

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 1993

THESE N° 213

**Pour une désinfection de surface de qualité
dans l'industrie pharmaceutique**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 1993

Par

Flora CAFFORT
née le 18 mai 1966, à Paris 16

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur C. BOSGIRAUD

- Président

Monsieur le Professeur J.A. NICOLAS

- Juge

Monsieur B. POROKHOV

- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE *elle* sur le Professeur RABY

- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er assesseur)
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2ème assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

Je tiens à remercier :

Mme Le Professeur Bosgiraud, qui a suivi l'évolution de mes travaux avec intérêt, et a gracieusement accepté de présider la présentation de cette thèse,

Mr le Professeur Nicolas, dont les cours à la faculté de Limoges, m'ont laissé un souvenir inoubliable, et qui me fait l'honneur d'être membre du jury,

Mme Nouyrigat, qui m'a accueillie pour mon stage de fin d'études à Rhône-Poulenc Rorer, et est ainsi à l'origine de cette thèse, mais n'a pas pu, hélas, en suivre l'évolution,

Mr Porokhov, responsable des Laboratoires de contrôles de Rhône-Poulenc Rorer, Maisons-Alfort, qui a accepté de remplacer Mme Nouyrigat pour représenter cet établissement, et m'a beaucoup aidée par l'apport de l'expérience industrielle,

mais aussi mes parents, pour lesquels mes études de Pharmacie sont peut-être une fierté mais portent aussi le poids de leur durée, et qui m'ont toujours épaulée,

et enfin toute ma famille et mes amis, pour leur aide et leur soutien.

PLAN

ABREVIATIONS	4
UNITES	5
INTRODUCTION	6
PREMIERE PARTIE : CHOIX DU DESINFECTANT	11
1 / Etude de la surface	13
2 / Etude de l'environnement	14
3 / Etude du désinfectant par rapport au médicament fabriqué	15
4 / Place du désinfectant dans la classification chimique	18
5 / Etude de la toxicité	23
6 / Critères de décision	26
DEUXIEME PARTIE : CONTROLES EN LABORATOIRE	28
1 / Les tests de stade 1	30
2 / Les tests de stade 2	46
3 / Conclusion	51
TROISIEME PARTIE : CONDITIONS D'UTILISATION	52
1 / Achat du désinfectant	54
2 / Rappel sur les procédures	56
3 / Préparation du désinfectant	57
4 / Utilisation du désinfectant	67
5 / Désinfection et Assurance de la Qualité	72
DISCUSSION	80
CONCLUSION	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
ANNEXES	95
TABLE DES MATIERES	143

ABREVIATIONS

AFNOR	Association Française de Normalisation
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AOAC	Association Of Analytical Chemists
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
BS	British Standard
BSI	British Standards Institute
CEE	Communauté Economique Européenne
Cell.	Cellule
CEN	Comité Européen de Normalisation
Cf.	Confère
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CL50	Concentration Létale 50
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Coll.	Collaborateurs
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DL50	Dose Létale 50
EOPS	Exempt d'organismes pathogènes spécifiques
EPA	Environmental Protection Agency
EUF	Eau ultrafiltrée
FDA	Food and Drug Administration
FIFO	First in / First out
IAAI	Indice d'Agressivité par Applications Itératives
IIOIP	Indice d'Irritation Oculaire Primaire
IIP	Indice d'Irritation cutanée Primaire
Jo	Jour de fabrication
J7	7° jour après la fabrication
ISO	International Standards Organization
N.B.	Nota bene
NF	Norme française
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
pH	Potentiel d'hydrogène
PIR	Pouvoir inhibiteur résiduel
QCT	Quantitative Carrier Test
QSDT	Quantitative Surface Disinfection Test
Réf.	Référence
RF	Facteur de réduction des micro-organismes
RPR	Rhône-Poulenc Rorer
SAI	Seringues auto-injectables (secteur de fabrication)
TS	Trypticase - Soja (bouillon ou gélose)
Var.	Variété

UNITES

%	pour cent
°	degré (ici, degré alcoolique)
°C	degré Celsius
µl	microlitre
µm	micromètre
D	Degré chlorométrique
g	gramme
g/l	gramme par litre
h	heure
min	minute
ml	millilitre
ppm	partie par million
V	Volume
V/V	Volume sur volume

INTRODUCTION

Le terme de "médicament" peut être perçu différemment selon la personne qui s'interroge : le malade y verra l'instrument de la guérison, tandis que son médecin entendra derrière la notion de traitement tout le cheminement de ce médicament dans le corps de son patient, c'est-à-dire la pharmacologie au sens large du terme. Pour les acteurs de l'industrie pharmaceutique, ce mot renferme en plus le long procédé de mise au point puis de fabrication et de distribution, avec toutes les contraintes que cela implique pour obtenir un produit sûr et efficace, c'est-à-dire de qualité.

La qualité, définie par la norme NF X 50 120 (ou ISO 8 402), est "l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites." (1) Dans le cas du médicament, il s'agit d'une qualité de conformité au prototype décrit dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) ; pour l'industrie, il s'agira de produire ce médicament de qualité dans les meilleures conditions, soit, avec le minimum de rebuts pour non-conformité, et au moindre coût. Il faut pour cela gérer, maîtriser et assurer la qualité de la production pharmaceutique.

De nombreux éléments, a priori éloignés du médicament en lui-même, mais pouvant avoir une influence directe ou indirecte sur sa qualité finale, devront donc être évoqués, puis contrôlés. L'un de ces éléments, sur lequel l'industrie pharmaceutique mondiale se penche actuellement, concerne les conditions de nettoyage des locaux et du matériel. La désinfection en est l'un des aspects, et devra être abordée sous l'angle du choix du désinfectant en fonction des exigences de l'utilisateur et des résultats des contrôles de l'environnement, mais également sous l'angle de la validation de son application, et de son intégration dans le processus d'Assurance de la Qualité du médicament.

Selon la norme française NF T 72 101, "la désinfection est une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables supportés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés ; le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération" et connus. Cette même norme distingue les désinfectants, "produit ou procédé utilisé pour la désinfection", des

antiseptiques qui sont destinés à être utilisés sur des milieux vivants (hommes, animaux). (2)

Dans l'industrie pharmaceutique, le but de la désinfection est d'obtenir une réduction drastique de tous les micro-organismes, qu'ils soient pathogènes ou non. (3)

Il faut souligner dès à présent le côté prophylactique que revêt la désinfection, qui correspond à la définition choisie lors du colloque international de 1972 à Hambourg :

"la désinfection est l'élimination dirigée de micro-organismes, destinée à empêcher la transmission de certains micro-organismes indésirables en altérant leur structure ou leur métabolisme, indépendamment de leur état physiologique." (4)

Ce type de définition permet de mettre en exergue l'objectif premier de l'industrie pharmaceutique : la santé.

Malgré ces définitions, certains points restent indécis : la désinfection résulte-t-elle de la destruction, de l'élimination des micro-organismes, ou d'une combinaison de ces deux actions ? (5) Peut-on se contenter de l'absence de transmission d'organismes vivants ? Et ne faut-il pas toujours garder en mémoire que les propriétés bactéricides d'un produit sont la résultante entre la lyse de certaines bactéries, la mort de certaines bactéries restant intactes au niveau de leur morphologie, et la croissance plus ou moins retardée de certaines autres (6), c'est-à-dire que l'efficacité ne fait que tendre vers 100% sans pouvoir l'atteindre avec certitude. Cette part de risque statistique, associée à la mise en place de systèmes qualité dans les industries pharmaceutiques, explique que l'opération de désinfection ne peut être laissée au hasard.

Par ailleurs, de nombreuses confusions persistent dans l'emploi des termes de désinfectant et d'antiseptique. La norme NF T 72 101 différencie clairement ces types de produits, mais cette normalisation n'est que française et un même produit peut correspondre à l'une ou l'autre des deux définitions, car selon la concentration utilisée il pourra être appliqué sur des surfaces inertes ou sur des téguments. C'est pourquoi la tendance actuelle en Europe est de supprimer le terme

"antiseptique" et de nuancer celui de "désinfectant" en fonction des utilisations possibles, de l'environnement dans lequel ces produits sont utilisés, du degré initial de contamination, et également du degré de désinfection requis. La classification proposée, qui n'est pas spécifique à l'industrie pharmaceutique, est la suivante :

A / Désinfectants pour milieux inertes

1. Désinfectants pour instruments
2. Désinfectants de surface dans les établissements de soin
3. Désinfectants de surface dans l'industrie
4. Désinfectants pour excréta et bandages infectés

B / Désinfectants pour application sur les tissus vivants

1. Désinfectants pour désinfection hygiénique des mains
2. Désinfectants pour l'hygiène générale des mains
3. Désinfectants pour désinfection préopératoire des mains
4. Désinfectants pour désinfection cutanée préopératoire
5. Désinfectants pour désinfection cutanée générale
6. Désinfectants pour désinfection des muqueuses
7. Désinfectants pour désinfection des plaies. (7)

Il est évident que même dans cette classification, certaines catégories peuvent partiellement se recouper, mais elle apporte l'avantage de regrouper sous un même titre des produits similaires, tout en soulignant les particularités d'emploi.

Partout dans le monde, la différence entre désinfectant et antiseptique reste floue : en Allemagne, on distingue les désinfectants pour usage sur l'homme ou l'animal, et ceux qui n'entrent pas en leur contact ; au Royaume-Uni, désinfectants et antiseptiques sont distincts et seuls ces derniers sont considérés comme des médicaments ; aux Etats-Unis, tous ces produits répondent à la dénomination de désinfectant, voire de "germicide" (terme considéré comme trop vague par les Européens) (8) ou même "chemical sterilants" (9) que l'on pourrait traduire par agent chimique de stérilisation ; la réelle différence se situe en fait dans les organismes dont ils dépendent et qui fixent les contrôles réglementaires et obligatoires : la Food and Drug Administration (FDA) pour les antiseptiques (considérés comme des médicaments), alors que les désinfectants (assimilés à des pesticides), sont sous la coupe de l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA), même si la FDA

contrôle leur utilisation dans le cadre des industries agro-alimentaires et pharmaceutiques.

De même, en France, un antiseptique doit obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché, alors qu'un désinfectant est considéré comme un produit de consommation, nécessitant une homologation par le Ministère de l'Agriculture. (10)

La base de cette thèse est une étude de la désinfection de surface. Pour matérialiser l'étude théorique, nous incluons dans ce document quelques résultats obtenus lors des travaux du stage de fin d'études effectué chez Rhône-Poulenc Rorer à Maisons-Alfort, dans le laboratoire d'analyses biologiques, de janvier à juin 1992, sur la validation des désinfectants utilisés dans une zone de production en atmosphère contrôlée.

"Il est impératif, au niveau de l'utilisateur, de posséder un certain nombre de connaissances théoriques, pratiques et légales afin de pouvoir décider, en connaissance de cause, de l'achat et de l'emploi de tel ou tel produit", a dit P. ISOARD. (11) Il est évident qu'à l'heure actuelle, la majorité des industries pharmaceutiques ont déjà fait leur choix de désinfectants de surface, mais les nouvelles directives des Bonnes Pratiques de Fabrication et de la FDA développent encore l'optique de qualité : l'industriel doit donc s'assurer du bien-fondé de son choix, et valider les méthodes de désinfection, afin d'insérer la preuve de son efficacité dans les dossiers des médicaments fabriqués.

Le premier sujet abordé traite des différents critères à prendre en compte dans le choix d'un désinfectant en fonction des données bibliographiques existantes ; les différents essais réalisables en laboratoire pour tester leur activité et leur efficacité occuperont la deuxième partie de ce document, et enfin le contrôle de leur efficacité en situation réelle et les conditions d'application de la désinfection de surface dans le cadre de l'industrie pharmaceutique concluront cette étude.

**PREMIERE PARTIE
=
CHOIX DU DESINFECTANT**

Les Bonnes Pratiques de Fabrication définissent dans leur glossaire, la matière première comme étant "toute substance, utilisée dans la fabrication d'un médicament, à l'exclusion des articles de conditionnement". Or la Fabrication reprend "toutes les opérations concernant l'achat des matières premières, des articles de conditionnement, la production, le contrôle de la qualité, la libération, le stockage, la distribution des médicaments ainsi que les contrôles correspondants", ce qui inclue donc les opérations de désinfection. (12) Cependant, peut-on considérer le désinfectant comme une matière première, alors qu'il n'entre pas dans la formulation du médicament ? Il devrait en tous cas être traité comme tel, pour assurer la qualité de son choix et de son utilisation.

C'est pourquoi tous les aspects de son emploi ainsi que les contextes dans lesquels celui-ci se fera, doivent être pris en compte.

Que l'industriel ait besoin d'un nouveau désinfectant, ou qu'il veuille réaliser la validation de ceux qu'il utilise, la démarche et les questions à soulever seront les mêmes ; simplement, si les désinfectants sont déjà employés et que leur choix avait été raisonné, la vérification de l'adéquation du produit aux besoins sera plus rapide.

1 / ETUDE DE LA SURFACE

1.1- SA TAILLE

La surface à désinfecter peut varier considérablement : une salle entière, une paillasse, un appareil, des gants... Les quantités de solution désinfectante à mettre en jeu vont varier en conséquence, ainsi que le budget à allouer à la désinfection ; mais il faut toujours garder à l'esprit que le coût du désinfectant n'est que très faible par rapport au coût global de la fabrication du médicament. La qualité du médicament doit rester le premier objectif.

Les produits d'emploi délicat, par exemple les produits visqueux, seront réservés aux petites surfaces.

1.2- SA FORME

Plus la forme de la surface à désinfecter est simple, sans recoins ni complications, plus la désinfection sera facile à mettre en oeuvre ; mais évidemment cette facilité de l'opération ne pourra que rarement être l'exigence première d'un cahier des charges. Par contre, la technique de désinfection à utiliser (essuyage, pulvérisation,...) sera parfois imposée par la forme de la surface, et limitera les choix dans les présentations des désinfectants.

1.3- LES MATERIAUX

Avant toute opération de désinfection, il faut connaître la composition de la surface et les agents auxquels elle est sensible, afin d'éviter une détérioration par un procédé (chimique ou mécanique) inadapté (11), ou une sous-efficacité de la désinfection.

En effet, il peut y avoir incompatibilité chimique entre la surface et

le désinfectant, provoquant une altération du support ou une inefficacité du produit, voire des dégagements gazeux.

Un matériau poreux absorbera le produit et diminuera l'efficacité de la désinfection, ou au contraire créera une sorte de rémanence de l'action désinfectante en "piégeant" le produit ; il peut également bloquer les micro-organismes hors d'atteinte du désinfectant.

Les aspérités, par exemple les déclivités au niveau des joints entre les dalles, peuvent être source de prolifération microbienne si le désinfectant n'est pas suffisamment volatil et que le solvant aqueux peut y stagner.

On peut noter que pour les revêtements de sol, dans les zones très sensibles à la contamination microbienne, la compatibilité avec une désinfection facile à mettre en oeuvre et efficace, est un point fondamental du cahier des charges, et qu'il peut être avantageux de faire subir un traitement de base, de type vitrification, aux revêtements de sol existants, ou même de les changer, plutôt que d'essayer d'adapter tant bien que mal les techniques et les produits de désinfection à une surface inadéquate. Et de nos jours, "il faut accepter de sacrifier l'esthétique au fonctionnel dans toutes les zones à risques." (11)

2 / ETUDE DE L'ENVIRONNEMENT

Avant de lancer une opération de désinfection, il est impératif d'étudier l'environnement des surfaces à désinfecter, c'est-à-dire leur localisation et leur niveau de contamination. En effet, ceci fournit une estimation du danger encouru. (13) Dans l'industrie pharmaceutique, de telles études (plus ou moins poussées selon les exigences du médicament fabriqué) sont réalisées en routine par des tests de contrôle de l'environnement, qui peuvent être considérés comme un élément des contrôles en cours de fabrication ; or "un système d'assurance de la qualité approprié à la fabrication des médicaments doit pouvoir garantir que (...) tous les contrôles nécessaires des produits intermédiaires ont

bien été réalisés, de même que tous les contrôles en cours de fabrication et toutes les validations." (12)

Ces contrôles d'environnement se font par mesure de la contamination des surfaces (écouvillons ou lames gélosées), mesure de la contamination de l'air par aspiration sur une membrane gélosée ou par sédimentation sur une boîte de Pétri.

Un traitement "statistique" des données obtenues lors des fabrications précédentes (cartes de contrôle donnant les niveaux de contamination, et micro-organismes identifiés) permettra de déterminer le niveau de contamination moyen, le risque maximal ainsi que la population microbienne rencontrée en pratique et contre laquelle devra être dirigée l'action du désinfectant.

D'autre part, la fonction du local peut apporter des renseignements : la surface à désinfecter se trouve-t-elle dans un lieu de réception des matières premières, dans un préparatoire, dans une zone de production (à atmosphère contrôlée ou non ?), dans un laboratoire d'analyses (chimique ou biologique ?), dans un vestiaire, dans un couloir ? Selon la réponse, les impératifs seront plus ou moins contraignants, et plus ou moins ciblés.

La localisation de la surface permettra également d'envisager en premier abord la fréquence de désinfection à appliquer, soit en fonction de la rapidité de recontamination du local, soit pour des aspects purement pratiques (une pièce vide est plus facile à désinfecter).

3 / ETUDE DU DESINFECTANT PAR RAPPORT AU MEDICAMENT FABRIQUE

Le désinfectant est utilisé dans le cadre de la fabrication d'un ou plusieurs médicaments. Sa "relation" plus ou moins directe avec le médicament en question, et le type de médicament, imposent aussi leurs exigences dans le choix du désinfectant.

3-1. CONTACT ENTRE LE MEDICAMENT ET LE DESINFECTANT

Si le désinfectant est utilisé dans des zones sans contact avec les matières premières ou les produits intermédiaires (par exemple, une zone de stockage des produits finis avant distribution), ce problème ne se pose pas.

A l'opposé, s'il doit servir à désinfecter une surface qui rentre en contact avec le médicament ou l'un de ses composants, toutes les possibilités d'interactions avec ces produits devront être étudiées à l'avance, notamment les risques d'inhibition d'activité ou d'altération de ces produits ou du désinfectant : aucune interaction ne sera acceptable.

Par ailleurs, il faut proscrire tout risque de contamination croisée du médicament.

3-2. CATEGORIE DE MEDICAMENTS FABRIQUES

3.2.1. Les médicaments obligatoirement stériles

Ces médicaments sont produits dans des zones d'atmosphère contrôlée, car les exigences en tant que contamination microbienne sont particulièrement drastiques. La désinfection sera donc une étape primordiale vers la qualité finale du médicament.

Les lignes directrices particulières des Bonnes Pratiques de Fabrication stipulent que dans les zones d'atmosphère contrôlée, "lorsqu'on utilise des désinfectants, il convient d'en utiliser plusieurs et de différents types et de ne les utiliser que sous surveillance microbiologique en vue de détecter tout développement de souches résistantes". (12) Il faudra donc instaurer une rotation dans l'utilisation des désinfectants, avec changement de produit à une fréquence définie.

3.2.1.1. Préparations aseptiques

La charge microbienne du produit doit rester nulle durant toute la phase de fabrication : la désinfection des locaux et du

matériel devra conduire à un niveau de contamination négligeable pour proscrire toute introduction de micro-organismes dans le médicament, ce qui le condamnerait.

De plus, les entrées en zone d'atmosphère contrôlée et les manipulations devant être restreintes, le désinfectant devra être très actif et d'utilisation simple, avec une forte rémanence.

3.2.1.2. Produits stérilisés dans leur récipient final

La stérilisation ayant lieu en fin de fabrication, la contamination du produit avant cette phase pourrait paraître moins problématique. En pratique, les opérations de désinfection peuvent être allégées par rapport à celles pour préparations aseptiques, mais il est important de respecter un niveau de contamination maximal, et aussi faible que possible, dans le produit, dans le local et sur les surfaces, pour potentialiser le facteur de réduction de la population microbienne par la stérilisation.

3.2.2. Médicaments non obligatoirement stériles

Il convient de déterminer le niveau de contamination acceptable en fonction de la composition du médicament, de sa forme galénique et de son conditionnement. Par exemple, les taux d'acceptabilité seront faibles pour les pommades et les sirops, très sensibles à la contamination microbienne ; autre exemple, celui des médicaments à usage homéopathique, pour lesquels "le procédé de fabrication doit être dominé par le souci d'éviter toute impureté, toute souillure ou contamination de nature chimique ou particulaire, étant donné les doses infimes de principe actif le plus souvent mises en jeu." (12)

Il faut d'autre part cibler les espèces potentiellement pathogènes par la voie d'administration en cause, ou les espèces susceptibles d'altérer la préparation, afin de proscrire de telles contaminations. (7)

4/PLACE DU DESINFECTANT DANS LA CLASSIFICATION CHIMIQUE

La méthode de classification des désinfectants adoptée quasi unanimement, est basée sur leur structure chimique. En effet, même si les mécanismes d'action des désinfectants sont encore mal élucidés, donc la relation structure - activité pas exploitée dans son intégralité, l'appartenance à un groupe chimique donne certaines indications très utiles pour le choix d'un désinfectant par l'utilisateur :

- ◆ le spectre d'activité (au moins approximatif et théorique),
- ◆ les connaissances actuelles sur son mécanisme d'action,
- ◆ la sensibilité théorique aux substances interférentes,
- ◆ les interactions éventuelles : synergies et/ou antagonismes.

Les fiches techniques fournies par les fabricants peuvent également donner des renseignements sur les produits disponibles, à condition de rester très critique vis-à-vis des arguments pseudo-scientifiques à but commercial.

Ainsi, en comparant les besoins (c'est-à-dire les résultats des études de l'environnement, des surfaces à désinfecter et du contexte médicamenteux dans lequel elles s'inscrivent) avec les données bibliographiques que l'on peut regrouper, le choix pourra être précisé (ou confirmé), et ce, avec un premier aperçu de l'efficacité pratique qu'aura le désinfectant dans les conditions de son emploi.

Il n'entre pas dans le cadre de cette étude de développer les caractéristiques connues de chaque groupe chimique ; deux tableaux en donnent un aperçu à la fin du document (Cf. Annexe A). Nous citerons simplement les désinfectants qui ont été utilisés pour les expériences chez Rhône-Poulenc Rorer, qui fourniront un exemple des données que l'on peut obtenir.

4-1. EAU DE JAVEL A 10% (11) (14) (15)

4.1.1. Solution étudiée

Il s'agissait d'une solution d'hypochlorite de sodium à 12^D, diluée à 10% dans de l'eau distillée, trois heures avant son utilisation.

4.1.2. Généralités

L'eau de Javel, ou hypochlorite de sodium en solution aqueuse, de formule ClNaO, fait partie des désinfectants minéraux halogénés, donc oxydants. Dans le cas des hypochlorites, ce pouvoir oxydant, dû au chlore actif, c'est-à-dire réellement utilisable, est chiffré par le degré chlorométrique (1^D = 3,22 g de chlore actif) et mesuré par iodométrie. Le chlore actif correspondant à la formation d'acide hypochloreux non dissocié, la concentration en chlore sera moins importante que le pH de la solution car il conditionne la réaction (pH optimal = 5). La contradiction entre les impératifs de pH de la solution, d'une part pour l'activité et d'autre part pour la stabilité (pH optimal de 9,5), imposera de sacrifier la durée de conservation en faveur de l'efficacité antibactérienne.

L'eau de Javel agit par oxydation au niveau de la membrane et des constituants cellulaires, et par halogénéation des protéines.

4.1.3. Avantages et inconvénients

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> *Spectre d'action très large *Importante marge de sécurité (CMI¹ et CMB² de 1,25% à 2,5%) *Rapidement actif *Facile à se procurer *Peu cher 	<ul style="list-style-type: none"> *Conservation limitée *Très sensible aux matières organiques et aux acides, thiosulfates, sulfures, sels ferreux... *Très irritant pour les voies respiratoires *Manipulation délicate

¹ Concentration minimale inhibitrice

² Concentration minimale bactéricide

4-2. EAU OXYGENEE A 30 VOLUMES

(11) (14) (16)

4.2.1. Solution étudiée

L'eau oxygénée utilisée était de l'eau oxygénée à 30 volumes des laboratoires GIFRER, dans des flacons neufs utilisés en une seule fois.

