



Indicateurs biologiques, pousses aléatoires - votre cycle de décontamination est-il réellement en cause ?

Jules Boulicot, ingénieur projet Bioquell SAS



LIVRE BLANC

Il n'est pas rare, lors des qualifications de performances d'un système de décontamination, d'observer des pousses suite à l'incubation d'indicateurs biologiques. Les investigations menées, suite à ces non-conformités, sont souvent longues, et aboutissent généralement à une remise en cause du cycle développé.

Avez-vous pensé aux 'Rogues BI'?

Qu'est-ce qu'un 'Rogue BI'?

Un indicateur dit 'Rogue', ou 'coquin' dans la langue de Molière, est dit d'un indicateur montrant des signes de pousse inexplicables et incohérents après incubation, lors des phases de qualification de performances, ou de développements de cycles. Ces pousses n'ont généralement pas d'explications rationnelles, ne sont pas constantes au fil des cycles réalisés, et surtout vont parfois contre toute logique de résultat attendu. Ces résultats incohérents font perdre du temps lors des investigations menées afin de les expliquer, et retardent les mises en route, ou remise en route, des équipements de production.

Voici quelques pistes à étudier dans les cas où des résultats d'indicateurs biologiques, paraissent étranges et difficilement explicables.

Conséquences des rogues lors d'un développement de cycle.

Elles peuvent être très vastes. Sans cycle de décontamination valide, la production ne peut être lancée ou redémarrée suite à des requalifications, impliquant des coûts importants pour les industriels, sans oublier les problèmes que pourront soulever les autorités réglementaires lors d'audits.

Certains fabricants d'indicateurs, recommandent l'utilisation de triplicats d'indicateurs lors des qualifications (3 indicateurs à la même position), suggérant ainsi que si 1 indicateur pousse sur les 3 à cette position, celle-ci est de fait validée. Bioquell n'est pas tout à fait en accord avec ce procédé. Un témoin positif ne peut être simplement ignoré. La politique de Bioquell à ce sujet est de répéter différents cycles afin de s'assurer que cette pousse est imputable soit au cycle développé, soit à la qualité de l'indicateur biologique utilisé.

A quoi les rogues sont-ils dûs ?

Bioquell a réalisé une étude impliquant plusieurs industriels commercialisant ces indicateurs, en observant les coupons grâce à un MEB (microscope électronique à balayage). Il est en effet difficile d'étudier les causes amenant à des indicateurs rogues, puisque cela implique de les détruire (mise en incubation). Il faut donc pouvoir les observer avant de les incuber. Les résultats obtenus suggèrent que ces rogues peuvent être induits par quelques problématiques particulières.

1. Milieu présent dans l'inoculum.

Généralement causé par un mauvais nettoyage de la suspension bactérienne, avant inoculation sur le disque inox. Le milieu de culture va alors protéger les spores de tout contact avec le produit biocide pendant le cycle de décontamination, qui ne pourra passer cette barrière protectrice. Les spores vont donc survivre et pousser lors de leur incubation.

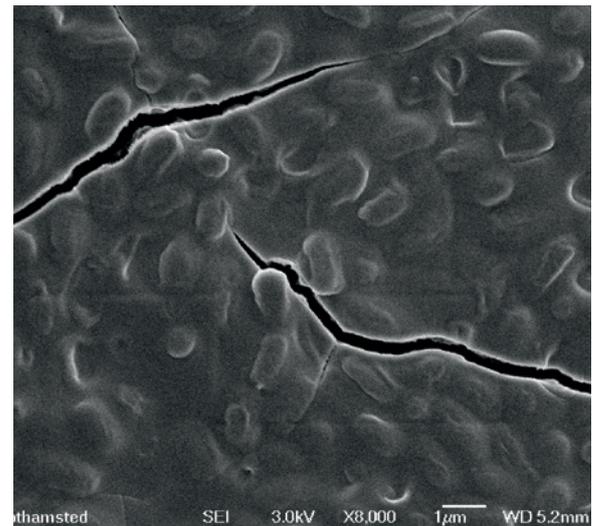


Image 1. Spores emprisonnées dans le milieu de culture solide

2. Disque inox abimé

Le support est un élément constitutif crucial de l'indicateur, et les dommages sur le disque peuvent aider les spores à survivre. Ces dommages sont souvent des éraflures, ou des enclaves sur la surface du disque, où les spores peuvent trouver refuge, et ainsi être protégés lors du cycle.

