

MONITORING DE L'EAU

Comparaison des méthodes traditionnelles et de l'ATP bioluminescence

Par É. BAGUR et N. MERCIER, BMS

Les méthodes traditionnelles pour le contrôle de la qualité de l'eau dépendent de l'appréciation de l'opérateur et ne répondent pas aux attentes de la FDA qui encourage le contrôle en temps réel, notamment avec son initiative PAT (Process Analytical Technology). Les méthodes analytiques alternatives fournissent quant à elles des résultats en quelques heures, voire quelques minutes. Un tel système a été étudié en vue de le comparer avec les méthodes classiques de comptage des colonies ou UFC.

Bien des publications ont évoqué les limites des méthodes traditionnelles de microbiologie et les besoins de l'industrie pharmaceutique actuelle, en suggérant l'adoption du PAT (Process Analytical Technology) en tant qu'outil pour la qualité [1-4]. Pour beaucoup, la réponse à ces limites est la microbiologie rapide [5 ; 6]. Pourtant, rares sont les articles d'utilisateurs ayant appliqué cette méthodologie pour résoudre les problèmes liés aux méthodes classiques. Cet article contribue à pal-

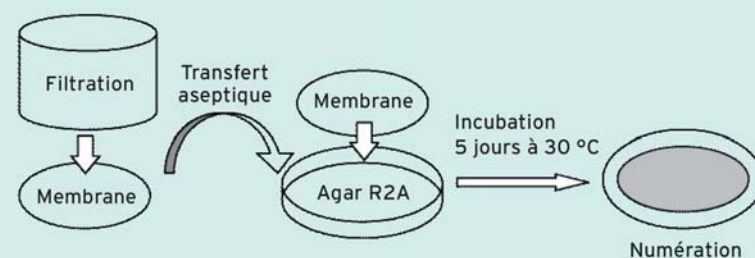
lier ce manque en présentant un exemple concret d'application d'une méthode alternative fondée sur l'ATP bioluminescence avec le système de microbiologie rapide Pallchek.

Analyse de l'eau - limites de la méthode traditionnelle

Historiquement, le suivi de la qualité des boucles d'eau repose sur le comptage sur boîte de Petri de la contamination. Dans cette méthode :

- les échantillons d'eau sont filtrés à travers des membranes de seuil de coupure 0,45 µm ;

1 Méthode traditionnelle de quantification de la contamination bactérienne de l'eau pharmaceutique



Analyse d'eau purifiée : 100 mL ou 1 mL, selon le système et les points contrôlés.

- les membranes sont déposées, en duplicat, sur un milieu gélosé type agar R2A et mises en incubation (5 jours à 30 °C) ;
- les colonies sont comptées au bout de 5 jours et le résultat est alors comparé aux limites d'alerte et d'action établies pour le système contrôlé (figure 1).

La méthode traditionnelle présente l'avantage d'être relativement facile à mettre en œuvre : elle nécessite peu de matériel et génère un coût faible à modéré. Les principaux inconvénients sont en revanche le délai entre le prélèvement et l'obtention des résultats et le risque de ne pas détecter des micro-organismes stressés.

Le délai entre l'obtention d'un résultat hors spécification (OOS) et la mise en place d'une action corrective constitue également un problème essentiel. Il peut conduire à sous-estimer le niveau de contamination réel, en raison notamment de micro-organismes susceptibles de se développer dans la boucle d'eau durant la période d'incubation de l'échantillon contrôlé (particulièrement dans le cas des organismes stressés, pouvant présenter une croissance lente).

La sous-estimation du niveau de contamination peut alors aboutir à des actions correctives inappropriées et, de ce fait, inefficaces. ➔

L'ATP bioluminescence permet une estimation qualitative et semi-quantitative de la contamination.

→ Réseaux d'eau étudiés

Dans cette étude, quatre systèmes de distribution d'eau ont été évalués : deux dans l'usine Gascogne (installation récente) et deux autres dans l'usine Guyenne (installation plus ancienne).

Sur le site de Gascogne, 72 points de prélèvement sont analysés en routine, dont 42 au niveau de la boucle de production et 30 au niveau de la boucle de distribution.

Sur le site de Guyenne, un total de 27 points de prélèvement sont analysés en routine, incluant 8 points au niveau de la boucle de production et 19 points au niveau de la boucle de distribution.

Le **tableau A** montre les niveaux d'action, établis selon les méthodes traditionnelles et à partir de l'historique des données.

Ces niveaux d'action pour le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau sont différents pour chaque usine. En effet, ils dépendent d'une comparaison entre la qualité des boucles de production et de distribution de l'eau purifiée, d'une part, et de l'historique des données de suivi des résultats, d'autre part.

L'ATP bioluminescence comme méthode rapide

La quantité d'adénosine triphosphate (ATP) mesurée par biolu-

2 Le système de microbiologie rapide Pallchek



Ce système de détection est constitué d'un photomètre manuel qui mesure l'émission de lumière générée par la réaction entre l'ATP et le réactif luciférine/luciférase.

minescence est une technologie largement répandue dans l'industrie agro-alimentaire en tant qu'outil de contrôle qualité [7 ; 8]. En outre, elle est reconnue comme une méthode sensible pour le contrôle de l'eau [9] et a obtenu l'approbation des instances réglementaires pour la libération de produits finis et le suivi de la qualité microbiologique de l'eau dans l'industrie pharmaceutique [9]. Des mesures quantitatives peuvent être réalisées en quelques minutes grâce à l'ATP bioluminescence. Elles restent cependant limitées en ter-

mes de sensibilité de détection, la technique étant fondée sur l'estimation directe du contenu en ATP de tous les micro-organismes présents dans l'échantillon. Ainsi la sensibilité se situe généralement aux alentours de 100 à 1 000 UFC. Toutefois cette méthode permet une estimation qualitative et semi-quantitative de la contamination. Les mesures qualitatives sont utilisées pour démontrer la présence ou l'absence d'un très faible niveau de micro-organismes contaminants en 24 heures tandis que les mesures semi-quantitatives sont utili-