4.2.2. Généralités

L'eau oxygénée à 30 volumes correspond à une solution aqueuse à 9% de peroxyde d'hydrogène (formule brute = H_2O_2), qui appartient au groupe des oxydants minéraux.

Elle agit par oxydation des constituants cellulaires et enzymatiques.

4.2.3. Avantages et inconvénients

AVANTAGES	INCONVENIENTS
*Spectre large	*mais actif surtout sur les bactéries à coloration de Gram positive.
*Marge de sécurité supérieure à 100 (CMI et CMB inférieures à 0,78125%)	*Très instable
*Prêt à l'emploi	*Activité très diminuée par les matières organiques

4-3. CLINISEPT 2500 POTENTIALISE®

(6) (11) (14)

4.3.1. Solution étudiée

Le CLINISEPT®, fabriqué par les laboratoires FANDRE, était dilué à raison de deux mesures de pompe dans 10 litres d'eau ultrafiltrée, soit une concentration d'environ 0,57%, trois heures avant son utilisation.

4.3.2. Généralités

Il s'agit d'une association de dérivés phénoliques (sels d'o.phénylphénol, o.benzyl p.chlorophénol et p.tertiaire amyphénol).

La première phase de leur action est une association aux lipides membranaires, qui provoque une altération de la perméabilité de la membrane, d'où une activité supérieure sur les bactéries à coloration de Gram négative par le caractère lipophile ; puis il y a absorption dans la phase protéique, avec formation de complexes Phénol-Protéine provoquant la coagulation de ces protéines, et enfin dénaturation des protéines, notamment du système enzymatique producteur d'énergie.

4.3.3. Avantages et inconvénients

AVANTAGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none"> *L'association de deux phénols et d'un phénol halogéné, potentialise leur activité. *L'alkylation augmente l'activité et diminue la toxicité. *Une faible augmentation de concentration entraîne une forte augmentation d'activité. *Conforme aux normes AFNOR *Préparation facile *Produit biodégradable 	<ul style="list-style-type: none"> *Faible marge de sécurité (CMB de 0,0125% à 0,2% pour une concentration d'emploi préconisée de 0,4%) *Le produit reste très longtemps bactériostatique quand on augmente les concentrations. *Non sporicide et peu virucide *Sensible aux matières organiques

4-4. CHLORHEXIDINE EN SOLUTION ALCOOLIQUE

(6) (11)

4.4.1. Solution étudiée

La chlorhexidine était diluée à raison de 0,5% dans de l'alcool à 70° dénaturé, puis la solution était filtrée sur une membrane de 0,22 µm de porosité.

4.4.2. Généralités

Les deux composants sont des désinfectants organiques ; la chlorhexidine appartient à la famille des biguanides.

L'alcool agit par désorganisation de la membrane cellulaire (dénaturation des protéines facilitée par la présence d'eau), la chlorhexidine provoque de plus une inhibition enzymatique.

4.4.3. Avantages et inconvénients

AVANTAGES	INCONVENIENTS
*Bactéricide et fongicide *L'alcool est un produit courant. *L'addition de chlorhexidine potentialise l'activité et donne une action rémanente à la solution.	*Peu actif sur les virus ou après un temps d'action très long, et sur les spores bactériennes. *L'alcool étant très volatil, son action est très brève. *Odeur désagréable *Inflammable

5/ETUDE DE LA TOXICITE

Il n'existe pas de réglementation spécifique concernant les études de toxicité des désinfectants et des antiseptiques ; cependant elles restent obligatoires pour le fabricant avant la commercialisation de son produit. Pour cela, il doit s'inspirer des textes en vigueur pour :

- les médicaments et produits à usage topique,
- les produits en contact avec les aliments,
- les produits cosmétiques et d'hygiène corporelle,
- les substances chimiques nouvelles,

textes émis par les Ministères de la Santé, du Travail, et de l'Agriculture, ainsi que par l'Association Française de Normalisation, l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (lignes directrices de l'OCDE), et la Communauté Economique Européenne (directives de la CEE).

A partir de ces différents textes, une liste des essais de toxicité à réaliser peut être dressée, que nous citerons simplement, sans les développer (quelques approfondissements sont donnés en Annexe B):

1. Toxicité aiguë par administration unique :
par voie orale, respiratoire et percutanée (avec détermination des Dose Létale 50 = DL50 et Concentration Létale 50 = CL50),
par irritation de la peau (indice d'irritation cutané primaire = IIP),
par irritation oculaire (indice d'irritation oculaire primaire = IIO).
2. Toxicité subaiguë, avec étude des voies orale et respiratoire, étude de la toxicité subaiguë cumulée, et détermination de l'indice d'agressivité par applications itératives (= IAAI)
3. Sensibilisation de la peau
4. Mutagenèse
5. Cancérogenèse
6. Tératogenèse
7. Fonction reproductrice (17)

Il est évidemment hors de question de demander à l'industriel utilisateur du désinfectant, de réaliser lui-même tous ces essais, mais il est indispensable qu'il se renseigne sur les produits qu'il utilise (ou fait

utiliser), afin que le manipulateur s'expose à un minimum de risques. Il engage sa responsabilité du point de vue de la législation du travail. Cette phrase de D. HUCHON-BECEL vient appuyer ce propos :

"Autant il apparaît acceptable d'avoir une attitude relative, privilégiant l'efficacité à la sécurité, lorsqu'il s'agit d'un médicament, autant il paraît difficilement concevable, de faire manipuler à des travailleurs des produits dont on ne possède pas toutes les garanties."

En fonction des données toxicologiques du produit, il conviendra donc de rédiger des précautions d'emploi adaptées, comme l'utilisation de gants lors de toute manipulation (en cas de toxicité percutanée), le port d'un masque protecteur (en cas de toxicité respiratoire), etc. ; dans la mesure du possible, les désinfectants devraient être utilisés dans des locaux ventilés pour éviter l'accumulation de vapeurs toxiques. L'OSHA (Occupational Safety and Health Administration) aux Etats-Unis, a établi des limites d'exposition à divers agents chimiques dans le cadre du travail, auxquelles les industriels doivent se référer quand ils prévoient la conception des locaux ou les procédures d'utilisation d'un produit.(18) En outre, il faudra prévoir les risques d'intoxication accidentelle (ingestion, contact prolongé,...) et faire diffuser auprès de chacun les conduites à tenir dans de tels cas.

Nos quatre exemples montrent les renseignements que l'on peut obtenir et à partir desquels fonder les précautions d'emploi :

1. Eau de Javel

Pour ce produit toxique et très irritant, trois cas sont à envisager :

- ~ l'**ingestion** provoque rapidement un dégagement de chlore par contact de l'acidité gastrique, d'où une forte irritation de la muqueuse, avec nausées et vomissements, difficultés à déglutir et salivation abondante. Si l'absorption est accidentelle, donc la quantité faible, il faut faire boire un grand verre d'eau froide ou d'une solution de thiosulfate de sodium à 1% ; si l'absorption est volontaire et la quantité importante, la personne devra être conduite d'urgence à l'hôpital avec interdiction de faire boire ou vomir.
- ~ en cas de **projection**, il faut rincer abondamment à l'eau dans les secondes qui suivent, pour éviter toute action du produit.

~ l'inhalation crée un risque d'oedème pulmonaire (0,15 g/l de gaz pendant 30 minutes suffisent). Dans ce cas, les premières mesures sont d'aérer au maximum le local et de le quitter, puis de laisser les personnes intoxiquées se reposer en leur donnant des boissons toniques non alcoolisées telles que du thé ou du café. (15)

2. Eau oxygénée

Elle est peu toxique aux concentrations d'emploi usuelles.

3. Phénols

Ils sont absorbés par la peau et les muqueuses, avec irritation ; ils sont de plus allergisants et photosensibilisants. (11)

4. Chlorhexidine

Il s'agit d'un produit irritant pour la peau et les muqueuses, mais avec une bonne tolérance locale (indices d'irritation cutanée primaire et d'agressivité cutanée, faibles).

L'ingestion est bien tolérée.

Des essais de tératogenèse ont montré une absence d'effet toxique. Les essais de mutagenèse sont plus controversés car selon la méthode utilisée, il y a ou non mutagenèse. (19)

L'autre facette de la toxicité éventuelle du désinfectant est celle du danger encouru par le consommateur du médicament. En effet, si un désinfectant est utilisé par exemple pour décontaminer des cuves destinées au mélange des principes actifs, des résidus du désinfectant pourraient s'insérer dans le médicament final, avec risque d'intoxication du malade. Ainsi, dans tous les cas où il pourrait y avoir contact entre le futur médicament et le désinfectant, il sera nécessaire et obligatoire de prévoir une technique efficace d'élimination du désinfectant en fin d'opération et de la valider, d'instaurer des analyses des eaux de rinçage avant utilisation du matériel pour la fabrication, et enfin de prouver, au cours des contrôles du produit fini, l'absence de résidus du désinfectant ; retrouver des traces de désinfectant serait donner la preuve d'une contamination croisée, ce qui entraînerait l'invalidation de la validation et donc le rejet des lots. Parfois, il sera plus judicieux de recourir à une "désinfection mécanique" (comme une stérilisation).

6/CRITERES DE DECISION (3) (7) (11) (13) (20)

En conclusion de cette partie, qui tient essentiellement en une étude théorique du désinfectant et des conditions de son emploi, les critères principaux à prendre en compte dans le choix d'un désinfectant seront :

→ **des critères d'activité :**

- un spectre d'activité large, incluant les micro-organismes "critiques" déterminés par les cartes de contrôle et les exigences du médicament fabriqué,
- une action irréversible : le désinfectant doit être microbicide et non uniquement microbiostatique, c'est-à-dire aussi bien bactéricide que fongicide et virucide,

→ **des critères de facilité d'utilisation,** qui incluent :

- une rapidité d'action (maximum vingt minutes) compatible avec l'emploi prévu,
- une action rémanente,
- une "résistance" face aux substances interférentes les plus courantes,
- une adéquation aux surfaces à désinfecter,
- une simplicité de préparation et de stockage,
- une faible toxicité et une odeur faible ou agréable,

→ **et enfin un rapport qualité / prix compétitif.**

Ce critère ne sera pris en compte que si les critères précédents laissent une latitude dans le choix, et devra rester en retrait derrière l'obtention de la qualité du médicament et de sa fabrication. En effet, le prix du désinfectant est négligeable face au coût total de la production, et un mauvais choix par souci d'économie conduirait au rejet des lots de médicaments fabriqués, avec une perte financière beaucoup plus lourde que le faible gain à l'achat du désinfectant.

Par ailleurs, il est intéressant de comparer les produits dits "classiques" comme l'eau de Javel, l'alcool ou l'eau oxygénée, avec les préparations du commerce, vendues sous le nom de désinfectants. Le tableau ci-après présente, en parallèle, les avantages et les inconvénients

de chaque classe et peut aider au choix du désinfectant en fonction des priorités que l'industriel s'est fixées ; on ne peut pas conclure à la supériorité des uns ou des autres.

Parallèle entre les produits du commerce et les désinfectants "classiques"	
Produits du commerce	Produits classiques
La seule bibliographie disponible est celle du fabricant.	Il existe une bibliographie vaste et impartiale sur chaque produit. De plus, les Pharmacopées fournissent des monographies précisant leurs caractéristiques et les contrôles.
La formulation exacte et totale n'est pas toujours connue (excipients?). Un même nom de marque peut correspondre à un produit différent selon les pays (exigences différentes quant aux excipients). (21)	Le produit est seul ou en solution à une dilution connue.
L'association de plusieurs principes actifs peut permettre une potentialisation ou l'addition de propriétés détergentes, théoriquement contrôlées.	Ils peuvent être associés en fonction des besoins particuliers mais en étudiant les interactions.
Il y a en général une dilution à effectuer avant emploi, mais des systèmes de distribution (pompe) sont prévus pour faciliter la manipulation.	Certains d'entre eux peuvent être utilisés tels quels mais la majorité doivent être dilués : il faudra être très précis dans le protocole opératoire ³ .
Les contrôles doivent être effectués par le fabricant, comme sur tout produit fini (contrôle qualité).	Ce sont des produits connus de longue date, souvent testés par plusieurs auteurs, et pour lesquels existent des tests de résistance.
La marque NF est obligatoire en France pour leur commercialisation.	La marque NF n'apparaît pas toujours.

³ L'avantage d'un produit pur sur un produit à diluer, vient des risques de contamination lors de la préparation, par la manipulation, le solvant ou le récipient utilisé. Ces risques, ainsi que celui d'une erreur dans la concentration finale, seront très diminués par l'application correcte de procédures validées. (7)

DEUXIEME PARTIE
=
CONTROLES EN LABORATOIRE

Nous venons de voir quels étaient les critères de choix d'un désinfectant et les éléments à prendre en compte lors de la décision. Bien évidemment, le point primordial reste l'activité de ce désinfectant.

J.C. DARBORD a dit qu'une "bonne connaissance des conditions de l'activité des (antiseptiques et des) désinfectants et des méthodes permettant de les évaluer, doit permettre à l'utilisateur un choix raisonné selon des critères scientifiques en complément des sacro-saints impératifs économiques."(6) Si cela paraît évident, ce n'est pas aussi simple en pratique quand on constate la multiplicité des tests existants. Il faut redire qu'actuellement, et quasi mondialement, les désinfectants de surface n'étant pas considérés comme des médicaments, il n'existe toujours pas de réglementation très stricte, ni surtout très claire, garantissant les conditions de leur fabrication, de leur contrôle et de leur activité.(11) Les auteurs s'accordent sur la distinction de différents niveaux de tests : des tests en laboratoire et des contrôles sur le terrain (= in loco = in situ) pour vérifier la validité des résultats en laboratoire dans les conditions d'application (7), mais aucune norme internationale n'existe, à aucun niveau.

Dans le premier niveau de contrôle, certains pays, dont la France, introduisent une séparation supplémentaire entre les contrôles de stade 1, c'est-à-dire l'étude dans des conditions expérimentales fixées de l'activité germicide fondamentale du désinfectant, et les contrôles de stade 2 correspondant à une étude en laboratoire mais dans des conditions plus proches de la réalité (8) ; ces derniers seront plus approfondis à la fin de cette deuxième partie, après avoir essayé de cerner les différents tests de stade 1.

1/LES TESTS DE STADE 1

1.1-HISTORIQUE

La volonté d'apporter la preuve de l'efficacité d'un désinfectant est apparue dès 1750 sous l'égide de John PRINGLE, qui mit au point le calcul du "*sodium chloride coefficient*" (coefficient - chlorure de sodium), ancêtre du test du coefficient - phénol de RIDEAL & WALKER de 1903 (par comparaison à une solution à 5% d'acide phénique). Le principe en était simple : mettre en présence des substances dissoutes dans l'eau et des morceaux de viande maigre, puis comparer l'odeur apparue dans chaque cas ; le sel de mer lui servait de standard (auquel il attribua la valeur 1) et il réalisa ainsi la première approche semi-quantitative de l'activité d'un désinfectant.

En 1889, GEPPERT utilisait pour la première fois un neutralisant (le sulfure d'ammonium) pour étudier l'activité du chlorure mercurique en arrêtant son action à un temps précis (c'est-à-dire en annihilant son pouvoir inhibiteur résiduel).

Et en 1897, DEFRIES mettait au point la première véritable méthode en point final, en éliminant le désinfectant et en rinçant les micro-organismes avec de l'eau stérile avant de les dénombrer ; au moment de l'évaluation du nombre de micro-organismes survivants, le contact avec le désinfectant était effectivement supprimé. Cette méthode préfigure les méthodes par filtration sur membranes. (22)

Depuis, les tests de stade 1 se sont multipliés et les lignes directrices édictées par les différents pays, indiquent les tests à appliquer suivant le pays producteur et/ou utilisateur :

- ◆ en France, les normes de l'AFNOR (Association Française de Normalisation),
- ◆ en Allemagne, les "lignes directrices pour les essais des désinfectants chimiques" de la Société allemande d'Hygiène et de Microbiologie ou DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie),

- ◆ au Royaume-Uni, les normes BS de l'Institut Britannique de Standardisation ou BSI (British Standards Institute),
- ◆ aux Etats-Unis, les tests de l'Association des Chimistes Officiels Analytiques ou AOAC (Association Of Analytical Chemists), de l'ASTM (American Society for Testing and Materials) et de l'Agence américaine pour la Protection de l'Environnement ou EPA (Environmental Protection Agency).

Actuellement, le comité technique 216 du Comité Européen de Normalisation (C.E.N.) travaille sur la sélection d'une série de méthodes d'essais des antiseptiques et désinfectants, permettant de tester les activités bactéricide, fongicide et sporicide, et qui devront être reconnues par tous les pays de la Communauté Européenne. (10)

1.2 - LES TESTS OFFICIELS

On vient de voir que chaque pays possède son test, voire ses tests, et que chacun reste encore trop sur ses positions. Décrire tous les tests officiels existant pourrait donc faire l'objet d'un ouvrage complet et n'est pas le but de cette étude.

L'intérêt principal de ces tests est leur standardisation, qui même si elle n'est que nationale, entraîne une harmonisation depuis les souches microbiennes à utiliser, jusqu'aux temps et aux concentrations d'étude, en passant par le matériel à employer ; les résultats obtenus peuvent ainsi être officialisés dans le pays concerné et avoir une valeur scientifique dans les autres pays.

Ces tests permettent de prouver l'activité intrinsèque d'un produit désinfectant. Ils seront donc utiles :

- aux fabricants de désinfectants, afin d'obtenir l'homologation de leurs produits ou de démontrer la conformité des lots fabriqués à cette homologation,
- aux chercheurs, pour savoir si une nouvelle molécule ou un nouveau produit possèdent une activité antimicrobienne suffisante pour briguer une homologation donc espérer une exploitation commerciale,

- et à l'industrie pharmaceutique utilisatrice du désinfectant, pour vérifier que le produit qu'elle achète et emploie, est conforme aux exigences de son pays et à celles qu'elle s'est fixées ; il s'agit donc ici d'un *contrôle* d'activité.

1.3 - LES NORMES AFNOR

En France, les tests réglementaires sont ceux décrits par les normes AFNOR. C'est pourquoi nous nous attarderons sur elles plutôt que sur celles en vigueur dans les autres pays.

Ces normes AFNOR de stade 1, appelées normes "qualificatives" (11), présentent un double intérêt ;

il existe des normes adaptées à chaque type d'activité à vérifier : bactéricidie, sporicidie, fongicidie, virucidie,

et l'existence d'un essai préliminaire pour vérifier l'élimination ou la neutralisation du produit, assure l'absence d'interférence avec les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques de ce produit. (6)

Etant très codifiées et chacun de leurs éléments répondant à une standardisation, la reproductibilité de ces normes devrait être assurée. Mais du même coup, elles sont très lourdes à mettre en oeuvre dans un laboratoire de contrôle, qui n'est pas réservé à ces essais.

1.3.1. Principes généraux des normes AFNOR

Malgré des différences dans leur application, en relation avec les micro-organismes étudiés, ces normes possèdent des principes et des méthodes communs.

Le but de cette étude n'étant pas d'analyser ou de commenter ces textes normatifs mais simplement de présenter les méthodes disponibles, cet aperçu général suffira pour comprendre les grandes lignes d'application, et un résumé plus développé de l'une d'elles servira d'exemple type de la "philosophie" des normes.

1.3.1.1. Les normes basées sur la méthode de dilution - neutralisation

Il s'agit des normes suivantes :

- NF T 72 150 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables - Détermination de l'activité bactéricide - Méthode par dilution - neutralisation.
- NF T 72 170 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables - Détermination de l'activité bactéricide en présence de substances interférentes de référence - Méthode par dilution - neutralisation.
- NF T 72 180 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité virucide vis-à-vis des virus des vertébrés.
- NF T 72 181 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité virucide vis-à-vis des bactériophages.
- NF T 72 200 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables - Détermination de l'activité fongicide - Méthode par dilution - neutralisation.
- NF T 72 230 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables - Détermination de l'activité sporicide - Méthode par dilution - neutralisation.

Le désinfectant, après contact à 32°C avec les micro-organismes de référence, est neutralisé par voie chimique, après dilution de la suspension (cette dilution correspond à une première "neutralisation", généralement insuffisante si l'on veut rester dans des rapports de volume corrects et doit donc complétée par une neutralisation chimique). Un échantillon est alors prélevé et mis en incubation pour un dénombrement des micro-organismes viables. Ce résultat sera mis en balance avec des résultats témoins permettant de supprimer des "artefacts" de manipulation.

1.3.1.2. Les normes basées sur la méthode de filtration sur membranes

Correspondant aux normes précédentes, on trouve dans cette catégorie :

- NF T 72 151 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité bactéricide - Méthode par filtration sur membranes.
- NF T 72 171 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité bactéricide en présence de substances interférentes de référence - Méthode par filtration sur membranes.
- NF T 72 201 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité fongicide - Méthode par filtration sur membranes.
- NF T 72 231 Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau - Détermination de l'activité sporicide - Méthode par filtration sur membranes.

N.B. : les normes NF T 72 180 et NF T 72 181 proposent également une méthode par filtration sur gel (tamisage moléculaire) pour les produits très cytotoxiques.

La "neutralisation" du désinfectant est ici réalisée par filtration (et rinçages) qui "sépare" le désinfectant des micro-organismes survivants. La membrane est directement mise à incuber sur un milieu nutritif. Le pourcentage de micro-organismes survivants sera également calculé en tenant compte des résultats témoins.

1.3.1.3. Commentaires sur le choix de la méthode

Pour choisir entre la méthode par dilution - neutralisation et la méthode par filtration sur membranes, toutes deux officielles et efficaces, divers critères propres au laboratoire devront être mis en avant ; ces critères vont :

du matériel disponible (surtout si les tests sont réalisés épisodiquement, le fait de posséder dans le matériel habituel du laboratoire des systèmes de filtration, ou au contraire un éventail de neutralisants, fera opter pour l'une ou l'autre des deux méthodes),

à la qualification ou aux habitudes de travail des techniciens, qui se familiariseront plus facilement avec une méthode qu'ils utilisent fréquemment.

Cependant des critères propres à ces méthodes sont également à faire valoir ;

ainsi la méthode par filtration a l'avantage :

- de dénombrer tous les micro-organismes de l'échantillon initial qui ont survécu et non une partie prélevée, comme dans la méthode par dilution,
- d'éviter la phase de neutralisation, délicate à mettre au point pour certaines formulations de désinfectants,

mais cette méthode par filtration a l'inconvénient :

- d'être plus onéreuse, bien que de nos jours, dans l'industrie, l'utilisation de systèmes de filtration à usage unique remette en cause cette affirmation : le temps nécessaire à sa réalisation est ainsi fortement réduit, la préparation du matériel simplifiée (plus d'autoclavage), les contrôles (matériel, milieux) réduits par l'utilisation des certificats de contrôle des fabricants, et donc le coût de main-d'oeuvre diminué en conséquence,
- de donner des résultats plus fluctuants que la méthode par dilution, selon le type de membranes utilisées et selon le délai de lecture choisi (11).

1.3.2. Particularités de ces différentes normes

1.3.2.1. Etude de l'activité bactéricide : NF T 72 150 et 151

Les souches de référence ⁴ utilisées pour ces normes sont :

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP A 22
<i>Escherichia coli</i>	CIP 54 127 (ATCC 10 536)
<i>Staphylococcus aureus souche Oxford</i>	CIP 53 154 (ATCC 9 144)
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 5 855
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CIP 7326

Ces souches bactériennes doivent être conservées et repiquées conformément aux recommandations de la norme expérimentale T 72 140 : elles doivent être spécifiées et d'origine connue, conservées sous forme lyophilisée ; le nombre d'ensemencements, sur des milieux précis et à intervalles réguliers, est limité et les caractères biochimiques doivent être régulièrement contrôlés.

Ces normes permettent d'obtenir deux types de spectres (reconnus officiellement), selon que l'on étudie les cinq souches ("activité bactéricide spectre 5") ou juste les quatre premières ("activité bactéricide spectre 4").

Le temps de contact prévu est de 5 minutes à 20°C, et l'abaissement du nombre de micro-organismes, nécessaire pour pouvoir déclarer le produit bactéricide selon la norme correspondante, de 99,999%.

