

ANNÉE 2015

N° 002

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Céline CHEVRIER

Présentée et soutenue publiquement le 25 mars 2015

Validation de l'efficacité virucide de désinfectants

Président : Mme Christine HERRENKNECHT, Professeur en Chimie Analytique

**Membres du jury : Mme Virginie FERRE, Professeur en Virologie
Mme Céline BREDAS, Docteur en Pharmacie**

REMERCIEMENTS

A Mme le Professeur Virginie Ferré,

Professeur en virologie et Doyen de l'UFR de Pharmacie de Nantes,

Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse, d'avoir apporté un regard critique et pertinent à ce travail.

A Mme le Professeur Christine Herrenknecht,

Professeur en chimie analytique,

Merci de m'avoir permis de réaliser ma dernière année de scolarité au sein de votre Master et merci d'avoir accepté de me consacrer encore un peu de temps en acceptant de faire partie du jury.

A Mme le Docteur Céline Breda,

Docteur en Pharmacie,

Merci de m'avoir accueillie dans votre structure, de m'avoir confié un sujet intéressant et enrichissant. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci à tous ceux qui pendant mon stage ont contribué à mon intégration dans l'entreprise et qui m'ont accompagnée dans mon travail.

Merci à Clément, à nos amis, à nos familles pour tout le reste...

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
I. Généralités.....	2
1. Désinfectants.....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants.....	4
1.3 Choix du désinfectant.....	5
1.3.1 Activité détergente.....	5
1.3.2 Spectre d'activité.....	5
1.3.3 Rapidité d'action.....	6
1.3.4 Rémanence.....	6
1.3.5 Compatibilité avec le matériel à désinfecter.....	7
1.3.6 Interférences.....	7
1.3.7 Toxicité et Odeur.....	9
1.3.8 Facilité de dosage.....	10
1.3.9 Stabilité.....	10
1.3.10 Coût.....	10
1.3.11 Stérilité.....	10
2. Désinfection.....	10
2.1 Règles de la désinfection.....	10
2.1.1 Cercle de Sinner.....	10
2.1.2 Alternance.....	11
2.2 Cibles de la désinfection.....	12
2.3 Activités bactéricide, fongicide, sporicide, virucide.....	14
2.4 Normes « Antiseptiques et désinfectants chimiques ».....	15
3. Désinfection des surfaces.....	18
3.1 Désinfection par voie aérienne (DSVA).....	18
3.1.1 Appareil utilisé.....	18
3.1.2 Cycle de l'appareil automatique.....	20
3.2 Désinfection des surfaces par contact.....	21
3.2.1 Nettoyage et balayage humides.....	22
4. Désinfection des effluents liquides.....	24
4.1 Méthodes de décontamination des effluents ¹⁹	24
4.1.1 Traitement chimique.....	25
4.1.2 Traitement thermique.....	25
4.1.3 Traitement chimique et thermique.....	25
4.1.4 Choix de la méthode de traitement des effluents.....	26
4.1.5 Risques potentiels associés aux systèmes de décontamination des effluents liquides.....	27
4.1.6 Cas concret.....	27
II. Validation de désinfections.....	29
1. Matériel et méthodes.....	30
1.1 Méthodes de titrage.....	30
1.1.1 Généralités.....	30
1.1.2 Préparation du titrage.....	30
1.1.3 Infections virales.....	31
1.1.4 Lecture des puits des plaques.....	32
1.1.5 Lecture des plaques.....	33
1.1.6 Critères de Validité.....	34

1.1.7	Méthodes statistiques de calculs des titres	34
1.1.8	Méthode statistique de Spearman Karber	37
1.1.9	Comparaison.....	38
1.1.10	Détermination de la LOD	38
1.1.11	Harmonisation	39
1.2	Validation de l'efficacité virucide de la désinfection - Méthode des portes germes	39
1.2.1	Validation de la désinfection aérienne	39
1.2.2	Validation de la désinfection des surfaces par contact	44
1.3	Validation de la désinfection des effluents liquides	46
III.	Résultats	48
1.	Résultats de la désinfection aérienne.....	48
2.	Résultats de la désinfection des surfaces par contact.....	49
3.	Résultats de la désinfection des effluents liquides	52
IV.	Discussion - Conclusions	52
V.	Bibliographie.....	54
VI.	ANNEXES	56
1.	Fichier Excel de calculs des titres (Reed Muench)	56
1.1	Onglet 1 « Preparation and reading ».....	56
1.2	Onglet 2 « Calculation sheet »	57
1.3	Onglet 3 Details of results et onglet 4 Results	58
2.	Comparaison entre les désinfectants pour la cuve de traitements des effluents liquides	59
Figure 1: Cercles de Sinner		11
Figure 2 : Cleaning, disinfection and sterilization (Sethu Veerabadran, Ian M Parkinson)		13
Figure 3 : Résistance décroissante aux biocides liquides selon la classification de McDonnell10		13
Figure 4 : Activités des désinfectants face aux microorganismes (Cleaning, disinfection and sterilization (Sethu Veerabadran, Ian M Parkinson)11)		14
Figure 5 : Clarus Z		19
Figure 6 : Phases d'un cycle de désinfection aérienne ¹⁴		20
Figure 7: Méthode de la godille illustrée ¹⁷		23
Figure 8 : Méthode au poussé illustrée ¹⁸		24
Figure 9 : Formules semi-développées du chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium et glutaraldéhyde		28
Figure 10: Formule de la dissociation du percarbonate de sodium		28
Figure 11: Réaction entre le tétracétylènediamine et le peroxyde d'hydrogène		28
Figure 12: Réaction d'équilibre en l'acide peracétique et l'acide acétique		29
Figure 13 : Exemple de distribution du contenu des plaques à puits à fond profond sur les plaques 96 puits.....		33
Figure 14 : A gauche coupons concaves enveloppés individuellement dans une enveloppe en Tyvek perméable à l'H ₂ O ₂ (souche ATCC 7953) et à droite G. <i>stearothermophilus</i> au microscope (x3000) ²⁶		41
Figure 15 : A gauche : Coupon PVC utilisé pour les études de validation des procédés de désinfection sur PVC, avec suspension virale. A droite : Reproduction du procédé de désinfection		45
Figure 16: Procédé de récupération virale sur les échantillons de surface		45
Figure 17: Verso d'un coupon PVC		51

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFSSAPs : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, remplacée par l'ANSM

AFNOR : Agence Française de Normalisation

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicaments et des produits de santé

ATCC : American Type Culture Collection

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CCID₅₀ : cell culture infective dose 50 %, dose infectant 50% des cellules

CQ : Contrôle Qualité

CTA : Centrales de traitement de l'air

DASRI : Déchets d'activités de soins à risques infectieux

DSP : Downstream process

DSVA : Désinfection des surfaces par voie aérienne

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EN : European norm, norme européenne

FDA : Food and Drug administration

LDE : Limite de détermination

LOC : Limite de calculs

LOD : Limite de détection

Log : logarithme

Ncum pos : Nombre cumulé de puits positifs pour les dilutions supérieures ou égales à la dilution donnée

Ncum neg : Nombre cumulé de puits négatifs pour les dilutions inférieures ou égales à la dilution donnée

NF : Normes françaises

OMS : Organisation Mondiale de la santé

PBS : Phosphate Buffered Saline, tampon phosphate

PPH : Polypropylène homopolymère

prEN : Norme européenne en projet

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PVC : Polychlorure de vinyle

TSB : Tryptic Soy Borth, Bouillon Trypticaséine Soja

WHO : World Health Organization, en français OMS

Introduction

L'objet de cette thèse est de présenter les critères de choix des désinfectants sur un site industriel manipulant des virus humains pathogènes et la validation de l'efficacité virucide de ces désinfectants dans les conditions réelles d'utilisation, sur les virus manipulés.

Ce travail repose sur une expérience de stage de 6 mois au cours de laquelle les choix de désinfectants ont été effectués et les validations d'une désinfection des surfaces aérienne et par contact ainsi que la désinfection d'une cuve d'effluents liquides ont été initiées.

Historique

Avant même de connaître l'existence des micro-organismes, la désinfection a toujours été pratiquée par les hommes.

L'analyse chimique des cendres de foyers préhistoriques a permis d'apprendre que pour conserver durant l'hiver, les viandes chassées durant l'été, les hommes préhistoriques utilisaient certaines essences d'arbre dont la combustion permettait de fumer et donc de conserver les viandes. Il est aujourd'hui connu que les essences utilisées étaient riches en composés phénoliques.¹

Par la suite, les égyptiens ont utilisé des principes de désinfection pour momifier leurs pharaons. Le placement des momies dans leurs sarcophages étanches garantissait ensuite leurs conservations.¹

Il est considéré que la plus ancienne référence à une désinfection des locaux par un produit chimique remonte à 800 ans avant Jésus-Christ. Dans l'Odyssée, Homère fait mention d'une purification en faisant brûler du soufre. Les vapeurs de dioxyde de soufre sont à l'origine de l'action « purifiante ».¹

Le mercure était également utilisé comme désinfectant et comme revêtement protecteur en Chine, en Inde, en Egypte et en Europe.¹

En 1674, Antoni van Leeuwenhoek décrit les premiers microorganismes qu'il a observés au microscope et qu'il appelle « animalcules ».¹

Au XVII^{ème} siècle, l'idée de chauffer afin d'éviter la multiplication des « animalcules » présents dans les aliments, liquides... est apparue. Cependant la théorie de la génération spontanée avait encore de beaux jours devant elle.¹

Le chlore, l'iode et l'eau oxygénée, des désinfectants encore couramment utilisés aujourd'hui ont été découverts respectivement en 1774 par Carl Scheele, en 1811 par Bernard Courtois et en 1818 par Louis Thénard.¹

Au milieu du XIX^{ème} siècle, l'obstétricien Ignaz Semmelweis permet de diminuer la mortalité des femmes après leurs accouchements en instaurant le lavage des mains des gynécologues avec une solution de chlorure de calcium.

A la même période, l'américain Holmer, chirurgien à Boston conclut sur l'utilité du lavage des mains avec une solution d'eau de Javel.¹

On considère que le pionnier de l'asepsie chirurgicale est le chirurgien Joseph Lister (1827-1912). Il écrit dans « On the Antiseptic Principle in the Practise of Surgery » qu'« il faut prévenir l'entrée des germes dans la plaie pendant et après l'opération » et que « tous les instruments, linges et d'une manière générale, tout ce qui entre en contact avec l'opération y compris les mains des chirurgiens et de leurs assistants doit être aseptisé ». Cependant à cette époque il était encore très courant pour les chirurgiens de ne pas revêtir de tenue particulière avant l'entrée dans la salle d'opération¹.

Aujourd'hui les désinfectants sont partout. Les hôpitaux, les industries pharmaceutiques, les collectivités et mêmes les particuliers utilisent des désinfectants pour nettoyer leurs locaux. On ne compte plus le nombre de désinfectants et de marques disponibles sur le marché.

Maîtrise de la biocontamination

La maîtrise de la biocontamination occupe une place prépondérante dans l'industrie pharmaceutique car elle permet de diminuer le risque de contamination des produits, diminuant ainsi le risque de refus de lot (et donc de pertes financières) et le risque de mise en danger des patients.

Elle permet également de limiter les risques pour les opérateurs qui travaillent en salles blanches ainsi que le risque de dispersion dans l'environnement de microorganismes, potentiellement pathogènes.

On entend par biocontamination la contamination d'une matière, d'un appareil, d'un individu, d'une surface, d'un liquide, d'un gaz ou de l'air par des particules viables².

I. Généralités

Définitions

La biodécontamination est une combinaison de processus dans lesquels les microorganismes (pathogènes ou non) sont enlevés, inactivés ou détruits, afin de rendre hors de danger la réutilisation d'objets pour un usage ultérieur. Cela comprend le nettoyage, la désinfection ou la stérilisation.

Le bionettoyage permet d'enlever physiquement les agents infectieux et les matières organiques mais ne les détruit pas forcément. Cependant cette phase est très importante, elle doit être la première étape avant de procéder à une désinfection ou à une stérilisation : « on ne désinfecte correctement que ce qui est propre ». En effet les matières organiques notamment peuvent inactiver des désinfectants chimiques et peuvent servir de support aux micro-organismes et ainsi permettre leur développement. L'état de propreté obtenu à l'issue du bionettoyage conditionne la qualité de la désinfection ou de la stérilisation ultérieure.

La désinfection était d'après la norme NF T 72-101³ une « opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables supportés par les milieux inertes contaminés en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes et/ou virus présents au moment de l'opération ».

La norme NF T 72-101 a été remplacée par la norme EN 14885³ qui donne la définition de la désinfection chimique suivante : « réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice inanimée, obtenue grâce à l'action irréversible d'un produit sur leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé approprié en fonction d'un objectif donné ».

Contrairement à la définition donnée dans la norme NF T 72-101, la désinfection ne concerne pas uniquement les surfaces inertes. Le terme de désinfection sera également utilisé pour la peau saine, tandis que le terme d'antisepsie sera utilisé pour la peau lésée et les muqueuses⁴.

La désinfection permet une réduction du nombre de microorganismes viables. Elle ne permet pas toujours une stérilisation des milieux contaminés, qui est l'élimination de tous les microorganismes viables.

Paramètres de nettoyage à maîtriser

Afin de maîtriser les opérations de nettoyage, il faut mettre en place un programme de nettoyage⁵.