A Spécification pour le monitoring de l'eau dans les usines Gascogne et Guyenne

Eau purifiée	Fréquence de contrôle	Niveau d'action à Guyenne (usine plus ancienne)	Niveau d'action à Gascogne (usine récente)	Niveau maximum recommandé par la Pharmacopée européenne
Système de production	Quotidien	15 UFC/mL	1 UFC/mL	100 UFC/mL
		1 500 UFC/100 mL	100 UFC/100 mL	10 000 UFC/100 mL
Point d'utilisation (production)	Hebdomadaire	15 UFC/mL	1 UFC/mL	100 UFC/mL
		1 500 UFC/100 mL	100 UFC/100 mL	10 000 UFC/100 mL
Point d'utilisation (nettoyage)	Mensuel	15 UFC/mL	1 UFC/mL	100 UFC/mL
		1 500 UFC/100 mL	100 UFC/100 mL	10 000 UFC/100 mL

Les niveaux d'action, fondés sur les méthodes traditionnelles, sont établis à partir de l'historique des données.

sées pour estimer le niveau de contamination dans l'échantillon.

Matériels et méthodes

Description du système de contrôle

Le système Pallchek (figure 2) est constitué d'un photomètre manuel détectant la contamination bactérienne à partir de la mesure de l'ATP. Le photomètre est placé sur une plaque de test en aluminium afin de créer une chambre de mesure à l'intérieur de laquelle la luminosité est réduite grâce à un joint flexible entourant la surface de lecture. Durant une mesure, le joint est comprimé contre la plaque en aluminium grâce à une pompe à

vide située dans le photomètre. Lors d'un essai, les échantillons sont placés sur des supports en matière plastique adaptés à la plaque de test en aluminium. Les réactifs sont ajoutés à l'échantillon pour permettre la mesure de l'ATP. Le premier réactif est un extractant qui lyse toutes les cellules microbiennes présentes dans l'échantillon afin de libérer l'ATP intracellulaire. Le second réactif, ajouté par la suite, est un complexe enzymatique luciférine/luciférase issu de la luciole *Photinus pyralis*. La réaction enzyme/substrat génère des photons proportionnellement à la quantité d'ATP présente dans l'échantillon. Les photons émis sont mesurés

par le photomètre du système Pallchek. Cet instrument contient un photomultiplicateur pour la détection et l'amplification des photons. Les résultats sont affichés sur un écran à cristaux liquides et sont exprimés en unités relatives de lumière (URL). 1 URL représente le dénombrement de 1 photon par seconde. Les cellules microbiennes contiennent un taux relativement constant d'ATP. Ce taux dépend du type de micro-organisme, de la taille de la cellule, des conditions nutritives, de la phase du cycle de croissance et du stress. Ainsi, la corrélation directe entre le nombre de micro-organismes et la lecture en URL doit être démontrée à l'aide

d'échantillons standardisés. Ce point est détaillé dans le paragraphe « Résultats et discussions ». Normalement, le système est utilisé avec un prélèvement recueilli sur membrane de filtration. Pour un échantillon concentré sur membrane, les mesures peuvent être effectuées de deux manières :

Mesure directe de l'ATP

L'échantillon est filtré et la membrane de filtration est directement analysée avec le luminomètre Pallchek. Cette méthode présente une limite de détection d'environ 100 à 1 000 UFC, selon la quantité d'ATP typiquement contenue dans les cellules bactériennes et la limite →

Conformat

→ de détection des réactifs et du photomètre utilisés. Elle fournit un résultat 1 minute après la filtration de l'échantillon (**figure 3a**).

Mesure indirecte de l'ATP

L'échantillon est filtré et la membrane de filtration est inoculée dans 10 mL de milieu de culture liquide puis mise en incubation toute la nuit (phase d'enrichissement). Après l'incubation, 8 mL du milieu de culture sont analysés avec le luminomètre Pallchek. Cette méthode permet de détecter jusqu'à 1 UFC et génère des résultats en 24 heures (**figure 3b**).

L'utilisation d'échantillons collectés par filtration sur membrane présente plusieurs avantages :

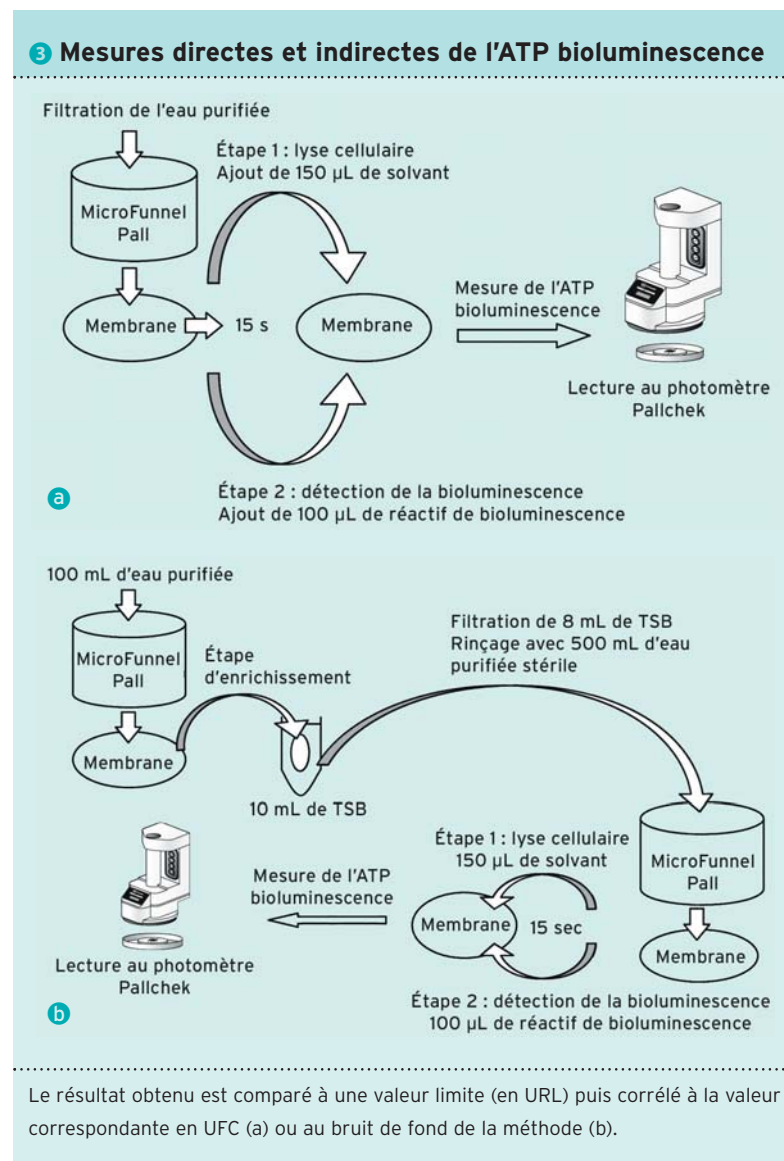
- la membrane peut être rincée avec des solutions appropriées afin d'éliminer tout composant pouvant interférer avec la détection ;
- tous les micro-organismes présents dans l'échantillon sont concentrés à la surface de la membrane, ce qui permet d'augmenter la quantité du signal lumineux au niveau du tube photomultiplicateur ;
- le contact entre les réactifs et les micro-organismes présents est optimisé.

