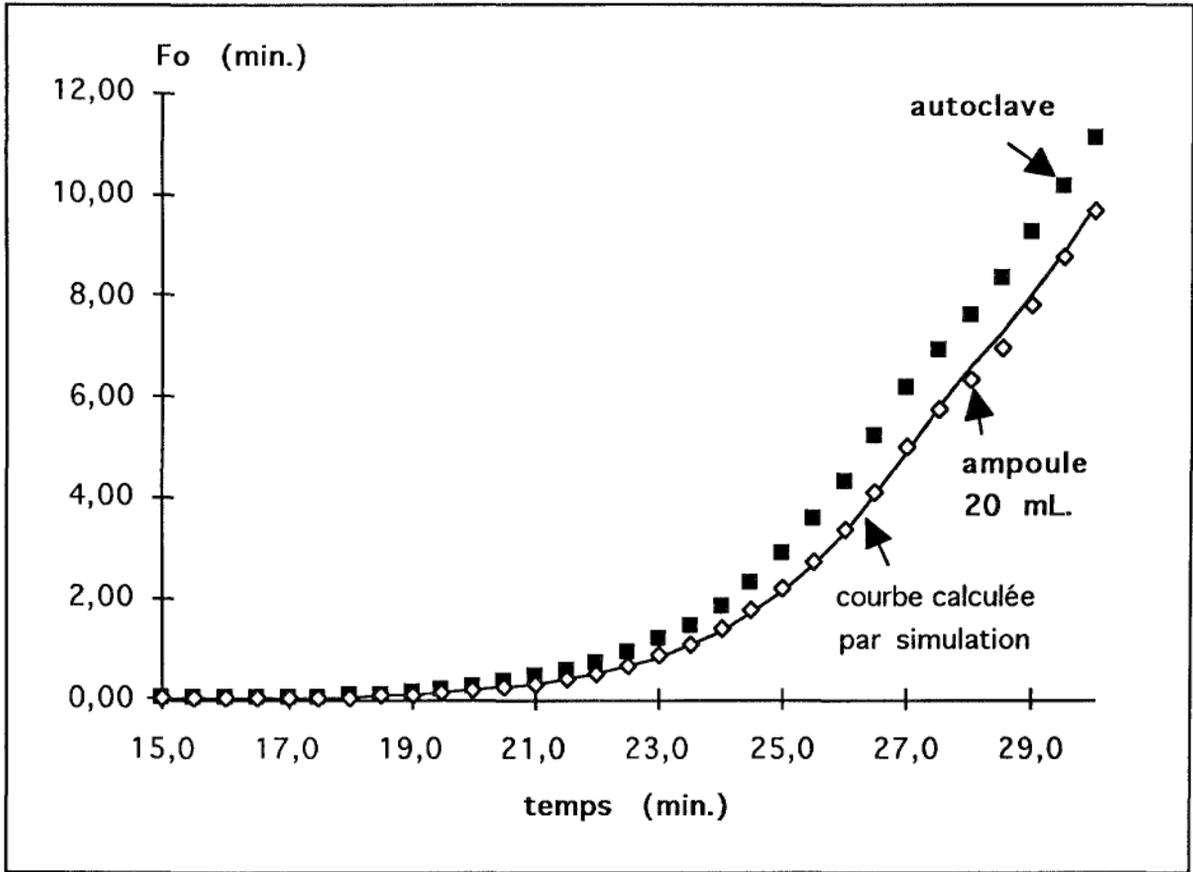


fig.32. Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des ampoules de 20 ml.