1.3.2.2. Etude de l'activité fongicide : NF T 72 200 et 201

Les souches de référence à utiliser sont :

<i>Absidia corymbifera</i>	CIP 1129-75
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CIP 1232-80
<i>Penicillium verrucosum</i> (var. cyclopium)	CIP 1231-80
<i>Candida albicans</i>	CIP 1180-79 (ATCC 2091)

⁴ Organismes officiels fournissant les souches de référence :

CIP = Collection de l'Institut Pasteur

ATCC = American Type Culture Collection

Le temps de contact est de 15 minutes à 20°C, et l'abaissement exigé du nombre de spores de moisissures ou de cellules végétatives de levures est de 99,99%.

1.3.2.3. Etude de l'activité sporicide : NF T 72 230 et 231

Les souches de référence sont :

Bacillus cereus CIP 7 803
Bacillus subtilis (var. niger) CIP 7 718 (ATCC 9 372)
Clostridium sporogenes 51 CIP 7 939

Le temps de contact est de 5 minutes à 75°C ou 1 heure à 21°C, et l'abaissement exigé de 99,999% de spores bactériennes.

1.3.2.4. Etude de l'activité virucide : NF T 72 180 et 181

Pour la norme NF T 72 180, les souches de référence sont :
entérovirus poliomyélitique (souche Sabin) cultivé sur
cellules VERO

adénovirus humain type 5 cultivé sur cellules KB
orthopoxvirus de la vaccine cultivé sur cellules VERO.

Les temps de contact sont de 15, 30 et 60 minutes à 20°C pour une réduction de 99,99% du nombre d'unités infectieuses.

Pour la norme NF T 72 181, les souches de référence sont les couples suivants :

bactériophage T2 et *Escherichia coli* B
bactériophage MS2 et *Escherichia coli* 4Hfrh
bactériophage Φ X 174 et *Escherichia coli* ATCC 13 706
bactériophage n° 66 et *Streptococcus lactis diacetylactis*.

Le temps de contact est de 5 minutes à 20°C et la réduction exigée de 99,99%.

1.3.3. Exemple de la norme NF T 72 151

1.3.3.1. But

Cette norme permet de vérifier l'activité bactéricide des désinfectants, par une étude *in vitro* portant successivement sur cinq souches de référence de la Collection de l'Institut Pasteur (ou quatre pour une étude spectre 4). La conformité à la norme assure une réduction d'au moins 5 logarithmes du nombre de bactéries viables.

1.3.3.2. Principe

Le principe en est de vérifier par filtration sur membranes que le contact entre les bactéries et le désinfectant réduit le nombre de bactéries viables.

La manipulation se fait en deux parties : tout d'abord un Essai Préliminaire, afin de déterminer les conditions opératoires, puis l'Essai Définitif (qui reprend l'essai préliminaire en tant qu'essai témoin), et ce sur les quatre ou cinq souches, en respectant le protocole décrit.

Le dénombrement des bactéries revivifiables se fait directement sur la membrane déposée sur un milieu gélosé, et mise à incuber à l'étuve dans des conditions définies selon la souche.

a) L'Essai Préliminaire consiste en :

→ un *dénombrement de contrôle* (résultat N), permettant de vérifier que la concentration de la suspension bactérienne est bien comprise entre $0,5 \cdot 10^8$ et $1,5 \cdot 10^8$ (condition de vérification de la norme),

→ un *dénombrement témoin* (résultat N') pour vérifier que la filtration ne diminue pas trop la quantité de bactéries retrouvées sur la membrane,

→ un *dénombrement essai préliminaire* (résultat n'), pour déterminer la nature et le volume de liquide de rinçage supprimant le pouvoir inhibiteur résiduel (PIR) du désinfectant.

Si les trois valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur, les conditions opératoires sont adoptées.

b) L'Essai Définitif doit être réalisé dans les conditions définies précédemment, qui, de plus, doivent être vérifiées lors de chaque essai. Ainsi, il comprend :

- un *dénombrement de contrôle* (résultat N), vérifiant la concentration de la suspension bactérienne,
- un *dénombrement témoin* (résultat N') pour mesurer l'influence de la filtration,
- un *dénombrement essai préliminaire* (résultat n) pour vérifier l'absence de pouvoir inhibiteur résiduel du désinfectant dans les conditions définies,
- et un *dénombrement essai définitif* (résultat X) pour calculer l'effet du désinfectant sur la suspension bactérienne par contact de 5 minutes à 20°C.

Les dilutions employées font que si N, N' et n ont des valeurs proches, et si X leur est inférieur, le désinfectant a bien provoqué une diminution d'au moins 10^5 fois le nombre initial de micro-organismes viables, c'est-à-dire au moins 99,999% : il est bactéricide selon la norme NF T 72 151.

N.B. : des schémas récapitulatifs, placés en Annexe C, montrent clairement les manipulations à effectuer.

1.3.3.3. Expression des résultats

Les résultats des Essais Préliminaires et Définitifs, ainsi que toute remarque concernant les conditions opératoires, doivent être consignés dans un procès-verbal rédigé suivant les recommandations de l'AFNOR.

Il est important de noter que lors de l'Essai Définitif, le désinfectant doit être utilisé à concentration double de celle étudiée ; cela n'étant pas possible pour certains d'entre eux, le résultat obtenu correspondra à seulement 90% de l'action du désinfectant à sa concentration d'utilisation.

1.3.3.4. Application pratique

En illustration de l'utilisation de cette norme, voici la démarche suivie au sein du laboratoire d'analyses de Rhône-Poulenc Rorer pour démontrer l'activité bactéricide spectre 4 des désinfectants utilisés dans le secteur de fabrication des seringues auto-injectables d'héparine, c'est-à-dire l'eau de Javel, l'eau oxygénée, le CLINISEPT® 2500 potentialisé des laboratoires FANDRE et une solution hydro-alcoolique à 0,5% de chlorhexidine.

a) Mise au point de la manipulation

Le parti pris, pour plus de facilité, était d'étudier souche après souche, tous les désinfectants. Ainsi, les manipulations se faisant sous une hotte à flux laminaire vertical dans un bloc stérile, pour diminuer les risques de souillures et pour des raisons pratiques, les gestes, le matériel et le temps pouvaient être optimisés :

- une seule suspension bactérienne à préparer et à diluer à chaque fois ;

- un seul dénombrement de contrôle et un seul dénombrement témoin à réaliser, valables pour tous les désinfectants étudiés le même jour ; seuls les dénombrements Essai préliminaire et Essai définitif étaient à multiplier par le nombre de désinfectants ;

- les différentes souches ne nécessitant pas les mêmes fréquences de repiquages avant leur utilisation, ni le même temps d'incubation après les filtrations, il était plus aisé, ainsi, de fixer une date de manipulation.

Même ainsi, il n'est pas facile de faire coïncider les impératifs de culture des souches, les attentes entre les résultats de l'Essai Préliminaire et de l'Essai Définitif, l'obtention des solutions désinfectantes en provenance de la production, et les impératifs d'utilisation des installations pour les contrôles de routine du laboratoire.

b) Application aux solutions aqueuses

Il s'agissait de solutions d'eau de Javel diluée à 10%, d'eau oxygénée GIFRER® à 30 volumes utilisée telle quelle, et d'une solution de CLINISEPT® à 0,57% environ, obtenue par dilution dans 10 litres d'eau ultrafiltrée d'une quantité correspondant à 2 mesures de pompe.

Pour chacune de ces solutions, deux essais au maximum ont été nécessaires pour démontrer l'activité bactéricide spectre 4 à 20°C conforme à la norme NF T 72 151 (1987). Les conditions opératoires choisies, ainsi que le détail des résultats, se trouvent dans les procès-verbaux placés en Annexe D.

c) Application à la solution alcoolique

c'est-à-dire une solution de 0,5% de chlorhexidine dans de l'éthanol à 70° dénaturé.

Les conditions opératoires appliquées lors du premier essai étaient identiques à celles utilisées pour les autres désinfectants, soit un rinçage de la membrane par 150 ml d'eau ultrafiltrée stérile en trois fois, mais n'ont donné de résultats qu'avec *Pseudomonas aeruginosa* ; pour les autres souches, le pouvoir inhibiteur résiduel de la solution désinfectante empêchait les bactéries de se développer sur la membrane lors des essais préliminaires. L'augmentation du volume de rinçage ne suffisait pas à le supprimer, l'emploi d'un neutralisant s'est imposé.

La norme propose en annexe une liste de neutralisants pouvant être ajoutés soit dans le milieu de culture de dénombrement, soit directement dans le liquide de rinçage, dont le polysorbate 80 ou Tween 80. Il a été décidé d'ajouter du Tween 80 à raison de 0,5% à 350 ml d'eau ultrafiltrée stérile pour constituer le liquide de rinçage à utiliser pour la solution alcoolique de chlorhexidine.

Les Essais préliminaires et les Essais définitifs ont alors donné des résultats satisfaisants prouvant l'activité bactéricide spectre 4 à 20°C conforme à la norme NF T 72 151 (1987) de la solution hydro-alcoolique à 0,5% de chlorhexidine (Cf. Procès-verbal en Annexe D).

Il faut souligner que la chlorhexidine est théoriquement inactivée par les tensioactifs non ioniques auxquels appartient le polysorbate 80 ; mais d'autre part, l'addition d'alcool réduit les interactions entre les deux molécules. "Ainsi, une solution alcoolique (10%) double l'activité de la chlorhexidine (0,04%) en présence de Tween 80 (1%)" (19) ; ceci prouve l'importance des essais préliminaires pour vérifier le choix des conditions opératoires.

1.3.4. Conclusion sur les normes AFNOR

L'application de ces normes est très lourde pour un laboratoire de contrôle ; il faut :

- du matériel spécifique, stérilisé après chaque usage, utilisé dans des conditions d'asepsie,
- des souches de caractéristiques précises (à contrôler), commandées aux organismes officiels, conservées et repiquées selon les conditions définies par la norme T 72 140, et ce, pour chaque activité à tester,
- du temps, pour pouvoir réaliser à la suite toutes les manipulations correspondant à un essai, pour pouvoir tester tous les désinfectants utilisés ou entre lesquels le choix se pose, et pouvoir pour chacun vérifier toutes les activités que l'on recherche (bactéricidie avec ou sans substances interférentes, sporicidie, fongicidie et/ou virucidie),
- du personnel formé, qualifié et disponible.

De plus, on ne peut que constater que ces normes ne sont valables que pour des désinfectants à l'état liquide, miscibles à l'eau (ou du moins avec une stabilité suffisante pour permettre l'essai) et satisfaisants aux essais préliminaires (neutralisation possible selon le mode opératoire). Une autre restriction à formuler, serait que ces normes ne tiennent aucun compte de la rémanence du produit et ne permettent pas de la tester.

Par contre, les souches de référence qu'elles imposent, le sont sans aucune restriction : ces mêmes protocoles peuvent être étendus à toute souche contre laquelle on veut diriger l'action du désinfectant, du moment que celles prescrites, échantillon représentatif des souches que l'on peut rencontrer, sont respectées.

1.4- LES NOUVELLES TECHNIQUES

Les normes AFNOR sont donc longues et difficiles à mettre en oeuvre, et présentent de plus quelques restrictions d'emploi ; c'est pourquoi, actuellement, de nombreux scientifiques s'attachent à mettre au point des techniques équivalentes aux tests de stade 1, mais d'application plus simple. Voici un aperçu de ces ouvertures qui s'offrent aux laboratoires de contrôle de l'industrie pharmaceutique.

1.4.1. Les microméthodes dérivées des normes AFNOR

Elles correspondent à une "miniaturisation" des normes NF T 72 150, 200 et 230. Elles permettent donc des contrôles de routine rapides et simplifiés. La comparaison statistique des résultats obtenus par ces méthodes, avec ceux des méthodes traditionnelles, n'a pas mis en évidence de différence significative. (11)

1.4.2. La méthode des stries

Il s'agit du protocole de DESVIGNES et Coll. L'étude porte sur cinq souches bactériennes et se déroule en deux parties :

→ *un essai préliminaire*, pour déterminer la dilution de désinfectant ne provoquant pas de bactériostase pendant la phase d'incubation.

Un microlitre de produit dilué est déposé en stries sur une géloseensemencée en masse par chacune des cinq souches bactériennes. Chaque strie est réalisée au moyen d'une anse calibrée.

Après incubation, aucune inhibition de culture ne doit être observée autour de chaque strie.

→ *puis l'essai proprement dit*, pour évaluer la régression de bactéries revivifiables après contact avec le désinfectant.

L'inoculum bactérien est mis en contact pendant 5 minutes à 21°C avec la dilution validée du produit. A l'aide d'une anse calibrée, 1

microlitre de la préparation est déposé en stries sur une gélose nutritive coulée en boîte de Pétri.

Une boîte témoin est réalisée en ensemençant en stries, différentes dilutions décimales de l'inoculum bactérien, pour évaluer la régression du nombre de bactéries revivifiables.

On retrouve dans ce protocole l'avantage fourni par l'existence d'un essai préliminaire, et ce, avec une plus grande simplicité d'utilisation ; VINCENT constate même une plus grande sévérité quant aux résultats pour la méthode des stries, comparée à la norme NF T 72 151.

Par sa facilité d'application, ainsi que son faible coût, cette méthode paraît bien adaptée à un usage courant, donc au contrôle de l'activité des désinfectants utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Le seul problème évoqué par VINCENT est celui de la neutralisation d'un désinfectant à base de chlorhexidine, tout en précisant qu'une étude plus poussée aurait sans doute permis de sélectionner le neutralisant adéquat (23) ; et le même problème ne s'est-il pas posé avec la norme AFNOR ?

DARBORD, en citant cette méthode, met pour sa part en valeur, outre la rapidité de mise en oeuvre, sa capacité d'application à de très nombreuses souches. (6)

1.4.3. Disparition de l'activité succino-déshydrogénasique

La première partie de ce test consiste à vérifier que la bactérie étudiée possède bien une succino-déshydrogénase ou toute enzyme équivalente, rendant le test possible.

En 3 à 4 minutes, un filtre contaminé par une suspension d'une telle bactérie deviendra, au contact d'une solution de succinate de sodium et de chlorure de tétrazolium, d'une couleur bleu intense, par formation de formazan. Le test consistera alors à tester de la même façon des préparations résultant du contact entre les bactéries et la solution désinfectante, à des concentrations différentes et à des temps différents, en recherchant l'absence de coloration du filtre.

Une approche quantitative peut être obtenue en dissolvant le formazan formé dans de l'acétone, et en titrant la solution obtenue par photolorimétrie.

Ce test permet donc une détermination rapide qualitative et/ou quantitative de l'activité d'une solution désinfectante, ainsi que la détermination du temps de contact optimal. La reproductibilité de la méthode a été démontrée pour plusieurs produits, sur plusieurs souches de référence, mais également sur des micro-organismes pathogènes ou de l'environnement. (24)

1.4.4. Conclusion

Ces tests, qui doivent faire la preuve de leur validité et de leur reproductibilité, ainsi que de leur équivalence aux normes officielles, ont l'avantage d'être plus rapides à exécuter, et généralement moins onéreux. D'autre part, la recherche se tourne vers des méthodes automatisables afin de faciliter les contrôles de routine. Mais ils ne pourront être utilisés par les industriels utilisateurs de désinfectant qu'à condition de ne pas mettre en jeu un matériel et des produits inhabituels pour le laboratoire de contrôle ou trop coûteux.

Par ailleurs, jusqu'à présent, ces tests ne permettent de remplacer que les normes de détermination de l'activité bactéricide, et ils ne sont pas reconnus officiellement : les tests normatifs restent encore de rigueur.

2 / LES TESTS DE STADE 2

Les tests dits de stade 2, ou "normes d'application" (11) correspondent à une étude expérimentale au laboratoire, de méthodes spécifiques adaptées aux différents types d'utilisation des désinfectants. (7)

On peut en distinguer deux sortes :

1. les essais testant l'action du désinfectant dans des conditions particulières se rapprochant de l'utilisation réelle, par variation de certains facteurs, comme la présence de substances interférentes ;
2. les tests de porte-germes ou "carrier tests", où le désinfectant, au lieu d'être mis en contact avec une suspension de micro-organismes dans un milieu liquide donné, devra exercer son action sur des micro-organismes fixés sur des supports divers.

Comme pour les tests de stade 1, l'internationalisation des essais est loin d'être réalisée. En outre, ces tests n'existent pas dans tous les pays, certains les incluent dans les tests de stade 1 et d'autres les considèrent comme des tests d'efficacité sur le terrain de stade 3 ; de plus, les tests existants sont souvent controversés et leur fiabilité mise en cause (7). Une entente mondiale est donc actuellement difficilement possible.

Les tests de stade 2 ont pourtant une place de choix dans l'évolution de l'étude purement théorique des tests de stade 1 vers les essais sur le terrain de la solution désinfectante.

2-1. LES TESTS EVALUANT L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS

Dans cette famille de tests, on trouve essentiellement les normes AFNOR NF T 72 170 et NF T 72 171 permettant d'étudier l'influence de substances interférentes de référence sur l'activité bactéricide des désinfectants, en suivant des méthodes qui sont des répliques des méthodes utilisées dans les normes NF T 72 150 et NF T 72 151.

Le désinfectant est testé de la même façon que pour ces normes (par dilution - neutralisation ou par filtration sur membranes), mais les

bactéries et le produit sont en contact avec des substances interférentes de référence, représentant les grandes classes d'interférences que l'on peut rencontrer en pratique ; ce sont :

- l'albumine bovine, en tant que protéine,
- l'extrait de levure, en tant qu'hydrolysate cellulaire,
- une solution de calcium et une solution de calcium et de magnésium, pour retrouver les eaux de duretés normalisées,
- deux solutions tampons, en tant que milieux acide et basique,
- et enfin un mélange albumine/eau dure, pour simuler les "conditions de propreté et de saleté" des méthodes d'essais des désinfectants destinés à l'hygiène alimentaire du Conseil de l'Europe. (2)

"Ces normes sont appelées à être remplacées, dans le futur, par des normes NF T 72 300 et NF T 72 301 ("Détermination de l'efficacité des produits sur divers micro-organismes, dans les conditions pratiques de l'emploi") qui, tout en s'inspirant largement de la norme NF T 72 170, autoriseront des variations de température, temps de contact, nature du milieu de réaction, nature des souches." (11) Ces normes sont encore à l'état de projets.

Ainsi, entreront dans cette catégorie, tous les tests, normalisés ou non, qui permettront de tester certains paramètres fixés a priori par les normes de stade 1. En effet, une extension de la norme NF T 72 150 par l'application des essais à une autre souche que les souches de référence citées, choisie pour sa fréquence élevée sur la surface à désinfecter, sera une façon de tester le désinfectant dans des conditions se rapprochant de la réalité. On peut citer comme autre exemple, la méthode de disparition de l'activité succino-déshydrogénasique vue précédemment, qui permet de décider d'un temps de contact optimal entre bactéries et désinfectant, et rejoint donc ce type d'essais quand elle est utilisée dans cette optique.

Un tout autre cas est celui des "tests de capacité", dont le test de Kelsey-Sykes, devenu norme britannique (BS = British Standard) : on y cherche à mesurer l'activité résiduelle d'une solution désinfectante après addition successive de suspension bactérienne, ce qui diminue sa capacité microbicide. Le but de ce test est de mimer la contamination progressive d'une solution désinfectante à chaque fois que le matériel de désinfection y est plongé. (8)

2-2. LES TESTS AVEC PORTE-GERMES = CARRIER TESTS

2.2.1. Historique

La première apparition d'un tel test dans la littérature est due, en 1881, à Robert KOCH qui testait l'activité de désinfectants sur des spores de *Bacillus anthracis* séchées sur un fil de soie.

Puis les progrès notables ont été apportés en 1949 par HEICKEN dans ses tests pratiques pour la désinfection des surfaces, où des supports de nature variée étaient contaminés par des bactéries et la quantité maximale acceptée de survivants après contact avec le désinfectant, fixée en tenant compte de la mort spontanée par dessiccation. (8)

En effet, il n'est pas possible dans ces conditions de distinguer les micro-organismes morts par action du désinfectant, de ceux non revivifiables par mort spontanée ; on peut connaître la réduction de micro-organismes par mort spontanée à partir de la formule suivante :

$$SD = \log N_i - \log N_c$$

avec SD : Spontaneous Death = mort spontanée

N_i : nombre de micro-organismes dans l'inoculum

N_c : nombre de micro-organismes par porte-germes

dans le contrôle sans désinfectant,

formule qui rend compte de l'influence de la dessiccation et de la manipulation. (25)

Jusqu'à maintenant, toutes les modifications effectuées sur des tests de stade 2, se sont faites sur la base de ce test de Heicken.

2.2.2 Les tests actuels

2.2.2.1. Aux Etats-Unis

Officiellement, le test permettant de juger de l'activité des désinfectants est le test de l'AOAC appelé "use-dilution test" : on détermine à l'aide de cylindres d'acier contaminés artificiellement, la dilution maximale de désinfectant, encore active.

Ce test, très peu reproductible, est appelé à disparaître, et sert essentiellement maintenant à classer les désinfectants par détermination de leur spectre d'activité. (26)

2.2.2.2. En Allemagne

Le test choisi par la DGHM est une adaptation du test de Heicken, avec évaluation de l'activité à partir du facteur de réduction de la population microbienne ou RF. (8)

Il s'agit d'un test semi-quantitatif.

2.2.2.3. En France

Le test officiel est celui proposé par la norme AFNOR NF T 72 190, dénommée :

"Désinfectants de contact utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau.
Méthode des porte-germes.

Détermination de l'activité bactéricide, fongicide et sporicide."

Les micro-organismes sont fixés sur des supports de référence, lisses (verre, acier...) et l'activité du désinfectant jugée en fonction du nombre de micro-organismes revivifiables retrouvés sur le support et dans le liquide de rinçage. On peut souligner l'addition de lait dans la suspension microbienne, pour limiter la mort naturelle.

Il s'agit d'une norme quantitative qui, comme les normes de stade 1, contient un essai préliminaire vérifiant la validité des résultats de l'essai proprement dit. Les réductions exigées sont de :

- 99,999% de bactéries,
- 99,99% de cellules végétatives de levures ou de spores de moisissures,
- et 99,9% de spores bactériennes. (2)

2.2.2.4. Autres tests

Ces tests sont mis au point par certains pays, afin d'obtenir un essai quantitatif à partir d'anciens tests semi-quantitatifs.

Il s'agit aux Pays-Bas du QCT = Quantitative Carrier Test de B. Van Klingerén et en Belgique du QSDT ou Quantitative Surface Disinfection Test, combinaison entre leur ancien test semi-quantitatif : le test de Leuwen, et le QCT. (21)

2.2.2.5. Comparaison entre ces tests

En 1990, G. REYBROUCK publiait ses résultats sur la comparaison des trois tests : test de la DGHM, test de Leuwen et norme NF T 72 190, par rapport à des désinfectants divers.

Une étude statistique des résultats (donnés en RF) montrait une différence significative entre ces tests (par le test de Wilcoxon). Il expliquait cette disparité comme suit : "bien que les trois techniques déterminent en fait la même qualité de la préparation (son activité antibactérienne), au moyen de la même unité (RF) et bien qu'elles soient basées sur la même démarche, des différences significatives dans l'activité sont observées. (...) La seule explication est que les différents résultats sont dus aux différences dans les techniques d'essais." De plus, ces différences (temps d'exposition, tests quantitatifs ou semi-quantitatifs, quantité de désinfectant par rapport au nombre de micro-organismes, présence de matière organique...) conduisent à des niveaux de sévérité différents : le test de Leuwen est le plus draconien de tous, puis le test français est plus rigoureux que le test allemand, mais cette échelle n'est pas toujours vérifiée. (21)

L'étude comparée des cinq tests NF T 72 190, test de la DGHM, test de Leuwen, QCT et QSDT, sur plus de trente désinfectants, concluait à des résultats corrélés uniquement pour les quatre derniers, avec encore des différences de sévérité sensibles, en précisant que le niveau de sévérité du test est dépendant de la souche testée. (21)

Une autre étude, en 1991, confirmait qu'un désinfectant peut "passer la barre" d'un test très sévère en ne rentrant pas pour autant dans les limites d'un test plus laxiste, et surtout que selon la souche choisie comme élément d'étude, les différences de réponses aux tests peuvent être très importantes. Notamment, G. Reybrouck arrivait ainsi à conclure à l'acceptabilité de 7 désinfectants sur les 29 contrôlés selon les normes américaines, et de 22 sur 29 selon les normes allemandes. (8)

3 / CONCLUSION

La logique elle-même explique le cheminement opéré jusque là : le désinfectant choisi en fonction des besoins réels, fait la preuve de son activité intrinsèque par les tests de stade 1 (phase indispensable) et de sa capacité prévisionnelle à être utilisé dans les conditions particulières propres à chaque cas, par des tests de stade 2 appropriés.