Étude préliminaire

Comme pour toute nouvelle technologie, l'évaluation des capacités du système et sa qualification des performances sont des éléments essentiels à la mise en place de techniques de microbiologie rapide. La suite vise à expliquer comment cette évaluation a été menée pour le système Pallchek.

Contrôles de conformité du système

Afin de s'assurer que le système fonctionne correctement, des contrôles de conformité doivent



être effectués au début de chaque journée d'essais, suivant les recommandations du fournisseur. Ces contrôles se sont déclinés en :

- mesures du bruit de fond : l'assurance d'un bruit de fond faible et stable réduit les risques de faux positifs. Deux types de bruit de fond sont mesurés, celui généré par l'instrument, et celui généré par le réactif. Pour déterminer le bruit de fond propre à l'instrument, le luminomètre Pallchek est placé sur la plaque test en aluminium fournie

avec l'appareil et la mesure est prise. Le résultat doit être inférieur à 20 URL. Pour déterminer le bruit de fond du réactif, un support plastique est placé sur la plaque test en aluminium. Successivement, 150 µL d'extractant puis 100 µL de réactifs de bioluminescence reconstitués sont ajoutés sur le support. Une mesure est réalisée dans les 5 secondes. Le résultat doit être inférieur à 80 URL ;

- confirmation de la performance du réactif : ce test fait office de

témoin positif démontrant qu'une concentration connue d'ATP génère un signal compris dans un intervalle de valeurs connu et précis. Un support plastique est placé sur la plaque d'aluminium. 100 µL d'une solution d'ATP standard à 10^{-9} M (élaborée à partir du kit de corrélation ATP du fabricant) sont ajoutés sur le support, puis 100 µL de réactif de bioluminescence reconstitué sont ajoutés avant d'effectuer la mesure. Le résultat est normalement compris entre 10^5 et 10^6 URL lorsque le kit de test Pall Haute Sensibilité est utilisé.

Corrélation URL/ATP

La réalisation d'une courbe de corrélation d'ATP est une procédure classique employée pour la formation des opérateurs et la comparaison des résultats de l'utilisateur avec les données du fabricant durant la validation du système. La procédure permet aussi à l'utilisateur d'identifier toute dérive de la performance du système et de qualifier et comparer les nouveaux lots de réactifs avec les précédents.

Une série de six dilutions, au dixième, de la solution d'ATP standard livrée par le fournisseur est préparée. Pour chacune de ces dilutions, les valeurs en URL sont mesurées cinq fois. Les données obtenues sont utilisées pour construire un graphe avec en ordonnée le logarithme des concentrations en ATP et en abscisse, le logarithme des résultats en URL (**figure 4**).

Corrélation URL/UFC

La seconde grande étape de la qualification du système est la corrélation des résultats en URL avec des comptages en UFC. Les deux principaux objectifs de cette étude sont la caractérisation du bruit de fond de l'échantillon et l'établis-

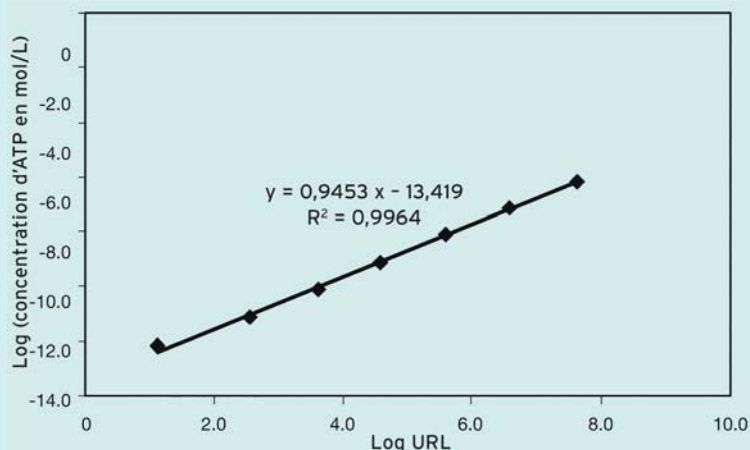
sement de la relation entre les URL et les UFC pour des micro-organismes spécifiques. L'essai est réalisé de la manière suivante :