Dans un premier temps il faut étudier ce qui est à nettoyer : la classe de la zone à atmosphère contrôlée (selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), classe A, B, C ou D), à l'intérieur de ces zones, les surfaces sont classées comme critiques, générales ou autres⁵. Les types de contaminants potentiels, les fréquences où il y a un risque de contamination ... sont étudiés.

Il faut déterminer la meilleure méthode de nettoyage (les équipements, les solutions de nettoyage, les traitements de surface) et les fréquences de nettoyage pour chaque type de surface pour parvenir au niveau de propreté souhaité. Un calendrier est alors établi décrivant les moments de nettoyage et les opérateurs des différents nettoyages (personnel de nettoyage ou opérateurs des zones). L'ensemble du personnel est formé, au niveau d'implication attendu dans le programme.

Le matériel nécessaire doit être stocké dans des installations adéquates (placard à balais, chariots...).

Il faut définir la méthode pour surveiller les résultats du nettoyage et réagir aux non conformités.

Enfin, une fois tous les paramètres fixés on peut procéder à la validation du procédé de nettoyage.

1. Désinfectants

1.1 Généralités

Le choix des désinfectants est un paramètre important de la désinfection. En fonction du domaine d'utilisation, ils sont classés en trois catégories.

Les procédés et produits destinés à la désinfection par voie aérienne en cas de maladie à déclaration obligatoire sont soumis à un agrément de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicaments et des produits de santé).

Les produits désinfectants de dispositifs médicaux sont soumis à la législation européenne des dispositifs médicaux et les autres produits désinfectants relèvent eux de la réglementation européenne des biocides.

On regroupe sous l'appellation de produits biocides « un ensemble de produits destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, par une action chimique ou biologique. Bien que ciblant les organismes nuisibles, les biocides sont par définition des produits actifs susceptibles d'avoir des effets sur l'homme, l'animal ou l'environnement. Les procédés de génération in-situ de produits biocides sont également encadrés par cette réglementation, ainsi que les articles traités incorporant des produits biocides.

Ces produits sont classés en quatre grands groupes, comprenant 22 types de produits différents :

- les désinfectants, types de produits 1 à 5 (ex : désinfectants pour les mains, désinfectants pour l'eau) ;
- les produits de protection, types de produits 6 à 13 (ex : produits de protection du bois contre les insectes ou les champignons, produits de protection du cuir, produits de protection des fluides utilisés dans la transformation des métaux) ;
- les produits de lutte contre les nuisibles, types de produits 14 à 20 (ex : rodenticides, insecticides) ;
- les autres produits, types de produits 21 et 22 (ex : peintures antisalissures appliquées sur les bateaux, fluides utilisés dans la taxidermie et la thanatopraxie). »⁶

1.2 Facteurs influençant l'efficacité des désinfectants

Plusieurs facteurs influencent l'efficacité des désinfectants :

- Type de désinfectants
- Concentration du désinfectant
- Type de micro-organismes
- Nombre de micro-organismes présents à l'origine
- Temps de contact entre désinfectant et micro-organismes
- pH
- Température
- Etat d'agrégation des micro-organismes (particules virales, biofilm...)
- La dureté de l'eau de dilution
- Présence de substances interférentes

De plus, il ne faut jamais mélanger plusieurs désinfectants, il y a un risque qu'ils perdent leur efficacité. Ainsi, si plusieurs désinfectants doivent être utilisés l'un après l'autre, il est nécessaire d'attendre que le premier sèche avant d'utiliser le deuxième.

Le mode de conservation et la durée de conservation sont deux points critiques à respecter.

En effet, il y a deux risques à utiliser un produit qui n'a pas été conservé correctement ou trop longtemps. Le désinfectant peut être inactif et/ou être contaminé par des micro-organismes.

Généralement, la conservation des désinfectants doit se faire à l'abri de la lumière et d'une température trop élevée dans le flacon d'origine. Il arrive que la conservation du produit dans un flacon non ouvert soit différente de la conservation du produit après

ouverture du récipient. Il est donc très important d'indiquer la date d'ouverture sur le récipient et la nouvelle date de péremption si elle est différente de celle du flacon non ouvert. Les dilutions sont généralement extemporanées et ne doivent pas être conservées. Si la solution diluée peut se conserver, il faut indiquer la date de préparation et la nouvelle date de péremption sur le flacon.

1.3 Choix du désinfectant

Le désinfectant « idéal » doit répondre aux critères suivants :

1. Avoir une activité détergente et désinfectante
2. Avoir un spectre d'activité qui correspond aux micro-organismes éventuellement présents sur les surfaces à désinfecter
3. Avoir une action rapide
4. Avoir un effet prolongé dans le temps, on parle de rémanence
5. Etre compatible avec le matériel à désinfecter
6. Etre actif en présence de substances interférentes
7. Ne pas être toxique pour le personnel et/ou l'environnement en conditions normales d'utilisation et ne pas avoir d'odeur trop présente ou désagréable
8. Etre facile à doser
9. Avoir une certaine stabilité
10. Avoir un coût peu élevé
11. Etre stérile s'il est utilisé en classe A ou B.

1.3.1 Activité détergente

L'activité détergente du détergent/désinfectant permet de détacher les salissures afin de permettre leur élimination.

1.3.2 Spectre d'activité

Lors du choix d'un désinfectant, il est nécessaire de connaître les micro-organismes qu'il faudra éliminer. Il peut s'agir de micro-organismes volontairement introduits dans la zone à désinfecter, par exemple des virus dans un laboratoire qui produit des vaccins contre ces virus, ou involontairement. Il peut s'agir par exemple de mycobactéries dans un service qui est amené à recevoir des patients avec une tuberculose active.

Une fois que la flore microbienne potentielle est connue, il est possible de réduire le nombre de désinfectants disponibles.

Il existe principalement 7 familles de désinfectants, présentées dans le tableau ci-dessous. Chaque famille a un spectre d'activité défini, ils sont détaillés dans le Tableau I : Spectres d'activité des désinfectants par famille⁷. Il est à noter que ce sont des indications a priori et que ces spectres peuvent varier en fonction du désinfectant, de sa concentration et du micro-organisme.

Tableau I : Spectres d'activité des désinfectants par famille

Famille	Spectre d'activité							
	Gram +	Gram -	Mycobactéries	Levures	Moississures	Virus nus	Virus enveloppés	Spores
Halogénés Chlorés	+	+	+	+	+	+	+	+
Aldéhydes	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydants	+	+	+	+	+	+	+	+
Biguanides	+	+	±	+	±	±	+	-
Alcools	+	+	+	±	±	±	+	-
Phénols	Activité variable selon les composés							-
Tensioactifs Ammoniums quaternaires	+	±	-	+	+	±	+	-

+ : Produits actifs

± : Produits inconstamment actifs

- : Produits inactifs

Par exemple, un service hospitalier amené à recevoir des patients atteints de tuberculose active, ne devra pas utiliser de désinfectant dont les composants actifs principaux sont des ammoniums quaternaires ou des biguanides.

1.3.3 Rapidité d'action

Les fabricants de désinfectants indiquent les durées d'action qui ont permis aux désinfectants d'atteindre les réductions logarithmiques minimales pour revendiquer une action bactéricide, virucide etc.

Ces indications doivent être prises en compte par l'industriel ou le service hospitalier qui choisit un désinfectant. En effet, si le désinfectant est utilisé pour une désinfection de dispositifs médicaux par trempage, une durée d'action de 1 h est tolérable, par contre dans le cas d'une désinfection à la lingette à l'entrée d'une zone classée A, le temps d'action doit être très court car les opérateurs n'attendront pas 15 minutes avant d'entrer le matériel dans la zone.

1.3.4 Rémanence

Un désinfectant n'élimine que les micro-organismes et/ou virus présents au moment de l'opération de désinfection. La rémanence désigne l'effet anti-microbien du désinfectant persistant sur une surface.

Si le désinfectant possède une rémanence, les micro-organismes qui se déposeront sur la surface après la désinfection et pendant l'effet rémanent pourront être éliminés. Cela permet notamment de désinfecter du matériel hors PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) avant de l'introduire sous le PSM en conservant un niveau microbien minimal.

La rémanence ne doit cependant pas être trop élevée et le désinfectant doit se dégrader afin de limiter les risques de toxicité du produit.

1.3.5 Compatibilité avec le matériel à désinfecter

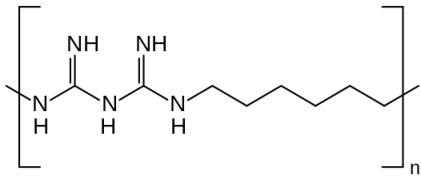
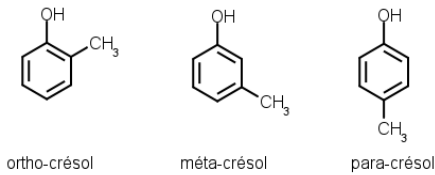
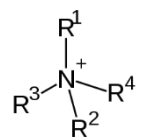
Il est primordial de connaître pour quelle application le désinfectant va être choisi. En effet, certains désinfectants altèrent les matériaux. C'est notamment le cas des désinfectants chlorés qui altèrent l'inox. Il ne sera donc pas possible d'utiliser un désinfectant chloré pour désinfecter un PSM. Le tableau ci-dessous⁷ (Tableau II : Modes d'action et Interférences/Incompatibilités des désinfectants par famille), répertorie les différentes familles de désinfectants avec leurs modes d'action et les facteurs interférents ou incompatibilités.

1.3.6 Interférences

Le tableau ci-dessous⁷ (Tableau II : Modes d'action et Interférences/Incompatibilités des désinfectants par famille) détaille également les substances ou conditions qui peuvent diminuer l'action des désinfectants. Dans de nombreux cas, les désinfectants voient leur efficacité diminuer avec la présence de matières organiques.

Tableau II : Modes d'action et Interférences/Incompatibilités des désinfectants par famille⁷

Famille	Exemples de molécules	Mode d'action	Facteurs interférents / Incompatibilités
Halogénés Chlorés	Hypochlorites ex : eau de javel (NaClO) Chloramines : ex monochloramine (NH ₂ Cl)	Pouvoir oxydant : production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN Halogénéation des acides aminés aromatiques des protéines, modifications structurales, inhibition enzymatique	pH<5, dégagement de chlore gazeux, perte d'activité Altération inox, bronze, cuivre, laiton
Aldéhydes	Formaldéhyde Glutaraldéhyde Aldéhyde succinique	Alkylation des groupes NH ₂ des protéines des structures et de fonction et ceux des acides nucléiques. Les dialdéhydes permettent la formation de ponts entre les acides aminés → rigidification des structures protéiques → perte d'activité biologique Altération de la paroi cellulaire Dénaturation et inhibition de la synthèse des acides nucléiques Dénaturation et inhibition de la synthèse des protéines des microorganismes	Humidité relative Inhibition par protéines
Oxydants	Acide peracétique Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Destruction de radicaux sulfhydriles et ponts disulfures des protéines, modification de protéines structurales, inhibition enzymatique Production de radicaux hydroxyles qui attaquent la membrane cellulaire	Matières organiques Activité accrue à pH acide Altération inox, bronze, cuivre, laiton

Biguanides	polyhexaméthylène biguanide 	Faibles concentrations : Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire, fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol ; Inhibition enzymatique Fortes concentrations : précipitent les protéines et acides nucléiques	Protéines et matières organiques Incompatibilités avec halogènes, aldéhydes, tensioactifs anioniques et non ioniques
Alcools	Ethanol Isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	Matières organiques, coagule les protéines Incompatibilités avec substances anioniques
Phénols	 ortho-crésol méta-crésol para-crésol	Faibles concentrations : inactivation des systèmes enzymatiques, altération de la membrane cytoplasmique Fortes concentrations : dérivés phénoliques pénètrent et précipitent les protéines cellulaires	Matières organiques, protéines, eau dure Quand pH augmente, on augmente solubilité mais propriétés antibactériennes sont diminuées Incompatibilités avec sels de fer, hypochlorites, alcools, ammoniums quaternaires Corrosifs pour métaux et nombreux matériaux
Tensioactifs Ammoniums quaternaires	Chlorure de benzalkonium 	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire, fuite de constituants cellulaires, lyse de la cellule tension sur la membrane, diminution de la perméabilité	Matières organiques Incompatibilités avec substances anioniques

1.3.7 Toxicité et Odeur

Les désinfectants sont des produits qui ont souvent une certaine toxicité pour le personnel et/ou pour l'environnement. Il est nécessaire de les manipuler avec précaution, en utilisant des gants, voire des lunettes de protection et une blouse.

Il est préférable d'utiliser des désinfectants déjà dilués afin de limiter les risques liés à la manipulation de produits concentrés.

1.3.8 Facilité de dosage

Il est important de respecter les conditions d'utilisation préconisées par les fabricants. Un des critères les plus importants est la quantité de désinfectant. Certains fabricants ont introduit dans leurs conditionnements primaires des pompes doseuses délivrant la quantité appropriée de désinfectant. Ces dispositifs permettent de faciliter les manipulations des opérateurs et de limiter les erreurs humaines.

1.3.9 Stabilité

Plus un produit est stable plus il se conservera longtemps. De plus, un produit très instable peut poser problème car il y a un risque de dégradation lors du contact avec la surface à désinfecter, avec par exemple, la présence de matières organiques. Cependant, un désinfectant qui se dégrade permet de limiter le risque de toxicité.

