

01/2008:50106

## 5.1.6. MÉTHODES ALTERNATIVES POUR LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE

*Le chapitre suivant est publié à titre d'information.*

### 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'objectif du présent chapitre est de faciliter la mise en oeuvre et l'emploi de méthodes microbiologiques alternatives, lorsqu'elles permettent d'assurer des contrôles microbiologiques à meilleur coût et d'apporter une garantie accrue quant à la qualité des produits pharmaceutiques. Ces méthodes alternatives peuvent également trouver des applications dans le cadre de la surveillance de l'environnement.

Les méthodes microbiologiques décrites dans la Pharmacopée Européenne sont utilisées depuis près d'un siècle, et ces méthodes de dénombrement et d'identification des microorganismes rendent encore de grands services aux microbiologistes. Pendant toutes ces années, elles ont constitué un outil précieux pour contrôler les produits pharmaceutiques et assurer leur sécurité microbiologique. Toutefois, les méthodes microbiologiques conventionnelles sont lentes et ne livrent des résultats qu'au terme d'un temps d'incubation pouvant aller jusqu'à 14 jours. Les résultats des contrôles microbiologiques conventionnels permettent donc rarement une intervention corrective proactive.

Au cours des dernières années sont apparues des méthodes alternatives de contrôle de la qualité microbiologique, dont certaines se sont avérées capables de livrer des résultats en temps réel (ou quasi réel), ouvrant la possibilité d'une action corrective plus précoce. Ces nouvelles méthodes apportent également une amélioration significative de la qualité des contrôles.

Le présent chapitre décrit un ensemble de nouvelles méthodes microbiologiques possédant des applications pharmaceutiques. Il en expose le principe, en discute les avantages et inconvénients, puis en présente les utilisations potentielles, c'est-à-dire les applications qui peuvent être envisagées au vu des principes sur lesquels se fonde la méthode. Son objectif n'est pas de suggérer quelles doivent être les applications effectives. Il comporte enfin des considérations d'ordre général sur la validation de ces méthodes, illustrée par des exemples spécifiques pour chaque type de méthode. Pour information, un protocole de validation détaillé est décrit en fin de chapitre.

Ce chapitre n'a pas pour objectif de recommander l'une ou l'autre méthode, ni de fournir une liste exclusive ou exhaustive des méthodes microbiologiques alternatives qui peuvent être utilisées pour le contrôle pharmaceutique. Son contenu est purement informatif, mais il peut être utilisé comme guide pour choisir une méthode microbiologique alternative en complément ou remplacement des approches microbiologiques conventionnelles, ainsi que pour procéder à la validation de la méthode choisie. Dans ce domaine en évolution constante et rapide, de nouvelles méthodes sont toujours susceptibles d'apparaître et les indications figurant dans ce chapitre peuvent leur être également applicables.

Il existe en matière de contrôles microbiologiques 3 grands types de déterminations spécifiques :

- essais qualitatifs de présence/absence de microorganismes,
- essais quantitatifs de dénombrement de microorganismes,
- essais d'identification.

#### 1-1. ESSAIS QUALITATIFS DE PRÉSENCE/ABSENCE DE MICROORGANISMES

En analyse microbiologique conventionnelle, les essais de ce type utilisent typiquement le développement, dans un milieu de culture, d'une turbidité ou autre modification liée à la croissance comme preuve de la présence de microorganismes viables dans l'échantillon examiné. L'exemple le plus courant est l'essai de stérilité. Les essais visant à établir la présence/absence dans un échantillon de microorganismes viables d'un

type particulier constituant d'autres exemples.

#### 1-2. ESSAIS QUANTITATIFS DE DÉNOMBREMENT DE MICROORGANISMES

La filtration sur membrane et le dénombrement sur plaque sont les méthodes conventionnelles utilisées pour estimer le nombre de microorganismes viables présents dans un échantillon. La méthode dite du nombre le plus probable (NPP) constitue un autre exemple de ce type de méthodes. Elle a été développée comme outil d'estimation du nombre de microorganismes viables présents dans un échantillon lorsque celui-ci ne se prête pas à un dénombrement direct sur plaque.