- des échantillons témoins sont contaminés avec les micro-organismes cibles ;
 - ces échantillons sont dilués en série, au dixième, afin d'obtenir une gamme de concentrations en micro-organismes, comprise entre 10^1 et 10^8 UFC environ ;
 - Pour chaque dilution, les valeurs en URL sont mesurées cinq fois avec le système Pallchek ;
 - en parallèle, un échantillon de chaque dilution est déposé sur gélose agar et incubé. Ces échantillons sont utilisés pour déterminer le nombre d'UFC pour chaque dilution testée ;
 - une courbe de corrélation est alors construite avec en abscisse le logarithme des dénombrements en UFC et en ordonnée le logarithme des valeurs en URL.
- De plus, cinq échantillons témoins (sans micro-organismes) sont testés afin de déterminer le bruit de fond. →

4 Courbe de corrélation URL/ATP

Lecture URL pour une concentration d'ATP de :

Essai	7.25×10^{-7} 0	7.25×10^{-8} 10^{-1}	7.25×10^{-9} 10^{-2}	7.25×10^{-10} 10^{-3}	7.25×10^{-11} 10^{-4}	7.25×10^{-12} 10^{-5}	7.25×10^{-13} 10^{-6}
1	4.2×10^7	3.9×10^6	4.2×10^5	3.2×10^4	4.0×10^3	4.5×10^2	6.8×10^1
2	4.5×10^7	3.8×10^6	4.1×10^5	3.9×10^4	4.2×10^3	4.2×10^2	7.1×10^1
3	4.0×10^7	3.8×10^6	3.7×10^5	3.5×10^4	4.0×10^3	4.3×10^2	6.9×10^1
4	4.3×10^7	3.6×10^6	3.8×10^5	4.2×10^4	4.3×10^3	4.5×10^2	7.5×10^1
5	4.1×10^7	4.0×10^6	4.0×10^5	4.0×10^4	4.4×10^3	4.1×10^2	6.8×10^1
Moyenne	4.2×10^7	3.8×10^6	4.0×10^5	3.8×10^4	4.2×10^3	4.3×10^2	7.0×10^1
Moyenne URL sans bruit de fond	4.2×10^7	3.8×10^6	4.0×10^5	3.8×10^4	4.1×10^3	3.8×10^2	1.3×10^1
Écart type	1923538.4	148324.0	20736.4	4037.3	178.9	17.9	2.9
CV	4.6	3.9	5.2	10.7	4.3	4.1	4.2



La valeur en URL est mesurée cinq fois pour chacune des six dilutions de la solution d'ATP standard.

Basan

→ Les courbes de corrélation sont présentées en figures 5 et 6.

Détermination du seuil

La limite de détection pour l'ATP bioluminescence a été définie en calculant trois fois la valeur moyenne du bruit de fond. Elle représente la valeur en URL au-delà de laquelle les lectures peuvent être considérées comme différentes du bruit de fond.

La limite de quantification de l'ATP bioluminescence a été définie en

calculant dix fois la valeur moyenne du bruit de fond. Elle représente la valeur en URL au-delà de laquelle les lectures donnent une estimation exacte du nombre de micro-organismes présents dans un échantillon. Les valeurs des limites de détection et de quantification ont été reportées sur les courbes de corrélation afin de déterminer les valeurs correspondantes en UFC. En accord avec les recommandations de l'ICH (International Committee for Harmonisation), un seuil limite a été

fixé à cinq fois la valeur moyenne du bruit de fond calculée à partir des données générées pour tous les micro-organismes testés. Ce seuil correspond à un minimum de 1 000 UFC.

Monitoring du réseau d'eau

Cette partie est consacrée à la description des méthodes alternatives appliquées pour le contrôle de la qualité de l'eau. Selon la qualité du réseau d'eau, la méthode employée est différente.

Mesure du bruit de fond de l'échantillon

Le bruit de fond de l'échantillon est mesuré à partir de prélèvements d'eau pour lesquels l'absence de contamination microbienne a été démontrée à l'aide de la méthode traditionnelle. Pour cette étude, les échantillons témoins étaient représentatifs des systèmes de production d'eau contrôlés.

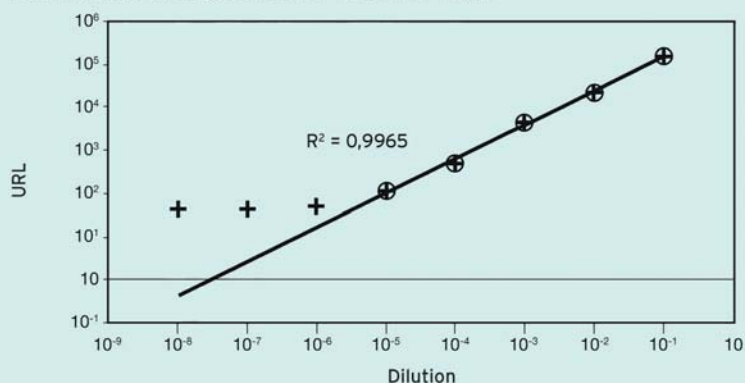
Les valeurs obtenues permettent de définir un seuil en URL au-delà duquel les résultats témoignent

5 ATP bioluminescence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Dilutions	Lecture URL					Moyenne	URL corrigées avec bruit de fond	UFC (moyenne des 3 itérations)
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5			
10 ⁻¹	1.6 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	4.6 x 10 ^{5*}
10 ⁻²	1.9 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁴	2.1 x 10 ⁴	1.9 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	2.1 x 10 ⁴	2.1 x 10 ⁴	4.6 x 10 ^{5*}
10 ⁻³	4.4 x 10 ³	5.4 x 10 ³	3.7 x 10 ³	4.5 x 10 ³	4.8 x 10 ³	4.6 x 10 ³	4.5 x 10 ³	4.6 x 10 ^{4*}
10 ⁻⁴	4.2 x 10 ²	5.5 x 10 ²	5.7 x 10 ²	5.1 x 10 ²	4.8 x 10 ²	5.1 x 10 ²	4.9 x 10 ²	4.6 x 10 ^{3*}
10 ⁻⁵	1.2 x 10 ²	1.1 x 10 ²	1.2 x 10 ²	1.3 x 10 ²	1.0 x 10 ²	1.2 x 10 ²	9.8 x 10 ¹	4.6 x 10 ^{2*}
10 ⁻⁶	5.6 x 10 ¹	5.6 x 10 ¹	5.4 x 10 ¹	4.4 x 10 ¹	4.6 x 10 ¹	5.1 x 10 ¹	3.3 x 10 ¹	4.5 x 10 ¹
10 ⁻⁷	4.6 x 10 ¹	3.5 x 10 ¹	3.4 x 10 ¹	2.8 x 10 ¹	4.3 x 10 ¹	3.7 x 10 ¹	1.9 x 10 ¹	4.0
10 ⁻⁸	3.6 x 10 ¹	5.5 x 10 ¹	3.7 x 10 ¹	3.9 x 10 ¹	5.2 x 10 ¹	4.4 x 10 ¹	2.6 x 10 ¹	4.0 x 10 ^{-1*}