Son efficacité dans le contexte de son emploi, doit encore être prouvée, pour vérifier son exacte adéquation avec les besoins de l'industriel.

On peut cependant noter que les tests de stade 2 ne sont pas obligatoires, surtout en l'état actuel de leur reconnaissance ; ils sont pourtant très utiles pour prévenir des incohérences qui ne seraient apparues que lors de la dernière phase d'étude du désinfectant (in loco) et donc de gagner du temps, si le désinfectant jusqu'alors étudié s'avisait doré et déjà ne pas correspondre, en l'abandonnant au profit d'un autre, plus adapté.

TROISIEME PARTIE
=
CONDITIONS D'UTILISATION

Pour chaque solution désinfectante, voire même pour chacune des dilutions utilisées, ainsi que pour chacun des types d'emploi, une étude adaptée doit être réalisée afin de contrôler l'efficacité de la désinfection et la qualité de sa mise en oeuvre.

En effet, le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication dans l'utilisation des désinfectants doit "garantir l'activité des produits et préparations dans les conditions d'utilisation, qui comportent des gestes de prolongement de la fabrication" ; "ceci implique non seulement le contrôle de l'efficacité des dilutions prescrites pour l'emploi selon les usages, mais aussi l'assurance de la stabilité de ces dilutions pendant la période de l'emploi. Les désinfectants devront alors être utilisés judicieusement (...) au niveau de l'industrie pour garantir la production de médicaments, quels qu'ils soient, ayant la qualité requise." (7)

Il faut donc évaluer la validité des résultats obtenus lors des étapes précédentes, notamment avec les tests de stade 1 et de stade 2, mais également assurer la qualité du produit et de son utilisation durant toute sa vie dans l'industrie.

1 / ACHAT DU DESINFECTANT

Citons les recommandations des Bonnes Pratiques de Fabrication (Chapitre 5), qui soulignent parfaitement les précautions à prendre lors d'un achat de matière première, et que l'on peut adapter à l'achat des désinfectants, en tenant compte du fait que le désinfectant n'est pas officiellement apparenté à une matière première.

"5.25. L'achat de matières premières est une opération importante qui requiert un personnel possédant une connaissance particulière et approfondie des fournisseurs.

5.26. Les matières premières ne doivent être achetées qu'auprès de fournisseurs agréés, cités dans les spécifications correspondantes ; si possible, l'achat doit se faire directement chez le producteur. Il est souhaitable que le fabricant du médicament discute avec les fournisseurs les spécifications qu'il a établies pour les matières premières. De même, il est utile que tous les aspects de la production et du contrôle des matières premières en question, y compris la manutention, l'étiquetage, les exigences de conditionnement ainsi que les procédures de réclamation et de refus soient discutés avec le producteur ou le fournisseur.

5.27. A chaque livraison, l'intégrité des emballages ou des récipients doit être contrôlée, ainsi que leur fermeture et la correspondance entre le bon de livraison et l'étiquette du fournisseur.

5.28. Lorsqu'une livraison de matières premières est constituée de différents lots, ceux-ci doivent être considérés séparément pour l'échantillonnage, l'analyse et l'acceptation.

5.29. Les matières premières stockées doivent être correctement étiquetées. Les étiquettes doivent porter au moins les informations suivantes :

- le nom utilisé dans l'établissement pour le produit et, le cas échéant, le code interne ;
- un numéro de lot attribué lors de la réception ;
- le statut du contenu (par exemple en quarantaine, en cours d'analyse, accepté, refusé) ;
- le cas échéant, la date de péremption ou une date après laquelle un nouveau contrôle s'impose.

En cas d'utilisation de systèmes de stockage totalement informatisés, l'ensemble des informations détaillées ci-dessus ne doit pas nécessairement apparaître en clair sur l'étiquette.

5.30. Une procédure ou des dispositions appropriées doivent donner toutes les garanties concernant l'identité du contenu de chaque récipient de matière première. Les récipients dans lesquels des échantillons ont été pris doivent être identifiés.

5.31. Seules peuvent être utilisées en fabrication les matières premières qui ont été libérées par le département du contrôle de qualité et qui sont en cours de validité.

5.32. Les matières premières ne peuvent être délivrées que par des personnes désignées à cet effet et selon une procédure écrite, ceci en vue de garantir que les matières premières prévues sont bien pesées ou mesurées avec précision dans des récipients propres et correctement étiquetés.

5.33. La nature de chaque substance délivrée, ainsi que son poids ou son volume, doivent être vérifiés indépendamment et la vérification notée." (12)

Certains points trop lourds à gérer (notamment les points 5.32 et 5.33) peuvent être allégés puisque le désinfectant n'entre pas dans la composition du médicament, et d'autant plus qu'il n'entre à aucun moment en contact direct avec lui.

En ce qui concerne l'échantillonnage des désinfectants, le fait de ne pas savoir si un désinfectant doit être considéré comme une matière première, pose des problèmes : doit-on suivre à la lettre les règles des Bonnes Pratiques de Fabrication et prélever des échantillons représentatifs de chaque lot, les "conserver aussi longtemps que sont conservés les échantillons des produits finis fabriqués avec ces lots" et ce "en quantité suffisante pour effectuer au moins une analyse" ? (12)

Il faut en tous cas se rapprocher au maximum de ces suggestions, en les adaptant en fonction des tailles des lots de désinfectants, et en sachant que les commandes de désinfectants ne se font pas forcément en relation avec les changements de lot du médicament. On peut se demander si, à l'avenir, quand un produit sert à la désinfection d'une surface en contact avec le médicament à un stade ou un autre de la fabrication, l'utilisation d'un nouveau lot de désinfectant n'entrera pas en compte dans l'attribution des numéros de lot du médicament.

2 / RAPPEL SUR LES PROCEDURES

Le terme de procédures apparaît dans l'extrait des Bonnes pratiques de Fabrication cité précédemment, à propos de l'approvisionnement en matière première. C'est un terme qui va être souvent retrouvé dans la suite de l'exposé, qu'il convient donc de resituer dès maintenant dans le contexte de la qualité au sein de l'industrie pharmaceutique.

Une procédure, souvent appelée P.O.S. pour Procédure Opératoire Standardisée, est, d'après les Bonnes Pratiques de Fabrication, "la description des opérations à effectuer, des précautions à prendre ou des mesures à prendre dans un domaine, directement ou indirectement en rapport avec la fabrication des médicaments." (12) C'est un document propre à l'entreprise.

Elle doit donc comporter toutes les indications nécessaires au bon déroulement de la manipulation, à sa répétabilité et sa reproductibilité, et ce dans un style approprié avec un vocabulaire clair et sans ambiguïté. Toute procédure doit suivre un plan chronologique, en répondant aux questions : Qui fait Quoi, Quand, Comment, Où, Avec quoi, Pourquoi et A quelle fréquence. Elle doit être contrôlée et signée et avoir l'approbation du Service d'Assurance de la Qualité.

Par ailleurs, pour être officialisée, une procédure doit faire l'objet d'une validation, donnant la preuve qu'elle permet réellement d'atteindre les objectifs fixés. Des validations régulières ou en cas de modifications, doivent être prévues pour assurer le maintien de la validité des résultats.

Le personnel concerné se doit de la consulter aussi souvent qu'il est nécessaire, et de l'appliquer dûment, afin d'éviter tout écart, qui ne garantirait plus l'assurance d'obtenir le résultat escompté.

Il est conseillé de rédiger des procédures pour tout point critique de la fabrication (dont les opérations de désinfection) et de confier la rédaction directement à ses utilisateurs.

3 / PREPARATION DU DESINFECTANT

Nous évoquerons dans cette partie "l'histoire" du désinfectant depuis son arrivée dans l'entreprise jusqu'à son utilisation.

Plusieurs cas peuvent se présenter :

1. le désinfectant arrive dans un contenant scellé, et est employé tel quel, sans aucune dilution (par exemple l'eau oxygénée à Rhône-Poulenc Rorer). La seule chose à prévoir dans ce cas, sera le stockage des récipients en attente d'utilisation.
2. la solution désinfectante active résulte d'une préparation à partir de divers produits : il faudra définir le mode opératoire et les conditions de préparation de la solution ; si cette préparation est faite extemporanément, juste avant l'opération de désinfection, seul le stockage des principes actifs la constituant devra être envisagé, alors que si la préparation a lieu à des fréquences données mais "à distance" de l'opération de désinfection, les conditions de stockage seront à étudier à la fois pour les principes actifs en attente de préparation et pour la solution définitive en attente d'utilisation.

3-1. PROCEDURE DE PREPARATION

Il est indispensable, comme pour toute opération réalisée au cours d'une production pharmaceutique, de consigner par écrit la technique de fabrication de la solution désinfectante telle qu'elle est utilisée. Ainsi, la procédure de préparation d'une solution désinfectante devra contenir, clairement énoncés :

- ◆ Le nom et les caractéristiques du désinfectant initial utilisé (formulation, marque, références nécessaires à une nouvelle commande...)
- ◆ La dilution ou les mélanges à effectuer, ainsi que les caractéristiques des autres produits nécessaires (par exemple, il faut préciser la nature exacte de l'eau à utiliser pour la dilution)

- ◆ Le matériel à utiliser, y compris le contenant final de la solution
- ◆ Le protocole opératoire, précis mais simple
- ◆ Les règles d'étiquetage à suivre
- ◆ Et enfin, les lieux et conditions éventuelles du stockage avant l'utilisation.

Il faut penser à préciser tous les points critiques de la manipulation, notamment :

- les techniques de nettoyage, voire de stérilisation des récipients vides et des bouchons, en insistant sur l'obligation de nettoyer un récipient avant de le remplir, même s'il contenait le même produit,
- la technique de séchage de ces récipients après lavage,
- et la méthode exacte de dilution, sans se contenter de donner le pourcentage à obtenir dans la solution finale : les proportions exactes de chaque constituant doivent être précisées pour éviter les "à peu près".

3-2. CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE CONSERVATION

Chaque produit chimique possède ses particularités de stabilité au cours du temps ; certains seront sensibles à la lumière, d'autres à l'oxygène, etc. La bonne connaissance de la formulation des désinfectants utilisés permet donc de prévoir leur capacité à rester actifs au cours du temps, ainsi que les conditions dans lesquelles ils devront être conservés pour les préserver au maximum du vieillissement.

Si la solution désinfectante doit être préparée extemporanément, la solution-mère devra être stockée selon les directives du fournisseur. Si la solution peut être préparée à l'avance en plus grandes quantités que celles nécessaires à une seule opération de désinfection, il convient de rechercher le matériau le plus adéquat à sa conservation (il ne doit pas y avoir d'interaction chimique avec le principe actif) en considérant les

impératifs de stockage : récipient hermétiquement fermé, opaque aux rayons ultraviolets le cas échéant, de forme compatible aussi bien avec la fabrication (pour éviter des manipulations de transvasement qui multiplient les risques de contamination microbienne) qu'avec le lieu de stockage (il faut éviter les pertes de place). La température du lieu de stockage peut également avoir son importance. (18)

Il convient de tester l'activité des désinfectants après certaines durées de stockage dans les conditions définies, si possible par des tests de stade 1, pour fixer la durée maximale de stockage à respecter pour assurer une bonne désinfection. Pour les solutions du commerce, le fabricant indique généralement la durée de conservation du produit ou de ses dilutions.

En outre, des règles d'étiquetage devront être adoptées pour faciliter le roulement des stocks et la bonne utilisation du produit. Sur chaque récipient contenant la solution désinfectante, qu'il soit récipient de stockage ou d'utilisation, doit être accolée une étiquette portant les mentions suivantes :

- Identification du produit : nom, concentration...
- Date de fabrication
- Date limite d'utilisation
- Secteurs d'utilisation
- Précautions d'emploi ou de stockage. (18)

L'utilisation de pastilles de couleur, voire de récipients de couleurs différentes, pour distinguer les produits en fonction de leur date limite d'utilisation, est reconnue comme plus adaptée à la mémoire et à l'attention humaine, et ainsi plus à même de s'intégrer dans le travail quotidien ; elle permet un auto-contrôle rapide et peu contraignant, qui sera donc plus facilement réalisé.

La gestion du stock devra être aussi minutieuse que pour toute matière première, et notamment elle devra comporter la vérification des dates de préparation et/ou de péremption ; l'application de la règle du FIFO (c'est-à-dire First in/First out, soit premier entré/premier sorti) facilitera cette conformité aux dates.

Pour donner quelques exemples, reprenons les désinfectants étudiés sur un plan pratique :

- ~ Les phénols doivent être conservés à l'abri de la lumière. (11)
- ~ L'eau de Javel doit être conservée :
 - à l'abri de la lumière, car les rayons ultraviolets favorisent la formation de chlorates inactifs. Elle peut alors être conservée environ six mois sans baisse sensible de titre, si elle n'est pas diluée,
 - dans des récipients en verre, émail, ou plastique, soigneusement nettoyés et bouchés (volatilité),
 - au frais, car la chaleur provoque une diminution de stabilité.(11) (15)
- ~ L'eau oxygénée doit être conservée dans des récipients fermés et entièrement remplis, pour éviter la libération d'oxygène et une perte de titre. (11)
- ~ La chlorhexidine doit être conservée à l'abri de l'air et de la lumière, à moins de 25°C. Les dilutions ne peuvent être conservées. (11) De plus, il ne faut pas utiliser de bouchons de lièges car leurs tanins inactivent la chlorhexidine. L'expérience a montré qu'une solution à 0,5% dans l'alcool à 70° peut être conservée six mois sans risque, alors qu'une solution aqueuse à 0,05% ne doit pas l'être plus de 8 jours. (19)

3-3. CONTROLE DE STERILITE

Les précautions qu'il faut prendre lors de la préparation de la solution et de son stockage, ont pour objet, comme on vient de le voir, d'assurer son activité donc son efficacité dans les conditions prévues, mais également de prévenir une contamination microbienne, que ce soit à la fabrication, ou durant le stockage. De plus, tout micro-organisme qui

serait apporté par le désinfectant, aurait eu toute latitude de s'y adapter et donc de lui être résistant : l'utilisation de ce désinfectant serait alors dangereuse. D'autre part, son efficacité en serait diminuée. S'assurer de la stérilité de la solution désinfectante au moment de son utilisation, c'est faire la preuve de l'innocuité de son emploi.

Ce problème de contamination du désinfectant sera d'autant plus sensible s'il n'est pas utilisé en une seule fois, mais reste à disposition pendant une durée déterminée (comme un désinfectant en pulvérisateur). Il faudra valider la stérilité du désinfectant sur la durée totale de son utilisation, c'est-à-dire après la fabrication, à la date limite d'utilisation, mais également pendant toute la période d'emploi dans les conditions réelles. Les résultats obtenus peuvent être déterminants quant à la fréquence de renouvellement de la solution.

L'étude effectuée par S.M. NKIBIASALA et ses collaborateurs sur les risques de contamination de sept produits, a démontré qu'une procédure correcte de fabrication permettait d'obtenir des produits de qualité pouvant être stockés longtemps sans problème. Les contaminants retrouvés étaient à des taux très faibles et venaient généralement de l'utilisation de récipients non stériles en plastique ou de l'opération de remplissage de ces récipients. Par ailleurs, la plupart de ces contaminants disparaissaient durant le stockage (étude sur six mois). (27)

On peut donc dire que si toutes les opérations sont réalisées dans de bonnes conditions, selon des procédures validées, le risque est faible, sans toutefois rendre les contrôles inutiles.

Nous présentons pour illustrer ce sujet, la technique de vérification de la stérilité des solutions désinfectantes, mise au point à Rhône-Poulenc Rorer.

3.3.1. Méthode de contrôle de la stérilité

3.3.1.1. But et principe

Le but de ce contrôle est de vérifier, par filtration sur membranes, l'absence de contamination des solutions désinfectantes. Ce contrôle répond à la loi du tout ou rien.

Le principe en est le suivant : la solution désinfectante est filtrée sous vide ; la membrane est alors rincée par trois fois avec de l'eau ultrafiltrée, puis mise à incuber, tandis que le dernier filtrat est récupéré pour vérifier la validité de la méthode en recherchant un pouvoir inhibiteur résiduel du désinfectant (PIR).

3.3.1.2. Précautions de manipulation

Il faut travailler aseptiquement depuis le prélèvement jusqu'au contrôle proprement dit, et n'utiliser pour cela que du matériel stérile.

(Se référer aux procédures correspondantes existant dans l'entreprise).

3.3.1.3. Matériel et réactifs nécessaires pour un contrôle

1. 2 appareils à filtration : Stérifils de Millipore
2. 2 membranes de type adapté à la solution désinfectante à tester, de taille correspondant à l'appareil de filtration et dont les pores ont un diamètre de 0,45 μm
Pour les solutions aqueuses : membranes MILLIPORE type HA, à stériliser à l'autoclave (118°C pendant 45 minutes)
Pour les solutions alcooliques : membranes GELMAN TF 450 Prod. 66149 (mêmes conditions de stérilisation)
3. 2 pinces plates
4. 2 flacons de 400 ml d'eau ultrafiltrée (EUF)
5. 2 boîtes de gélose trypticase-soja (TS)
6. 1 flacon de récupération des filtrats
7. 6 pipettes de 2 ml
8. 3 tubes contenant 14 ml de bouillon TS, marqués D, F1 et F2
9. bouillon de *Sarcinea lutea* ATCC 9341 (culture de 24 à 48 h)
10. environ 210 ml de la solution désinfectante à tester

3.3.1.4. Méthode

Le contrôle de la stérilité et le test de validité de la méthode (absence de pouvoir inhibiteur résiduel après la dernière filtration) sont effectués en parallèle.

Test de stérilité :

100 ml de la solution désinfectante sont filtrés sous vide dans des conditions aseptiques. La membrane est alors rincée par 2 fois 400 ml d'EUF. Le troisième rinçage (par 400 ml d'EUF également) doit permettre de garder le dernier filtrat. La membrane est alors récupérée et placée sur une gélose TS.

Cette opération est recommencée une seconde fois avec du matériel propre et stérile.

L'une des géloses est mise à incuber en étuve à 32°C, l'autre à 25°C, pendant 7 jours.

La lecture des résultats consistera en un dénombrement des unités formant colonies (ufc) apparues sur la membrane, et en une identification de ces micro-organismes.

Recherche du PIR :

Les trois tubes de bouillon TS sont complétés respectivement par 2 ml de désinfectant pour le tube D, et 2 ml des derniers filtrats de chaque filtration, pour les tubes F1 et F2. Deux gouttes de culture de *Sarcinea lutea* (dont la concentration est vérifiée par spectrophotométrie) sont alors ajoutées dans chaque tube. Après agitation, les tubes sont mis à incuber à 37°C pendant 7 jours.

Le développement de *Sarcinea lutea* visualisé par l'apparition d'un anneau jaune à la surface du bouillon, sera noté ' + ' ; un tube sans trouble (pas de développement) sera noté ' - '.

3.3.1.5. Interprétation des résultats

a) Absence de pouvoir inhibiteur résiduel

On cherche à prouver que les rinçages sont suffisants pour supprimer le désinfectant de la membrane, et ainsi à donner la preuve que si des micro-organismes étaient présents dans la solution, ils pourraient se développer sur la membrane. Le tableau suivant passe en revue les différents cas possibles et leur interprétation :

F1 '+' et F2 '-' ou l'inverse	Problème lors de la manipulation => Refaire les filtrations et le test de validation
D '+' F1 et F2 '-'	Problème lors de la manipulation => Refaire les filtrations et le test de validation ; vérifier la nature du micro-organisme
D '+' F1 et F2 '+'	A cette dilution, le désinfectant n'est pas efficace sur <i>Sarcinea lutea</i> => Essayer en augmentant les volumes de désinfectant et filtrats dans les tubes de bouillons, tout en s'assurant de rester en deçà de la concentration d'utilisation du désinfectant
D '-' F1 et F2 '-'	Existence d'un pouvoir inhibiteur résiduel => Augmenter les quantités d'eau de rinçage; éventuellement, utiliser un neutralisant.
D '-' F1 et F2 '+'	Le désinfectant est actif sur la Sarcine à cette dilution, alors que les filtrats ne le sont plus. = Absence de PIR La méthode est validée.

b) Stérilité du désinfectant

Les résultats de stérilité ne seront interprétables que si la validité de la méthode a été prouvée.

Le produit testé sera considéré comme stérile si aucune unité formant colonie n'est retrouvée sur les deux membranes après 7 jours d'incubation ; la reproductibilité sur trois tests consécutifs permettra de généraliser ce résultat à la solution désinfectante.

3.3.2. Résultats obtenus

Les tableaux ci-après présentent les résultats obtenus à Rhône-Poulenc Rorer : en premier lieu, les résultats de la validité de la méthode, puis ceux de la stérilité des désinfectants.

Pour comprendre les essais effectués, il faut d'abord présenter les conditions de test des désinfectants, le but étant d'être le plus prêt possible des conditions réelles :

* l'eau de Javel diluée à 10% le jour même, était prélevée après 3 heures d'attente dans un seau à l'air ambiant, dans le sas "sortie du matériel" de la zone de production ; les essais ont été réalisés sur les préparations de trois jours différents ;

* l'eau oxygénée à 30 volumes était testée en flacons neufs, sur trois lots différents ;

* le CLINISEPT® était dilué dans les mêmes conditions que pour son utilisation, et prélevé après trois heures d'attente dans le sas matériel ; les tests ont été effectués sur trois jours ;

* la solution hydro-alcoolique de chlorhexidine, après filtration sur membrane de 0,22 μm de porosité, était distribuée dans des pissettes, utilisées pendant au maximum une semaine. Les tests ont donc été réalisés sur la solution le jour de sa fabrication (J0) et 7 jours après (J7) pour tester sa stérilité dans le temps, et ce sur différents lots de fabrication : premier lot testé dans trois pissettes différentes et trois autres lots testés en fonction de leurs dates de fabrication. (La stérilité des pissettes utilisées avait été vérifiée auparavant.)

Validité de la méthode :

	11, 12 et 13 mars 1992	12 février, 04 et 12 mars 1992	11, 12 et 13 mars 1992	01 avril 1994 sur 3 pissettes
	Eau de Javel	Eau oxygénée	CLINISEPT	Alcool + chlorhexidine
D	- - -	- - -	- - -	- - -
F1	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
F2	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Stérilité des désinfectants :

	Eau de Javel		Eau oxygénée		CLINISEPT		Alcool + chlorhexidine			
Temp.	32°C	25°C	32°C	25°C	32°C	25°C	32°C		25°C	
Essai							Jo	J7	Jo	J7
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4							-	-	-	-
5							-	-	-	-
6							-	-	-	-

Pour conclure, le premier tableau montre que pour les quatre solutions testées, la méthode utilisée était valide, donc les résultats interprétables.

Le deuxième tableau révèle que toutes les solutions ont donné la preuve de leur stérilité dans leurs conditions d'utilisation, y compris dans la durée de leur utilisation quand ce point était à prendre en compte.

4 / UTILISATION

Un désinfectant, quelle que soit sa qualité initiale, ne pourra réellement être efficace que s'il est utilisé à bon escient. Il faut donc "réguler" les conditions de son utilisation, c'est-à-dire prévoir des procédures et des plans de désinfection, former le personnel en conséquence et contrôler l'efficacité finale.

4-1. CONDITIONS D'UTILISATION

Avant la rédaction de ces procédures, les conditions exactes de l'emploi du désinfectant doivent être déterminées : une désinfection seule est-elle suffisante ou doit-elle succéder à une phase de nettoyage, pour réduire les taux de matières protéiques (qui diminueraient son efficacité) et la masse microbienne ?

Les études précédentes de l'activité du désinfectant, et notamment en présence de substances interférentes, donnent les directions à prendre dans l'application.

