

stérilisation par les gaz sont actuellement utilisés, notamment la stérilisation par l'oxyde d'éthylène, le peroxyde d'hydrogène, l'acide peracétique ou des combinaisons de ces méthodes.

La désinfection de surface par les gaz est communément utilisée pour les dispositifs médicaux, les isolateurs, les locaux, etc. L'utilisation des gaz dans ce contexte ne relève pas de la Pharmacopée Européenne, mais les indications données dans le présent chapitre général sur l'utilisation d'indicateurs biologiques peuvent constituer une aide pour la validation de ces procédés de désinfection.

4-1. MICROORGANISMES D'ESSAI

4-1-1. Stérilisation par l'oxyde d'éthylène

Pour la stérilisation par l'oxyde d'éthylène, l'utilisation de spores de *Bacillus atrophaeus* (par exemple ATCC 9372, NCIMB 8058, NRRL B-4418 ou CIP 77.18) ou d'autres souches dont il a été démontré qu'elles présentent des performances équivalentes est recommandée. Le nombre de spores viables par support est supérieur ou égal à 10^6 et les microorganismes d'essai possèdent une valeur *D* appropriée pour le procédé à valider. Ces indicateurs biologiques sont utilisés en routine à chaque cycle de stérilisation, permettant ainsi de vérifier l'efficacité du procédé.

4-1-2. Autres procédés

Il incombe à l'utilisateur de définir le cycle de stérilisation à appliquer et éventuellement de qualifier l'indicateur biologique utilisé. *Geobacillus stearothermophilus* s'est avéré approprié pour la stérilisation par le peroxyde d'hydrogène vaporisé.

5. INDICATEURS BIOLOGIQUES POUR STÉRILISATION PAR IRRADIATION

Sauf indication contraire, l'emploi d'indicateurs biologiques n'est en général pas considéré comme nécessaire pour la validation de la dose d'irradiation ayant un effet stérilisant. L'emploi d'indicateurs biologiques peut toutefois être requis pour le développement et la validation de la stérilisation par irradiation de tissus ou préparations cellulaires, ou dans d'autres cas spécifiques (par exemple dans le cas de produits susceptibles d'avoir un effet protecteur sur les spores).

5-1. MICROORGANISMES D'ESSAI

L'utilisation de spores de *Bacillus pumilus* (par exemple ATCC 27142, NCTC 10327, NCIMB 10692 ou CIP 77.25) ou d'autres souches dont il a été démontré qu'elles présentent des performances au moins équivalentes est recommandée.

6. PRÉPARATIONS MICROBIENNES POUR FILTRATION STÉRILISANTE

Comme indiqué dans le chapitre général 5.1.1, certains produits qui ne se prêtent pas à la stérilisation dans leur récipient final peuvent être stérilisés par filtration. L'épreuve biologique consiste alors à évaluer la rétention des microorganismes par les filtres, alors que dans les sections précédentes les indicateurs biologiques servaient à évaluer la capacité du procédé de stérilisation à détruire les microorganismes.

Pour valider le procédé de stérilisation, il faut apporter la démonstration (généralement via un modèle à échelle réduite) que la filtration stérilisante est capable d'assurer la rétention de l'intégralité d'une biocharge d'essai d'au moins 10^7 UFC par centimètre carré de surface filtrante utile, en utilisant un microorganisme d'essai approprié. Cet essai doit simuler autant que possible le procédé de filtration réel. Lorsque cela est réalisable, il est conduit dans le produit lui-même et dans les conditions de filtration spécifiées. En cas d'impossibilité, par exemple dans le cas d'un produit présentant des propriétés antimicrobiennes, il convient d'utiliser pour l'essai un milieu aussi proche que possible du produit.