1.3.10 Coût

Le coût des désinfectants est évidemment un critère très important. En effet la désinfection n'est pas un événement exceptionnel et doit être régulièrement effectuée. Les désinfectants sont utilisés en grandes quantités et/ou doivent être renouvelés (conservation) régulièrement.

1.3.11 Stérilité

« Les désinfectants et détergents utilisés dans des zones de classe A et B doivent être stériles. »⁸. Ils seront double-ensachetés pour permettre leur entrée en zone sans contamination.

2. Désinfection

2.1 Règles de la désinfection

La procédure de désinfection s'appuie sur certaines règles. Tout d'abord, comme mentionné précédemment, afin de réaliser une désinfection optimale, il est nécessaire d'éliminer les matières organiques qui pourraient servir de support aux microorganismes ou diminuer l'efficacité des désinfectants et de réduire le nombre de micro-organismes présents. La première étape à toute désinfection est donc le nettoyage.

2.1.1 Cercle de Sinner

Le docteur H. Sinner a décrit dans les années 1960 le cercle de Sinner (Figure 6). Il décrit que le résultat final des opérations de nettoyage est influencé par 4 facteurs interdépendants. Si l'un des facteurs est diminué, il est nécessaire de compenser cette perte en augmentant un ou plusieurs facteurs.

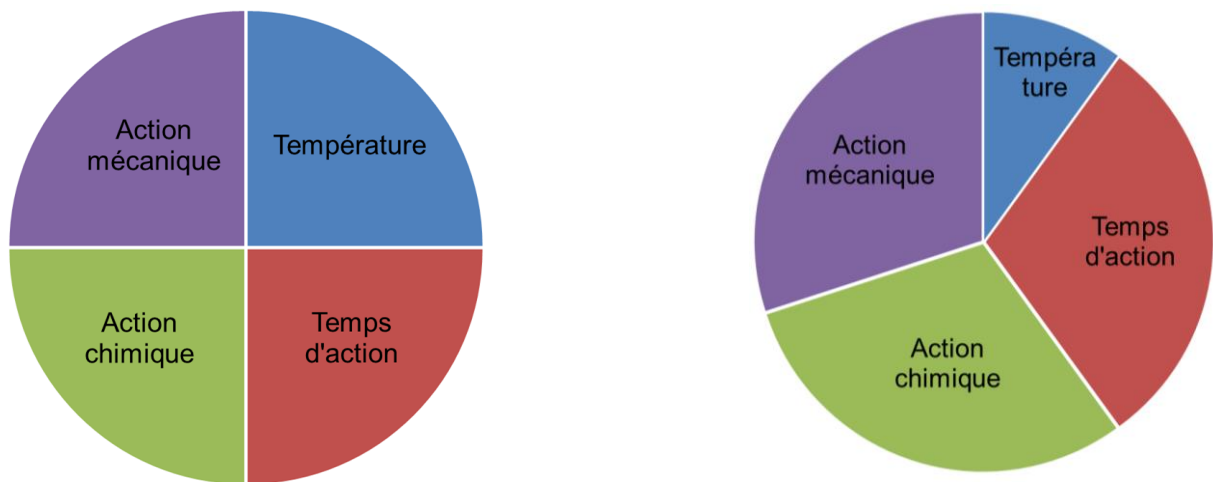


Figure 1: Cercles de Sinner

Exemple : A droite un cercle de Sinner, où la diminution de la température a été compensée par une augmentation de la concentration en produit pur, un temps d'action plus long et une action mécanique plus importante.

L'action chimique représente l'action d'une solution détergente et/ou désinfectante. Ce facteur est modifié par l'augmentation ou la diminution de la concentration en produit pur. Il est à noter que l'augmentation de la concentration en produit n'est pas toujours synonyme d'augmentation de l'efficacité de la désinfection, l'augmentation de la concentration pouvant notamment entraîner la précipitation du milieu.

L'action mécanique représente les frottements ou la pression appliqués à la surface.

La température a un effet sur l'action désinfectante. L'augmentation de la température peut permettre d'augmenter l'activité du désinfectant. Il ne faut cependant pas monter à des températures qui pourraient dégrader le désinfectant. L'augmentation de la température peut être due à des frottements importants.

Le temps d'action correspond à la durée pendant laquelle le désinfectant est en contact avec la surface à désinfecter.

2.1.2 Alternance

Il est nécessaire d'alterner l'utilisation d'un désinfectant avec celle d'un détergent ou d'un détergent/désinfectant. Cela permet de limiter le risque de formation de biofilms. Il est également recommandé de réaliser une alternance des désinfectants afin de limiter le risque de développement de résistances des micro-organismes.

En effet l'acquisition de résistances contre les antibiotiques est bien connue, notamment chez les bactéries. Elle peut s'acquérir par mutation génique ou acquisition de matériel génétique (transposon ou plasmides)...

En ce qui concerne les désinfectants, les termes de « réduction de la susceptibilité » ou de « tolérance accrue » sont préférés car les concentrations utilisées dans la désinfection excèdent largement le niveau létal des désinfectants (virucide, bactéricide...).

Il n'y a pas de données disponibles qui montrent qu'un microorganisme résistant aux antibiotiques est moins sensible aux germicides chimiques liquides qu'un microorganisme sensible dans les conditions et les concentrations actuellement utilisées.

Cependant il a été démontré que certaines souches de *S. aureus* qui contiennent un plasmide porteur du gène codant la résistance à la gentamicine avaient une réduction de leur sensibilité à certains désinfectants et antibiotiques (contenant des ammoniums quaternaires). Deux familles de gènes (qacCD et qacAB) sont impliquées dans la protection contre des composants de certains désinfectants (comme des ammoniums quaternaires). Il est supposé que la protéine codée par le qacA est une protéine associée à la membrane cytoplasmique qui réduirait activement l'accumulation intracellulaire de toxiques (comme les ammoniums quaternaires).

D'autres études ont montré que la tolérance au formaldéhyde médiée par un plasmide est transférable de *Serratia marcescens* à *E.coli* et que la tolérance aux ammoniums quaternaires médiée par un plasmide est transférable de *S. aureus* à *E. coli*.

Cependant comme les concentrations de désinfectants utilisées en pratique sont bien supérieures aux concentrations minimales inhibitrices, même pour les souches les plus résistantes, le niveau de tolérance est bas et n'est pas en mesure de compromettre l'efficacité des désinfectants.

Certains chercheurs ont suggéré que l'utilisation de désinfectants ou des antiseptiques pourrait faciliter le développement de micro-organismes résistants aux antibiotiques.

Il n'y a actuellement aucune preuve que l'utilisation des antiseptiques ou de désinfectants sélectionne des organismes résistants dans la nature. De plus l'action des antibiotiques et des désinfectants sont fondamentalement différents. Les antibiotiques sont sélectivement toxiques et n'ont qu'un nombre limité de cibles chez les microorganismes tandis que les désinfectants sont non spécifiques. Ils ont un spectre large et possèdent de nombreux mécanismes à effets toxiques⁹.

L'alternance des désinfectants semble donc recommandée surtout par mesure de précaution plutôt que par réel besoin de limiter les risques d'apparition de résistances telles qu'elles sont connues pour les antibiotiques.

2.2 Cibles de la désinfection

Il existe 4 types principaux de cibles pour la désinfection : les champignons, les mycobactéries, les virus et les bactéries. On pourrait également ajouter les prions à cette liste.

Chacun de ces types d'organismes possède des caractéristiques biologiques différentes qui influent sur leurs résistances aux désinfectants.

En 1957, Spaulding a proposé une classification des microorganismes, des plus résistants aux moins résistants. Cette classification représentée Figure 2 est encore couramment utilisée mais repose sur les connaissances de l'époque.

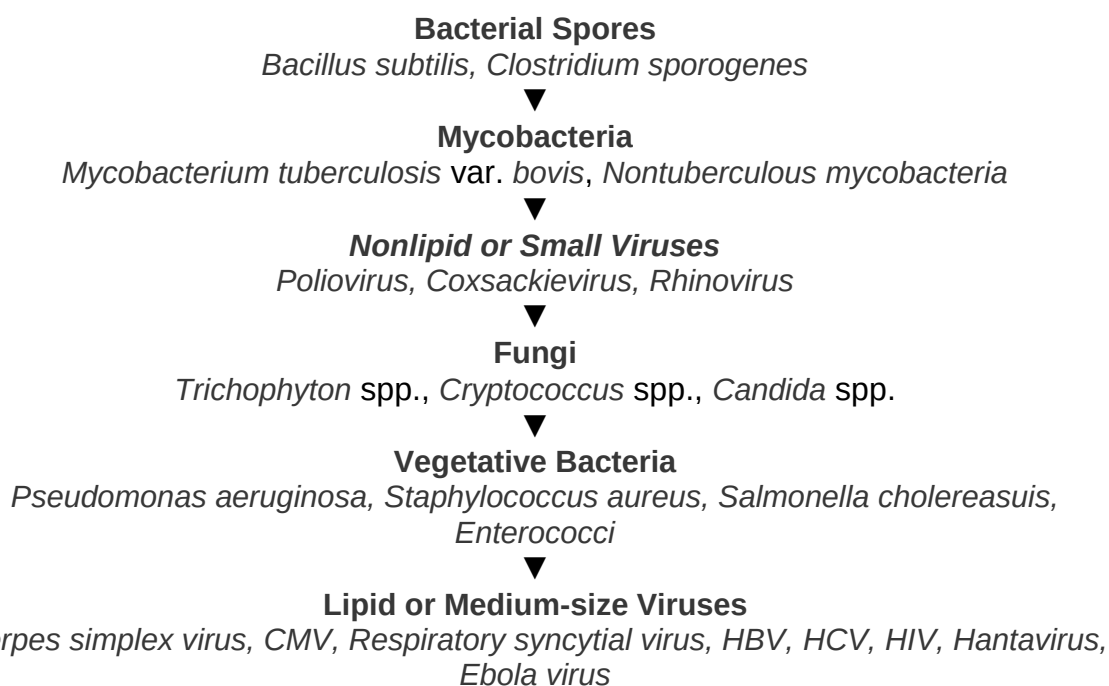


Figure 2 : Résistance décroissante aux biocides liquides selon la classification de Spaulding

McDonnell propose en 2007 une classification remise à jour, les micro-organismes sont classés du plus résistants au moins résistants :

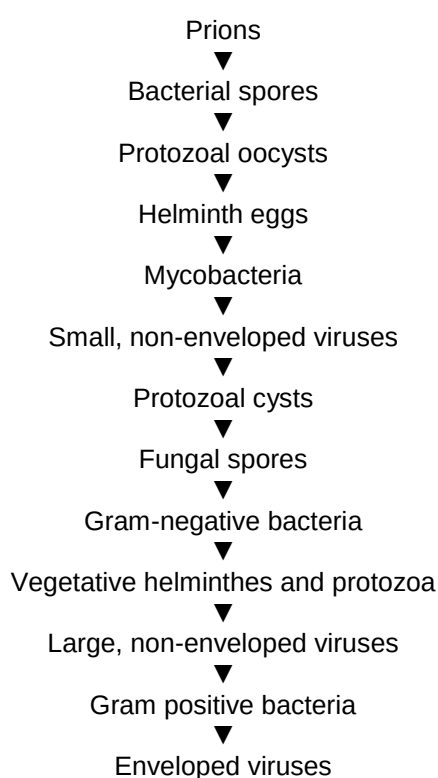


Figure 3 : Résistance décroissante aux biocides liquides selon la classification de McDonnell¹⁰

Les spores sont globalement plus résistantes aux désinfectants car l'enveloppe et le cortex des spores agissent comme une barrière. La paroi cellulaire des mycobactéries, cireuse, riche en acides gras et lipides empêche l'entrée des désinfectants.

Les bactéries gram-négatives possèdent une membrane externe qui agit comme une barrière à l'absorption des désinfectants.

Les virus non enveloppés ont une résistance face aux désinfectants chimiques supérieure à celle des virus enveloppés. En effet, les désinfectants tels que l'alcool peuvent désorganiser les membranes lipidiques et dénaturer les protéines.

Sethu Veerabadran, Ian M Parkinson¹¹ ont publié un tableau représentant les principaux types de désinfectants chimiques et leurs activités face aux micro-organismes par type de microorganismes.

Microbicidal activity of chemical disinfectants							
Disinfectant	Microbicidal activity					Stable	Corrosive/damaging
	Spores ^b	Mycobacteria ^c	Bacteria ^c	Viruses ^c			
				Enveloped	Non-enveloped		
Glutaraldehyde 2%	3 h	20 min	<5 min	<5 min	<5 min	Moderate 14–28 days	No
Ortho-phthalaldehyde 0.55%	>6 h	<5 min	<5 min	<5 min	<5 min	Moderate 30 days	No (staining)
Peracetic acid 0.2–0.35% ^a	10–20 min	5–20 min	<5 min	<5 min	<5 min	No 1–3 days	Slight
Alcohol (usually 70%)	None	<5 min	<5 min	<5 min	5–10 min	Yes	Slight (lens cements)
Chlorine dioxide	<5 min	<5 min	<5 min	<5 min	<5 min	No 1–5 days	Yes
Superoxidized water (electrolysed saline)	<5 min	<5 min	<5 min	<5 min	<5 min	No <1 day	Yes

^a Activity varies with concentration of product.
^b Time required to achieve 6 log₁₀ reduction.
^c Time required to achieve 5 log₁₀ reduction.