4.1.1. Nettoyage préalable

Il est souvent indispensable, surtout dans les zones où la contamination est importante. En effet, comme dans le cas d'une stérilisation, la réduction logarithmique provoquée par le désinfectant sera plus efficace sur une faible masse microbienne initiale. De plus, le biofilm qui se forme progressivement à partir des matières organiques protège les micro-organismes de l'action des désinfectants.

Deux possibilités s'offrent alors :

- utiliser simultanément dans une même solution un désinfectant et un détergent ; ceci est de plus en plus courant dans les produits du commerce, pour lesquels l'action des deux produits a été testée dans ces conditions par le fabricant, mais il est risqué de réaliser soi-même son mélange sans une étude approfondie des interactions possibles entre les deux produits : il peut y avoir inactivation de l'un ou de l'autre ou, plus dangereux, réaction chimique avec formation d'un produit toxique.

L'avantage de ce système est une réduction du temps global de l'opération. (3)

- la deuxième possibilité est d'utiliser successivement les deux produits ; les recommandations actuelles sont assez en accord pour prescrire des lavages, généralement à l'eau, avant et après le nettoyage, pour assurer la reproductibilité du nettoyage puis de la désinfection, par un niveau de contamination initial constant. (28) Le rinçage du produit détergent est indispensable pour éviter les interactions avec le désinfectant.

4.1.2. Le matériel utilisé

Une attention particulière doit être portée aux outils utilisés pour l'opération de désinfection. Qu'il s'agisse de balais, d'éponges ou de lingettes, leur choix doit être à la fois adapté à la surface à désinfecter et au produit (risque d'absorption du produit). Pour limiter les variations, le matériel à utiliser doit être standardisé, ainsi que les techniques d'utilisation, de nettoyage s'ils sont à usage multiple, et de stockage. La stérilité de la solution désinfectante tout au long de son utilisation ayant été prouvée, il ne faut pas la re-contaminer par les ustensiles de nettoyage. Il est évident qu'il faut éviter au maximum de les replonger dans le seau car cela risque d'introduire dans la solution les micro-organismes préalablement essuyés. Ce phénomène doit être pris en compte lors des essais d'activité dans le temps du produit.

Par ailleurs, si les ustensiles ne sont pas à usage unique, il est conseillé de les réserver à un usage donné, afin d'éviter la contamination croisée avec d'autres produits désinfectants, produits de nettoyage, principes actifs de médicaments ou micro-organismes provenant d'une autre zone de l'entreprise.

Leur stockage avant et/ou après utilisation, doit se faire dans des conditions rationnelles, en s'assurant de leur propreté, voire de leur stérilité. Notamment, ils doivent être séchés avant d'être rangés, et surtout ne jamais rester dans un liquide. (28)

4.1.3. Quand désinfecter ?

Il est indispensable de prévoir quand la surface devra être désinfectée et/ou de définir la fréquence de l'opération. Selon la surface et son rôle dans la fabrication du médicament, cette opération pourra être réalisée soit à une fréquence déterminée, soit après chaque utilisation. Ceci doit être décidé en fonction des besoins et de la contamination microbienne de la zone.

En outre, il faut penser à tout imprévu pouvant impliquer une désinfection supplémentaire, comme un produit renversé par inadvertance ou une intervention de maintenance.

Dans certains cas, il est possible d'instaurer des opérations de désinfection superficielles en routine, auxquelles se rajouteront à période fixe des désinfections complètes (de la zone entière).

L'alternance des désinfectants est préconisée (un produit différent tous les quinze jours) pour éviter toute adaptation des micro-organismes : en effet, certaines souches pourraient devenir résistantes à un désinfectant utilisé de façon prolongée, par une mutation transmise aux cellules filles lors de leur multiplication ou à d'autres bactéries par transfert et recombinaison génétique. D'après P. ISOARD, "en fait, on n'a pratiquement aucune preuve chimique ou biologique que cette alternance de désinfectant puisse présenter un intérêt quelconque", car les mécanismes de résistance aux désinfectants ne sont pas vraiment élucidés (11). Cependant, dans le doute, étant donné que des résistances sont apparues en pratique (par exemple résistance au chlore dans les eaux d'alimentation, à la solution hydro-alcoolique de chlorhexidine chez Rhone-Poulenc Rorer, etc.), et vu l'analogie avec l'antibiorésistance, mieux vaut pratiquer cette alternance de produits.

4-2. TRACES ECRITES

Comme le précisent les Bonnes Pratiques de Fabrication, toute opération de désinfection doit suivre une procédure écrite. Celle-ci doit décrire précisément le protocole de la désinfection puisque rien ne peut

être laissé au hasard ni à l'appréciation du manipulateur si l'on veut que le résultat soit fiable et reproductible, donc de qualité assurée.

On doit y trouver au minimum :

- le nom du produit à utiliser, avec indication de la concentration et les références de la procédure de préparation correspondante, le cas échéant ;
- le matériel à utiliser pour la désinfection (seaux, balais, éponges...) ;
- la technique à employer ;
- la surface à désinfecter, avec si nécessaire un plan de la zone ou le schéma de la machine, pour limiter les incertitudes ;
- le moment prévu pour la désinfection et/ou la fréquence de l'opération ; il faut préciser si cela peut avoir lieu pendant le fonctionnement normal du local ;
- le nombre de personnes nécessaires et leur qualification ; etc.

On peut noter que dans le cas d'une préparation extemporanée de la solution désinfectante, les procédures de préparation et de désinfection peuvent faire l'objet d'un seul document.

Pour clarifier les données, mais sans pour autant pouvoir remplacer les procédures, un résumé peut être présenté sous la forme d'un plan de désinfection ; il permet de condenser les points fondamentaux et de les afficher pour que chacun puisse s'y reporter facilement à tout moment.

Un exemple de plan de désinfection est donné par C.L. TAIBI et reproduit dans le tableau ci-dessous, mais il peut être complété et adapté en fonction des particularités de chaque production. (4)

Plan de désinfection							
Nettoyer quoi	Avec quoi	Combien	Combien de temps	Comment	Mode d'application	Fréquence	Précautions
Surfaces							
Sols							
Etc.							

Un tel plan permet d'avoir en un seul coup d'oeil, un aperçu de ce qui doit être fait, et devrait si possible mentionner les références des procédures correspondantes qui développent chaque cas.

Par ailleurs, l'opérateur doit signer ou parapher une fiche de désinfection (le plan de désinfection peut éventuellement en tenir lieu) engageant ainsi sa responsabilité au niveau de l'application des procédures : une sécurité est alors obtenue par l'assurance de la réalisation de la désinfection selon le protocole en vigueur.

D'autre part, il est souvent utile d'apposer sur la surface un label indiquant son état actuel pour éviter tout risque d'erreur, par exemple les mentions "nettoyé", "désinfecté" ou "prêt à l'emploi", ou au contraire "en attente de nettoyage". (28)

4-3. FORMATION DU PERSONNEL

Nous venons de voir qu'un maximum de faits devait être consigné par écrit afin d'éviter tout écart. En effet, chacun a naturellement tendance à réaliser les choses de la façon qui lui semble la plus efficace et la plus rapide ; mais la procédure prévoit une "façon de faire" qui a été réfléchi et surtout validée, et qui assure un résultat conforme à ce que l'on attend. Toute modification à ce niveau, risque de remettre en question le résultat obtenu, car la validité de la méthode ne sera plus certifiée.

Par conséquent, il est fondamental de faire prendre conscience à tous de l'importance de l'application stricte du texte de la procédure, tout en signalant à chacun que toute proposition de modification sera la bienvenue et sera étudiée. Il est en effet capital que chaque opérateur soit impliqué par son travail et que personne ne se sente exclu. "La meilleure façon d'intéresser le personnel à un travail ingrat par définition, est de lui expliquer par des exemples simples et précis l'importance du rôle qu'on lui demande de jouer." (13)

C'est pourquoi, outre la présentation des procédures et de leur importance, la formation du personnel devrait passer dans le cas de la désinfection, par une approche des notions de microbiologie, de contamination et d'hygiène. Car comme l'a souligné le Professeur CALOP

(pharmacien chef au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble) lors d'une table ronde : "L'hygiène est une chaîne qui n'a la force que du maillon le plus faible." (29) Il faut donc arriver à faire comprendre que l'action de chacun, surtout dans ce domaine, influence le travail des autres et l'efficacité finale de la désinfection, donc la qualité du médicament produit, et par là même, la "santé" de l'entreprise.

L'introduction des procédures opératoires dans le travail quotidien, doit passer par une phase de familiarisation de l'utilisateur avec le texte et ce qu'il représente ; il faut apprendre et s'entraîner à réaliser une tâche selon la procédure adéquate, apprentissage qu'il est bon de "contrôler" par une certification du personnel. Ceci ne doit en aucun cas être ressenti comme une surveillance, mais plutôt comme un certificat de "bon travail", prouvant que l'on peut faire confiance à la personne et lui donner des responsabilités.

5 / DESINFECTION ET ASSURANCE DE LA QUALITE

La désinfection doit s'inscrire dans la Politique Qualité de l'entreprise et donc subir des contrôles réguliers, une validation des procédures de désinfection et de contrôles, et des auto-inspections ou audits réguliers pour vérifier le bon fonctionnement du système.

5-1. LE CONTROLE DE LA DESINFECTION

Ces méthodes de contrôle, appelées tests de stade 3, ou tests in situ, sont destinées à juger de l'efficacité de la désinfection au sens global du terme, c'est-à-dire aussi bien du produit dans les conditions de son emploi que de l'adéquation d'un protocole à un cas précis et de sa correcte application. (11)

Ainsi, il s'agira de déterminer le niveau de contamination résiduel de la surface et de le comparer au niveau de contamination initial, pour mesurer l'action de l'opération de désinfection, ainsi qu'à un niveau de contamination maximal tolérable, pour décider de l'acceptation ou du refus de l'opération.

5.1.1. Les différentes techniques existantes

Il n'existe actuellement aucune normalisation à ce niveau de l'étude. Mais certaines de ces méthodes sont passées dans l'usage courant ; elles correspondent à des techniques de contrôles microbiologiques de l'environnement.

5.1.1.1. Méthode par écouvillonnage

Cette méthode consiste à frotter une surface déterminée avec un écouvillon humide, puis à "épuiser" cet écouvillon dans un milieu de recueil ; il y a ensuite mise en incubation soit du milieu de recueil, soit directement de l'écouvillon. (11)

Cette méthode peut être uniquement qualitative (apparition d'un trouble dans le milieu de culture) ou quantitative (par dénombrement d'une quantité aliquote).

5.1.1.2. Méthode par empreintes sur gélose

Une lame gélosée est appliquée directement sur la surface à analyser, puis mise en incubation. Un dénombrement des micro-organismes est alors réalisé et ramené à la surface totale. (11)

5.1.1.3. Méthodes par lavage - rinçage - récupération

On projette sur la surface une quantité définie de liquide de récupération, qui se charge de micro-organismes, puis sera repris afin de permettre un dénombrement.

Ces techniques semblent les plus respectueuses de la réalité, puisqu'elles permettent de récupérer tous les micro-organismes présents sur la surface, selon une technique reproductible : malheureusement elles sont encore limitées dans leur utilisation par les difficultés de mise au point d'appareillages fiables. (11)

5.1.1.4. Comparaison des deux techniques les plus couramment employées : écouvillonnage et lames gélosées

Le tableau suivant présente en parallèle les avantages et les inconvénients de ces deux techniques. (11)

ECOUVILLONS	LAMES GELOSEES
-------------	----------------

AVANTAGES

<ul style="list-style-type: none"> * peu encombrant * brise les agrégats. * utilisable pour les surfaces difficiles d'accès 	<ul style="list-style-type: none"> * facile à appliquer * permet un comptage facile si la contamination est faible. * ne nécessite pas d'ensemencement.
--	--

INCONVENIENTS

<ul style="list-style-type: none"> * ne permet de récupérer que 30 à 35% des micro-organismes présents sur la surface (30) ; le risque est augmenté en zone d'atmosphère contrôlée, car le niveau de contamination initial étant faible, le pourcentage récupéré sera d'autant diminué. * reproductibilité délicate d'un technicien à l'autre (pression, vitesse de déplacement) et d'une surface à l'autre (propriétés physico-chimiques des surfaces) ; le contrôle doit donc être effectué par du personnel qualifié pour cette technique, avec le moins de changement possible. 	<ul style="list-style-type: none"> * ne permet pas de mesurer des niveaux de contamination élevés, du fait de l'impossibilité d'effectuer des dilutions. * chaque agrégat ne donne naissance qu'à une colonie, d'où une erreur par défaut, d'autant plus gênante que le niveau de contamination est faible. * certaines lames sont délicates à appliquer sans endommager la gélose. * la gélose devrait contenir un neutralisant du désinfectant. * la reproductibilité dépend de la pression exercée lors de l'application.
---	---

5.1.2. Procédures de contrôle

En fait, la technique de contrôle sera choisie en fonction des surfaces à contrôler (forme, accessibilité), des habitudes du laboratoire de contrôle et de la qualification des personnes habilitées à ces prélèvements (de façon à utiliser les mêmes techniques que pour les contrôles de l'environnement), afin d'avoir une unité sur l'ensemble des tests d'un désinfectant.

Pour chaque cas (désinfectant, dilution, surface), les procédures devront expliciter :

- le but du contrôle
- les conditions d'application (désinfectant, surface)
- le matériel à prévoir
- les précautions de prélèvement et d'ensemencement
- le protocole opératoire
- un modèle de présentation des résultats
- les conduites à tenir en fonction des résultats obtenus (personnes à prévenir selon les cas...)
- la fréquence des prélèvements
- les noms des personnes concernées.

Pour pouvoir effectivement comparer les résultats obtenus avant et après désinfection, les points de prélèvements doivent être très précisément fixés et indiqués sur des plans joints à la procédure ; de plus, ces points doivent être suffisamment nombreux pour que les résultats soient représentatifs de l'ensemble de la surface. Ils doivent être judicieusement choisis au niveau des zones les plus facilement contaminables et les plus difficiles à nettoyer.

Un exemple de procédure de contrôle d'efficacité de la désinfection est donné en annexe par la procédure de Rhône-Poulenc Rorer, donnant une procédure générale de contrôle soit par écouvillonnage soit par lames de contact, puis des parties plus pratiques adaptées à chacun des cas rencontrés sur place. (Cf. Annexe E)

Il est important que ces procédures de contrôle d'efficacité suivent les conditions réelles d'utilisation puisque le processus entier est ainsi contrôlé, et non uniquement l'activité du désinfectant.

5.1.3. Cas particuliers

5.1.3.1. Les animaleries

Dans le cas des animaleries d'hébergement, le contrôle de l'efficacité de la désinfection peut être réalisé d'une tout autre manière : le but de la désinfection étant de protéger les animaux contre une contamination microbienne, le principe du contrôle sera de placer des animaux témoins d'état sanitaire parfaitement connu (généralement animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques ou EOPS) dans la salle désinfectée, et de définir, après un temps d'attente donné, le nouvel état sanitaire de ces animaux.

Cette technique reflète beaucoup mieux, dans ce cas, l'efficacité de la désinfection que de simples prélèvements de surface, puisqu'elle est plus proche de la réalité. La difficulté résulte de la nécessité de condamner la pièce pendant une période encore plus longue que celle nécessaire à la désinfection, et du coût engendré par l'acquisition de tels animaux uniquement dans le but du contrôle, ainsi que par les analyses à faire effectuer a posteriori sur ces animaux par des laboratoires spécialisés. Par contre, cette technique permet de mettre en évidence l'inefficacité éventuelle de la désinfection sur des micro-organismes très particuliers et très dommageables pour ces animaux de laboratoires, ciblés en fonction des utilisations qui en seront faites.

5.1.3.2. Surfaces en contact direct avec le futur médicament

Dans ce cas, outre la recherche de contaminants résiduels, il est absolument nécessaire de rechercher des résidus de désinfectant, dont la présence est formellement interdite dans le médicament. Des valeurs maximales sont alors définies (de l'ordre du ppm) en fonction de la sensibilité de la méthode utilisée (minimum détectable), mais aucune standardisation n'est faite.

Dans le cas des médicaments obligatoirement stériles, le matériel et les articles de conditionnement primaire ne sont pas désinfectés mais stérilisés, car ce risque minimum laissé par la sensibilité des méthodes de détection, n'est pas acceptable.

Par ailleurs, il existe une méthode permettant de tester la propreté microbienne de tout le processus de fabrication : le Media Fill Test. Le mélange médicamenteux est remplacé par un milieu de culture et les opérations de fabrication réalisées dans les conditions habituelles. Le milieu de culture récupéré en fin de parcours (parfois même dans le conditionnement primaire) est alors mis à incuber en étuve : si des souches microbiennes se développent, c'est la preuve de l'existence d'une source de contamination en un point (inconnu) de la chaîne de production.

5-2. VALIDATION DE LA DESINFECTION

Une validation est "l'établissement de la preuve, en conformité aux principes des Bonnes Pratiques de Fabrication, que la mise en oeuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés." (12)

De tels programmes de validation doivent donc être appliqués à toutes les procédures, y compris celles de désinfection et de son contrôle, mais également à tout le processus de la désinfection, voire du nettoyage dans le cadre duquel elle s'inscrit. Outre la nécessité réglementaire d'instaurer ces programmes de validations, ils apportent la possibilité de mettre en évidence puis d'éviter, un grand nombre de problèmes qui auraient pu n'apparaître que tardivement en utilisation normale, et ainsi garantir avec suffisamment de certitude l'absence de risque de contamination du produit médicamenteux fabriqué. (28)

Dans l'absolu, avant d'établir le protocole de validation, il faudrait prévoir tous les cas possibles, accidents mineurs et majeurs, afin de mettre à l'épreuve l'efficacité de la méthode dans des cas extrêmes et de montrer que son efficacité demeure réelle même en cas de problème rompant le schéma classique de la production : il faut prévoir le pire, voire l'impensable, pour accéder à une totale sécurité. En pratique, pour que l'opération de validation soit réalisable concrètement, et étant donné que de toute façon l'imprévu reste toujours possible, un compromis devra être

fait entre l'obtention de la sécurité absolue et d'autre part, le temps et le coût mis en jeu dans la validation. Les problèmes laissés de côté seront traités au cas par cas, si le besoin apparaît.

Pour tester l'efficacité de la désinfection de surface, il faut bien évidemment que la surface soit initialement contaminée. La solution préférable pour créer cet état, est de réaliser la validation après utilisation normale de la surface, ce qui traduira mieux les conditions réelles, mais en parant toujours au pire, c'est-à-dire ici en choisissant la surface de plus grande taille, la plus facilement contaminable, la partie la plus difficile à décontaminer et lors de l'opération qui apporte le plus de contamination microbienne ; la solution désinfectante pourra également être utilisée à sa plus faible concentration.

L'autre possibilité est de contaminer volontairement la surface avec une quantité microbienne supérieure aux quantités qu'elle supportera dans les conditions d'utilisation. Cette solution est délicate d'application (manipulation des souches, risque de contamination d'autres surfaces, introduction de souches microbiennes particulières et ce dans des zones parfois protégées...) et sera généralement réservée à l'étude de cas précis de conditions extrêmes. (28)

Il est admis actuellement, sans qu'il y ait de textes réglementaires à ce sujet, que l'application du protocole de validation doit donner trois fois de suite des résultats conformes, pour que la méthode puisse être considérée comme valide. Mais il ne faut pas oublier que la preuve de l'efficacité d'une procédure de désinfection reste essentiellement basée sur des probabilités puisque l'absence de contamination ne peut être réellement affirmée (5) (étude d'échantillons, capacité fluctuante des bactéries à la revivification, réduction logarithmique de la population microbienne donc jamais complète...).

La nécessité d'une re-validation peut se faire sentir dans différents cas : changement de désinfectants, de procédure ou modification de la surface à traiter. Dans le cas d'une contamination du médicament fabriqué, si la cause ne peut être directement soulignée, une re-validation

du process de désinfection peut également être utile pour orienter les recherches. De telles validations sont dites "validation pour cause". Récemment encore, la tendance était, pour toute validation, de réaliser des validations de routine à intervalles réguliers ; actuellement, si la première validation a été réalisée correctement, cette approche est souvent considérée comme trop conservatrice, et l'adaptation de programmes de validation complets ou allégés en fonction des problèmes ou des changements survenus, semble beaucoup plus pragmatique et mieux s'inscrire dans une politique de qualité. (28)

5-3. AUDIT DE QUALITE

Chaque industrie pharmaceutique, par sa gestion de la qualité, a instauré des programmes d'audits, "examens méthodiques et indépendants en vue de déterminer si les activités et les résultats relatifs à la qualité satisfont aux dispositions préétablies, et si ces dispositions sont mises en oeuvre de façon efficace et aptes à atteindre les objectifs."(1) Les auditeurs auront entre autres fonctions, de vérifier la validité des procédures et des procédés de désinfection, des bons choix des causes de re-validation, et d'aider les personnes concernées à évoluer vers une utilisation plus rationnelle des désinfectants et vers une qualité meilleure ou moins coûteuse, si besoin est.

DISCUSSION

♦ L'étude poussée de la désinfection de surface est conseillée par les Bonnes Pratiques de Fabrication et tous les organismes officiels internationaux, voire rendue indispensable par l'obligation qu'ont les industriels d'atteindre la qualité dans leur entreprise. Cependant, peu de précisions sur les méthodes à utiliser pour s'assurer de l'efficacité de la technique de désinfection employée, sont données par ces mêmes organismes ; les Bonnes Pratiques de Fabrication et les recommandations édictées par les autres pays pour les industries pharmaceutiques, ne donnent aucune indication sur les tests existants auxquels ils accorderaient leur confiance. Par contre, chaque pays possède son organe de normalisation qui fournit un ou plusieurs types de contrôles, mais sans harmonie par rapport aux autres pays ; l'organisation internationale de standardisation (ou ISO) n'a pas à l'heure actuelle, réalisé de textes normatifs sur le sujet des désinfectants comme elle l'a fait pour de nombreux autres sujets.

D'autre part, à ce flou dû à l'absence d'harmonisation internationale, se rajoute la confusion apportée par la faible crédibilité des tests actuels : on a vu que nombres d'entre eux étaient contestés par les scientifiques, non reconnus dans les pays voisins, ne donnaient pas toujours les mêmes résultats pour un même désinfectant, et il n'existe encore aucune donnée de reproductibilité entre les laboratoires. (8)

Il paraît donc indispensable, maintenant que l'attention des fabricants de médicaments a été portée sur le problème de la désinfection, que les personnes concernées se penchent sérieusement sur la création de standards clairement définis.

Mais qui doit les spécifier ? L'utilisateur, le fabricant, les scientifiques qui y travaillent ou les organismes réglementaires ? Vu l'avantage qu'apporteraient des standards internationaux par rapport à de simples standards nationaux, il semble que les décisions doivent venir d'un consensus international, sur la base des expériences actuelles de tous. L'avenir est abordé dans ce sens en Europe, par l'intermédiaire du Comité Technique 216 du Comité Européen de Normalisation (C.E.N.) : dès avril 1990, ce comité, rassemblant les membres de la Communauté Européenne et six membres de l'Association pour le libre échange européen (E.F.T.A. = European Free Trade Association) en la personne de représentants de gouvernements, de l'industrie et des universités, a

oeuvre pour l'obtention de standards européens quant aux dénominations, aux exigences, aux méthodes d'essais et aux recommandations d'utilisation. Les textes sont encore à l'état de projets. On peut espérer que les autres pays accepteront de se conformer à ces règles puisqu'elles seront les seules à découler d'une étude consensuelle basée sur les connaissances actuelles de plusieurs pays, avec acceptation par chacun de ces pays. (8)

◆ Pour l'heure, seules les normes nationales font office de règles et en France, les normes AFNOR ont l'intérêt de pouvoir déboucher sur un label de conformité. En effet, tout fabricant de désinfectants peut demander l'obtention de la marque "NF Désinfectants".

L'étude du dossier technique comprenant la fiche technique du produit, la documentation complète, les expertises physico-chimiques et toxicologiques et les expertises microbiologiques effectuées par un laboratoire accrédité par le Réseau National d'Essais (RNE), est réalisée par le Secrétariat technique du Laboratoire National de la Santé ; des qualitiens de l'AFNOR inspectent l'usine de fabrication pour vérifier la validité de son plan qualité ; enfin, un Comité Particulier regroupant utilisateurs, fabricants, experts et représentants des Ministères, étudie toutes les données et propose sa décision.