#### 1-3. ESSAIS D'IDENTIFICATION

La caractérisation biochimique et morphologique d'un microorganisme inconnu est la méthode classique d'identification utilisée dans les essais de la pharmacopée. Des méthodes récemment développées ont permis de rationaliser et d'automatiser certains aspects de cette identification, notamment pour ce qui concerne le traitement, l'analyse et le stockage des données. Plusieurs approches nouvelles ont été intégrées à ces méthodes, dont certaines réactions biochimiques, l'utilisation de substrats carbonés, la caractérisation de la composition en acides gras, le profilage à l'aide d'endonucléases de restriction et le séquençage de l'ADNr 16S.

## 2. PRINCIPES GÉNÉRAUX DES MÉTHODES ALTERNATIVES

Les méthodes microbiologiques alternatives font appel à des techniques directes ou indirectes de détection ; dans certains cas, une amplification du signal est obtenue par des méthodes d'enrichissement. Pour tenir compte de ces différences et pour des raisons de commodité dans la présentation de ce chapitre, les méthodes alternatives de contrôle de la qualité microbiologique sont divisées en 3 catégories :

- méthodes fondées sur la croissance, avec, généralement, obtention d'un signal détectable au terme d'une période de subculture,
- mesure directe, avec différenciation et visualisation de cellules individuelles,
- analyse de composants cellulaires, avec mesure indirecte d'une présence microbienne via l'expression de composants cellulaires spécifiques.

Ces distinctions peuvent dans certains cas être artificielles, mais elles permettent d'établir une classification opérationnelle.

### 2-1. MÉTHODES FONDÉES SUR LA CROISSANCE

#### 2-1-1. Détection précoce de croissance

##### 2-1-1-1. Aspects critiques généraux des méthodes fondées sur une détection précoce de croissance

Ces méthodes sont tributaires de l'existence d'une croissance microbienne permettant l'obtention d'un nombre détectable de microorganismes. Aux niveaux de contamination, typiquement faibles, qui caractérisent les produits pharmaceutiques, la détection peut demander 24 h ou même davantage, surtout dans le cas des moisissures et levures. Il est possible d'en accroître la sensibilité en procédant à la filtration du produit. La membrane filtrante est alors incubée dans le milieu et le résultat est exprimé en termes de présence/absence dans la quantité de produit correspondant au volume filtré. Ces systèmes comportant des étapes d'incubation en milieu liquide n'apportent pas d'informations quantitatives mais permettent seulement d'établir une présence/absence dans la quantité de produit analysée. L'analyse de différentes quantités d'échantillon peut permettre une détermination semi-quantitative (essai limite). Le principal avantage de ces méthodes, par rapport aux méthodes classiques, réside souvent dans leur capacité à permettre le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons et, potentiellement, l'obtention d'un résultat dans un temps plus court.

##### 2-1-1-2. Méthodes électrochimiques

*Principe.* La multiplication et l'activité métabolique des microorganismes, dans un milieu de croissance approprié, entraînent la production de métabolites ioniques fortement chargés à partir des nutriments organiques faiblement chargés, induisant ainsi une modification des propriétés électriques du milieu. Ces modifications d'impédance (mesurée par la conductance ou la capacitance) sont suivies au moyen d'électrodes intégrées aux récipients de culture et en contact avec le milieu. Le point final de mesure est le temps requis pour détecter une variation d'impédance prédéterminée. Le temps de détection est inversement proportionnel à la taille de l'inoculum initial. Pour les moisissures et levures qui ne produisent que de faibles variations d'impédance, on a généralement recours à une mesure indirecte de la conductance par le biais d'un réceptacle d'hydroxyde de potassium. Une mesure directe de la capacitance est également possible.

*Aspects critiques.* Détection automatisée avec génération de données électroniques, graphique des variations d'impédance reflétant la courbe de croissance des microorganismes, réduction à 48 h de la durée de l'essai.

*Utilisations potentielles.* Dosage microbiologique des antibiotiques, efficacité de la conservation antimicrobienne, présence/absence dans la quantité d'échantillon examinée lors du dénombrement de microorganismes viables totaux.

#### 2-1-1-3. Mesure de la consommation ou production d'un gaz

*Principe.* Les microorganismes en phase de multiplication et de métabolisme actifs utilisent des milieux de croissance appropriés, produisant en retour des métabolites ou induisant l'élimination d'éléments nutritifs spécifiques. L'une des approches possibles consiste à surveiller les modifications de composition de l'espace de tête gazeux dans des récipients de culture fermés, à l'aide de transducteurs de pression réagissant à la production d'un gaz (CO<sub>2</sub> par exemple) ou à la consommation d'un gaz (O<sub>2</sub> par exemple). D'autres indicateurs peuvent également être utilisés, notamment la détection colorimétrique du CO<sub>2</sub>.