*Lecture UFC extrapolée

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027/CIP 82,118



+ Test 5 ○ URL moyennes corrigées avec bruit de fond

	Valeur URL	Dilution	Valeur UFC extrapolée
Limite de détection (3 x bruit de fond)	1.3 x 10 ⁴	10 ⁻⁶	460
Limite de quantification (10 x bruit de fond)	4.4 x 10 ²	10 ⁻⁴	~ 4000

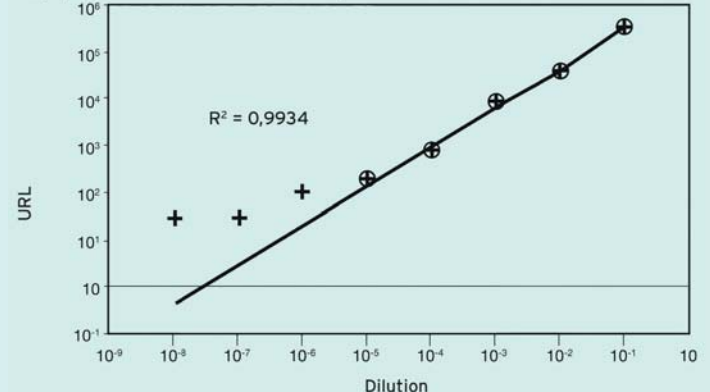
La valeur seuil du bruit de fond est estimée à 4,4.10¹ URL.

6 ATP bioluminescence *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Dilutions	Lecture URL					Moyenne	URL corrigées avec bruit de fond	UFC (moyenne des 3 itérations)
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5			
10 ⁻¹	3.1 x 10 ⁵	2.8 x 10 ⁵	3.0 x 10 ⁵	3.1 x 10 ⁵	2.9 x 10 ⁵	3.0 x 10 ⁵	3.0 x 10 ⁵	8.36 x 10 ^{5*}
10 ⁻²	2.8 x 10 ⁴	3.4 x 10 ⁴	3.2 x 10 ⁴	3.0 x 10 ⁴	2.9 x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁴	8.36 x 10 ^{5*}
10 ⁻³	7.3 x 10 ³	8.7 x 10 ³	8.2 x 10 ³	7.9 x 10 ³	8.3 x 10 ³	8.1 x 10 ³	8.1 x 10 ³	8.36 x 10 ^{4*}
10 ⁻⁴	7.0 x 10 ²	6.8 x 10 ²	7.1 x 10 ²	6.5 x 10 ²	6.7 x 10 ²	6.8 x 10 ²	6.7 x 10 ²	8.36 x 10 ^{3*}
10 ⁻⁵	1.2 x 10 ²	1.3 x 10 ²	1.6 x 10 ²	1.4 x 10 ²	1.3 x 10 ²	1.4 x 10 ²	1.2 x 10 ²	8.36 x 10 ^{2*}
10 ⁻⁶	9.7 x 10 ¹	7.4 x 10 ¹	1.0 x 10 ²	8.6 x 10 ¹	7.8 x 10 ¹	8.7 x 10 ¹	7.0 x 10 ¹	8.3 x 10 ¹
10 ⁻⁷	3.2 x 10 ¹	1.6 x 10 ¹	2.9 x 10 ¹	2.7 x 10 ¹	2.3 x 10 ¹	2.5 x 10 ¹	8.4	8.0
10 ⁻⁸	1.6 x 10 ¹	3.4 x 10 ¹	2.8 x 10 ¹	1.9 x 10 ¹	2.5 x 10 ¹	2.4 x 10 ¹	7.4	1.0

*Lecture UFC extrapolée

Staphylococcus aureus ATCC 6538/CIP 4,83



+ Test 5 ○ URL moyennes corrigées avec bruit de fond

	Valeur URL	Dilution	Valeur UFC extrapolée
Limite de détection (3 x bruit de fond)	7.5 x 10 ¹	10 ⁻⁶	83
Limite de quantification (10 x bruit de fond)	2.5 x 10 ²	10 ⁻⁵	> 1000

La valeur seuil du bruit de fond est estimée à 2,5.10¹ URL.

d'une contamination de l'échantillon. La méthode d'analyse utilisée est décrite en **figure 7**. La valeur seuil ainsi calculée correspond à cinq fois la valeur moyenne du bruit de fond obtenue.

Lorsque la filtration des échantillons est réalisée avec les membranes Pall GN-6 Metrical, les résultats pour ces témoins doivent être inférieurs à 150 URL. D'autres membranes peuvent donner des valeurs de bruit de fond différentes. Dans ce cas, la valeur du seuil doit être ajustée convenablement.

Plusieurs tests ont été effectués, avec différents volumes de rinçage de la membrane de filtration, afin d'atteindre la plus faible valeur de bruit de fond reproductible.