La marque NF correspond donc à un certificat français de qualification, engageant la responsabilité du fabricant. (11)

En Angleterre, un système équivalent a été mis en place par l'Institut Britannique de Normalisation (BSI) avec attribution d'un sigle de conformité, mais aux normes britanniques ! (31)

◆ Tout au long de cette étude, sont ressorties l'ampleur des contrôles à effectuer pour s'assurer de l'efficacité d'un désinfectant, sur le plan intrinsèque puis lors de son utilisation, et la difficulté que peut avoir

le laboratoire d'analyses d'une industrie pharmaceutique à mettre en place de tels contrôles : cela correspond à du personnel, du temps, des techniques nouvelles et éventuellement l'achat de matériel ; les essais de toxicologie devront souvent être sous-traités. Or le choix d'un nouveau désinfectant est assez rare dans l'industrie, où l'objectif principal sera d'effectuer des contrôles périodiques d'un même produit, en faible quantité, pour s'assurer qu'il correspond toujours à ce que l'on attend de lui. S'il incombe à cette industrie la responsabilité de la totalité des contrôles des désinfectants, toute évolution sera compromise, car il s'agira pour elle d'une charge supplémentaire, sans intérêt direct et la déviant de son objectif premier, la production de médicaments.

De plus, ces mêmes fabricants de désinfectants fournissent des produits aux particuliers et à des entreprises qui ne possèdent pas les structures leur permettant de réaliser de tels contrôles. L'activité du désinfectant doit donc être contrôlée et prouvée par le fabricant, en se conformant aux normes en vigueur. (13) Celui-ci devrait considérer la fabrication de son désinfectant comme celle d'un médicament, c'est-à-dire appliquer des règles de bonnes pratiques à ses productions et à ses contrôles de qualité. (7)

Dans ce cadre, l'apposition du label NF assurera le consommateur de la qualité du produit et de sa fabrication, et le pharmacien industriel pourra "se reposer" sur cette dénomination et alléger en toute sécurité ses contrôles. Les essais des normes avec les souches de référence pourront être considérés comme acquis, ce qui permettra à l'industriel de s'attacher à vérifier l'activité du produit sur les souches isolées dans son entreprise (si possible à l'aide de ces mêmes normes), et à valider l'efficacité in situ du désinfectant ; ces deux études étant spécifiques à l'utilisateur, restent entièrement de son ressort.

Le problème qui se pose alors est de savoir jusqu'à quel point l'utilisateur peut faire confiance au fabricant ? Peut-on se contenter de sa renommée, de l'assurance qu'il donne de la qualité de son produit, ou doit-on vérifier chaque lot fourni ? C'est le dilemme classique des relations client / fournisseur, pour lequel un juste compromis est encore difficile à trouver entre les audits chez le fabricant et les contrôles systématiques ; la marque de conformité engageant la responsabilité du

fabricant devrait permettre d'augmenter la confiance que l'on peut lui accorder, et par là, de restreindre les contrôles suivant des plans d'échantillonnage statistiques. (6)

De l'autre point de vue, les fabricants ne doivent pas rester sur leurs acquis et devraient apporter leur contribution à la mise au point de tests plus aisés et plus fiables et, de concert avec les autorités ministérielles, travailler au développement et à la reconnaissance des homologations des produits existants, ainsi qu'à la création d'essais standards internationaux. (13) L'un des freins à l'évolution de ces standards est la peur de voir exclure des marchés des produits qui correspondaient aux exigences précédentes mais ne seraient plus à la hauteur des nouveaux standards internationaux. (8)

♦ S'il paraît évident, à partir de ces remarques que l'industriel ne devrait choisir, pour sa sécurité, que des désinfectants "NF" (ou de label équivalent dans les autres pays), il ne doit pas perdre de vue que les renseignements fournis par les fournisseurs doivent être consultés avec circonspection : seules les indications du label sont officielles.

Les brochures données par le fabricant sont prolixes en renseignements sur l'activité, la composition, les modes d'utilisation, les incompatibilités, les données toxicologiques et de tolérance et les précautions d'emploi, mais si ces données sont toujours utiles à consulter, il faut les aborder en fonction des références et expertises qui leur sont associées.

♦ Actuellement, la notion de biodégradabilité d'un désinfectant est souvent un argument de vente : il y a "débauche d'écolo-marketing chez fabricants et distributeurs soudainement soucieux de la protection de l'environnement", mais les écolabels ne sont que rarement officiels. (32)

En France, la création du label "NF Environnement", certificat AFNOR, permettra d'intégrer à l'étude du cycle de vie du produit et de son

emballage (production, utilisation, destruction ou recyclage) et de leurs interactions nuisibles avec l'eau, l'air et le sol, "l'aptitude du produit à l'usage auquel il est destiné", tout en gardant en mémoire qu'un produit parfaitement non polluant n'est qu'utopie. Malheureusement, sur ce point d'écologie, la guerre des nationalités fait à nouveau rage, et l'harmonisation est loin d'être envisageable. (32)

♦ Dans un tout autre ordre d'idée, il est important d'attirer l'attention sur le double emploi de certains produits en tant que désinfectant et en tant qu'antiseptique. Le cas de la chlorhexidine, souligné par D. HUCHON-BECEL, montre clairement le problème et devrait inciter les utilisateurs à faire le poids et la mesure dans l'utilisation qu'ils en font : "quels que soient les résultats concernant l'efficacité antibactérienne de la chlorhexidine, dans le domaine de la désinfection, il ne nous paraît pas souhaitable d'utiliser à grande échelle et à forte concentration, un produit qui, comme la chlorhexidine, est indispensable comme antiseptique et risque, par une plus large utilisation, de voir augmenter trop rapidement la résistance bactérienne." (19)

Etant donnée la multiplicité des produits désinfectants à la disposition des industriels, il paraît tout à fait envisageable d'abandonner certains produits, même efficaces, au profit de la médecine : la désinfection n'étant qu'en arrière-plan du médicament, doit céder sa place, face à l'importance de celui-ci pour la Santé Publique.

CONCLUSION

L'approche de la désinfection de surface sous l'angle des Bonnes Pratiques de Fabrication et de la Qualité dans l'industrie pharmaceutique, montre qu'un désinfectant, s'il n'est ni un médicament, ni une matière première à part entière, doit être considéré avec tout autant de soin et d'attention.

Le choix d'un désinfectant et de la méthode de désinfection selon laquelle il sera utilisé, passe par un long cheminement retraçant les qualités propres du produit, les besoins ressentis dans l'industrie au niveau de la décontamination, et le contexte de son application. Si nous ne sommes pas rentrés dans les détails des mécanismes d'action et des facteurs physico-chimiques influençant leur activité, c'était pour se concentrer sur les problèmes concrets auxquels un industriel peut être confronté, et tenter de tracer la démarche à suivre pour atteindre la phase de validation de la désinfection, qui permettra l'utilisation en toute confiance du produit. Ces mêmes questions peuvent permettre d'aborder la remise en question des désinfectants utilisés de longue date dans une industrie, mais pour lesquels on se doit de prouver le bien-fondé de leur utilisation actuelle.

Si la multitude des tests présentés semble rendre une telle étude difficilement abordable dans la continuité des productions médicamenteuses et de la marche de l'entreprise, la possibilité d'un travail conjoint avec les fournisseurs, et la sécurité apportée par les labels de conformité aux normes d'efficacité antimicrobienne, permettent d'axer les contrôles au sein de l'industrie utilisatrice essentiellement sur la preuve de l'efficacité in situ du désinfectant (qui s'insère plus aisément dans les schémas de fabrication) et envers la population microbienne rencontrée sur le terrain.

Il ne faut pas oublier que si l'opération de désinfection est une étape fondamentale de la qualité microbiologique de la production, elle n'est pas seule en jeu : l'hygiène du personnel (la quasi totalité des contaminations des zones de production est due aux bactéries humaines apportées par le personnel y travaillant), les précautions lors des manipulations et les systèmes de traitement de l'air, s'ajoutent au

processus de nettoyage, pour atteindre cette qualité. La désinfection est seulement l'un de ces éléments, mais d'une importance cruciale.

La formation du personnel est une phase essentielle pour l'obtention d'une désinfection de qualité. Toute procédure n'aura de valeur que si elle est correctement appliquée ; tout contrôle d'un échantillon ne pourra être interprété dans le sens d'une généralisation, que si chacun engage sa responsabilité, à tous niveaux (fabrication, désinfection, prélèvements, contrôles...). Instaurer la qualité dans une opération de désinfection, suppose que son but a été expliqué aux divers opérateurs, que des bases de microbiologie et d'hygiène leur ont été données, que leur fonction est clairement définie et que les moyens leur sont donnés de s'impliquer dans leur travail et de s'intégrer dans la Politique Qualité générale de l'entreprise. Il est notamment indispensable d'expliquer que si ils sont inévitablement des sources de contamination, une bonne hygiène, des précautions élémentaires et un respect des procédures, limitent cet aspect.

Par ailleurs, la volonté d'atteindre la qualité dans le procédé de désinfection ne doit pas faire perdre de vue le premier objectif de l'entreprise : la qualité du médicament. En effet, une "désinfection parfaite" pour un médicament non conforme serait de la non qualité.

Un médicament sera de qualité :

- ◆ s'il contient la quantité de chaque principe actif annoncée sur l'étiquette (conforme à l'AMM),
- ◆ s'il contient cette quantité dans chaque dose unitaire,
- ◆ s'il est exempt de substances étrangères,
- ◆ s'il conserve son dosage, son activité thérapeutique et son apparence jusqu'à sa péremption,
- ◆ si, au moment de l'administration, il libère son principe actif avec la biodisponibilité prévue.

L'absence de résidus de désinfectants dans le médicament fini est donc une condition obligatoire à la qualité du médicament et à sa libération (Cf. point 3). Mais les limites de sensibilité des techniques de

détection laissant un doute quant à son absence réelle, pour toute surface entrant en contact direct avec le médicament, la désinfection sera à manipuler avec d'infinies précautions.

Si l'avenir est encore ballotté entre les problèmes d'harmonisation des tests, les lacunes en terme de définitions mondialement acceptées, et les recommandations trop évasives en matière de conditions d'utilisation et de validation, ce problème n'est que depuis peu sur la sellette des autorités et l'on peut s'attendre (ou espérer) à ce que la focalisation actuelle de toutes les parties concernées, sur ce problème, aboutira à une évolution rapide et fructueuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) NORME FRANCAISE NF-X 50120 - Qualité : vocabulaire.-
AFNOR ; Paris la Défense ; 1987
- 2) NORMES FRANCAISES sur les antiseptiques et les désinfectants.- T 72 -
AFNOR ; Paris la Défense ; 1981 à 1989
- 3) WALLHAÜSSER K.H.- Disinfectants as an aid for good manufacturing practice
in the pharmaceutical industry.-
J. Pharm. Belg. ; 1981 ; 36 (5) ; 283-297
- 4) TAIBI C.L.- L'infection existe, sa prévention aussi.-
PARIS CLT Editeur EM Inter; 1987; 52-72 ; 101
- 5) MILES R.S.- What standards should we use for the disinfection of large
equipment? -
J. Hosp. Infect. ; 1991 ; 18 (suppl.A) ; 264-273
- 6) DARBORD J.C.- Méthodes d'étude "in vitro".-
in : *Hygiène hospitalière pratique* - DARBORD J.C., DAUPHIN A. coord.
APHIF EM Inter Lavoisier ; PARIS .; 1988 ; 2è édition ; 49-62
- 7) DONY J.- Qu'attend-on d'un désinfectant ? Usage des désinfectants dans les
règles de Bonnes Pratiques de Fabrication.-
J. Pharm. Belg. ; 1981 ; 36 (4) ; 217-222
- 8) REYBROUCK G.- International standardization of disinfectant testing : is it
possible?-
J. Hosp. Infect. ; 1991 ; 18 (suppl.A) ; 280-288
- 9) RUTALA W.A.- APIC guidelines for selection and use of disinfection.-
Am. J. Infect. Control. ; 1990 ; 18 (2) ; 99-117
- 10) REGULATORY AFFAIRS BULLETIN - Regulatory control of disinfectants.-
Inveresk Research International ; 1992 ; 49 ; 12-17

- 11) ISOARD P.- Guide de la biocontamination.-
APEC - APRIA - COBAC ; 1988 ; 83-94 ; 151-159

- 12) MINISTERE DE LA SANTE ET DE L'ACTION HUMANITAIRE - Bonnes
Pratiques de Fabrication.-
Direction des journaux officiels ; Paris ; 1993

- 13) HUET M., CHANTEFORT A.- La désinfection des surfaces.-
Rev. Prat. ; 1980 ; 30 (51) ; 3519-3525

- 14) BREBANT T.- Etude de quelques désinfectants utilisés pour la
décontamination des surfaces.-
Rapport de stage - RHÔNE POULENC RORER Maisons-Alfort ; 1990 ; 14-35

- 15) PRADEAU D.- Les produits chlorés.-
in Hygiène hospitalière pratique - DARBORD J.C., DAUPHIN A. coord.
APHIF EM Inter Lavoisier ; PARIS ; 1988 ; 2^e édition ; 232-246

- 16) LESIEUR D.- Antiseptiques : classification et mode d'action.-
Bulletin de la société de pharmacie de Lille ; 1976 ; 4

- 17) HUCHON-BECEL D., MICHEL-BRIAND C.- Essais de toxicité sur les
antiseptiques et les désinfectants.-
in Hygiène hospitalière pratique - DARBORD J.C., DAUPHIN A. coord.
APHIF EM Inter Lavoisier ; PARIS ; 1985 ; 81-85

- 18) ASSOCIATION OF OPERATING ROOM NURSES- Proposed recommended
practices. Disinfection.-
AORN-J. ; 1991 ; 54 (1) ; 75-80

- 19) HUCHON-BECEL D.- La chlorhexidine.-
in Hygiène hospitalière pratique - DARBORD J.C., DAUPHIN A. coord.
APHIF EM Inter Lavoisier ; PARIS ; 1988 ; 2^e édition ; 314-343

- 20) SIMONS J., SOTTY P.- Prévention en laboratoires de recherche. Risques biologiques.-
CNRS - INRA - INSERM. Paris ; 1991; 139
- 21) REYBROUCK G.- The assessment of the bactericidal activity of surface disinfectants.-
Zentralbl. Hyg. Umweltmed. ; 1990 ; 190 (5-6) ; 479-510
- 22) HUGO W.B.- A brief history of heat and chemical preservation and disinfection.-
J. Appl. Bacteriol. ; 1991 ; 71 (1) ; 9-18
- 23) VINCENT F., PREVOST X., GOURY V., STEINMETZ A.C., DARBORD J.C.-
Etude comparative de trois méthodes d'évaluation des produits antiseptiques et désinfectants en contrôle de qualité.-
Pathol. Biol. (Paris) ; 1988 ; 36 (15) ; 584-586
- 24) DODIN A., RYTER A., NICOLAS R.- Pour un nouveau test de sensibilité aux substances données pour antiseptiques ou désinfectantes.-
Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales ; 1988 ; 81 (4) ; 726-731
- 25) BREBANT T.- Décontamination des sols et plans de travail dans l'industrie pharmaceutique.-
Th. D. : Pharm. Paris V ; 1991 ; n° 61 ; 12-15 ; 20-61
- 26) GRÖSCHEL D.H.- Disinfectant testing in the U.S.A. -
J. Hosp. Infect. ; 1991 ; 18A ; 274-279
- 27) NKIBIASALA S.M., DEVLEESCHOUWER M.J., VAN GANSBEKE B., ROST F., DONY J.- Disinfectants prepared in a hospital pharmacy. Assessment of their microbiological purity and antimicrobial effectiveness.-
J. Clin. Pharm. Ther.; 1989 ; 14 ; 457-464

- 28) MAC CORMICK P.Y., CULLEN L.F.- Cleaning validation.-
in : *Pharmaceutical process validation*
Edition Ira R. BEVRY, Robert A. NASCH ; 1993 ; 2^e édition ; 319-351
- 29) COLLIGNON H.- Hygiène et désinfection. Prévention de la contamination bactérienne en milieu hospitalier.-
Soins ; 1990 ; 541 ; 39-42
- 30) ANGELOTTI R., FOTER M.J., BUSCH A.K., LEWIS K.W.- A comparative evaluation of method for determining the bacterial contamination of surface.-
Food. Res. ; 1958 ; 23 ; 175-185
- 31) SIMPSON R.A.- Using guidelines, policies and standards : are we in control ?
J. Hosp. Infect. ; 1991 ; 18 (suppl.A) ; 99-105
- 32) BRUNEAU J.P.- Un label vert à la française.-
Que choisir ; 1991 ; 270 ; 8-10

ANNEXE A

SPECTRES D'ACTIVITE,
ANTAGONISMES ET SYNERGIES

(d'après ISOARD, référence bibliographique n°11)

Spectres d'activité des principales familles de désinfectants

Désinfectants		Micro-organismes					
		GRAM +	GRAM -	Mycobactéries	Spores	Champignons & levures	Virus
Halogènes	iodés	+++	+++	++	++	+++	+
	chlorés	+++	+++	±	+	++	+
Aldéhydes		+++	+++	++	++	++	++
Alcools		++	++	++	0	±	±
Phénols		+++	±	±	±	++	±
Tensioactifs	anioniques	+++	+	+	0	++	?
	cationiques	+++	+	±	±	± discuté	±
	amphotères	+++	+++	++	+++ discuté	+++	+
Mercuriels		++	+	0	0	++	0
Biguanides	chlorhexidine	+++	++	+++ discuté	0	+	0 discuté
	hexamidine	+++	++	?	0	++	0
Carbanilides		+++	++	?	?	++	?

Légende :

- +++ : Très bonne activité
- ++ : Bonne activité
- ± : Efficacité inconstante
- ± : Efficacité faible
- 0 : Efficacité nulle
- ? : Efficacité mal connue

Antagonismes et synergies des principaux désinfectants

Famille		Antagonismes	Synergies
Halogènes	Composés chlorés	Matières organiques Thiosulfates Sulfures Sels ferreux	
	Composés iodés	Matières organiques Composés mercuriels Thiosulfate de sodium	Savons Ammoniums quaternaires
Aldéhydes		Ammoniaque	Degré hygrométrique > 50%
Alcools		Matières organiques	Eau Composés iodés
Phénols		Matières organiques Ammoniums quaternaires Savons, pour certains phénols Alcool pour l'hexachlorophène	Sels de sodium et potassium Sels métalliques
Tensio-actifs	Anioniques (savons)	Matières organiques Ammoniums quaternaires Hexachlorophène	Crésol
	Cationiques (ammoniums quaternaires)	Matières organiques Graisses, savons, calcium, magnésium, aluminium...	
	Amphotères	Savons	
Dérivés des métaux	Mercure	Matières organiques Composés soufrés	Tensio-actifs
Biguanides	Chlorhexidine	Matières organiques Savons, lécithine, jaune d'oeuf, liège	Ammoniums quaternaires Amphotères
	Hexamidine	Ions phosphates	Alcools, halogènes Excipient mouillant
Carbanilides		Matières organiques	Tensio-actifs
Permanganate de potassium		Matières organiques	

ANNEXE B

ETUDES DE TOXICITE

Indice d'irritation cutanée primaire (IIP)

Le principe est de déterminer la capacité d'irritation primaire d'un produit qui, après une seule application sur une zone scarifiée, provoque une réaction cutanée au bout de 24 ou 71 heures (érythèmes, escarres, oedème). Cette réaction est notée sur une échelle numérique ; la moyenne des résultats obtenus est appelée Indice d'Irritation Primaire ou IIP.

Si l'indice obtenu est inférieur à 0,5, la substance sera dite non irritante, entre 0,5 et 2, légèrement irritante, de 2 à 5, moyennement irritante et enfin de 5 à 8, sévèrement irritante.

Indice d'irritation oculaire primaire (IIOP)

Ce test est effectué chez le lapin albinos mâle. L'introduction du produit dans le cul-de-sac conjonctival d'un seul oeil permettra une comparaison entre les deux yeux. On détermine alors, comme dans le test précédemment décrit, les indices d'irritation oculaire individuel, moyen et maximum.

Indice d'agressivité par applications itératives (IAAI)

Le test consiste en l'application d'une dose de produit par jour pendant 6 semaines sur le dos et les flancs de 3 lapins albinos. Il représente la forme de toxicité chronique et permet de déterminer l'action sur la peau d'une application quotidienne du produit, et de déceler des réactions qui souvent ne peuvent l'être au cours d'un test d'irritation primaire ou d'un test de sensibilisation.

Test de sensibilisation

Ce test a pour but de prévoir des réactions cutanées allergiques, mais est critiquable en raison de la subjectivité du résultat qui varie d'un laboratoire à l'autre.

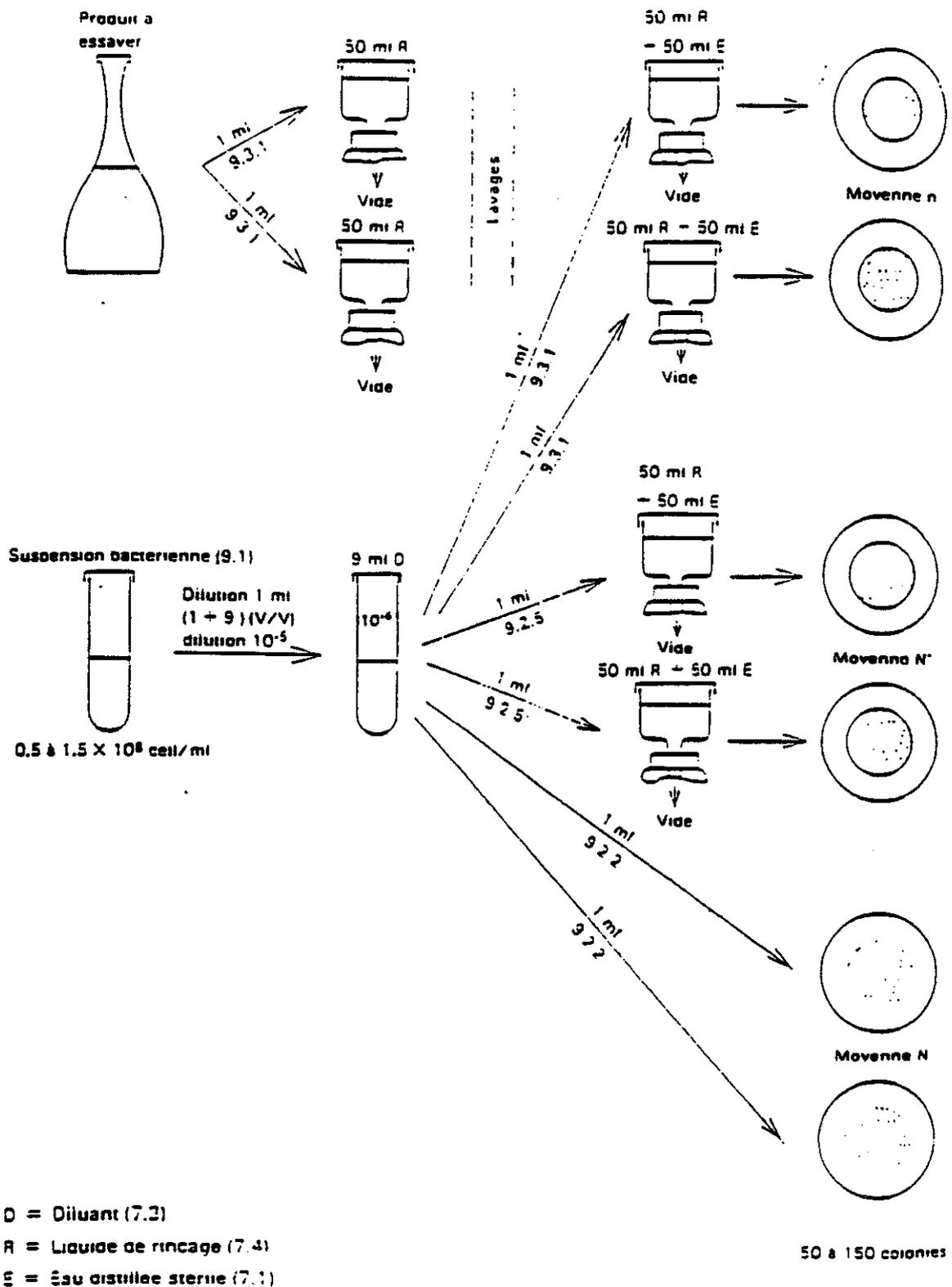
Tests de mutagenèse :

Le but de ces tests est de prévoir un éventuel pouvoir mutagène (induction de mutations génétiques). On trouve dans cette catégorie, le test d'Ames, le test du micronucleus et le test du létal dominant.