Figure 4 : Activités des désinfectants face aux microorganismes (Cleaning, disinfection and sterilization (Sethu Veerabadran, Ian M Parkinson)¹¹)

Les temps donnés correspondent aux temps nécessaires pour éliminer les sous populations les plus résistantes.

Ce type de classification est à prendre avec précaution, en effet la résistance des micro-organismes dépend du type de micro-organismes mais à l'intérieur de ces sous catégories, la résistance entre deux micro-organismes peut être très différente. De plus, le type de désinfectants influe sur la résistance des micro-organismes. Un même micro-organisme n'aura pas la même résistance face à deux désinfectants différents.

2.3 Activités bactéricide, fongicide, sporicide, virucide

Les désinfectants peuvent avoir une ou plusieurs des quatre activités suivantes (définitions de la norme NF EN 14885³):

- **Activité Bactéricide** : capacité d'un produit à réduire le nombre de cellules viables appartenant à des micro-organismes d'essai représentatifs, dans des conditions définies

- Activité Fongicide : capacité d'un produit à réduire le nombre de cellules végétatives viables de levures et de spores de moisissures appartenant à des microorganismes d'essai représentatifs, dans des conditions définies.

- Activité Sporicide : capacité d'un produit à réduire le nombre de spores bactériennes viables de micro-organismes d'essai représentatifs dans des conditions définies

- Activité Virucide : capacité d'un produit à réduire le nombre de particules virales infectieuses dans des micro-organismes d'essai appropriés, dans des conditions définies.

La désinfection ne permet donc pas d'atteindre un état stérile (état d'un produit exempt de microorganisme viable) mais permet une réduction de la charge en microorganismes. La réduction minimale à atteindre pour revendiquer une action désinfectante dépend du type d'activité :

- Bactéricide : 5 log
- Fongicide : 4 log
- Sporicide : 3 log
- Virucide : 4 log

2.4 Normes « Antiseptiques et désinfectants chimiques »

La norme EN 14885 « Antiseptiques et désinfectants chimiques – Application des Normes européennes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques »³ est la norme européenne qui donne les définitions et les indications nécessaires pour comprendre l'organisation des normes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques selon le domaine d'application et les catégories d'essais. Il existe en effet différentes catégories d'essais pour la détermination de l'activité désinfectante d'un produit.

Les essais de phase 1 sont des normes de base, ce «**sont** des essais de suspension quantitatifs permettant d'établir qu'un produit a une activité bactéricide, fongicide ou sporicide, quelles que soient les conditions spécifiques d'usage prévu»³.

Les normes de phases 2 et 3 sont dites des normes d'application, adaptées au domaine d'utilisation.

« **La phase 2** comporte deux étapes :

- **les essais de phase 2, étape 1** sont des essais de suspension quantitatifs permettant d'établir qu'un produit a une activité bactéricide, fongicide, mycobactéricide, sporicide ou virucide simulant des conditions pratiques correspondant à l'usage prévu»³. Ce sont des tests de suspension qui se rapprochent des conditions pratiques : apport de matières organiques, eau dure, temps de contact spécifique, température mais ne tiennent pas compte des paramètres spécifiques pour le domaine choisi (instruments, surface...)

- « - **les essais de phase 2, étape 2** sont d'autres essais de laboratoire quantitatifs simulant les conditions pratiques, par exemple des essais sur des surfaces, des instruments, des essais de lavage des mains et de friction des

mains, en vue d'établir qu'un produit a une activité bactéricide, fongicide, mycobactéricide, sporicide ou virucide ;

Les **essais de phase 3** sont des essais de terrain dans des conditions pratiques. On ne dispose pas actuellement d'une méthodologie validée pour ce type d'essais. En attendant l'élaboration de normes, c'est l'autorité réglementaire qui a la responsabilité de déterminer l'acceptabilité des données obtenues à l'issue des essais de terrain, à l'appui des revendications concernant un produit.»³.

Le tableau ci-dessous répertorie les normes disponibles concernant les essais des antiseptiques et désinfectants chimiques (uniquement pour environnement médical, soins de santé) :

Tableau III : Récapitulatifs des normes applicables à la détermination de l'efficacité des désinfectants

Types d'essais	Bactéricide	Sporicide	Fongicide Levuricide	Mycobactéricide	Virucide
Phase 1	EN1040 :2005	EN14347 :2005	EN1275 :2005	-	-
Phase 2 étape 1	EN13727 :2012 +A1 :2013	projets	EN13624:2013	EN14348 :2005	EN14476 :2013
Phase 2 étape 2	EN1499 :2013 EN1500 :2013 EN12791:2005 (en révision) EN14561 :2006 +projets	-	EN14562 :2006 + projet	EN14563 :2008	Projet (EN1677)

L'AFNOR (Agence Française de Normalisation) a standardisé les études in vitro de l'activité des antiseptiques et désinfectants. Ces études permettent d'évaluer la concentration minimale de produits, qui dans des conditions déterminées de température et de temps de contact, provoque la réduction dans des proportions préalablement définies d'une population initiale microbienne.

Il y a trois étapes dans ce type d'étude. La première consiste à mettre le produit en contact avec un inoculum microbien. A la fin du temps de contact défini, il faut inhiber l'activité du désinfectant soit en diluant/neutralisant le mélange désinfectants/micro-organismes soit en filtrant la suspension sur une membrane¹².

La dernière étape consiste à déterminer les micro-organismes encore viables par exemple par culture.

Une seule norme concerne l'activité virucide des désinfectants, la NF EN 14476¹³. Il s'agit d'une norme correspondant aux essais de phase 2, étape 1.

Le principe de cette norme repose sur l'évaluation de l'efficacité virucide du désinfectant lorsqu'il est ajouté à une suspension d'essai de virus dans une solution d'une substance interférente (Solution d'albumine bovine+/- érythrocytes). Des températures d'essais, des temps de contact et des microorganismes d'essai sont définis (voir tableau ci-dessous, extrait de la norme NF EN 14476¹³)

Tableau IV : Extrait de la norme NF EN 14476 concernant les conditions d'essai

Tableau 1 — Conditions d'essai minimales et additionnelles

Conditions d'essai	Traitement hygiénique des mains par frictions et lavage hygiénique des mains	Désinfection des instruments	Désinfection des surfaces	Désinfection des textiles
Spectre minimal des microorganismes d'essai	<i>Poliovirus</i> <i>Adénovirus</i> <i>Norovirus murin</i> Activité virucide à spectre limité ^a <i>Adénovirus</i> <i>Norovirus murin</i>	<i>Poliovirus</i> <i>Adénovirus</i> <i>Norovirus murin</i> lorsque la température est de 40 °C ou plus : uniquement <i>Parvovirus</i>	<i>Poliovirus</i> <i>Adénovirus</i> <i>Norovirus murin</i>	<i>Parvovirus</i>
Conditions additionnelles	Tout microorganisme d'essai pertinent			
Température d'essai	selon les recommandations du fabricant, mais égale / comprise entre			
	20 °C	20 °C et 70 °C	4°C et 30 °C	30 °C et 70 °C
Temps de contact	selon les recommandations du fabricant			
	mais compris entre 30 s et 120 s	mais au maximum 60 min	mais au maximum 5 min ou 60 min ^b	mais au maximum 20 min
Substance interférente				
conditions de propreté	solution d'albumine bovine à 0,3 g/l (traitement hygiénique des mains par frictions) ^c	solution d'albumine bovine à 0,3 g/l et/ou	solution d'albumine bovine à 0,3 g/l et/ou	
conditions de saleté	solution d'albumine bovine à 3,0 g/l plus érythrocytes à 3,0 ml/l (lavage hygiénique des mains) ^d	solution d'albumine bovine à 3,0 g/l plus érythrocytes à 3,0 ml/l	solution d'albumine bovine à 3,0 g/l plus érythrocytes à 3,0 ml/l	solution d'albumine bovine à 3,0 g/l plus érythrocytes à 3,0 ml/l
Conditions additionnelles ^e	propreté ou saleté ^{c, d} ; toute substance pertinente	toute substance pertinente	toute substance pertinente	toute substance pertinente

Les conditions d'essais ne sont pas représentatives de l'utilisation pratique des désinfectants et une revendication de l'efficacité virucide du désinfectant selon la norme NF EN 14476¹³ ne permet pas à l'industriel d'assurer que le désinfectant sera efficace dans les conditions réelles de son entreprise, contre les virus qu'il manipule.

Il est donc nécessaire de procéder à une validation de l'efficacité des désinfectants dans les conditions dans lesquels ils sont utilisés. Dans ces cas-là, l'efficacité de la désinfection repose sur l'efficacité du désinfectant mais également sur la procédure de nettoyage et désinfection associée.

3. Désinfection des surfaces

3.1 Désinfection par voie aérienne (DSVA)

La désinfection aérienne est le processus utilisé pour réduire la contamination microbiologique des surfaces par saturation de l'air en désinfectant.

Dans les zones de production elle est réalisée après chaque campagne de production (et si besoin dans le cadre d'actions correctives).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est la substance active la plus utilisée actuellement dans les procédés automatiques disponibles sur le marché français. Il a remplacé le formaldéhyde qui a été déclaré cancérigène en juin 2004 par le Centre international de recherche sur le cancer. Il est utilisé à des concentrations variables et est parfois associé à d'autres substances actives, notamment l'acide peracétique ($CH_3-COOOH$)¹⁴.

La concentration efficace en H_2O_2 est celle atteinte sur les surfaces cibles à désinfecter. Cette concentration dépend, en dehors du type de dispersion (nébulisation, pulvérisation ou flash évaporation), dans le cas de l' H_2O_2 , de l'équilibre des concentrations en H_2O_2 dans les différents compartiments environnementaux :

- a. La concentration initiale en H_2O_2 dans le produit biocide
- b. La concentration en H_2O_2 dans l'atmosphère qui est dépendante de la température et l'hygrométrie ambiantes
- c. La concentration en H_2O_2 sur les surfaces à désinfecter qui est dépendante de la condensation ou de la « microcondensation » du produit. La condensation survient lorsque la température des surfaces cibles est inférieure à celle de l'air ambiant, lorsque le point de rosée est atteint. La « microcondensation » est invisible à l'œil nu et survient juste en dessous du point de rosée.

Propriétés de l' H_2O_2 :

- stable à l'état pur
- sensible en solution aqueuse à la chaleur, la lumière, aux impuretés
- Très actif sur les bactéries, moins et plus lentement sur les fungi, les virus et les spores

3.1.1 Appareil utilisé

D'après l'AFSSAPs (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé)¹⁴, désormais remplacée par l'ANSM, « le rôle de l'appareil est de disperser dans l'atmosphère le produit biocide afin que ce dernier puisse entrer en contact avec les surfaces à désinfecter. » Les produits peuvent être dispersés par des procédés manuels (dispersats dirigés) ou des procédés automatiques (dispersats non dirigés).

Il existe au moins trois types d'appareils automatiques qui utilisent au moins 3 types principes de dispersion : nébulisation, pulvérisation et la flash évaporation.

Le tableau ci-dessous compare les procédés manuels et les procédés automatiques.

Tableau V : Comparaison entre deux types de procédés de DSV¹⁵

Dispersats dirigés	Dispersats non dirigés
Procédé manuel En présence humaine	Procédé automatique Hors présence humaine
Pulvérisateur manuel, pneumatique, électrique Spray ou vaporisateur manuel : sans pression Appareils avec latence et compresseurs (pression <10bars)	Couple appareil-produit -Nébulisation (0.5 à 2 µm) -Pulvérisation (10 à 50 µm) -Flash évaporation (gaz)
Dispersion de gouttelettes	Dispersion de micro-gouttelettes ou de gaz
Remise à disposition plus rapide Exposition des professionnels Efficacité opérateur-dépendant	Pas d'exposition des professionnels Immobilisation longue (jusqu'à plusieurs heures)

Le Clarus Z est l'appareil automatique (dispersats non dirigés) utilisé sur le site industriel où s'est réalisée l'expérience de stage de 6 mois, pour les désinfections aériennes. Il comprend un module de mesure des paramètres environnementaux avec une sonde de température, une sonde d'humidité relative et une sonde mesurant la teneur atmosphérique en peroxyde d'hydrogène.

Il est équipé d'un poste de contrôle amovible, qui permet de monitorer le cycle de décontamination depuis l'extérieur de la zone à décontaminer (Voir Figure 5 : Clarus Z).