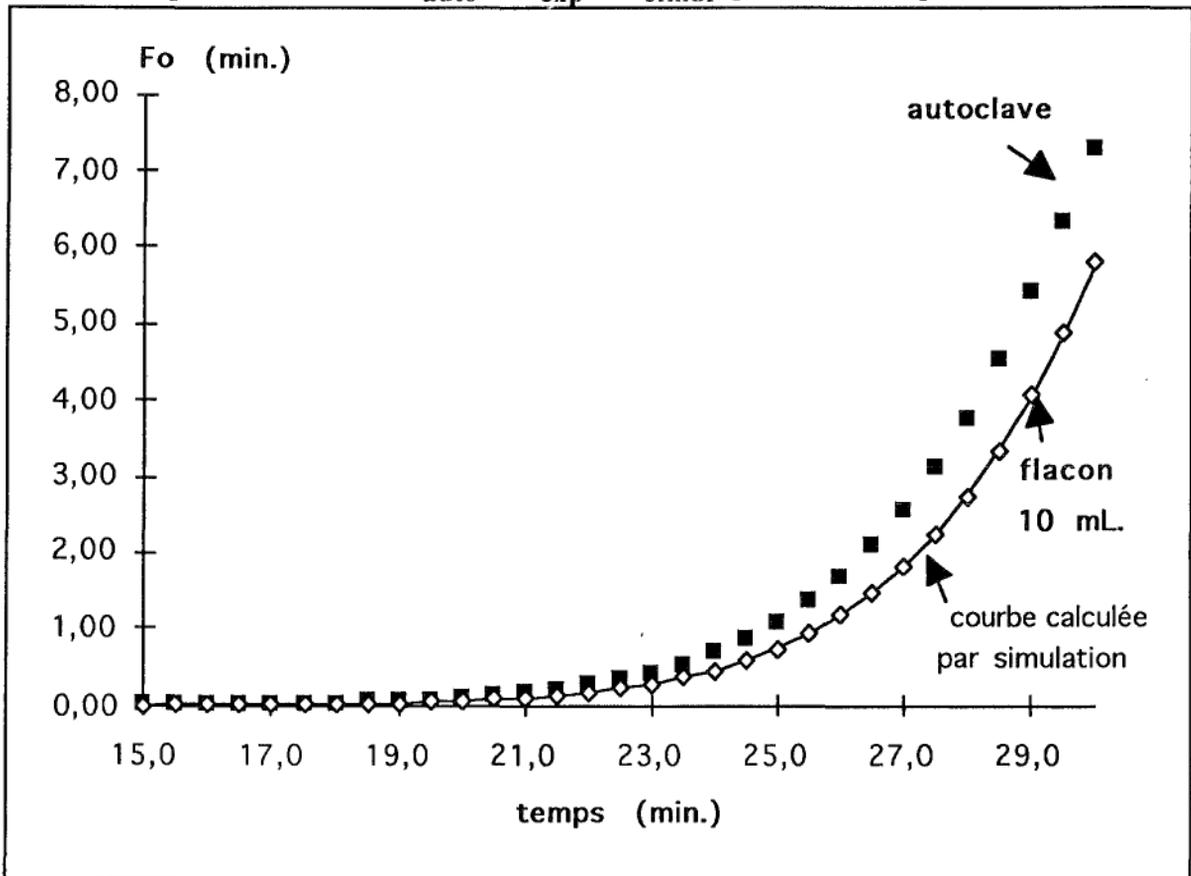


fig.33. Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des flacons de 10 ml.