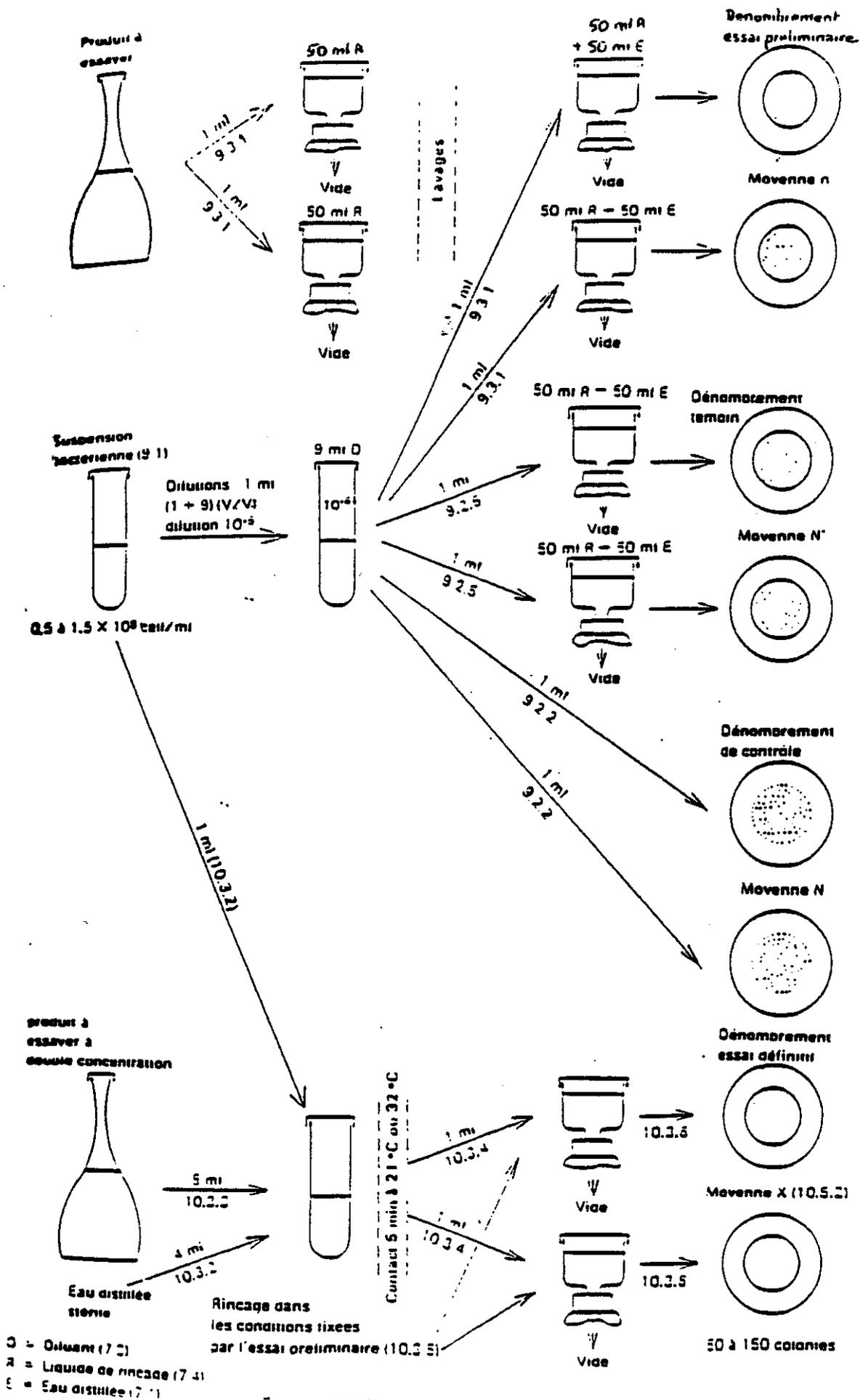
Test de cancérogenèse par anatomopathologie, et test de tératogenèse avec étude de la fonction reproductrice. (17)

ANNEXE C

SCHEMAS RECAPITULATIFS
Norme NF T 72 151



Schema d'essai préliminaire pour une souche bactérienne



ANNEXE D

PROCES-VERBAUX
Norme NF T 72 151

DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE
selon la norme AFNOR NF T 72 151
Spectre 4
Méthode par filtration sur membranes

1 / Laboratoire ayant réalisé l'essai

L.A.Biol. de Rhône-Poulenc RORER à Maisons-Alfort

2 / Identification de l'échantillon

Nom du produit : ***Eau de Javel à 10%***

Fabrication : *extemporanée à la laverie des S.A.I.*

Dates des essais : *Mars - Avril 1992*

Substance active : *Hypochlorite de sodium à 12^D chlorométriques*

Concentration : *10% V/V*

3 / Conditions expérimentales

3.1. Température d'essai : *20°C + 1°C*

3.2. Diluant du produit utilisé lors des essais : *eau ultrafiltrée stérile*

4 / Mode opératoire déterminé à la suite de l'essai préliminaire

4.1. Nature des membranes et références : *Membranes quadrillées en mélange d'esters de cellulose, soudées à un entonnoir en polyéthylène.*

Taille des pores : 0,45 µm

= système MILLIFLEX 100 de MILLIPORE, à usage unique.

Réf. : MXHA WG 1 24

4.2. Liquide de rinçage (7.4)

Nature : *Eau ultrafiltrée stérile*

Nombre de lavages : *3*

Volume utilisé pour chaque lavage : *50 ml*

4.3. Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement : *Néant*

5 / Résultats des essais préliminaires dans les conditions décrites ci-dessus

Concentrations du produit (V/V)	Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	N'	n
10%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	148	89	116
10%	<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	160	125	164
10%	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	125	136	183
10%	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	75	44	72

avec N = dénombrement de contrôle (9.2.4)
 N' = dénombrement témoin (9.2.6)
 n = dénombrement essai préliminaire (9.3.2)

6 / Essai proprement dit

6.1. Résultats dans les conditions décrites ci-dessus

Concentration de produit en pourcentage V/V au contact avec les bactéries : 10%

Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	n	N'	X	pH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	50	49	52	0	10,21
<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	99	88	102	0	10,23
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	51	68	59	0	10,18
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	88	64	71	0	10,25

avec N = dénombrement de contrôle (10.5.1)
 N' = dénombrement témoin (10.5.1)
 n = dénombrement essai préliminaire (10.5.3)
 X = dénombrement essai définitif (10.5.2)

6.2. Conclusion

**L'eau de Javel à 10%
présente une activité bactéricide spectre 4 à 20°C
conforme à la norme NF T 72 151 (1987).**

Signatures

DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE
selon la norme AFNOR NF T 72 151
Spectre 4
Méthode par filtration sur membranes

1 / Laboratoire ayant réalisé l'essai

L.A.Biol. de Rhône-Poulenc RORER à Maisons-Alfort

2 / Identification de l'échantillon

Nom du produit : *Eau oxygénée à 30 volumes*

Fabrication : *Laboratoires GIFRER*

Dates des essais : *Mars - Avril 1992*

Substance active : *Solution de peroxyde d'hydrogène*

Concentration : *30 volumes = 9 % V/V*

3 / Conditions expérimentales

3.1. Température d'essai : *20°C ± 1°C*

3.2. Diluant du produit utilisé lors des essais : *Néant*

4 / Mode opératoire déterminé à la suite de l'essai préliminaire

4.1. Nature des membranes et références : *Membranes quadrillées en mélange d'esters de cellulose, soudées à un entonnoir en polyéthylène.*

Taille des pores : 0,45 µm

= système MILLIFLEX 100 de MILLIPORE, à usage unique.

Réf. : MXHA WG 1 24

4.2. Liquide de rinçage (7.4)

Nature : *Eau ultrafiltrée stérile*

Nombre de lavages : *3*

Volume utilisé pour chaque lavage : *50 ml*

4.3. Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement : *Néant*

5 / Résultats des essais préliminaires dans les conditions décrites ci-dessus

Concentrations du produit (V/V)	Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	N'	n
9 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	148	89	83
9 %	<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	160	125	150
9 %	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	125	136	81
9 %	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	75	44	68

avec N = dénombrement de contrôle (9.2.4)
 N' = dénombrement témoin (9.2.6)
 n = dénombrement essai préliminaire (9.3.2)

6 / Essai proprement dit

6.1. Résultats dans les conditions décrites ci-dessus

Concentration de produit en pourcentage V/V au contact avec les bactéries : 8,1 % (90% de solution à 30 volumes)

Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	n	N'	X	pH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	50	48	52	0	2,20
<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	99	72	102	0	2,18
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	51	61	59	0	2,18
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	88	92	71	0	2,18

avec N = dénombrement de contrôle (10.5.1)
 N' = dénombrement témoin (10.5.1)
 n = dénombrement essai préliminaire (10.5.3)
 X = dénombrement essai définitif (10.5.2)

6.2. Conclusion

L'eau oxygénée à 8,1 % présente une activité bactéricide spectre 4 à 20°C conforme à la norme NF T 72 151 (1987) ; donc, a fortiori :

**L'eau oxygénée à 9 % (30 volumes)
présente une activité bactéricide spectre 4 à 20°C
conforme à la norme NF T 72 151 (1987).**

Signatures

DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE
selon la norme AFNOR NF T 72 151
Spectre 4
Méthode par filtration sur membranes

1 / Laboratoire ayant réalisé l'essai

L.A.Biol. de Rhône-Poulenc RORER à Maisons-Alfort

2 / Identification de l'échantillon

Nom du produit : **CLINISEPT® 2500 potentialisé**

Fabrication : *Laboratoires FANDRE*

Dates des essais : *Mars - Avril 1992*

Substance active : *Association de dérivés phénoliques*
(o.phénylphénate, o.benzyl p.chlorophénate, p.tertiaire amyphénate)

Concentration : "2 coups de pompe" pour 10 litres d'eau,
soit 0,57 % (V/V)

3 / Conditions expérimentales

3.1. Température d'essai : $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.2. Diluant du produit utilisé lors des essais : *eau ultrafiltrée stérile*

4 / Mode opératoire déterminé à la suite de l'essai préliminaire

4.1. Nature des membranes et références : *Membranes quadrillées en mélange d'esters de cellulose, soudées à un entonnoir en polyéthylène.*

Taille des pores : 0,45 μm

= système MILLIFLEX 100 de MILLIPORE, à usage unique.

Réf. : MXHA WG 1 24

4.2. Liquide de rinçage (7.4)

Nature : *Eau ultrafiltrée stérile*

Nombre de lavages : 3

Volume utilisé pour chaque lavage : *50 ml*

4.3. Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement : *Néant*

5 / Résultats des essais préliminaires dans les conditions décrites ci-dessus

Concentrations du produit (V/V)	Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	N'	n
0,57 %	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	148	89	166
0,57 %	<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	160	125	149
0,57 %	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	125	136	101
0,57 %	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	75	44	80

avec N = dénombrement de contrôle (9.2.4)
 N' = dénombrement témoin (9.2.6)
 n = dénombrement essai préliminaire (9.3.2)

6 / Essai proprement dit**6.1. Résultats dans les conditions décrites ci-dessus**

Concentration de produit en pourcentage V/V au contact avec les bactéries : **0,57 %**

Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	n	N'	X	pH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	50	50	52	0	10,50
<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	99	114	102	0	10,45
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	51	75	59	0	10,50
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	88	78	71	0	10,48

avec N = dénombrement de contrôle (10.5.1)
 N' = dénombrement témoin (10.5.1)
 n = dénombrement essai préliminaire (10.5.3)
 X = dénombrement essai définitif (10.5.2)

6.2. Conclusion

**Le CLINISEPT® 2 500 dilué à 0,57%
 présente une activité bactéricide spectre 4 à 20°C
 conforme à la norme NF T 72 151 (1987).**

Signatures

DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE
selon la norme AFNOR NF T 72 151
Spectre 4
Méthode par filtration sur membranes

1 / Laboratoire ayant réalisé l'essai

L.A.Biol. de Rhône-Poulenc RORER à Maisons-Alfort

2 / Identification de l'échantillon

Nom du produit : **Alcool + chlorhexidine**

Fabrication : *extemporanée à la laverie des S.A.I.*

Dates des essais : *Avril - Mai - Juin 1992*

Substance active : *Ethanol à 70° dénaturé, et chlorhexidine*

Concentration : Chlorhexidine 0,5 %
 Alcool à 70° qsp 100%

3 / Conditions expérimentales

3.1. Température d'essai : *20°C ± 1°C*

3.2. Diluant du produit utilisé lors des essais : *Néant*

4 / Mode opératoire déterminé à la suite de l'essai préliminaire

4.1. Nature des membranes et références : *Membranes quadrillées en mélange d'esters de cellulose, soudées à un entonnoir en polyéthylène.*

Taille des pores : 0,45 µm

= système MILLIFLEX 100 de MILLIPORE, à usage unique.

Réf. : MXHA WG 1 24

4.2. Liquide de rinçage (7.4)

Nature : *Eau ultrafiltrée stérile + 0,5 % de Tween 80*

Nombre de lavages : *3*

Volume utilisé pour chaque lavage : *100 ml, puis 2 fois 75 ml*

4.3. Neutralisant ajouté au milieu de dénombrement : *Néant*

5 / Résultats des essais préliminaires dans les conditions décrites ci-dessus

Concentrations du produit (V/V)	Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	N'	n
100%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	148	89	82
100%	<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	50	86	49
100%	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	65	88	50
100%	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	84	158	140

avec N = dénombrement de contrôle (9.2.4)
 N' = dénombrement témoin (9.2.6)
 n = dénombrement essai préliminaire (9.3.2)

6 / Essai proprement dit

6.1. Résultats dans les conditions décrites ci-dessus

Concentration de produit en pourcentage V/V au contact avec les bactéries : 90 %

Souches ; collection d'origine et numéro dans la collection	N	n	N'	X	pH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A 22	57	60	48	0	7,30
<i>Escherichia coli</i> CIP 54 127	62	60	108	0	7,29
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53 154	91	80	111	0	7,29
<i>Enterococcus hirae</i> CIP 5 855	96	125	132	0	7,28

avec N = dénombrement de contrôle (10.5.1)
 N' = dénombrement témoin (10.5.1)
 n = dénombrement essai préliminaire (10.5.3)
 X = dénombrement essai définitif (10.5.2)

6.2. Conclusion

L'alcool à 70° additionné de 0,5% de chlorhexidine présente une activité bactéricide spectre 4 à 20°C conforme à la norme NF T 72 151 (1987).

Signatures

ANNEXE E

CONTRÔLE DE L'EFFICACITE
DE LA DESINFECTION

Procédure de Rhône-Poulenc Rorer

RHÔNE-POULENC RORER

	:	:	Exemplaire n°	page 1/20
	:	PROCEDURE TECHNIQUE	:	Annule le document :
	:	N°	:	Date d'application :
	:		:	

CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA DECONTAMINATION
DES SURFACES

Rédigée par :	:	Vérifiée par :
Date et signature :	:	Date et signature :
	:	

DISTRIBUTION DES EXEMPLAIRES

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

	:	:	Exemplaire n°	page 2/20
	:	:	Annule le document :	
	:	:	Date d'application :	
	:	:		
	:	:		
	:	:		
	:	:		
	:	:		
	:	:		
	:	:		

CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA DECONTAMINATION
 DES SURFACES *
 1. PROCEDURE GENERALE

Rédigée par :	:	Vérifiée par :
Date et signature :	:	Date et signature :
	:	
	:	

DISTRIBUTION DES EXEMPLAIRES

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

But : Vérifier par un prélèvement avant la décontamination et un prélèvement après la décontamination, aux mêmes points, soit l'absence soit la disparition des germes

Matériel nécessaire (il doit être stérile) pour une opération

- Ecouvillons en alginate de calcium, avec milieu de transport

Référence : TRANSETTE III (code 17 4321 P) des laboratoires SPECTRUM inc
Houston - Revendeur SOBIODA

Contrôlés selon la procédure 4.88.028 paragraphe V.2

Prévoir autant d'écouvillons que de points de prélèvement, plus un témoin

- lames de surface Réf: Biotest HYCON - GK - A, Art n° 931 050 avec languettes adaptées
- chamoisines stériles VELEDA en sachet SOPLAMED
- sachet plastique Biotest permettant de mettre les écouvillons
- boîte stérile pour le transport des lames de surface
- 1 sac pour mettre la boîte
- 2 sacs radiostérilisés pour le transport
- 1 feutre permanent
- des élastiques
- Tubes (autant que d'écouvillons) contenant 14 ml de bouillon trypticase soja (=TS)
- 1 hotte à flux laminaire pour l'ensemencement

Lieu de l'étude

- . les 2 blocs de remplissage
- . la salle de filtration
- . le préparatoire

Les quatre pièces sont en zone stérile

Conditions particulières

L'opérateur doit se conformer aux règles en vigueur sur le lieu de l'étude

cf procédure "Procédure d'entrée du personnel en salle stérile"

Mode opératoire

1. Préparation du matériel : En atmosphère stérile, sous la hotte à flux laminaire
- 1.1. Inscrire sur les écouvillons et sur les lames de surface les références des points de prélèvement
(se reporter aux plans de prélèvement correspondants)

Remarque : il est conseillé d'attacher les écouvillons par groupes, à l'aide d'élastiques, afin de simplifier la manipulation dans les blocs

(Exemple : le groupe = bloc 1 ; 2e groupe = bloc 2 ; 3e groupe = le reste)
afin de simplifier la manipulation dans les blocs stériles

- 1.2 Placer les écouvillons dans le sachet; le fermer, placer le sachet et les chamoisines dans un sac.

Placer le sac dans le 2 eme sac ; fermer avec du papier adhésif ou un élastique
(ce sac peut être sorti de sous la hotte ; son contenu est stérile)

- 1.3 Mettre les lames de surface dans la boîte stérile, la boîte dans le sac et fermer

2. Ecouvillonnage : à l'atelier de fabrication

- 2.1. Sortir les écouvillons correspondant à un groupe ainsi qu'une chamoisine.
- 2.2. Libérer le milieu de transport, en pinçant le bout de l'étui de l'écouvillon, et enfoncer l'écouvillon pour qu'il s'humidifie.
- 2.3. Faire le contrôle en partant de la zone la plus propre jusqu'à la zone la moins propre

Sortir l'écouvillon en le tenant à travers l'étui.

Frotter une surface d'environ 25 cm² en prenant bien soin d'utiliser tout le coton (en le roulant).

Remettre l'écouvillon dans son emballage

- 2.4. Pulvériser sur la chamoisine de l'alcool phéniqué à 1% (ou le désinfectant préconisé dans le bloc) et essuyer soigneusement l'endroit écouvillonné (afin de ne pas laisser de traces d'alginate)

Remarque : Près de la machine, il est très important de ne pas pulvériser directement sur le point à nettoyer, pour éviter que l'alcool ne risque de pénétrer dans les seringues

- 2.5. Procéder de même pour les points suivants, en prenant une chamoisine propre pour le premier point de chaque bloc
- 2.6. Remettre les écouvillons dans le sachet

3. Prélèvements avec les lames de surface

- 3.1. Ouvrir la feuille de protection d'environ 2 cm et sortir la lame de gélose
- 3.2. Presser la gélose contre la surface à tester
- 3.3. Remettre la lame dans la protection en prenant soin de ne rien toucher avec la gélose
- 3.4. Fermer à l'aide d'une languette
- 3.5. Faire de même avec les lames
- 3.6. Remettre les lames de surface dans la boîte et refermer

4. Ensemencement des écouvillons (sous la hotte)

- 4.1. Dater et identifier les tubes de bouillon T S, de la même façon que les écouvillons
- 4.2. Préparer les écouvillons dans l'ordre des tubes, afin de limiter les mouvements sous la hotte.
- 4.3. Prendre dans la même main le tube et l'écouvillon ; de l'autre main, ouvrir l'étui de l'écouvillon puis le tube ; mettre l'écouvillon dans le tube et reboucher le plus rapidement possible
- 4.4. Faire de même avec les autres écouvillons.

5. Incubation

5.1. Écouvillons

- 5.1.1. 7 jours à l'étuve à 32° C
puis 7 jours à l'étuve à 25° C
- 5.1.2. Dès qu'un trouble apparaît dans un des tubes, faire un isolement sur gélose T S, puis identifier le germe (coloration de gram, galerie,)
- 5.2. Lames de surface : 7 jours à l'étuve à 32° C
- 1.3. Penser à noter les conditions dans lesquelles la manipulation s'est effectuée
(heure de prélèvement, nombre de personnes dans le bloc)

:	:	:
:	:	: Exemple n° page.7/20
:	:	:
:	PROCEDURE TECHNIQUE	: Annule le document :
:	:	:
:	N°	: Date d'application :
:	:	:

CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA DECONTAMINATION
DES SURFACES

2. CONTROLE DE L'ACTION DU FORMALDEHYDE
PAR VOIE AERIENNE

Rédigée par :

: Vérifiée par :

Date et signature :

: Date et signature :

DISTRIBUTION DES EXEMPLAIRES

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

But : Vérifier par un écouvillonnage avant formalisation et un écouvillonnage après formalisation aux mêmes points, l'absence ou la disparition des germes

Mode opératoire

Appliquer la procédure générale sur les 17 points de prélèvement suivants :

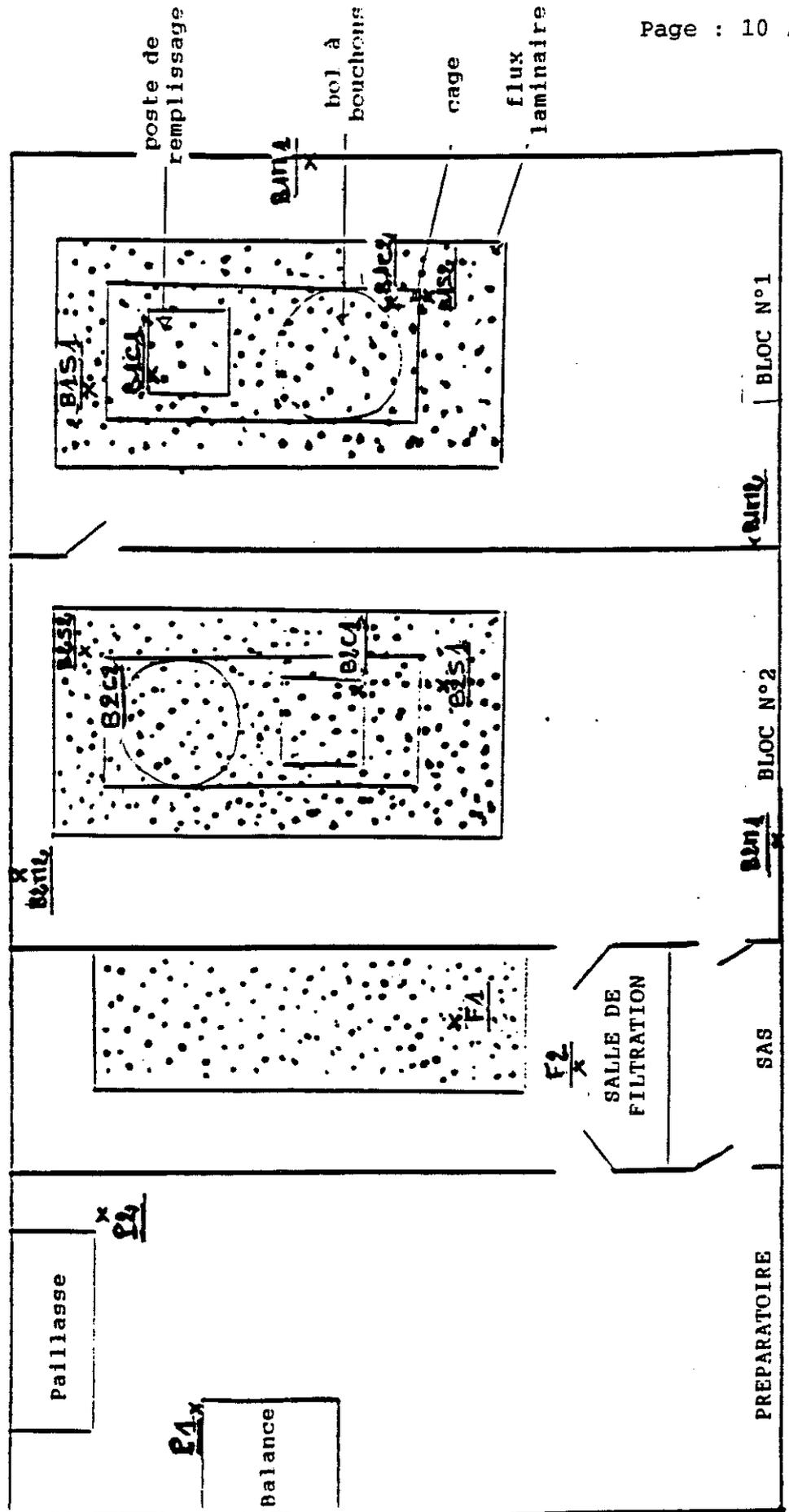
- . Bloc 1 cage 1 = B1C1 (voir plan)
- cage 2 = B1C2
- sol 1 = B1S1
- sol 2 = B1S2
- mur 1 = B1M1
- mur 2 = B1M2
- . Bloc 2 cage 1 = B2C1
- cage 2 = B2C2
- sol 1 = B2S1
- sol 2 = B2S2
- mur 1 = B2M1
- mur 2 = B2M2
- . Salle de filtration
- point 1 = F1
- point 2 = F2
- . Préparatoire
- point 1 = P1
- point 2 = P2
- . Témoin négatif = T

Noter les résultats dans le tableau correspondant

PLAN DU CONTROLE

	Avant Formol		Après Formol	
	32° C	25° C	32° C	25° C
<u>ELOC 1 =</u>				
Cage 1				
Cage 2				
Sol 1				
Sol 2				
Mir 1				
Mir 2				
<u>ELOC 2 =</u>				
Cage 1				
Cage 2				
Sol 1				
Sol 2				
Mir 1				
Mir 2				
<u>Saie de filtration =</u>				
Sous le flux 1 = F1				
Devant porce 2 = F2				
<u>Saie Préparatoire =</u>				
Balance P 1				
Milieu P 2				

PLAN DE PRELEVEMENT
 POUR LE CONTROLE DU FORMALDEHYDE



:	:	:
:	:	: Exemple n° page 11/20
:	PROCEDURE TECHNIQUE	: Annule le document :
:	N°	: Date d'application :
:	:	:

CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA DECONTAMINATION
DES SURFACES

3. CONTROLE DE LA PROPRETE DES BOLS ET RAMPES A BOUCHONS

Rédigée par :	:	Vérifiée par :
Date et signature :	:	Date et signature :
:	:	:

DISTRIBUTION DES EXEMPLAIRES

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

: Contrôle de l'efficacité de la décontamination : Page : 12/20
: des surfaces :
:

BUT : Vérifier par une série d'écouvillonnages l'absence de contamination sur le trajet des bouchons, après une semaine de fabrication

Mode opératoire

Le contrôle doit avoir lieu juste avant le nettoyage des bols à bouchons.