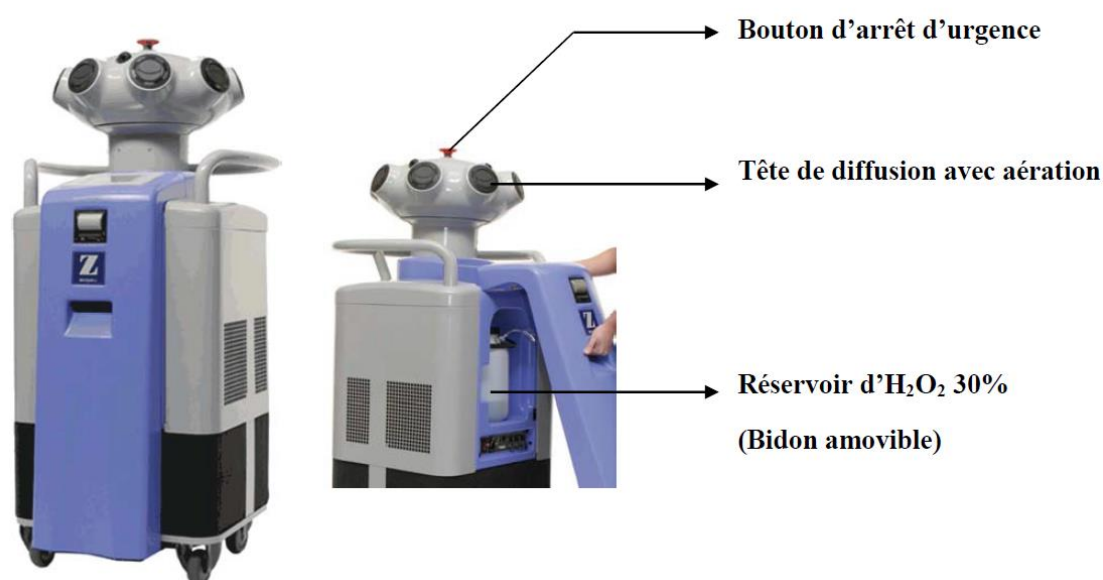


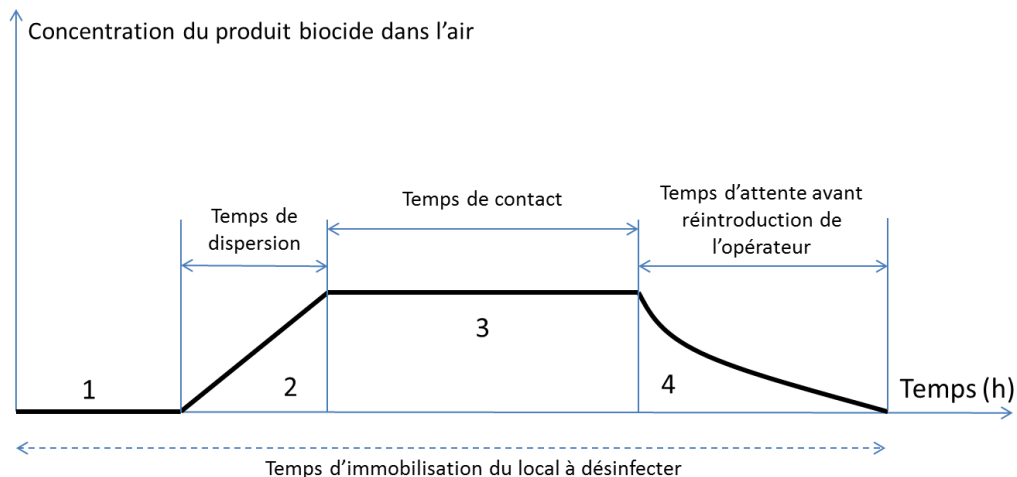
Figure 5 : Clarus Z

Préalablement à la décontamination par Clarus Z/H₂O₂, la zone à décontaminer est minutieusement préparée pour permettre la désinfection de toute la zone (cale des portes, arrêt des PSM, bouchage des compteurs de particules, ouverture des placards et tiroirs, etc) et la ventilation du local est arrêtée.

3.1.2 Cycle de l'appareil automatique

Le Clarus Z est paramétré, positionné puis il exécute son cycle complet sans l'intervention d'un opérateur. Le cycle de désinfection comprend (Voir Figure 6 : Phases d'un cycle de désinfection aérienne) :

- 1- Un **préconditionnement (5 à 10 min)** : Les conditions environnementales initiales du local sont définies de manière à avoir des paramètres optimaux. L'arrêt des Centrales de traitement de l'air (CTA) est effectué durant cette étape. Une montée en température du vaporiseur et une amorce de la pompe s'effectuent.
- 2- Une phase de **dispersion (30 à 70 min)** au cours de laquelle le biocide est diffusé de manière à atteindre toutes les surfaces de la zone. Le peroxyde d'hydrogène liquide est pompé jusqu'au vaporiseur, transformé en vapeur et soufflé au travers des petites buses dans la zone alentour. Il est ensuite distribué par un ventilateur à haute vitesse d'air dans la tête de l'unité.
- 3- Une phase de **contact (45 min)**, correspondant au temps nécessaire pour atteindre le niveau d'efficacité attendu. Lors de cette phase, la vapeur est promue partout dans la zone.
- 4- Une phase d'**aération (plusieurs heures)**, destinée à éliminer le produit résiduel et correspondant au temps d'attente avant la réintroduction de l'opérateur après la phase de contact. Durant cette phase, la vapeur circule au travers d'un filtre catalytique. Le peroxyde se dégrade en eau et oxygène, selon l'équation suivante : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.



Phases du cycle :

- 1 : préconditionnement (optionnel)
- 2 : diffusion
- 3 : phase de contact
- 4 : aération

Figure 6 : Phases d'un cycle de désinfection aérienne¹⁴

L'appareil diffuse le produit de manière à ce qu'il soit amené au contact de l'ensemble des surfaces cibles.

La répartition surfacique du produit est dépendante :

- Du volume à traiter et de la configuration spatiale plus ou moins encombrée de matériels
- Du lieu et débit de sortie du produit
- Du type de diffusion et du positionnement de l'appareil
- De la température et l'hygrométrie

Il peut être nécessaire d'ajouter des ventilateurs dans la zone afin de s'assurer de la bonne dispersion du produit dans tous les recoins. Les emplacements des ventilateurs doivent être déterminés très précisément et être toujours identiques aux emplacements utilisés lors de la validation de la désinfection aérienne de la zone.

Un protocole de validation est rédigé pour chaque zone car les différences d'agencement et de volume sont des paramètres importants car ils influencent la distribution de la vapeur d' H_2O_2 et donc les concentrations en H_2O_2 au niveau des surfaces à désinfecter. Le protocole décrit tous les paramètres de la DSA et notamment :

- Durée des 4 phases,
- Débit en H_2O_2
- Quantité totale d' H_2O_2 à injecter (par exemple pour une concentration finale à $18,5\text{g}/\text{m}^3$, si la zone fait 130m^3 il faudra $2400\text{ g d' } \text{H}_2\text{O}_2 \pm 120\text{g.}$)

3.2 Désinfection des surfaces par contact

La désinfection des surfaces par contact correspond à la désinfection des surfaces à l'aide de lingettes imprégnées de désinfectant (désinfectant pulvérisé ou lingette plongée dans du désinfectant puis essorée).

Ce type de désinfection est réalisé avant, pendant et après chaque manipulation de virus. Elle permet de protéger le produit des contaminations ainsi que les opérateurs. Une procédure de nettoyage décrit les principes du nettoyage et de la désinfection des locaux. Elle décrit le matériel (lingettes, détergents/désinfectants...) utilisé ainsi que les méthodes de nettoyage à appliquer. Elle définit l'organisation et la fréquence du nettoyage en fonction des zones et du statut des zones ainsi que la qualification du personnel réalisant le nettoyage nécessaire.

Cette procédure est accompagnée de consignes spécifiques à chaque zone (ex : « Nettoyage et désinfection dans la zone CQ », « Méthodes de nettoyage et désinfection en couloir OUT ») et spécifiques à chaque type de nettoyage (ex : « Mise à blanc en Contrôle Qualité »). Des enregistrements assurent la traçabilité du nettoyage et de la désinfection.

3.2.1 Nettoyage et balayage humides

3.2.1.1 Nettoyage humide

Les techniques d'essuyage sont utilisées dans la plupart des phases du nettoyage. L'essuyage fournit des résultats qui soutiennent la propreté intermédiaire et de précision des surfaces générales et critiques. Il convient d'humecter le tissu d'essuyage choisi avec la solution de nettoyage appropriée. La solution dépend du type de contaminant à éliminer. Il convient de toujours effectuer l'essuyage avec des passages dans un seul sens, se chevauchant, en commençant par les zones les plus critiques jusqu'aux zones les moins critiques, en suivant le sens du flux d'air unidirectionnel. Au fur et à mesure de l'essuyage, il convient de plier les tissus d'essuyage afin d'exposer une surface non utilisée. Il convient de remplacer le tissu d'essuyage aussi souvent que nécessaire pour éviter de transférer des contaminants vers d'autres parties des surfaces de la salle propre¹⁶.

La méthode de nettoyage des surfaces à la lingette sur le site industriel est la suivante :

- a. Préparation des lingettes pour surfaces et le détergent/désinfectant approprié,
- b. Pliage de la lingette en 4 et pulvérisation du détergent/désinfectant jusqu'à humidification totale,
- c. Application du détergent/désinfectant par technique de la godille sur les surfaces à nettoyer.
- d. Indication de la date et du désinfectant utilisé afin de vérifier que l'alternance des désinfectants est bien respectée

3.2.1.2 Balayage humide

Le balayage humide est une méthode efficace de nettoyage grossier ou intermédiaire pour éliminer la contamination. Le balayage humide peut également être utilisé pour éliminer les résidus de liquides renversés. Les tissus d'essuyage humide peuvent être utilisés dans des zones petites ou très localisées. Les balais humides sont utilisés pour les sols et les autres surfaces importantes. Il convient de remplir le seau à balai avec de l'eau propre filtrée, déminéralisée ou distillée, et de la changer fréquemment afin d'éviter la contamination. Plus la surface est critique, plus il convient de changer souvent l'eau. La coloration de l'eau indique qu'il convient de vider le seau, de le nettoyer et de le remplir pour le nettoyage en mode grossier. Il convient que les zones intermédiaires et critiques ne présentent que peu ou pas de coloration pendant toute l'utilisation spécifiée; il convient donc que les procédures de nettoyage de ces zones définissent la superficie maximale qu'il est admis de nettoyer avant de changer l'eau¹⁶. Des détergents non ioniques ou des tensioactifs peuvent être ajoutés, si nécessaire. Il convient que les balais humides soient bien essorés afin d'éviter les flaques. Un balai humide permettra d'avoir une surface humide, qui séchera plus rapidement. Il convient d'utiliser une méthode systématique, avec des passages se chevauchant, de manière à garantir un nettoyage complet des surfaces au sol.

La méthode de nettoyage des sols utilisée sur le site industriel est la suivante :

- a. Préparation des lingettes pour sols et le détergent/désinfectant approprié,
- b. Versement dans le seau dédié d'un volume adéquat avec la surface au sol à nettoyer,
- c. Trempage des lingettes dans le seau et essorage,
- d. Application du détergent/désinfectant par technique de la godille sur les sols, soit à l'aide d'un balai trapèze, soit manuellement en prenant soin de plier la lingette en 4.

3.2.1.3 Méthode de la godille

L'opérateur travaille à reculons avec le balai placé devant lui. La première étape consiste à faire le contour de la pièce, à reculons, balai placé devant, on parle de détourage.

L'opérateur revient ensuite dans le coin le plus éloigné de la porte d'entrée et il effectue des mouvements en « 8 » avec le balai tout en se déplaçant dans la pièce comme indiqué dans la Figure 7: Méthode de la godille illustrée.

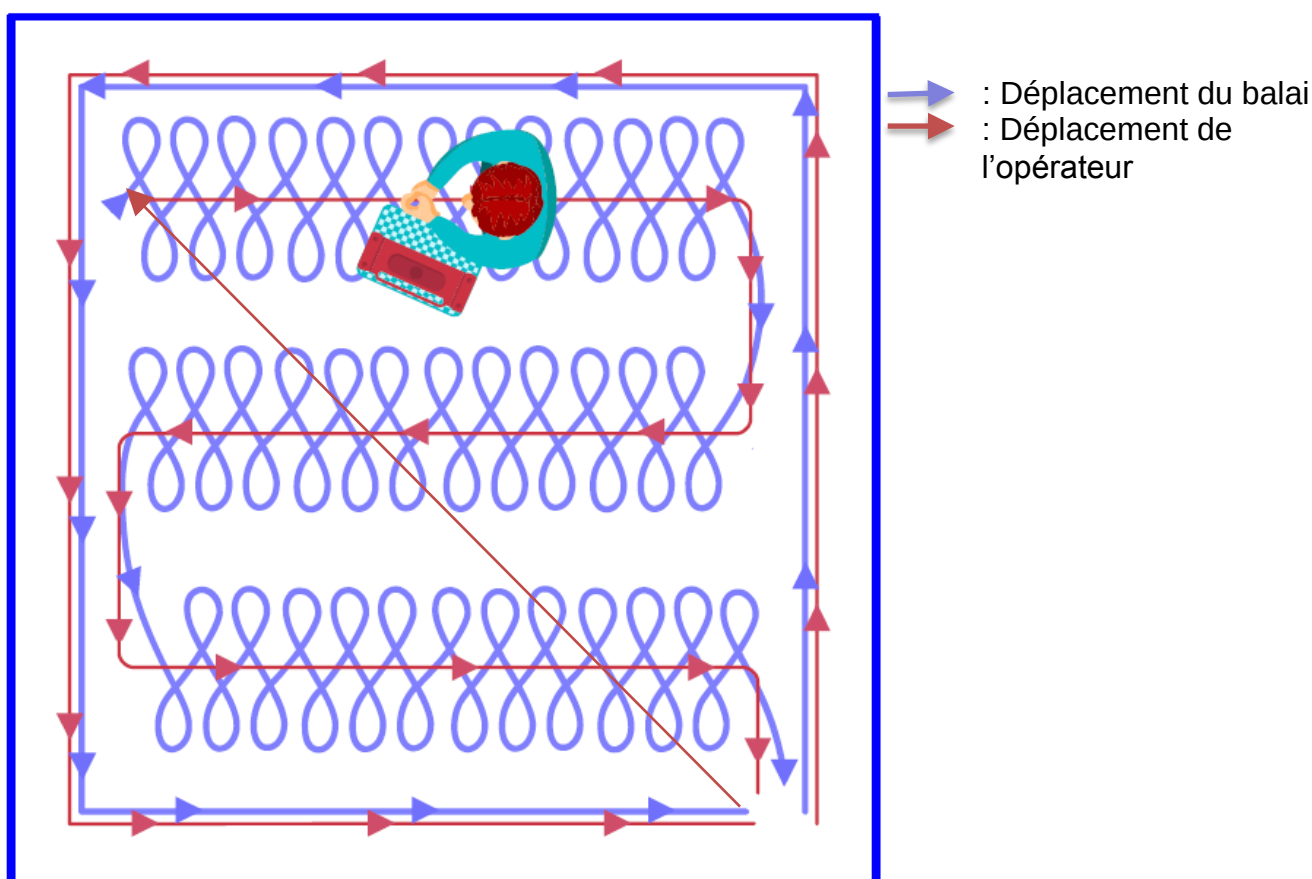


Figure 7: Méthode de la godille illustrée ¹⁷

Le balai ne doit jamais être soulevé et le balai ne doit pas effectuer de marche arrière en cours d'utilisation.