6-1. MICROORGANISMES D'ESSAI

Pour les procédés utilisant un système de filtration sur membrane avec un diamètre nominal de pores inférieur ou égal à $0,22 \mu\text{m}$, il est recommandé d'utiliser une suspension

de *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091 ou CIP 103020). La suspension de *Brevundimonas diminuta* doit être préparée de façon à obtenir principalement des cellules non agrégées, de la plus petite taille possible. D'autres microorganismes, par exemple issus de la flore naturelle isolée à partir du produit ou processus considéré, peuvent être utilisés s'ils constituent pour le système de filtration stérilisante une épreuve plus exigeante que *Brevundimonas diminuta*. Pour les systèmes de filtration ayant un diamètre nominal de pores inférieur ou égal à $0,1 \mu\text{m}$, une suspension d'*Acholeplasma laidlawii* (ATCC 23206) peut être utilisée.



04/2022:50103

5.1.3. EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE

Dans le cas où les préparations pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes adéquates, des agents de conservation antimicrobienne peuvent être ajoutés, spécialement aux préparations aqueuses, pour éviter la prolifération ou limiter la contamination microbienne qui, dans les conditions normales de conservation et d'emploi, notamment pour des récipients multidoses, pourrait se produire et entraîner un risque d'infection pour le malade et une détérioration de la préparation. Les agents de conservation antimicrobienne ne doivent pas remplacer des bonnes pratiques de fabrication.

L'efficacité d'un agent de conservation antimicrobienne peut être accrue ou diminuée par le composant actif de la préparation ou par la composition de la préparation dans laquelle il est incorporé ou par le récipient et le mode de fermeture adopté. L'activité antimicrobienne de la préparation dans son récipient définitif est évaluée pour sa durée de conservation, afin de s'assurer que cette activité ne se modifie pas au cours de la conservation de la préparation. Ces examens peuvent être effectués sur des échantillons prélevés à partir du récipient définitif immédiatement avant l'essai.

Au cours de la phase de développement d'une préparation pharmaceutique, il doit être démontré que l'activité antimicrobienne de la préparation telle quelle ou, si nécessaire, additionnée d'un ou de plusieurs agents de conservation, assure une protection appropriée contre les effets nocifs qui peuvent résulter d'une contamination microbienne ou d'une prolifération au cours de la conservation et de l'usage de la préparation.

L'efficacité de l'activité antimicrobienne peut être démontrée à l'aide de l'essai décrit ci-après. L'essai n'est pas destiné au contrôle de routine.

ESSAI DE L'EFFICACITÉ DE LA CONSERVATION ANTIMICROBIENNE

L'essai consiste en la contamination artificielle de la préparation, si possible dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de microorganismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une température prescrite, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des organismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence d'augmentation du nombre de microorganismes dans la préparation ensemencée se produit après les temps et aux températures prescrits. Les critères d'acceptation, en terme de diminution du nombre de microorganismes en fonction du temps, varient pour les diverses catégories de préparations, selon le degré de protection recherché (voir tableaux 5.1.3.-1, 5.1.3.-2, 5.1.3.-3).

Microorganismes d'essai

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 ; NCIMB 8626 ; CIP 82.118.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 ; NCTC 10788 ; NCIMB 9518 ; CIP 4.83.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 ; NCPF 3179 ; IP 48.72.
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 ; IMI 149007 ; IP 1431.83.

Les essais sont effectués à l'aide de souches uniques. Aux microorganismes prescrits peuvent être ajoutées, dans les cas appropriés, d'autres souches ou espèces qui peuvent représenter des contaminants potentiels de la préparation. Il est recommandé d'utiliser, par exemple, *Escherichia coli* (ATCC 8739 ; NCIMB 8545 ; CIP 53.126) pour toutes les préparations orales et *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381 ; IP 2021.92) pour les préparations orales à concentration élevée en sucre.

Préparation de l'inoculum

Avant l'essai,ensemencez la surface d'un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (2.6.12) pour les bactéries ou celle d'un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé sans addition d'antibiotique (2.6.12) pour les champignons, avec la culture mère récemment obtenue de chacun des microorganismes spécifiés. Incubez les cultures bactériennes à une température de 30-35 °C pendant 18-24 h, la culture de *C. albicans* à une température de 20-25 °C pendant 48 h et la culture de *A. brasiliensis* à une température de 20-25 °C pendant 1 semaine ou jusqu'à obtention d'une sporulation satisfaisante. Des subcultures peuvent être nécessaires après reprise des microorganismes, avant qu'ils n'atteignent leur état optimal, mais il est recommandé de maintenir au minimum le nombre de repiquages.