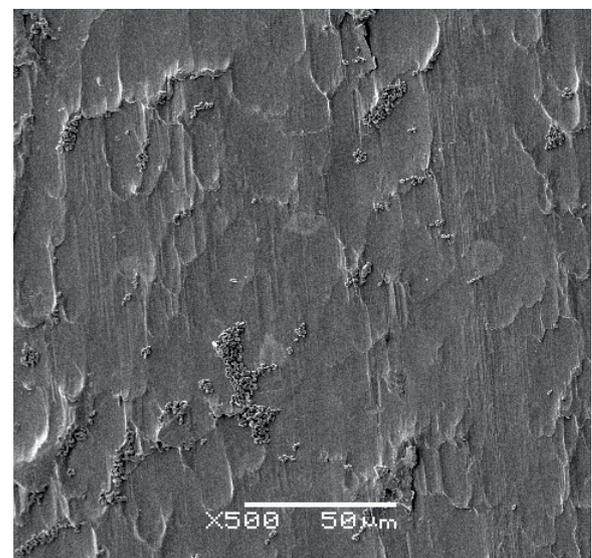


Image 2. Dommage sur la surface du disque inox.

3. Agglomération ou multicouche

La plupart des fabricants d'indicateurs insisteront sur l'importance d'une couche unique et une répartition uniforme de la charge microbienne sur le disque. En effet, l'empilage des couches de spores induit une résistance importante de l'indicateur, puisque le biocide ne pourra passer au travers des multiples couches microbiennes, laissant ainsi non exposées les couches de micro-organismes les plus profondes (~biofilm).

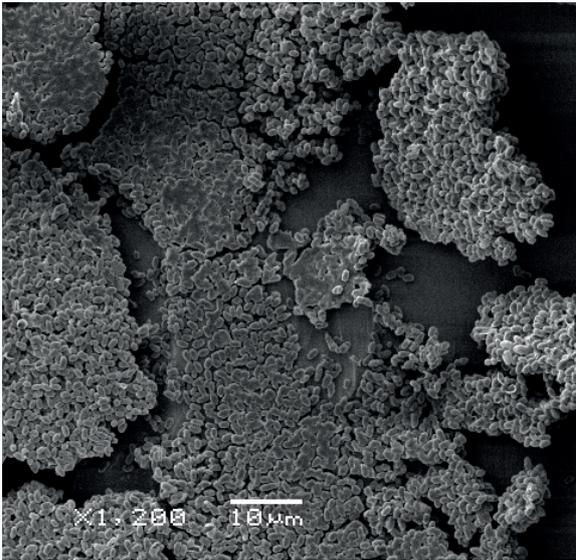


Image 3. Micro-organismes en multi- couches.

Quels sont les symptômes typiques des rogues Bi's ?

Incohérence des résultats au fil des cycles:

L'effet le plus significatif et perturbant dans l'étude des indicateurs rogues, est sans doute l'incohérence des résultats obtenus tout au long des cycles réalisés, notamment lors d'une QP.

Rappel: *Nous supposons ici qu'un seul et unique lot d'indicateurs biologiques est utilisé. Si plusieurs lots d'indicateurs biologiques sont utilisés, notamment lors de qualification de performances, ou toute autre requalification saisonnière, les résultats ne sont pas exploitables.*

Cas 1: Inconstance des résultats sur plusieurs cycles identiques dont les paramètres sont contrôlés et monitorés:

Il peut arriver que sur 3 runs consécutifs, avec le même cycle de référence, et dans des conditions environnementales identiques, les résultats montrent des incohérences notables. Par exemple :

- Pousse sur le cycle 2 d'une position qui ne montre pas de signe de pousse aux cycles 1 et 3
- Une autre position montre une pousse seulement au cycle 1
- Une dernière position développe une croissance aux cycles 1 & 3

Après vérification que les cycles réalisés ont bien été identiques en tous points, et que les paramètres environnementaux sont bien respectés, cette variation de résultats peut être expliquée par la présence de rogues Bi's.

Cas 2: Indicateurs positifs avec des cycles plus forts, censés être plus efficaces:

Suite à une série infructueuse de tests entraînant des résultats non valides lors de qualifications, le réflexe est bien souvent de renforcer le cycle de décontamination. Quel désastre de s'apercevoir que de nouvelles positions sont positives. Un cycle plus fort, est normalement sensé éliminer les positions non conformes observées lors des cycles plus faibles, et non pas apporter de nouvelles incertitudes. Il n'est donc pas logique que de nouvelles positions soient positives alors qu'elles ne l'étaient pas avec les cycles précédents plus faibles.