3.2.1.4 Méthode au poussé

Une autre méthode peut être utilisée à la place de la méthode de la godille. Il s'agit de la méthode au poussé (voir Figure 8 : Méthode au poussé illustrée). Cette méthode ne sera pas utilisée pour le nettoyage des sols en zone car l'opérateur marche derrière ce que le balai à nettoyer. Cependant cette technique peut être adapté pour un nettoyage des surfaces à la main.

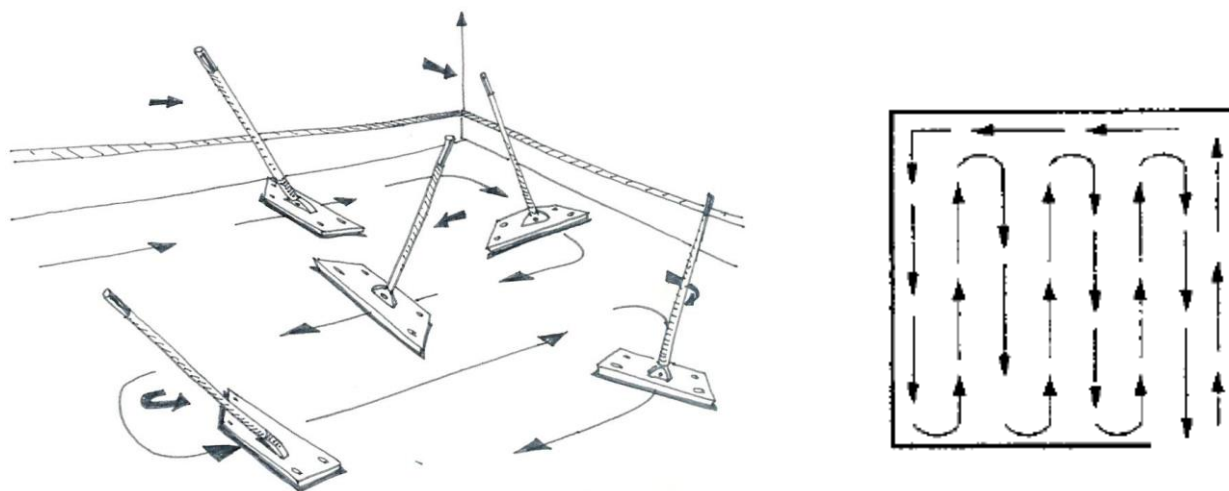


Figure 8 : Méthode au poussé illustrée ¹⁸

4. Désinfection des effluents liquides

Dans le but de protéger la santé humaine et l'environnement, tous les déchets biologiques provenant des industries doivent être décontaminés avant d'être rejetés. Cela inclut les déchets solides et les déchets liquides. Sur le site industriel pris en exemple, les déchets solides et les déchets liquides contenus dans des récipients (<1L) sont mis dans des futs plastiques pour les déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI) qui sont ensuite autoclavés et éliminés comme déchets biologiques par une filière spécialisée.

Les déchets liquides en gros volumes doivent être également décontaminés par un système de décontamination des effluents avant le rejet dans les égouts. Les déchets liquides ont plusieurs origines, les douches, les éviers, le nettoyage en place, les bioréacteurs...Ce système de décontamination doit assurer une inactivation de tous les microorganismes car il s'agit de la dernière étape avant le rejet dans l'environnement. Il peut s'agir d'un système de décontamination thermique, chimique ou thermique et chimique. Il doit être validé.

La validation de l'efficacité du désinfectant utilisé dans le kill tank dans les conditions réelles d'utilisation permet d'assurer l'innocuité des liquides rejetés dans le réseau urbain.

4.1 Méthodes de décontamination des effluents¹⁹

Les effluents liquides potentiellement contaminés peuvent être traités de différentes façons : par un système chimique, par un système thermique, par un système combinant les deux. La pression peut également être combinée à ces systèmes pour accroître l'efficacité.

4.1.1 Traitement chimique

Les agents oxydants tels que l'hypochlorite de sodium, NaOCl (composant de l'eau de Javel) ou l'acide peracétique sont généralement utilisés car ils ont un large spectre d'activité. L'agent chimique d'une concentration connue est mélangé avec un ratio déterminé directement dans la cuve des effluents pendant un temps de contact défini. Certains systèmes permettent un chauffage de la cuve si nécessaire.

Avantages : Ce type de désinfection est simple à mettre en œuvre et requiert des équipements assez peu coûteux.

Inconvénients :

- Nécessité de l'utilisation de matériaux résistants notamment à la corrosion
- Nécessité d'un mélange adéquat
- Il ne faut pas de résidus de biocides avant relargage dans le système des égouts
- Les produits de réaction entre les déchets et le biocide doivent pouvoir être relargués dans les égouts sans danger
- Risque de précipitation
- Nécessité de vérifier l'adéquation de la suspension à relarguer dans les égouts en termes de pH, température, composition en métaux, composés chimiques, matières en suspension, composés huileux...
- Risque de fuite et de relargage de vapeurs chimiques dangereuses dans l'air de travail ou l'environnement
- Nécessité de manutention de solutions concentrées de désinfectants chimiques

4.1.2 Traitement thermique

Une combinaison de la température et de la pression est généralement nécessaire pour s'assurer que tous les agents biologiques seront détruits. La température utilisée est généralement de l'ordre de 121-134°C.

Avantage :

- Moins de risque de précipitation

Inconvénients :

- Forte consommation d'énergie
- Augmentation du risque de corrosion de la cuve

4.1.3 Traitement chimique et thermique

Avantages :

- Pas de pression requise
- Températures à atteindre moins importante, moins d'énergie
- Possibilité de choisir le mode de désinfection

Inconvénients :

- Nécessité de déterminer la combinaison température/désinfectant appropriée
- Inconvénients des traitements chimiques

4.1.4 Choix de la méthode de traitement des effluents

Afin de choisir le système de décontamination des effluents, il faut déterminer la nature et la quantité des effluents qui seront rejetés en période normale d'activité. Il faudra également considérer les sources de contamination inhabituelles qui pourraient survenir, par exemple suite à des fuites, à des erreurs humaines ...

Il existe principalement deux façons de traiter les effluents liquides : traitement par «lot » (batch en anglais) ou traitement en continu.

Le traitement en continu est applicable pour le traitement thermique des effluents. Il s'agit d'un système à flux continu basé sur la température. Il s'agit d'une série d'échangeurs chauffants et refroidissants. Ce système permet une distribution uniforme de la température dans une zone compacte et donc assure une efficacité et fiabilité plus grande. Ce système est plus adapté pour les structures rejetant de grandes quantités d'effluents liquides. On peut trouver des systèmes qui traitent 2-300L/h et jusqu'à 10000L/h. Pour le traitement de grands volumes d'effluents, les systèmes continus sont meilleurs car leur capacité peut être augmentée par augmentation de la surface d'échanges, le débit et la taille des instruments.

La validation peut être réalisée en « spikant » le système (ajout de quantités connues de microorganismes) et en prenant des échantillons à la sortie (pour déterminer les quantités de microorganismes restantes).

Dans le cas du traitement par « lot », les effluents sont collectés puis, une fois un temps déterminé ou un niveau de la cuve atteint, le traitement des effluents est effectué et le contenu de la cuve est rejeté dans le système de traitements des eaux usées de la ville. Le traitement par « batch » est applicable pour les traitements chimiques et pour les traitements thermiques.

La taille de la cuve doit correspondre au volume journalier maximum possible d'effluents. Cela varie souvent entre 1200 et 3000L. Il est nécessaire de mettre en place des systèmes de récupération ou au moins des systèmes qui évitent la dispersion des liquides en cas de fuites de la cuve. Le système par batch est plutôt recommandé pour les petites entreprises, qui ont des volumes peu importants à traiter. De plus, si des solides peuvent être présents en suspension dans les liquides (par exemple précipités), ce système sera plus adapté.

Etapes du traitement par lot :

La première étape consiste à remplir la cuve de stockage avec les effluents soit par gravité, les effluents coulent jusqu'à la cuve soit à l'aide pompes. Lorsque les effluents atteignent un certain niveau dans la cuve, une alarme informe qu'il faut procéder au traitement. Il est également possible de procéder au traitement sans attendre d'avoir rempli la cuve. Les valves d'admission sont alors fermées et une cuve de stockage prend le relais. Si cette cuve est de taille réduite, il peut être nécessaire d'avertir le personnel de limiter les rejets durant cette période.

Pour un traitement chimique, un volume défini de biocide (de concentration connue) est injecté manuellement ou à l'aide d'une pompe. Pour un traitement thermique, le contenu de la cuve est chauffé (à l'aide serpentins chauffant ou à l'aide d'une

enveloppe chauffante (la vapeur est injectée entre la coque intérieure et la coque extérieure de la cuve)), ou par injection de vapeur.

Une pompe de recirculation mélange le contenu de la cuve, permettant de mettre le biocide en contact avec l'intégralité du contenu de la cuve (traitement chimique), d'éviter les points froids (traitement thermique) et permet d'éviter l'accumulation de solide dans le fond de la cuve.

Dans le cas d'un traitement thermique, une phase de refroidissement est requise avant le rejet dans les égouts.

Une fois que le traitement est terminé, un échantillonnage est réalisé et plusieurs paramètres sont contrôlés (comme par exemple le pH ou l'absence de microorganismes viables). Si les paramètres sont conformes le rejet dans les égouts peut être effectué.

Il peut être très contraignant d'attendre les résultats microbiologiques, surtout dans les cas où il n'existe qu'une seule cuve de traitement des effluents liquides. Dans ces cas-là, une validation approfondie et bien menée ainsi qu'un monitoring des opérations de décontamination doivent être effectués pour permettre le rejet avant l'obtention des résultats définitifs.

4.1.5 Risques potentiels associés aux systèmes de décontamination des effluents liquides

- Risque de débordement
- Risque de reflux vers les laboratoires en cas de valves défectueuses ou de systèmes non adaptés
- Risque de problème du système de chauffage ou d'injection de désinfectant, entraînant une libération dans l'environnement d'effluents non traités
- Risque de zone non exposée à la chaleur ou au désinfectant
- Décontamination insuffisante
- Risque d'exposition du personnel de maintenance en cas de matériel dégradés (corrosion, valves défectueuses...)
- Risque de brûlures en cas de rejet accidentel durant un cycle
- Exposition aux agents chimiques

Afin de limiter ces risques les systèmes de décontamination des effluents doivent être validés, contrôlés et monitorés. Le personnel doit être formé à l'utilisation, à la maintenance et aux conduites à tenir en cas de problèmes (par exemple fuites).

Ces systèmes sont de préférence placés en dessous des zones qui rejettent les effluents, permettant ainsi aux liquides de descendre par gravité et donc éviter l'utilisation de pompes.

4.1.6 Cas concret

Le « kill tank » présent sur le site est une cuve de récupération des effluents liquides qui peut contenir jusqu'à 1000L. Dans cette cuve sont rejetés les liquides provenant des zones de production. Ils peuvent donc contenir des virus.

Le principe de la cuve est le suivant :

Une fois la cuve pleine, un désinfectant est injecté dans la cuve. Le cycle de désinfection comprend des phases de mélange à l'aide d'une pompe de recirculation qui brasse le contenu de la cuve pendant environ 45 minutes. Une fois le cycle terminé, le contenu de la cuve est déversé dans le réseau urbain par l'intermédiaire d'un puisard.

Le désinfectant précédemment utilisé sur le site industriel était le Vet anios QG. C'est un désinfectant dont les principes actifs antimicrobiens sont le glutaraldéhyde (10,00%) et le chlorure d'alkyl C12-16 diméthylbenzylammonium (34,06%).

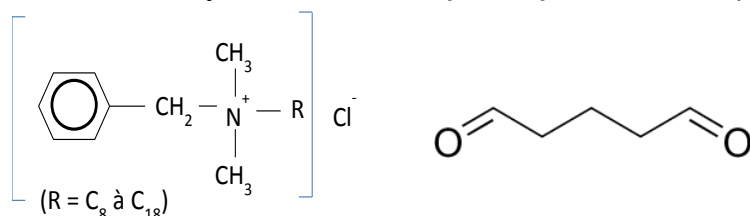


Figure 9 : Formules semi-développées du chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium et glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est un irritant respiratoire et un sensibilisant cutané. Il tend à être remplacé par l'acide peracétique afin de diminuer le risque pour le personnel et pour l'environnement.