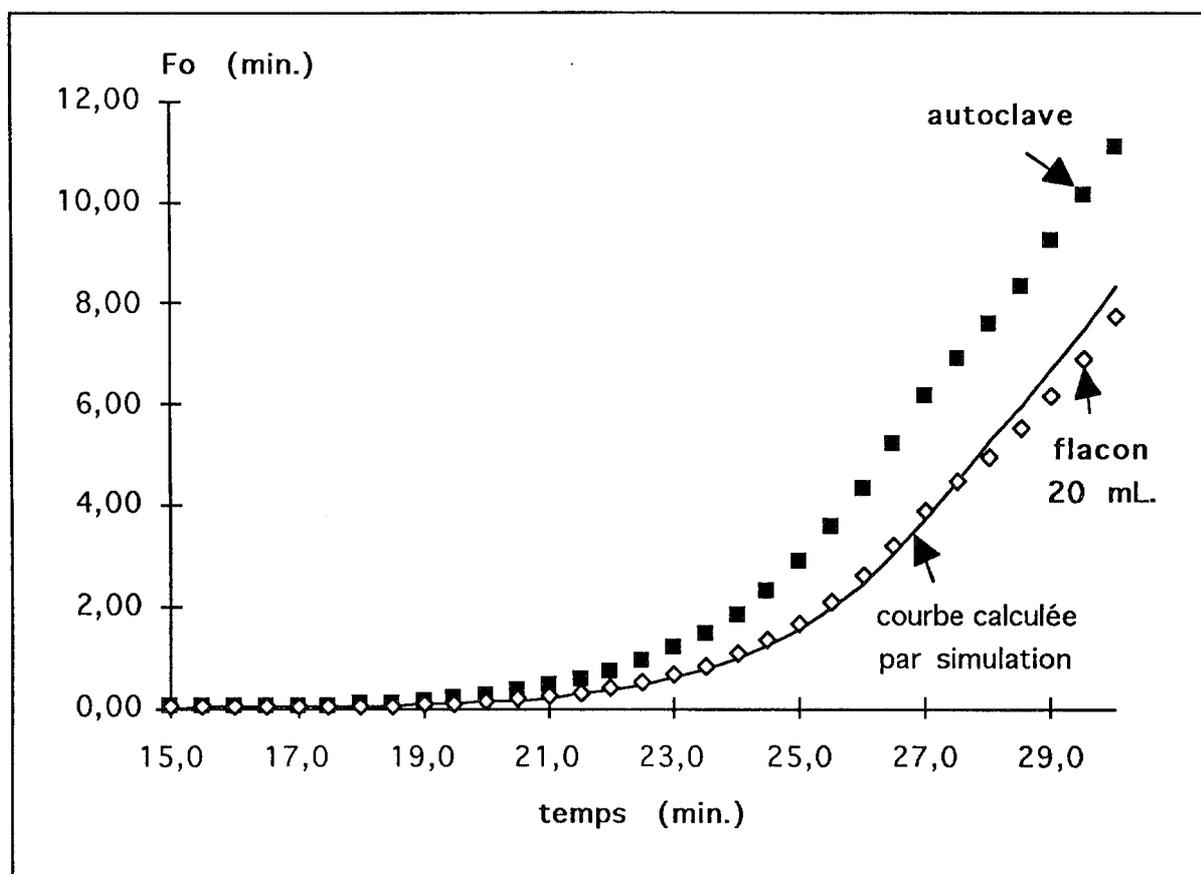


fig.34. Comparaison des Fo_{auto} , Fo_{exp} , Fo_{simul} pour des flacons de 20 ml.

Les cinq graphiques, que nous venons d'exposer, montrent que les calculs du Fo expérimental sont quasiment les mêmes que ceux trouvés par simulation.

L'intérêt de la simulation est de permettre, dans le futur, à l'opérateur de prédire de façon raisonnable la valeur du Fo au début du plateau de stérilisation pour chaque produit et pour n'importe quelle température. Il suffira qu'il connaisse la valeur du K moyen de la solution à stériliser.

Les valeurs de Fo , pour l'autoclave et la solution à l'intérieur de l'ampoule ou du flacon, sont différents (de l'ordre de 0,5 minute pour une ampoule de 2 ml) voire très différents (de l'ordre de 2 minutes pour un flacon de 20 ml) à l'approche du début du plateau de stérilisation. Ces valeurs montrent que l'étude, que nous avons effectuée, a permis de prouver qu'il était préférable de piloter un autoclave à l'aide d'une sonde thermique placée à l'intérieur de la solution à stériliser.

En effet, l'ancien pilotage de l'autoclave, qui s'effectuait à l'aide d'une sonde placée dans la purge, ne donnait pas la vraie valeur stérilisatrice Fo au début du plateau de stérilisation et ainsi faussait les paramètres demandés par l'opérateur. Ainsi, un Fo de 30 minutes demandé par l'opérateur pour la stérilisation d'un lot de production, ne devient en réalité plus qu'un Fo de 29 minutes à l'intérieur de la solution, même s'il est exact qu'en fin de stérilisation, lors du refroidissement, la solution à l'intérieur d'une ampoule voit sa température chuter moins

rapidement que celle de l'enceinte. Toutefois, la valeur de Fo la plus faible étant par règle celle qui doit être prise en compte, le pilotage de l'autoclave par sonde thermique au sein des ampoules devra être retenu.