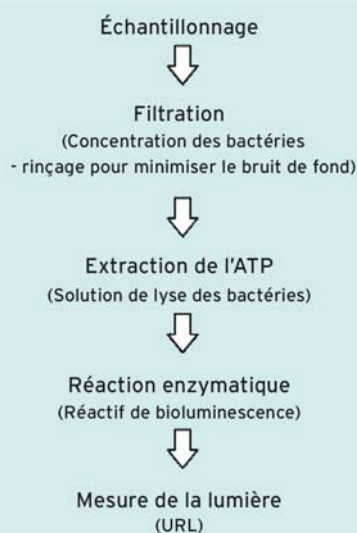
Des témoins négatifs sont analysés à chaque contrôle de routine afin de réévaluer la valeur seuil en fonction des conditions environnementales.

Procédure semi-quantitative fondée sur la mesure directe de l'ATP

Cette méthode est utilisée quand les données existantes montrent qu'une contamination microbienne est potentiellement présente dans les prélèvements d'eau. Dans ce cas, les échantillons sont collectés et analysés immédiatement, permettant l'obtention d'un résultat 1 minute environ après la filtration (**figure 7**). Les principales étapes sont :

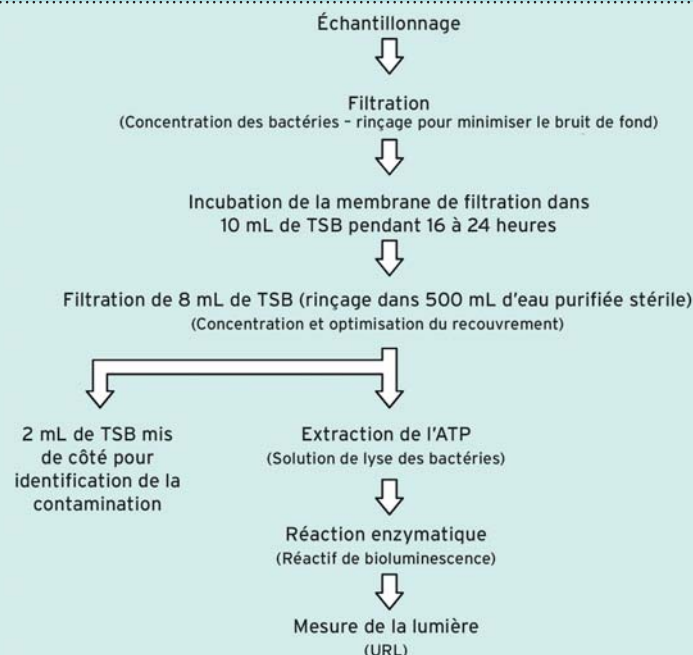
- prélèvement d'un échantillon réparti en trois aliquotes qui sont ensuite filtrées. Le volume de ces échantillons dépend du niveau de contamination microbienne estimé (**tableau A**) ;
- mesure immédiate de l'ATP bioluminescence de chacun des échantillons ;
- comparaison des valeurs obtenues (URL) avec le seuil déterminé précédemment. Les résultats

7 Protocole de mesure directe



Ce protocole s'applique aux témoins négatifs ou aux échantillons avec contamination attendue.

8 Protocole de mesure indirecte



Ce protocole est utilisé dans le cas d'échantillons non contaminés ou très faiblement contaminés.

B Interprétation de mesures directes sur différents volumes

Volume de prélèvement	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4
1 000 mL	-	+	+	+
100 mL	-	-	+	+
10 mL	-	-	-	+
Niveau estimé de contamination	< 1 UFC/mL < 100 UFC/100 mL	< 10 UFC/mL < 1 000 UFC/100 mL	< 100 UFC/mL < 10 000 UFC/100 mL	< 1 000 UFC/mL < 100 000 UFC/100 mL

+ : résultat URL > seuil (contamination > 1 000 UFC/échantillon).

- : résultat URL < seuil (contamination < 1 000 UFC/échantillon).

tats sont rapportés comme présence (+) ou absence (-) de contamination selon que la valeur est supérieure ou inférieure au seuil.

Le **tableau B** décrit, d'après la corrélation URL/UFC établie précédemment, la relation entre le volume d'échantillonnage, le résultat obtenu par méthode rapide (présence (+) ou absence (-)) et le niveau de contamination attendu (nombre d'UFC dans l'échantillon).

Il faut noter que ce tableau reprend les résultats d'une étude réalisée lors du développement de la méthode, à partir de cultures pures ATCC, et non d'échantillons contaminés naturellement et prélevés dans les boucles d'eau étudiées. L'objectif de ce tableau est de démontrer comment le niveau de contamination de l'échantillon est estimé à partir des résultats en URL et des volumes d'échantillon testés.

La mesure directe présente plu-

sieurs avantages : elle permet l'obtention d'un résultat en temps réel (30 minutes) tout en étant rapide et simple à mettre en œuvre. En outre, l'analyse de plusieurs volumes d'échantillons donne une estimation rapide du niveau de contamination et identifie immédiatement un résultat OOS, réduisant ainsi le risque des résultats faux positifs ou faux négatifs.

La principale limite de cette méthode reste la sensibilité, ➡

Interprétation de mesures indirectes avec plusieurs dilutions d'un échantillon

Volume de prélèvement	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4
1	-	+	+	+
1/10	-	-	+	+
1/100	-	-	-	+
Niveau estimé de contamination	< 1 UFC/100 mL	< 1-10 UFC/100 mL	< 10-100 UFC/100 mL	< 100-1 000 UFC/100 mL

+ : résultat URL > seuil (contamination > 1 UFC/échantillon) ; - : résultat URL < seuil (contamination < 1 UFC/échantillon)

→ c'est pourquoi elle est plutôt recommandée pour le contrôle des réseaux de distribution possédant un taux relativement élevé de contamination microbienne (plus de 1 000 UFC par échantillon). Pour des dispositifs délivrant une eau caractérisée par une contamination avoisinant les quelques cellules, comme les boucles d'eau pour préparations injectables ou d'eaux hautement purifiées, une approche différente est requise.