De plus le Vet anios QG est un « désinfectant pour sols, surfaces, matériels et instruments pour élevage ». Les virus testés sont donc des virus animaux et ne correspondent pas aux types de virus qui sont manipulés sur le site.

Afin de remplacer le Vet anios QG, le Vet anios C50 a été initialement proposé. Il s'agit d'un « désinfectant pour les sols, surfaces, matériels et équipements pour élevage ». Il se présente sous la forme d'une poudre et est à base de percarbonate de sodium, de tétraacétyléthylènediamine et de chlorure de N-alkyl(C12-14)-N-benzylN,N-diméthylammonium.

En ce dissociant dans l'eau le percarbonate donne du peroxyde d'hydrogène selon l'équation ci-dessous :

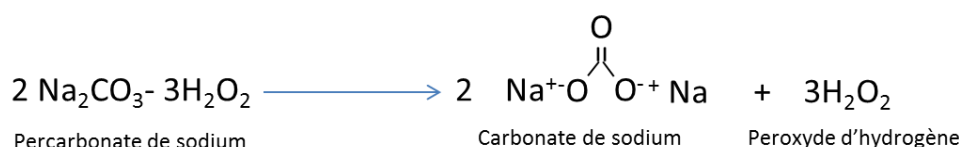


Figure 10: Formule de la dissociation du percarbonate de sodium

Le tétraacétyléthylènediamine donne en présence de peroxyde d'hydrogène, de l'acide peracétique selon la réaction suivante :

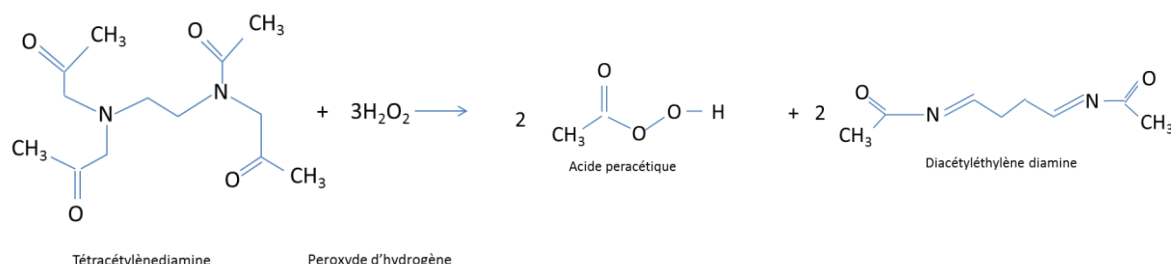


Figure 11: Réaction entre le tétraacétylènediamine et le peroxyde d'hydrogène

Une fois la solution de Vetanios C50 reconstituée, elle contient de l'acide peracétique et du peroxyde d'hydrogène, responsable de l'action désinfectante.

Le Vetanios C50 étant une poudre, il entraîne des contraintes (et des risques) de manipulation pour le personnel, l'Oxyaniolyse 9000 a été proposé pour remplacer le Vetanios QG. Ses avantages sont les suivants (Voir Annexe VI : comparaison des désinfectants) :

- Diminution du risque environnemental et personnel par rapport au Vetanios QG
- Stabilité : 18 mois
- Moins de manutention que le Vetanios C50 : Sécurité du personnel
- Efficacité prouvée vis-à-vis de virus humains (selon la norme EN 14476)¹³.

Le principe actif antimicrobien de ce désinfectant est l'acide peracétique (1% p/p ; 0,96 mL pour 100 mL). Ce désinfectant contient également du peroxyde d'hydrogène et de l'acide acétique. En effet, l'acide peracétique n'existe pratiquement pas à l'état pur, il se présente en solution aqueuse en mélange avec l'acide acétique et le peroxyde d'hydrogène conformément à la réaction d'équilibre suivante :

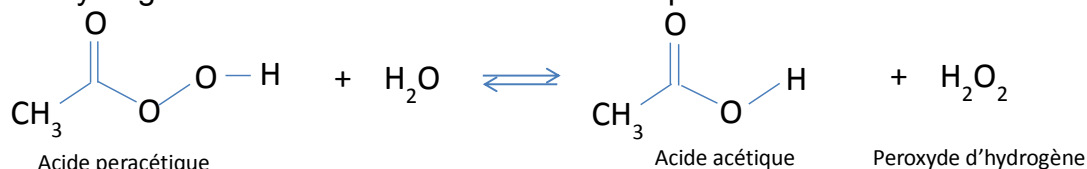


Figure 12: Réaction d'équilibre en l'acide peracétique et l'acide acétique

II. Validation de désinfections

Une fois que la procédure de nettoyage est établie et que les produits et matériels sont définis, il est possible de procéder à la validation du procédé de nettoyage.

« Valider un procédé de nettoyage, c'est démontrer de manière scientifique et documentée, que les différentes étapes de ce procédé permettent d'obtenir dans des conditions préétablies une surface ne comportant pas de contamination résiduelle supérieure à une limite préalablement fixée, ceci de manière reproductible »²⁰.

Les Bonnes pratiques de fabrication (BPF) indiquent que « s'agissant des procédures de nettoyages applicables à des produits et des procédés similaires, la sélection d'une gamme représentative de produits et de procédés similaires est jugée acceptable. Une seule étude de validation, peut être réalisée en se fondant sur la méthode du pire cas qui tient compte des points critiques.

Généralement, la mise en œuvre de la procédure de nettoyage à trois reprises consécutives et donnant un résultat favorable est nécessaire pour prouver la validité de la méthode»²¹.

« Lorsqu'aucun changement important n'est intervenu au niveau du statut validé, un examen attestant que les installations, systèmes, équipements et procédés satisfont aux exigences prescrites tient lieu de revalidation.»²².

Cette méthodologie de validation sera retenue pour les validations effectuées.

Des méthodes analytiques validées dont la sensibilité permet la détection des résidus ou contaminants doivent être utilisées. La limite de détection (LOD) de chaque méthode analytique doit être suffisamment basse pour permettre de détecter le niveau de résidu ou de contaminant acceptable défini.

Concernant la validation de la désinfection des surfaces par contact, la méthode des porte-germes est utilisée c'est-à-dire l'utilisation de coupons représentatifs des surfaces à désinfecter (Inox : PSM ; PVC : Revêtement du sol) sur lesquels du virus a été déposé. Une réduction de la charge virale d'au moins 4 log CCID₅₀ doit être observée pour valider la désinfection.

1. Matériel et méthodes

1.1 Méthodes de titrage

1.1.1 Généralités

Afin de mesurer l'efficacité virucide des désinfectants, il est nécessaire de connaître le titre de la suspension virale de départ utilisée et de mesurer après la phase de contact avec le désinfectant, le titre de la suspension.

La différence calculée est appelée la réduction logarithmique de la charge virale. Les virus utilisés sont des virus cultivables sur cellules.

Le titre des suspensions virales est mesuré par titrage par effet cytopathique (ou cytopathogène).

Le titrage est réalisé par infection de cellules permissives au virus par des dilutions successives de la suspension de départ. Après un temps d'incubation défini (en fonction du type cellulaire et du virus), une lecture des tapis cellulaires est effectuée. L'infection virale est détectée par observation d'effets cytopathogènes (plages de lyse) au microscope. Le titre viral est ensuite calculé à partir de la dilution limite où 50% des puits sont positifs à l'aide de la méthode statistique de Reed-Muench ou de Spearman Karber. L'unité utilisée pour les titres viraux est le CCID₅₀/mL (avec l'indication de la méthode de calculs).

1.1.2 Préparation du titrage

1.1.2.1 Préparation de la suspension cellulaire

La première étape consiste à préparer une suspension cellulaire de densité définie, pour inoculer les plaques de titrages.

Les cellules utilisées sont toutes des cellules adhérentes. Dans un premier temps, la flasque est observée au microscope. Il s'agit de vérifier que les cellules sont bien adhérentes et évaluer leur confluence. Le milieu est également observé. Il contient un indicateur coloré, si le milieu a changé de couleur, le terme de milieu

« conditionné » est utilisé et cela indique une acidification du milieu de culture, elle peut être due à un temps entre deux passages trop long ou à une contamination.

Il faut éliminer le milieu contenu dans les flasques et rincer avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) en prenant garde à ne pas verser le PBS sur le tapis cellulaire pour ne pas l'endommager. Le PBS permet l'élimination des protéines, qui neutraliseraient l'action de la trypsine.

Pour détacher les cellules de la flasque, de la trypsine/EDTA est déposée sur le tapis cellulaire et les flasques sont placées dans un incubateur pendant un temps défini en fonction du type cellulaire. L'EDTA est un chélateur des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Cela va permettre de rompre les liaisons Ca^{2+} et Mg^{2+} dépendantes au niveau des interactions cellules substrat. La trypsine est une protéase, active à 37°C, qui clive les protéines membranaires d'adhésion. Cela permet de remettre en suspension les cellules. Cette action est réversible. Une fois que les cellules sont décollées de la flasque, du milieu est ajouté, cela va détourner l'action de la trypsine sur les protéines contenues dans le sérum du milieu de culture et permet d'arrêter l'action de la trypsine sur les cellules qui pourraient être endommagées.

Le milieu de la flasque contenant les cellules mises en suspension est récupéré et on procède à une numération sur cellules de Malassez.

A partir de cette numération la quantité de suspension cellulaire et la quantité de milieu à ajouter pour obtenir la suspension cellulaire de densité voulue sont définies.

100 μL de cette suspension cellulaire sont déposés dans chaque puits de plaques 96 puits à fond plat.

1.1.3 Infections virales

La deuxième étape est l'infection virale. Il faut attendre quelques heures avant de procéder à l'infection virale afin de laisser le temps aux cellules d'adhérer aux puits. Avant infection, une confluence de 60 à 80 % doit être observée (conditions favorables à la multiplication du virus).

Des dilutions sérielles des échantillons sont effectuées : au dixième ou au tiers.

Pour cela, des plaques 96 puits à fond profond sont utilisées (Plaque du haut sur la figure 13) dans lesquelles du milieu de dilution a été déposé. L'échantillon est vortexé et déposé dans les puits de la ligne A. A l'aide d'une pipette multicanaux, le contenu des puits est homogénéisé par aspiration-refoulement. Un volume défini du contenu des puits A est déposé dans les puits B. Le contenu des puits est homogénéisé et un volume défini est déposé dans les puits C et ainsi de suite jusqu'à la dernière ligne, des dilutions sérielles sont ainsi obtenues.

Il faut ensuite déposer le contenu de ces plaques sur les plaques 96 puits contenant les cellules (Plaque du bas sur la figure 13). 1 colonne de plaque à fond profond est déposée sur 5 colonnes de plaque 96 puits classique. Les colonnes 1 et 12 des plaques contenant les cellules sont les contrôles négatifs, du milieu de dilution y est déposé. Ils sont placés en bord de plaque afin de limiter les effets de bords pour les échantillons.

Par plaque, 2 échantillons sont déposés, 5 fois par dilution. Le titrage des échantillons est effectué sur plusieurs réplicats d'échantillons (par exemple plusieurs tubes d'une même suspension) et les réplicats sont déposés sur des plaques différentes.

Un contrôle interne est systématiquement ajouté à la série de titrage. Il est déposé de la même manière que les échantillons (5 fois la même dilution) en triplicats sur 3 plaques différentes.

Les plaques 96 puits sont ensuite mises à incuber à une température et pendant un temps défini (en fonction du virus et des cellules).

1.1.4 Lecture des puits des plaques

Après le temps d'incubation défini, la lecture des effets cytopathogènes dans les puits est réalisée. Dans un premier temps une vérification de l'absence d'effets cytopathogènes dans les puits des contrôles négatifs est effectuée. Dans un deuxième temps, l'ensemble des 5 puits par ligne correspondant à l'échantillon sont observés au microscope. Le nombre de puits comportant des effets cytopathogènes (« puits positifs ») est compté.

Un fichier Excel a été créé durant ce stage pour faciliter le calcul des titres et limiter le risque d'erreur. Il est présenté en Annexe I.

Ce fichier comporte 4 onglets. Le premier appelé « Preparation and reading » permet la préparation du plan des plaques pour le titrage. Il est imprimé par l'opérateur le jour du début de l'essai et il est utilisé le jour de la lecture pour noter les lectures des puits. Celles-ci sont ensuite rentrées dans l'onglet 1 du fichier Excel. L'onglet 2 permet le calcul automatique des titres viraux en utilisant les méthodes de Reed Muench ou de Spearman Karber. Les tableaux croisés dynamiques des onglets 3 et 4 permettent ensuite la synthèse des résultats et permettent de vérifier la validité du titrage de l'échantillon.

Au cours de cette validation de la désinfection, les plaques de cellules ont été préparées quelques heures avant la réalisation des protocoles de validation à proprement parler. Cela permet de laisser le temps aux cellules d'adhérer aux puits. Avant infection, on doit observer une confluence de 60 à 80 %.

Deux types de titrages peuvent être réalisés : titrage fort ou titrage faible. Le titrage fort est réalisé pour les titres supposés supérieurs à 4 log CCID₅₀/mL et le titrage faible pour les suspensions dont le titre est estimé inférieur à 3 log CCID₅₀/mL.