1. Faire enlever tous les pistons restants dans la machine
2. Appliquer la procédure générale sur les 8 points suivants :

Bloc n° 1	-	1)	
Bloc n° 2	-	2)	
Bloc n° 3	-	3)	= Sur le bol
Bloc n° 4	-	4)	
Bloc n° 5	-	5)	
Bloc n° 6	-	6)	
Bloc n° 7	-	7)	= Sur les rampes
Témoin négatif		8		

en se conformant au schéma joint

Remarque : les 7 premiers écouvillons peuvent être multipliés par le nombre de blocs à contrôler

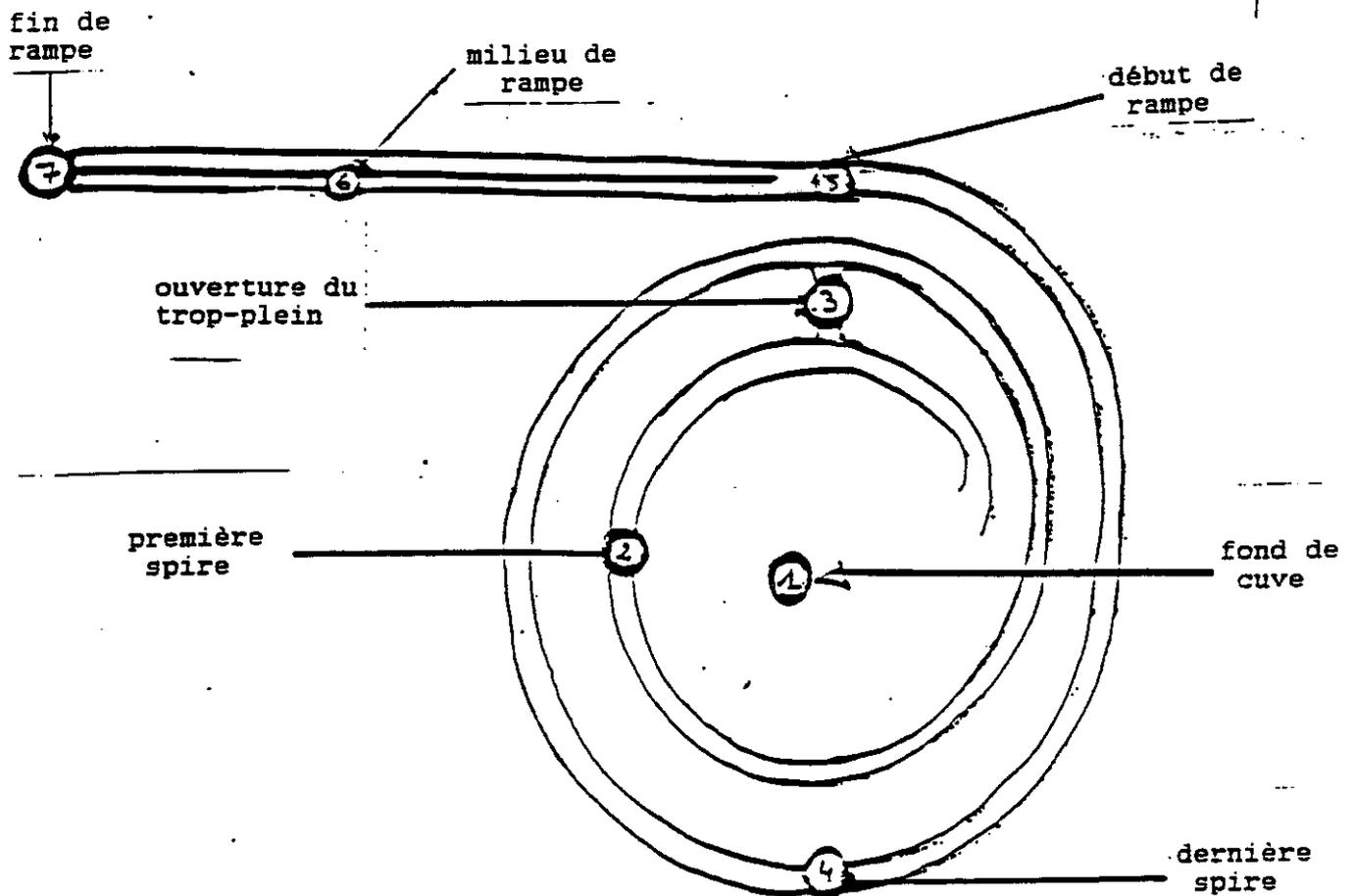
3. Inscrire les résultats sur le tableau correspondant, en précisant la technique de nettoyage utilisée la semaine précédente.

Interprétation des résultats

Chaque écouvillonnage devant être impérativement suivi d'un nettoyage complet des bols à bouchons, l'étude de leur propreté ne peut se faire qu'à la fin d'une semaine d'utilisation, c'est-à-dire juste avant le nettoyage hebdomadaire des machines

Les résultats quant à l'efficacité du nettoyage, testée avec 1 semaine de décalage, ne pourront donc être interprétables que si aucun germe ne pousse

CONTROLE DE LA PROPRETE
DES BOLS ET RAMPES A BOUCHONS
PLAN DE PRELEVEMENT



:	:	:
:	:	:
:	:	:
:	PROCEDURE TECHNIQUE	: Exemple n° page 15/20
:	:	:
:	N°	: Annule le document :
:	:	:
:	:	: Date d'application :
:	:	:

CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA DECONTAMINATION
DES SURFACES

4. DECONTAMINATION DES NESTS PAR PULVERISATION

Rédigée par :	:	Vérifiée par :
Date et signature :	:	Date et signature :
	:	
	:	

DISTRIBUTION DES EXEMPLAIRES

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

: Contrôle de l'efficacité de la décontamination : Page : 16/20
: des surfaces :
:

But : Vérifier par applications de lames de contact avant et après pulvérisation d'alcool, la propreté des enveloppes des nests et l'efficacité de la pulvérisation de désinfectant.

MODE OPERATOIRE :

Appliquer la procédure générale concernant les lames de contact, en testant les points suivants:

- Dessus de l'enveloppe du nest
- Côté de l'enveloppe du nest, sur 2 nests par bloc.

Faire la même opération aux mêmes points avant et après pulvérisation du désinfectant en vigueur.

RESULTATS :

Inscrire sur la feuille de résultats le nombre d'unités formant colonies par lame de surface.

Identifier les germes.

:	:	Exemplaire n°	page.18/20
:	:	Annule le document :	
:	PROCEDURE TECHNIQUE	Date d'application :	
:	N°		

CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA DECONTAMINATION
 DES SURFACES
 5. DECONTAMINATION DE LA PAROI EXTERIEURE DES CUVES

Rédigée par :	Vérifiée par :
Date et signature :	Date et signature :

DISTRIBUTION DES EXEMPLAIRES

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

ANNEXE F
=
GLOSSAIRE

Les définitions indiquées par des astérisques sont tirées des ouvrages suivants :

- * *SIMONS J., SOTTY P.- Prévention en laboratoires de recherche. Risques biologiques. (référence bibliographique n° 20)*
- ** *ISOARD P.- Guide de la biocontamination. (Référence bibliographique n° 11)*
- *** *Glossaire des Bonnes Pratiques de Fabrication de 1993*
- **** *Norme NF X 50 120*
- ***** *Norme NF T 72 101*

Antibiorésistance* : Capacité d'une bactérie de croître en présence d'une dose d'antibiotique normalement inhibitrice. Selon son mécanisme d'acquisition, cette résistance peut se perpétuer et se transmettre.

Antiseptie***** : Opération au résultat momentané, permettant au niveau des tissus vivants, d'inhiber ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus, en fonction des objectifs fixés.

Antiseptique* : Procédé physique ou substance chimique, toléré par les tissus vivants, détruisant les micro-organismes (pathogènes ou non).

Asepsie* : Ensemble des mesures propres à empêcher tout apport exogène (contamination) de micro-organismes dans un milieu donné.

Assurance de la qualité**** : Ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité.

Audit qualité**** : Examen méthodique et indépendant en vue de déterminer si les activités et les résultats relatifs à la qualité satisfont aux dispositions préétablies, et si ces dispositions sont mises en oeuvre de façon efficace et aptes à atteindre les objectifs.

Bactéricide***** : Produit ou procédé ayant la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.

Biocontamination** : Contamination d'une surface par des micro-organismes.

Biodégradabilité** : Aptitude d'une matière organique à être dégradée naturellement en milieu généralement aqueux, par l'action de micro-organismes.

Biofilm** : Ensemble de micro-organismes, de la flore et de la faune microscopiques ainsi que de leurs sécrétions macromoléculaires qui sont présents sur la surface d'un matériau en raison d'une part de l'adhésion des organismes vivants, d'autre part de leur multiplication et de leur activité biologique.

Contamination** : Présence d'un élément indésirable dans un fluide, sur une surface ou dans un espace protégé. Cet élément entraîne une perturbation d'ordre qualitatif ou quantitatif d'une opération précise dans laquelle intervient le fluide ou la surface contaminée. La perturbation peut être observée immédiatement ou se révéler seulement par la suite. Dans le cas d'une contamination biologique, on utilisera le terme biocontamination.

Contrôle**** : Action de mesurer, examiner, essayer, passer au calibre une ou plusieurs caractéristiques d'un produit ou service et de les comparer aux exigences spécifiées en vue d'établir leur conformité.

Décontamination***** : Opération, au résultat momentané, permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération (et connus).

Désinfectant***** : Produit ou procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination des surfaces dans des conditions définies.

Désinfection***** : Opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération.

Fiabilité**** : Aptitude d'un dispositif à accomplir une fonction requise dans des conditions données, pendant une durée donnée.

Filtration* : Méthode de séparation des constituants d'un mélange selon leur taille, par passage à travers une membrane semi-perméable dont les pores ont un diamètre calibré.

Fongi- : Préfixe qui s'applique aux champignons.

In vitro* : Qualifie une expérimentation faite en dehors de l'organisme, en conditions artificielles.

In loco = in situ : sur le terrain, dans les conditions réelles.

Latence* : Temps de réaction, pendant lequel il y a apparence d'inactivité.

Matière première*** : Toute substance utilisée dans la fabrication d'un médicament, à l'exclusion des articles de conditionnement.

Médicament*** : On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques.

Micro-organisme* : Organisme vivant invisible à l'oeil nu.

Microbicide : Produit ou procédé ayant la propriété de tuer les micro-organismes dans des conditions définies. On distingue *bactéricide*, *fongicide*, *sporicide* et *virucide*, selon la catégorie de micro-organismes visés ; la valeur de la réduction logarithmique nécessaire pour rentrer dans ces catégories, varie selon les micro-organismes.

Microbiostatique : produit ou procédé ayant la propriété d'inhiber momentanément la croissance des micro-organismes dans des conditions définies.

Mutagène* : Caractérise un agent chimique, biologique ou physique susceptible de provoquer des mutations chez les êtres vivants.

Nettoyage** : Opération d'élimination des salissures (particulaires, biologiques, liquides...) avec un procédé faisant appel, dans des proportions variables les unes par rapport aux autres, aux facteurs suivants : action chimique, action mécanique, temps d'action de ces deux paramètres et température.

Neutralisant** : Substance utilisée pour inactiver les antiseptiques et les désinfectants de manière à mettre en évidence leur activité bactéricide, fongicide, virucide, sporicide.

Particule viable** : Terme utilisé pour définir une particule, sans préjuger de sa taille, et contenant un ou plusieurs micro-organismes donnant naissance, dans des conditions convenables de prélèvement et de culture, à une colonie macroscopiquement visible. On utilise parfois les termes dérivés de l'anglais de P.N.C. (particule donnant naissance à des colonies) ou U.F.C.(unité formant colonie).

Pathogène* : Qui engendre la maladie.

Procédure** : Règles écrites d'organisation déterminant les compétences et les démarches pour parvenir à un but.

Qualité**** : Ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites.

Quarantaine*** : Situation des matières premières, des articles de conditionnement, des produits intermédiaires, vrac ou finis, isolés physiquement ou par d'autres moyens efficaces, dans l'attente d'une décision sur leur libération ou leur refus.

Rémanence : Persistance dans le temps de l'activité du désinfectant.

Résistance* : Qualité d'un corps qui réagit contre l'action d'un autre corps.

Sécurité* : Situation objective dans laquelle le danger est contenu dans les limites inférieures optimales.

Spectre d'action : Ensemble des micro-organismes sur lesquels le produit est actif.

Spori- : préfixe qui s'applique aux spores bactériennes.

Stérilité* : Etat de ce qui est stérile, c'est-à-dire exempt de toute contamination par des micro-organismes revivifiables.

Tératogène* : Se dit d'un agent physique, chimique, biologique, capable d'induire chez l'embryon l'apparition d'anomalies se manifestant par des malformations.

Toxicité* : Propriété nocive d'un produit chimique sur un être vivant.

Traçabilité**** : Aptitude à retrouver l'historique, l'utilisation ou la localisation d'un article ou d'une activité, ou d'articles ou activités semblables, au moyen d'une identification enregistrée.

Validation*** : Etablissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication, que la mise en oeuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés.

Zone à risques** : Local géographiquement défini et délimité dans lequel les sujets ou les produits sont particulièrement vulnérables à l'impact de la biocontamination.

Zone d'atmosphère contrôlée*** : Zone dont le contrôle de la contamination particulaire et microbienne dans l'environnement est défini et qui est construite et utilisée de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de substances contaminantes.

TABLE DES MATIERES

PLAN	3
ABREVIATIONS	4
UNITES	5
INTRODUCTION	6
PREMIERE PARTIE : CHOIX DU DESINFECTANT	11
1 / ETUDE DE LA SURFACE	13
1-1 Sa taille	13
1-2 Sa forme	13
1-3 Les matériaux	13
2 / ETUDE DE L'ENVIRONNEMENT	14
3 / ETUDE DU DESINFECTANT PAR RAPPORT AU MEDICAMENT FABRIQUE	15
3-1 Contact entre le médicament et le désinfectant	16
3-2 Catégorie de médicaments fabriqués	16
3.2.1. Les médicaments obligatoirement stériles	16
3.2.1.1 Préparations aseptiques	16
3.2.1.2 Produits stérilisés dans leur récipient final	17
3.2.2. Médicaments non obligatoirement stériles	17
4 / PLACE DU DESINFECTANT DANS LA CLASSIFICATION CHIMIQUE	18
4-1 Eau de Javel à 10%	19
4.1.1 Solution étudiée	19
4.1.2 Généralités	19
4.1.3 Avantages et inconvénients	19
4-2 Eau oxygénée à 30 volumes	20
4.2.1 Solution étudiée	20
4.2.2 Généralités	20
4.2.3 Avantages et inconvénients	20
4-3 CLINISEPT® 2500 potentialisé	21
4.3.1 Solution étudiée	21
4.3.2 Généralités	21
4.3.3 Avantages et inconvénients	21
4-4 Chlorhexidine en solution alcoolique	22
4.4.1 Solution étudiée	22
4.4.2 Généralités	22
4.4.3 Avantages et inconvénients	22

5 / ETUDE DE LA TOXICITE	23
6 / CRITERES DE DECISION	26
DEUXIEME PARTIE : CONTROLES EN LABORATOIRE	28
1 / LES TESTS DE STADE 1	30
1-1 Historique	30
1-2 Les tests officiels	31
1-3 Les normes AFNOR	32
1.3.1 Principes généraux des normes AFNOR	32
1.3.1.1 Basées sur la méthode de dilution/neutralisation	33
1.3.1.2 " " " " de filtration sur membranes..	34
1.3.1.3 Commentaires sur le choix de la méthode	35
1.3.2 Particularités de ces différentes normes	36
1.3.2.1 Etude de l'activité bactéricide : NF-T 72 150 et 151..	36
1.3.2.2 " " " fongicide : NF-T 72 200 et 201 ...	36
1.3.2.3 " " " sporicide : NF-T 72 230 et 231 ...	37
1.3.2.4 " " " virucide : NF-T 72 180 et 181 ...	37
1.3.3 Exemple de la norme NF-T 72 151	38
1.3.3.1 But	38
1.3.3.2 Principe	38
1.3.3.3 Expression des résultats	39
1.3.3.4 Application pratique	40
1.3.4 Conclusion sur les normes AFNOR	42
1-4 Les nouvelles techniques	43
1.4.1 Les microméthodes dérivées des normes AFNOR	43
1.4.2 La méthode des stries	43
1.4.3 Disparition de l'activité succino-déshydrogénasique	44
1.4.4 Conclusion	45
2/ LES TESTS DE STADE 2	46
2-1 Les tests évaluant l'influence de certains facteurs	46
2-2 Les tests avec porte-germes = carrier-tests	48
2.2.1 Historique	48
2.2.2 Les tests actuels	49
2.2.2.1 Aux Etats-Unis	49
2.2.2.2 En Allemagne	49
2.2.2.3 En France	49
2.2.2.4 Autres tests	50
2.2.2.5 Comparaison entre ces tests	50

3 / CONCLUSION	51
TROISIEME PARTIE : CONDITIONS D'UTILISATION	52
1 / ACHAT DU DESINFECTANT	54
2 / RAPPEL SUR LES PROCEDURES	56
3 / PREPARATION DU DESINFECTANT	57
3-1 Procédure de préparation	57
3-2 Conditions de stockage et de conservation	58
3-3 Contrôle de stérilité	60
3.3.1 Méthode de contrôle de la stérilité	62
3.3.1.1 But et principe	62
3.3.1.2 Précautions de manipulation	62
3.3.1.3 Matériel et réactifs nécessaires pour un contrôle	62
3.3.1.4 Méthode	63
3.3.1.5 Interprétation des résultats	64
3.3.2 Résultats obtenus	65
4 / UTILISATION	67
4-1 Conditions d'utilisation	67
4.1.1 Nettoyage préalable	67
4.1.2 Le matériel utilisé	68
4.1.3 Quand désinfecter ?	69
4-2 Traces écrites	69
4-3 Formation du personnel	71
5 / DESINFECTION ET ASSURANCE DE LA QUALITE	72
5-1 Les méthodes de contrôle de la désinfection	72
5.1.1 Les différentes techniques existantes	73
5.1.1.1 Méthode par écouvillonnage	73
5.1.1.2 Méthode par empreintes sur gélose	73
5.1.1.3 Méthode par lavage - rinçage - récupération	73
5.1.1.4 Comparaison des deux techniques les plus courantes	74
5.1.2 Procédures de contrôles	75
5.1.3 Cas particuliers	76
5.1.3.1 Les animaleries	76
5.1.3.2 Surfaces en contact direct avec le médicament ...	76
5-2 Validation de la désinfection	77
5-3 Audit de Qualité	79
DISCUSSION	80

CONCLUSION	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
ANNEXES	95
Annexe A : Spectres d'activité, antagonismes et synergies	95
Annexe B : Etudes de toxicité	98
Annexe C : Schémas récapitulatifs de la norme NF-T 72 151	100
Annexe D : Procès-verbaux / Norme NF-T 72 151	103
Eau de Javel à 10%	104
Eau oxygénée à 30 volumes	107
CLINISEPT® 2500 potentialisé	110
Alcool + chlorhexidine	113
Annexe E : Procédure de contrôle d'efficacité de la désinfection ...	116
Annexe F : Glossaire	137
TABLE DES MATIERES	143

MOTS - CLES

1. Désinfectants de surface
2. Industrie pharmaceutique
3. Qualité
4. Réglementation
5. Choix et utilisation
6. Validation

RESUME

La mise en place d'un plan de désinfection de surface dans une industrie pharmaceutique doit s'inscrire dans la Politique Qualité de l'entreprise, et être abordée sous l'angle des Bonnes Pratiques de Fabrication, car son but est l'obtention d'un médicament de qualité.

Qu'il s'agisse de faire ou de confirmer le choix d'un désinfectant de surface, l'adéquation du produit aux besoins réels repose initialement sur une concordance entre les capacités théoriques du désinfectant et les exigences de l'utilisateur ; les données bibliographiques que l'on peut obtenir doivent être mises en balance avec le contexte de l'utilisation : le médicament concerné, les surfaces à traiter et leur localisation, enfin la population microbienne rencontrée. L'activité intrinsèque du désinfectant doit être conforme à la réglementation en vigueur, et adaptée à l'utilisation que l'on souhaite en faire ; la preuve en sera fournie par des tests en laboratoire, pour lesquels l'harmonisation sur le plan international est encore en suspens. Son efficacité réelle sera vérifiée par des contrôles en situation, qui doivent s'inscrire dans un programme de validation de l'opération entière ; une démarche Qualité doit également être appliquée au désinfectant, de son achat jusqu'à son utilisation, en passant par sa préparation et son stockage. Les contrôles ne donnent que des résultats ponctuels qui ne peuvent être généralisés que si la globalité du procédé est maîtrisée et validée, et si les points critiques ont été évalués.

Si la désinfection de surface est un point fondamental de la démarche vers la qualité microbiologique du médicament, elle n'est pas seule en cause. L'intégration des acteurs de la désinfection au processus de fabrication et leur responsabilisation, sont nécessaires à l'assurance de la qualité de la désinfection et par là, de la qualité du médicament.