Procédure qualitative fondée sur une mesure indirecte de l'ATP

Lorsque le taux de contamination microbienne attendu dans l'eau est très bas (de 0 à 100 UFC/100 mL), la

mesure directe semi-quantitative ne convient plus. En effet, la mesure en URL, pour une très faible contamination, se situe en dessous de la limite de quantification établie durant la qualification du système. Une approche différente doit être utilisée pour déterminer si la qualité de l'eau reste dans les limites acceptables.

La méthode indirecte (figure 8) est un test de présence/absence mesurant l'ATP après une étape d'enrichissement. Celle-ci implique une filtration sur membrane de l'échantillon et une incubation de la membrane d'analyse toute une nuit dans un milieu liquide. L'enrichissement favorise la croissance microbienne et donc l'amplification du signal de bioluminescence obtenu.

Un prélèvement d'eau est collecté puis dilué au dixième afin d'obtenir trois échantillons de 100 mL (non dilué, dilués au 1/10 et au 1/100). Chaque échantillon est ensuite filtré sur une membrane de 47 mm de diamètre. Celle-ci est transférée de manière aseptique dans 10 mL de milieu liquide. Après mise en incubation toute une nuit, 8 mL de chaque milieu sont filtrés à travers des membranes de 47 mm de diamètre. La valeur d'ATP bioluminescence de ces membranes est mesurée comme précédemment à l'aide du système Pallchek. Le bruit de fond de la méthode est évalué par l'analyse de plusieurs échantillons témoins non contaminés. En utilisant la même appro-

che que pour la technique semi-quantitative, un seuil est calculé, correspondant à cinq fois le bruit de fond moyen observé.

Un résultat en URL supérieur au seuil représente un résultat positif (+) et signifie que l'échantillon contient au moins 1 UFC. Un résultat inférieur au seuil est négatif (-) et signifie que l'échantillon contient moins de 1 UFC.

Le tableau C décrit les différentes possibilités de résultats après 24 heures d'incubation. Il montre comment la combinaison des résultats pour les trois dilutions testées permet d'estimer le niveau de contamination de l'échantillon original, dans un intervalle de valeurs comprises entre 1 UFC/100 mL et 100 UFC/100 mL. Là encore, ce tableau est fondé sur une étude réalisée lors du développement de la méthode avec des cultures pures ATCC. Cette méthode est particulièrement adaptée aux réseaux de distribution d'eau où un très faible niveau de contamination est attendu. En outre, elle a l'avantage de fournir une alerte bien plus rapide que les méthodes traditionnelles, en particulier quand ces dernières utilisent la gélose agar R2A dont le délai de résultat est de 5 jours.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 M. Miller, *The impact of Process Analytical Technology, cGMP's for the 21st Century and other regulatory and compendial initiatives on the implementation of Rapid Microbiological Methods*. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, volume I, p. 195-295. Published by Davies Healthcare International Publishing LLC, 2005.
- 2 R. Johnson, A "PAT" on the back for Rapid Microbiological Methods. European Pharmaceutical Review, issue 4, p. 84-88, 2007.
- 3 P. J. Newby, G. Dalmaso, S. Lonardi, B. Riley, P. Cooney and K. Tyndall, *The introduction of qualitative rapid microbiological methods for drug product testing*. Pharmaceutical Technology, Sept 1 issue, p. 6-12, 2004.
- 4 B. S. Riley, *Rapid microbiology methods in the pharmaceutical industry*. Am. Pharm. Rev. 7 (2): 28-31, 2006.
- 5 P. Dostalek et T. Branyik, *Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food industry - a review*. Czech J. of Food Sciences 23 (3): 85-92, 2003.
- 6 P. E. Stanley, *Bioluminescence and chemiluminescence applications. Rapid microbiology. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology*. J. of Bioluminescence and Chemiluminescence 4: 375-380, 2005.
- 7 American Society for Testing of Materials, D 4012-81. Volume 11.01. Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Water, 2002.
- 8 United States Pharmacopoeia 31/National Formulary 26. General Chapter <1223> "Validation of Alternative Microbiological Methods", 2008.
- 9 European Pharmacopoeia 5th Edition, Supplement 5.5. 5.1.6. Alternative Methods for Control of Microbiological Quality, p. 4131-4142, 2006.

Résultats et discussion

La figure 4 montre un exemple typique de courbe de corrélation URL/ATP. Celle-ci présente un très bon coefficient de corrélation (r^2) de 0,9964. Comme il a été précisé dans le paragraphe « Matériel et méthodes », la construction de la courbe de corrélation d'ATP représente un très bon outil de formation des utilisateurs pour ce type de méthode d'ATP bioluminescence. Elle permet également à l'utilisateur d'identifier toute dérive des performances des réactifs ou de l'instrument, d'évaluer la reproductibilité de l'essai (avec dif-

férents opérateurs, réactifs et instruments) et enfin de vérifier la robustesse et la fidélité de la méthode en faisant délibérément varier certains paramètres comme les volumes d'échantillons ou de réactifs. La reproductibilité, la fidélité et la robustesse sont des facteurs critiques (entre autres) dont il faut tenir compte lors de la mise en place de nouvelles technologies selon les recommandations des Pharmacopées américaine [8] et européenne [9].

Les **figures 5 et 6** présentent des données démontrant la corrélation entre les URL et les UFC pour deux micro-organismes, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Pseudo-*

monas aeruginosa (ATCC 9027). Il convient de noter que ces courbes ont été obtenues à partir de cultures pures. Elles ne sauraient être représentatives de données obtenues à partir d'isolats naturels d'un environnement de production, des stress environnementaux pouvant réduire significativement la quantité d'ATP présente dans les micro-organismes récupérés.