Les essais de pilotage que nous avons effectués ultérieurement ont donné une information supplémentaire à notre étude. En effet, si nous pilotons bien l'autoclave grâce à la sonde placée dans un flacon de 10 ml renfermant de l'eau, cette sonde durant le plateau de stérilisation va indiquer une température de 122,5 °C (pour un Fo de 40 minutes à 122 °C). Or, la sonde placée dans la purge va indiquer durant ce même plateau une température de 122,0 °C. Par conséquent le pilotage de l'autoclave, qui s'effectue toujours à l'aide de la sonde la plus basse en température ou ayant le Fo le plus petit, va s'opérer dans un premier temps, jusqu'au milieu du plateau de stérilisation environ, à l'aide de la sonde dans le flacon puis le relais va être pris par la sonde de la purge jusqu'à la fin de la stérilisation. Ainsi, le système que nous avons mis en place ne sera utilisé par l'ordinateur de bord que durant la moitié d'un cycle de stérilisation ; cependant comme nous l'avons déjà dit, la valeur du Fo en fin de cycle sera la valeur stérilisatrice réelle du lot et non plus celle de l'enceinte de l'autoclave.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE.

Nous avons, à travers cette thèse, dans une première partie essayé de définir ce qu'était la stérilité (probabilité que dans un million d'unités il n'y ait au maximum qu'un microorganisme vivant), les moyens d'y parvenir (stérilisation à la chaleur humide, à la chaleur sèche,...) et enfin les moyens de contrôle (indicateurs physico-chimiques, papiers témoins de stérilisation). L'étude de la destruction des microorganismes a permis une approche scientifique de la stérilisation, avec notamment la mesure de l'effet stérilisant, appelée valeur stérilisatrice (Fo).

Dans une deuxième partie, nous avons montré l'exploitation possible du Fo pour la stérilisation de lots d'ampoules injectables, stérilisation effectuée dans un autoclave que nous avons qualifié. La qualification s'est déroulée en quatre étapes :

- test de BOWIE et DICK;
- distribution de la chaleur;
- challenge bactérien;
- pénétration de la chaleur.

Cette qualification a permis la mise en place d'un dispositif assurant la stérilité de chaque lot, mais aussi la mise au point d'un appareillage étanche permettant d'une part, l'étude approfondie de la pénétration de la chaleur dans les ampoules lors de l'autoclavage, et d'autre part le pilotage du stérilisateur à l'aide d'une sonde thermique Pt 100 placée à l'intérieur de la solution mise dans un flacon en verre : nous avons démontré l'importance de ce positionnement. Ce procédé a été validé et est actuellement utilisé en routine

Cette étude, qui repose sur des bases scientifiques et technologiques, a permis d'augmenter la maîtrise du procédé de stérilisation et par conséquent de garantir la qualité des produits injectables.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

par ordre alphabétique

- 1- AGALLOCO J.
A review of the U.S. FDA guideline on aseptic processing
Journal of Parenteral Science and Technology, 46, (3), 78-84, 1992
- 2- AGALLOCO J.
Steam sterilization in place technology
Journal of Parenteral Science and Technology, 44, (5) 253-256, 1990
- 3- AGALLOCO J.
The validation of life
Journal of Parenteral Science and Technology, 47, (3), 142-146, 1993
- 4- ARDOUIN A.C., VIGOUROUX F.
Stérilisation et Pharmacopées,
Texte de l'exposé du 14 mai 1982 à la XIV^e session de formation SFSTP de
Montpellier
- 5- AVIS K.A.
Developments in the preparation of sterile products subjected to terminal sterilization
Pharmaceutical Technology 15th Anniversary, 58-62, 1990
- 6- BEGG D.
Microbiological aspects of sterilisation
Packaging technology, 273-278, 1990
- 7- CERTAIN B., LUA E., RIONDET G.
Maintenance et assurance qualité d'un système de traitement de l'eau pour
préparations injectables
Congrès A3P, Bordeaux, 1994
- 8- CHEMIN Ph., DEVAUX F., UCHIDA-ERNOUF G., CLAIR M.
Ampoule et médicament en FRANCE (officine et hôpital) 1983-1986
S.T.P.Pharma, 4, (5), 425-427, 1988