Pour récolter les cultures bactériennes et de *C. albicans*, utilisez un liquide de suspension stérile contenant 9 g/L de chlorure de sodium R. Dispersez et transférez la culture développée en surface dans un récipient approprié. Ajoutez une quantité de liquide de suspension suffisante pour réduire le nombre de microorganismes à environ 10⁸ par millilitre. Pour récolter la culture de *A. brasiliensis*, utilisez un liquide de suspension stérile contenant 9 g/L de chlorure de sodium R et 0,5 g/L de polysorbate 80 R et ajustez le nombre des spores à environ 10⁸ par millilitre avec la même solution.

Prélevez immédiatement un échantillon approprié de chaque suspension et déterminez le nombre d'unités formant colonie par millilitre dans chaque suspension par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membrane (2.6.12). Ce chiffre sert à déterminer l'inoculum et le niveau de base à employer dans l'essai. Les suspensions doivent être utilisées immédiatement.

PROCÉDÉ

Pour le dénombrement des microorganismes viables dans les préparations ensemencées, utilisez le même milieu gélosé que celui employé dans la culture initiale du microorganisme correspondant.

Ensemencez une série de récipients du produit à examiner avec une suspension de l'un des microorganismes d'essais afin d'obtenir un inoculum de 10⁵ à 10⁶ microorganismes par millilitre ou par gramme de préparation. Le volume de la suspension de l'inoculum ne dépasse pas 1 pour cent du volume du produit. Mélangez soigneusement pour assurer une répartition homogène.

Maintenez le produit ensemencé à une température de 20-25 °C à l'abri de la lumière. Prélevez des échantillons appropriés de chaque récipient, par exemple 1 mL ou 1 g, au temps zéro et aux intervalles appropriés, selon le type de préparation, et déterminez le nombre de microorganismes viables par dénombrement sur plaques ou par filtration sur membrane (2.6.12), en vérifiant que toute activité antimicrobienne résiduelle dans la préparation est éliminée

par dilution, par filtration ou par l'utilisation d'un neutralisant spécifique. Lorsque des procédés de dilution sont utilisés, tenez compte de la réduction de la sensibilité dans la détection de petits nombres de microorganismes viables. Lorsqu'un neutralisant spécifique est utilisé, la capacité du système à permettre la croissance des microorganismes d'essai est confirmée à l'aide de contrôles appropriés.

La méthode est validée afin de vérifier sa capacité à mettre en évidence la réduction requise du nombre de microorganismes viables.

CRITÈRES D'ACCEPTATION

Les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont donnés dans les tableaux 5.1.3.-1, 5.1.3.-2 et 5.1.3.-3 en termes de réduction logarithmique du nombre de microorganismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum.

Tableau 5.1.3.-1. – Préparations parentérales, préparations ophtalmiques, préparations intra-utérines et préparations intramammaires

		Réduction logarithmique				
		6 h	24 h	7 j	14 j	28 j
Bactéries	A	2	3	-	-	NR
	B	-	1	3	-	NI
Champignons	A	-	-	2	-	NI
	B	-	-	-	1	NI

NR : non retrouvé

NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente

Les critères A représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre. Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés, par exemple en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables, les critères B s'appliquent.

Tableau 5.1.3.-2. – Préparations auriculaires, préparations nasales, préparations pour application cutanée et préparations pour inhalation

		Réduction logarithmique			
		2 j	7 j	14 j	28 j
Bactéries	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Champignons	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente

Les critères A représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre. Dans des cas justifiés, lorsque les critères A ne peuvent être respectés, par exemple en raison d'une augmentation du risque de réactions indésirables, les critères B s'appliquent.

Tableau 5.1.3.-3. – Préparations orales, préparations buccales et préparations rectales

		Réduction logarithmique	
		14 j	28 j
Bactéries		3	NI
Champignons		1	NI

NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente

Ces critères représentent l'efficacité qu'il est recommandé d'atteindre.