Les données obtenues à partir du suivi des résultats des contrôles microbiologiques des systèmes de distribution d'eau des usines de BristolMyers-Squibb Gascogne et Guyenne sont présentées dans les **tableaux D et E**. Cette étude a été effectuée en utilisant l'ATP bioluminescence en

parallèle avec la méthode traditionnelle. Pour chacune des techniques, les prélèvements ont été réalisés à des moments différents et selon des méthodes différentes. De plus, les essais ont été effectués durant la validation de la boucle (juste après la désinfection ou avant le début de la production), ce qui suggère que les micro-organismes présents ont été soumis à un stress supplémentaire. Malgré les différences entre les deux méthodes, les résultats obtenus sont comparables (**tableaux D et E**). Ces données montrent que la mesure directe permet une meilleure évaluation de la contamination pour des échantillons dont la limite d'action est d'environ

100 UFC/mL. Par conséquent avec cette méthode, un prélèvement de 100 mL est plus approprié pour déterminer si la contamination est supérieure ou inférieure à un niveau d'alerte de 10 UFC/mL, ce qui représente une limite plus sévère que celle fixée actuellement (20 UFC/mL). Les résultats obtenus avec la méthode indirecte d'ATP bioluminescence montrent une différence d'un facteur 10 avec ceux de la méthode traditionnelle, ce qui peut être dû aux différences dans l'échantillonnage ou les conditions de test. Néanmoins, cette différence peut aussi refléter la détection, par la méthode alternative, de bactéries stressées qui n'ont pu être révélées avec la ➔

Ionisos

→ méthode classique. Dans tous les cas, ces données démontrent une bonne corrélation globale entre les deux méthodes, notamment :

- sur le site Gascogne : quand la méthode traditionnelle donne un résultat supérieur à 10 UFC, l'ATP bioluminescence donne entre 1 et 10 UFC. À partir de l'analyse de trois volumes différents d'échantillon, l'ATP bioluminescence permet de démontrer si le niveau de contamination est inférieur ou supérieur à un niveau d'alerte de 10 UFC/100 mL ;

- sur le site Guyenne : la méthode indirecte montre des résultats qui ne sont pas en rapport avec le niveau de contamination réel des échantillons.

Cette étude constituait une évaluation de la méthode de bioluminescence, et non de sa validation. Les résultats obtenus ont aidé à déterminer la méthode d'analyse la plus appropriée selon le niveau de contamination de chaque système de distribution. Elle montre aussi que les souches sauvages ne se comportent pas de la même manière que les

cultures pures et donc que la méthode d'analyse doit être adaptée au niveau réel de contamination des échantillons analysés.

Conclusions

Le système de microbiologie rapide Pallchek est une méthode sensible pour détecter la contamination microbienne. Afin d'obtenir des résultats cohérents et pertinents, il est essentiel que :

- des techniques précises et aseptiques soient utilisées durant la préparation, le stockage et l'utilisation des réactifs ;

- les procédures de test soient standardisées et suivies exactement de la même manière lors de chaque test ;
- la conformité du système et d'autres contrôles appropriés soient testés ;

- la formation de l'opérateur et le suivi de sa qualification soient assurés à l'aide de techniques validées comme la réalisation de courbes de corrélation d'ATP.

Si ces étapes sont appliquées, la méthode peut alors être rapidement intégrée dans le contrôle qualité de routine.

Elle permet une application efficace et rapide tout en offrant une interprétation simple des résultats. L'application de la méthode de microbiologie rapide Pallchek en tant qu'outil de suivi microbiologique de la qualité de l'eau permet le déclenchement de plusieurs actions rapides et primordiales en adéquation avec les objectifs de la PAT, contrairement aux méthodes traditionnelles. Ces actions comprennent :

- le ré-échantillonnage et l'analyse de l'eau purifiée lorsque la limite d'alerte, d'action ou une spécification est dépassée, permettant ainsi une action corrective proactive ;
- la confirmation ou infirmation rapide d'un résultat OOS ;
- l'alerte rapide auprès de la fabrication pour la mise hors service de la boucle d'eau à partir d'un résultat OOS validé (et la mise en place d'une stérilisation du réseau par précaution) ;
- l'analyse rapide de la qualité de l'eau immédiatement après le redémarrage d'un process.

D Réseau d'eau purifiée du site Gascogne

Point d'échantillonnage	Méthode traditionnelle	ATP bioluminescence directe			ATP bioluminescence indirecte		
	Résultats (UFC/100 mL)	1 000 mL	Résultats (UFC/100 mL)	1	Dilution 1/10	1/100	Résultats (UFC/100 mL)
A1	16	-	< 100	+	-	-	1-10
B2	20	-	< 100	+	-	-	1-10
A1	1	-	< 100	-	-	-	< 1
B2	0	-	< 100	-	-	-	< 1
A1	0	-	< 100	-	-	-	< 1
B2	11	-	< 100	-	-	-	< 1
A1	0	-	< 100	-	-	-	< 1
B2	19	-	< 100	+	-	-	1-10
A1	1	-	< 100	-	-	-	< 1
B2	7	-	< 100	-	-	-	< 1
A1	1	-	< 100	-	-	-	< 1
B2	19	-	< 100	+	-	-	1-10

Le niveau d'alerte est établi à 100 UFC/100 mL.

E Réseau d'eau purifiée du site Guyenne

N° d'échantillon	Point de prélèvement	Méthode traditionnelle	Méthode directe		Méthode indirecte			Résultat (UFC/mL)
		Résultat (UFC/mL)	1 000 mL	Résultat (UFC/mL)	Dilution 1	1/10	1/100	
1	Entrée de la boucle de recirculation	16	+	>1	+	+	-	< 0,1-1
2	Entrée de la boucle de recirculation	33	+	>1	+	+	+	> 1
3	Entrée de la boucle de recirculation	72	+	>1	+	+	+	> 1
4	Entrée de la boucle de recirculation	29	+	>1	+	+	+	> 1
5	Entrée de la boucle de recirculation	13	+	>1	+	+	-	< 0,1-1

Les méthodes traditionnelle et de bioluminescence rapide n'ont pas été effectuées en parallèle avec le même échantillon.

Les auteurs souhaitent remercier Catherine Piron, Lucia Ceresa et Peter Ball (Pall Life Sciences) pour leur aide durant cette étude et la préparation de ce papier.

Cet article a été initialement publié dans le n° 3 (mai 2009) du magazine *European Pharmaceutical Review*.