- 9- CHEW N.J.
Validation of biopharmaceutical process
Pharmaceutical Technology Europe, 34-39, décembre 1993
- 10- COUTURIER C., GOURY V., BELLOCQ J.M., CALLANQUIN M., DARBORD J.C.
Essais de validation d'indicateurs de stérilisation par la chaleur humide
S.T.P.Pharma, 4, (6), 517-521, 1988
- 11- DARBORD J.C.
Indicateurs biologiques de stérilisation. Intérêt et limites.
Sci. Techn.Pharm., 7, 331-334, 1982
- 12- DARBORD J.C., CHEVRON M., MOLLET M.
Stérilisation par la vapeur à l'hôpital, étude de la validation des indications du Thermalog S[®]
Labo.Pharma.Probl.Tech., 31, 331, 349-352, 1983
- 13- DARBORD J.C., GUYOMARD S., GOURY V.
Validation et/ou contrôle : exemple de la recherche des substances pyrogènes
S.T.P.Pharma, 5, 57-59, 1989
- 14- DE ALMEIDA
Stérilisation à l'oxyde d'éthylène
Journées de DIJON 16-17-18 novembre 1987
- 15- ENZINGER M., DE VISSER A., TOWNSEND M.
Steam sterilization validation studies for manufacturing equipment
Pharmaceutical Technology, 31-33, août 1977
- 16- FRIEBEN W.R., ENZINGER R.M.
Sterile product manufacturing technology
Journal of Parenteral Science and Technology, 46, (3), 85-86, 1992
- 17- GALTIER F.
Comprendre la notion de valeur stérilisatrice F et l'utiliser
Fascicule LEQUEUX

- 18- GALTIER F.
La stérilisation à l'hôpital, au laboratoire et dans l'industrie
Décembre 1989. Editions Graphotec
- 19- GIRAUD C., PARIS F., DARBORD J.C., PRADEAU D.
Le contrôle de qualité des papiers de stérilisation, législation
Labo.Pharma- Probl.Tech.,32,340,215-221, 1984
- 20- GUERRET J., WERMELINGER T.
Validation de la stérilisation à la chaleur humide d'une émulsion lipidique injectable
Laboratoires SYNTHELABO, document interne
- 21- HAJJAR R., CUINE A.
Validation des méthodes de stérilisation par voie sèche et par voie humide
Sci.Tech.pharm., 7, 323-330, 1982
- 22- HEINTZ M., URBAN S., SCHILLER I., GAY M., BUHLMANN X.
The production of spores bacillus stearothermophilus
Pharma.Acta.Helv., 51, (5), 137-143, 1976
- 23- HODGES N.A.
A comparison of heat resistance in commercially available bacillus stearothermophilus
spore preparations used for monitoring steam sterilization
J.Pharm.Pharmacol., 34, 259-260, 1982
- 24- HOPIN HU, CAMILLERI J., TAMASHIRO W.
A new membrane for biopharmaceutical filtration
Pharmaceutical Technology Europe, 17-20, janvier 1994
- 25- KING J.G, RUSSEL A.D., HUGO W.B., AYLIFE G.A.J.
Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation
Blakwell Scientific Publications, Oxford, 1983
- 26- KIRK B., HAMBLETON R.
Evaluation of a prototype micro-electronic autoclave cycle integrator
J.Pharm.Pharmacol., 33, 69-74, 1981