Pousses non immédiates:

Habituellement, un indicateur positif montre des signes de croissance assez rapidement (j+1 ou j+2) après incubation. Il est plus rare de voir des indicateurs montrer des signes de croissance à j+5 ou j+6. Cela peut être significatif d'indicateurs 'rogues'. En effet, certaines des causes de rogues observées ci-dessus, montrent qu'ils peuvent parfois être induits par des superpositions de couches de spores, ou par des anfractuosités dans le support, permettant aux spores de se protéger.

Il est donc possible que le phénomène de pousses à j+5 ou j+6, démontre cet effet de protection artificiel des spores non atteints par la décontamination. L'apparition de positifs en fin de période d'incubation peut s'expliquer par le fait que les couches supérieures de spores détruites mettent du temps à repasser en suspension dans le bouillon, avant de laisser place aux spores non détruits dans les sous-couches protégées. Le milieu de culture met donc plus de temps à atteindre ces spores toujours actifs, d'où une latence importante observée lors de l'incubation.

Comment devrait se présenter un indicateur vu au microscope afin de réduire les risques de rogues ?

L'approche de Bioquell sur la prévention des rogues, commence par le soin apporté à la préparation de l'inoculum bactérien. Plusieurs méthodes de nettoyage et rinçage sont pratiquées, pour assurer l'élimination totale du milieu de culture et des cellules végétatives avant inoculation sur le disque inox. Des photos de l'inoculum sont également prises afin de pouvoir réaliser des comparaisons de lots.

Une nouvelle procédure a également été adoptée pour tester les indicateurs Bioquell. Le test KM100, observe la résistance des lots, aidant ainsi à identifier les lots plus résistants que les autres. Le but ici, est d'identifier les lots ayant une résistance de référence (valeur-D) la plus proche possible de celle que Bioquell préconise lors de l'utilisation de ses systèmes de décontamination.

Bioquell prend également des clichés MEB d'un échantillon d'indicateurs, sur tous les lots commercialisés, afin de contrôler la répartition et la qualité des indicateurs libérés. Ces images sont disponibles sur demande pour les clients Bioquell, afin de les aider dans leurs démarches qualité. Ce test n'est pas un critère de libération de lots, puisque seule une petite partie de la production est testée, mais contribue aux critères qualité Bioquell.

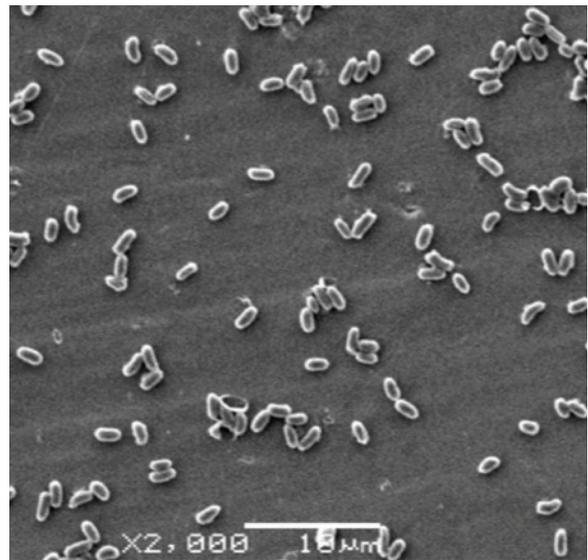


Image 4. Distribution propre, régulière et homogène des spores répartis sur le disque inox.

Néanmoins, et malgré tous les efforts entrepris dans la fabrication des indicateurs, il existera malheureusement toujours des rogues. En effet, les indicateurs sont fabriqués à partir d'un matériel biologique vivant qu'il est difficile de totalement contrôler. Le but de Bioquell est de réduire au maximum la part des rogues au sein des lots commercialisés.

France
Bioquell SAS
T: +33 (0)1 43 78 15 94

UK Headquarters
Bioquell UK Ltd
T: +44 (0)1264 835 835

The Americas
Bioquell Inc
T: +1 215 682 0225

Germany
Bioquell GmbH
T: +49 (0) 221 168 996 74

Ireland
Bioquell Ireland
T: +353 (0)61 603 622

Singapore
Bioquell Asia Pacific Pte Ltd
T: +65 6592 5145

China
Bioquell Shenzhen
Technology Company Ltd
T: +86 755 8635 2622