*Aspects critiques.* Pour les microorganismes à croissance lente tels que les mycobactéries, cette méthode permet une détection plus rapide. Il n'existe pas de relation directe entre la charge microbiologique initiale et le point final de détection. La température d'incubation et l'algorithme de traitement des données influencent fortement les résultats.

*Utilisations potentielles.* Produits dans lesquels des microorganismes à croissance lente peuvent être présents.

#### 2-1-1-4. Bioluminescence

*Principe.* L'adénosine triphosphate (ATP) est un marqueur bien connu de viabilité cellulaire. La méthode de bioluminescence consiste à provoquer la libération d'ATP par les microorganismes, à l'aide d'un agent d'extraction approprié, puis à en effectuer un dosage quantitatif au moyen du système enzymatique luciférine/luciférase, qui émet une lumière d'intensité proportionnelle à la quantité d'ATP présente. La lumière émise est mesurée avec un bioluminomètre et exprimée en unité de lumière relative (ULR) dans le cas de la bioluminescence en milieu liquide. La valeur ULR obtenue pour l'échantillon est comparée à une valeur seuil, établie à 2 ou 3 fois l'ULR du milieu utilisé pour la culture ou la mise en suspension de l'échantillon. Le résultat est positif si l'ULR obtenue pour l'échantillon est supérieure à la valeur seuil. Cette méthode comporte une variante qui consiste à retenir les microorganismes sur une membrane, puis à les cultiver par incubation sur milieu gélosé, les microcolonies formées étant détectées au moyen d'une caméra à détecteur à couplage de charge (CCD) et les résultats exprimés en microUFC. Cette méthode est quantitative, mais sur un intervalle de linéarité étroit.

*Aspects critiques.* Si le produit dont provient l'échantillon présente un niveau de contamination bactérienne élevé (de l'ordre de 500-1000 UFC par quantité d'échantillon examinée), la détection est rapide (1 h). Si le niveau de contamination est faible (moins de 100 UFC par quantité d'échantillon examinée), il est nécessaire d'amplifier le nombre de microorganismes par incubation sur un milieu de culture (liquide ou gélosé) pendant 12-48 h selon la méthode utilisée. Après ce temps d'incubation, une cellule unique capable de croissance sera multipliée par 1000 et pourra être détectée. La production d'ATP est variable d'un microorganisme à l'autre, les bactéries en contenant 1-10 fg et les germes fongiques environ 100 fg par cellule, et il existe de nombreux autres facteurs pouvant affecter la teneur en ATP de la cellule : espèce, phase de croissance, état nutritionnel, stress ou âge de la cellule. Il n'est donc pas possible d'obtenir un dénombrement direct à partir de la valeur ULR. Par ailleurs, la turbidité et la coloration de l'échantillon peuvent affecter la réaction, soit en l'amplifiant (d'où une augmentation du signal lumineux émis) soit en l'atténuant (d'où une diminution du signal lumineux émis). En raison de sa nature enzymatique, la réaction est également sensible à l'interférence de produits susceptibles d'inhiber ou de réduire l'activité enzymatique. En pratique, ce type d'interférence est rare mais il doit néanmoins faire l'objet d'une étude approfondie lors de la validation. La réaction est également sensible à la présence d'autres nucléotides phosphatés tels que l'ADP ou le GTP, qui interfèrent en produisant de l'ATP en présence d'adénylate kinase. Cette enzyme est utilisée pour améliorer la sensibilité de certaines méthodes de bioluminescence : un 3<sup>e</sup> réactif contenant de l'ADP est alors ajouté et de l'ATP supplémentaire est produit en présence de l'adénylate kinase libérée par les microorganismes.

*Utilisations potentielles.* Efficacité de la conservation antimicrobienne, présence/absence de microorganismes dans la quantité d'échantillon examinée lors du dénombrement des germes aérobies viables totaux (bioluminescence en tube ou sur plaque de microtitrage), dénombrement des germes aérobies viables totaux (bioluminescence sur membrane), surveillance de l'environnement et de la qualité de l'eau. La méthode est applicable aux produits filtrables ou non filtrables.