- 27- LEE J.Y.
Auditing an aseptic filtration process
Pharmaceutical technology, 66-72, 1989
- 28- LE HIR A.
Un exemple d'étude de validation de procédé de stérilisation par la vapeur
S.T.P.Pharma, 2, 859-861, 1986
- 29- LINDBOE W.G., KAN-ICHI HAYAKAWA
Comparative terminal sterilization
Journal of Parenteral Science and Technology, 47, (3), 138-141, 1992
- 30- MOUWEN H.C., MELTZER T.H.
Sterilizing filters
Pharmaceutical Technology International, 75-77, septembre 1993
- 31- NEGRIER médical
Intégrateurs THERMALOG®
Documentation publicitaire 1983
- 32- ODLAUG T., CHALUMEAU H., COUQUELET M., GERMAIN A.
Validation d'un cycle de stérilisation à la vapeur
Ann.Pharmaceutiques Françaises, 41, (6), 507-516, 1983
- 33- PERRY R.H., GREEN D.
Perry's chemical engineers handbook, 6^{ème} édition, section 10, 11-13 et 24-25, 1984
- 34- PETIT G.
Matériels de stérilisation. Cahier des charges et qualification
Sci.Techn.Pharm., 7, 295-322, 1982
- 35- UDAYA BHASKARA RAO Y., MAHADEVAN M.S., MICHAELS S.L.
Evaluation of microporous tangential flow filtration in the production of diphtheria and pertussis vaccines
Pharmaceutical Technology, 103-110, septembre 1992
- 36- Aseptic processing and terminal stérilization
Parenteral Drug Association, 45, (6), 254-258, 1991

- 37- Bonnes Pratiques de Fabrication
janvier 1993, quatrième édition
Ministère de la santé et de l'action humanitaire
- 38- Bulk Pharmaceuticals Committee
Concepts for the process validation of bulk pharmaceutical chemicals
Pharmaceutical Technology International, 37-44, janvier 1994
- 39- Committee on microbial purity (FIP)
Validation and control of non-standard sterilization processes
Journal of Parenteral Science and Technology, 47, (1), 9-14, 1993
- 40- Committee on microbial purity (FIP)
Validation and environmental monitoring of aseptic processing
Journal of Parenteral Science and Technology, 44, (5), 272-277, 1990
- 41- Depyrogenation
Parenteral Drug Association
Technical report n°7, 1985
- 42- Qu'est-ce que le BOWIE-DICK test ?
Service formation KABI®, document rédigé par AUXEMERY Ch., 1989
- 43- Use of aseptic processing and terminal sterilization in the preparation of sterile
pharmaceuticals for human and veterinary use
Parenteral drug Association, 46, (3), 65-68, 1992
- 44- Validation of dry heat processes used for sterilization and depyrogenation
Parenteral Drug Association
Technical report n°3, 1981
- 45- Validation of steam sterilization cycles
Parenteral Drug Association
Technical Monograph n°1, 1978



AUTORISATION D'IMPRESSION
ET DE
SOUTENANCE

De la Thèse dont l'intitulé est :

Contribution à l'étude et à la validation
d'un procédé de stérilisation par la chaleur
humide

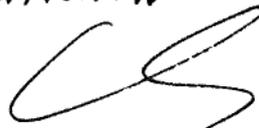
CANDIDAT : Monsieur ROVARCH Dominique

Vu

GRENOBLE, le 7/11/1994

Le Président du Jury

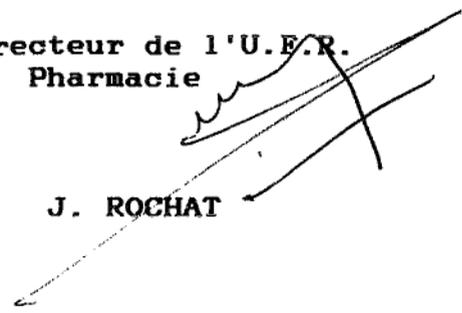
C. JEANNIN



Vu

GRENOBLE, le 8/11/1994 P/ Le Président de l'Université
Joseph FOURIER - GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

Le Directeur de l'U.F.R.
Pharmacie



J. ROCHAT