Le titrage fort correspond au dépôt de 900µL de milieu de dilution dans les lignes A à H d'une plaque 96 puits à fond profond. 100 µL de la suspension à titrer sont déposés dans la ligne A. A l'aide d'une pipette multicanaux, le contenu des puits de ligne A est homogénéisé par aspiration-refoulement (2 fois). On dépose ensuite un volume de 100µL du contenu des puits A dans les puits B et ainsi de suite jusqu'à la dernière ligne. On parle de dilutions sérielles au dixième. Il est possible de réaliser une prédilution si le titre est supposé très fort.

Le titrage faible correspond au dépôt de 900µL de milieu de dilution dans les lignes A à H d'une plaque 96 puits à fond profond. Ce n'est plus 100 µL mais 450 µL de la suspension à titrer qui sont déposés dans les puits de la ligne A et ensuite lors des

dilutions sérielles. On parle de dilutions sérielles au tiers. Dans le cas où le titre attendu est très faible, la ligne A n'est pas remplie avec du milieu de dilution et la suspension virale est déposée pure dans la ligne A.

Il faut ensuite déposer le contenu de ces plaques sur les plaques 96 puits contenant les cellules. 1 colonne de plaques à fond profond est déposée sur 5 colonnes de plaques 96 puits classiques (100µL/puits). Les colonnes 1 et 12 des plaques contenant les cellules sont les contrôles négatifs, dans lequel du milieu de dilution a été déposé.

Par plaque, on a donc 2 échantillons déposés en 5 réplicats et 2 contrôles négatifs, placés en bord de plaque afin de limiter les effets de bords pour les échantillons.

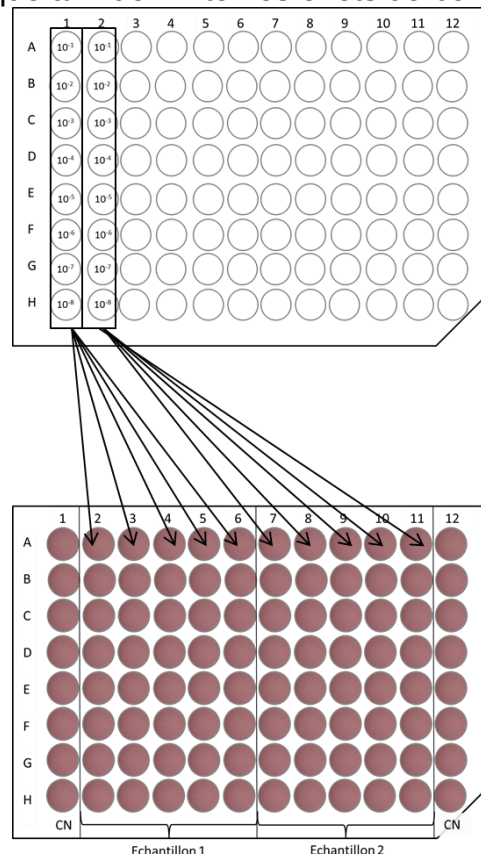


Figure 13 : Exemple de distribution du contenu des plaques à puits à fond profond sur les plaques 96 puits.

(En haut : plaque 96 puits à fond profond, en bas : plaque 96 puits ; CN : Contrôle négatif).

Chaque suspension à titrer est déposée en triplicats (le dépôt de 5 réplicats de chaque dilution est répété 3 fois). Les triplicats doivent être placés sur trois plaques différentes.

1.1.5 Lecture des plaques

La lecture des plaques se fait au microscope (grossissement x100) par un opérateur formé à la lecture du couple cellule/virus.

Dès qu'un effet cytopathogène est observé, le puits est dit « positif ». Le nombre de puits positifs par échantillon et par ligne est comptabilisé (nombre de puits positifs maximal = 5).

1.1.6 Critères de Validité

Les puits de contrôle négatif ne doivent pas présenter de puits positifs sinon cela signifie qu'ils ont été contaminés et l'essai est invalidé.

Chaque série de titrage comporte un contrôle interne, de titre connu, déposé en triplicats sur 3 plaques différentes et titré selon la méthode du titrage fort. La différence maximale entre les 3 valeurs des réplicats du contrôle interne doit être inférieure à 0,5 log CCID₅₀/mL et la valeur moyenne des réplicats doit se situer dans les limites de la carte de contrôle, sinon l'essai est invalidé.

Le titrage des échantillons est effectué sur plusieurs réplicats d'échantillons (par exemple plusieurs tubes d'une même suspension). On mesure ensuite l'écart entre la valeur maximale et la valeur minimale du titre obtenu. Si cet écart est supérieur à 0,5 log CCID₅₀/mL, le titrage n'est pas valide.

Si la ligne A (la plus concentrée) ne présente pas de puits positifs alors le titre est dit <LOD (limite de détection). Si elle présente moins de 50% de puits positifs, le titre est dit <LOC (Limite de calcul). Si une pré-dilution avait été effectuée, il est nécessaire de re-titrer sans prédilution.

Si la ligne H (la moins concentrée) présente des puits positifs, le titre est dit >LDE (Limite de détermination). Il est nécessaire de refaire le titrage, soit en modifiant le type de dilution sérielle (passer d'un titrage faible à un titrage fort) ou bien réaliser une prédilution.

1.1.7 Méthodes statistiques de calculs des titres

1.1.7.1 Généralités

Les méthodes statistiques permettent de connaître la dilution limite où 50% des puits sont positifs lorsque les résultats des manipulations ne permettent pas de l'obtenir directement, ce qui est très souvent le cas. En effet la probabilité de trouver directement la dilution où 50 % des puits sont positifs est très faible. On a donc systématiquement recours à ces méthodes pour connaître le titre de la suspension virale.

1.1.7.2 Méthode statistique de Reed-Muench

1.1.7.2.1 Principes

La méthode de Reed Muench permet de connaître la dilution limite où 50% des puits sont positifs et est donc utilisée pour connaître le titre des suspensions virales.

La méthode a été décrite dans l'article écrit par L. J. Reed et H. Muench et publié dans « The American Journal of Hygiene » en 1938²⁴.

Etant donné qu'il s'agit de suspensions virales, il sera considéré que plus la suspension est concentrée (donc moins elle est diluée) plus il y a de virus dans la suspension et donc plus il y a de puits positifs.

Il est aussi considéré que si un puits est positif à une dilution donnée alors il serait/aurait été positif à une dilution inférieure (concentration plus élevée de virus) et que si un puits est négatif à une dilution donnée alors il serait négatif à une dilution supérieure (concentration moins élevée de virus).

C'est la raison pour laquelle les pourcentages de puits positifs considérés dans les formules sont des pourcentages obtenus à partir du nombre cumulé de puits positifs (en additionnant à partir de la ligne la plus diluée : H jusqu'à la dilution considérée) et à partir du nombre cumulé de puits négatifs (en additionnant à partir de la ligne la plus diluée A jusqu'à la dilution considérée). Un exemple de calculs de pourcentages de puits positifs est donné dans le tableau suivant.

Tableau VI : Exemple de calculs de pourcentages

Ligne (dilution)	A	B	C	D	E	F	G	H
Dilution	1e-01	1e-02	1e-03	1e-04	1e-05	1e-06	1e-07	1e-08
Lecture de la dilution (puits positifs)	5	5	5	3	0	1	0	0
Nombre de puits négatifs	0	0	0	2	5	4	5	5
Nombre cumulé de puits positifs pour les dilutions $\geq$ à la dilution donnée ($N_{cum\ pos}$)	19	14	9*	4	1	1	0	0
Nombre cumulé de puits négatifs pour les dilutions $\leq$ à la dilution donnée ($N_{cum\ neg}$)	0	0	0	2	7	11	16	21
% puits positifs ($N_{cum\ pos} / N_{cum\ pos+neg}$)	100,0 0	100,0 0	100,0 0	66,67	12,50	8,33	0,00	0,00

* : Puits positifs en H + Puits positifs en G + Puits positifs en F + Puits positifs en E + Puits positifs en D + Puits positifs en C = 0+0+0+1+0+3+5 = 9

Cette méthode n'est plus recommandée (FDA, WHO...). En 1978, Finney écrit à propos de la méthode Reed-Muench "They 'ought never to be used' because their tests were not valid and less efficient than other simple methods. They should be forgotten, 'except as part of statistical history'".²³

1.1.7.3 Calculs des titres viraux

Les titres viraux sont calculés en utilisant la méthode statistique de Reed-Muench (WHO 1973)²⁵ et exprimés en log CCID₅₀/mL selon les formules suivantes :

Titre viral = - log (première dilution virale donnant moins de 50% de puits positifs) -
Facteur de correction + log (10) + log (raison de la prédilution)

Avec :

Log (10) : correspond à la conversion du résultat obtenu sur les 100 µL placés dans la plaque en mL.

Raison de prédilution : par exemple 100 pour une prédilution au centième.

Raison de dilution sérielle : 10 pour le titrage fort, 3 pour le titrage faible.

$$\text{Facteur de correction} = \frac{50 - (\% \text{ puits positifs en dessous de } 50\%)}{(\% \text{ puits positifs au-dessus de } 50\%) - (\% \text{ puits positifs en dessous de } 50\%)} \times \log (\text{raison de dilution sérielle})$$

Pour calculer les différents pourcentages, il est nécessaire de réaliser les calculs préliminaires suivants :

- Pour chaque dilution (A à H), calculer le nombre de puits négatifs,
- Pour les puits positifs, calculer pour chaque dilution le nombre cumulé de puits positifs en partant de la dilution la moins concentrée (ligne H) ($N_{\text{cum pos}}$)
- Pour les puits négatifs, calculer pour chaque dilution le nombre cumulé de puits négatifs en partant de la dilution la plus concentrée (ligne A) ($N_{\text{cum neg}}$)
- Pour chaque dilution, calculer le pourcentage de puits positifs selon la formule suivante : nombre cumulé de puits positifs par rapport à la somme des puits positifs et négatifs cumulés ($N_{\text{cum pos}} / N_{\text{cum pos+neg}}$)

Exemple de calculs utilisant les données du Tableau VI : Exemple de calculs de pourcentages : échantillon sans prédilution et titrage fort (dilution sérielle au dixième)

- Le pourcentage de puits positifs en-dessous de 50% (% puits positifs en-dessous de 50%) correspond à la valeur du premier pourcentage de puits positifs en dessous de 50%. Exemple = 12,5%.
- Le pourcentage de puits positifs au-dessus de 50% (% puits positifs au-dessus de 50%) correspond à la valeur du premier pourcentage au-dessus de 50. Exemple = 66,67%
- La première dilution virale donnant moins de 50% de puits positifs est la valeur de la première dilution qui permet d'obtenir un « % puits positifs en dessous de 50% ». Exemple : La valeur correspond à la dilution qui donnait 12,5% de puits positifs = 10^{-5}

Facteur de correction = $(50-12,5)/(66,67-12,5) \times \log_{10}(10) = 0,69$

Titre viral = $-\log_{10}(10^{-5}) - 0,69 + \log_{10}(10) = 5,31 \text{ log CCID}_{50}/\text{mL}$

1.1.8 Méthode statistique de Spearman Karber

1.1.8.1 Principes

La méthode a été proposée par Spearman en 1908 et indépendamment réintroduite par Karber en 1931. Cette méthode est facile d'utilisation et est donc très utilisée. Elle est dite supérieure aux autres méthodes simples d'utilisation, notamment à celle de Reed Muench. Les inexactitudes dues à la méthode d'estimation sont moins importantes avec la méthode Spearman Karber qu'avec les autres méthodes comparables²⁵.

Lorsqu'il est question de produits avec des courbes dose-réponses symétriques, la valeur calculée avec la formule de Spearman Karber est la dilution qui causerait une réponse positive chez exactement 50% des animaux avec un nombre d'animaux très important.

La courbe dose-réponse de suspensions virales est connue pour avoir un certain degré d'assymétrie. C'est pourquoi la dilution limite des suspensions virales calculées avec la méthode de Spearman Karber est la dilution qui causerait une réponse positive de 43 % des animaux. L'OMS dit dans les annexes de la monographie 23, que « toutefois cette valeur est aussi appropriée pour mesurer l'infektivité de la suspension virale que ne l'est la dilution limite 50%²⁵. »

1.1.8.2 Calculs des titres viraux

Les titres viraux sont calculés en utilisant la méthode statistique de Spearman-Karber (WHO 1973²⁵) et exprimés en log CCID₅₀/volume déposé dans puits selon les formules suivantes (WHO) :

$$\text{Titre viral} = x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i$$

Avec :

“ x_0 : log₁₀ of the reciprocal of the lowest dilution at which all animals are positive

d : log₁₀ of the dilution factor

n_i : number of animal use at each individual dilution (after discounting accidental deaths)

r_i : number of positive animals

Summation is started at dilution x_0 ”

Appliquée aux titrages réalisés pour la validation de la désinfection on obtient la formule suivante :

$$\text{Titre viral (log CCID}_{50}\text{/mL)} = (3 - \log_{10} (\text{Volume/puits en microlitres})) + x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i$$

$$\text{Titre viral (log CCID}_{50}\text{/mL)} = (3 - \log_{10} (\text{Volume/puits en microlitres})) + (-\log_{10} (\text{dilution la plus importante où tous les puits sont positifs}) - [\log_{10} (\text{facteur de dilution sérielle}) / 2] + [\log_{10} (\text{facteur de dilution sérielle})] \times \sum (\text{proportions}))$$

Exemple de calculs (mêmes données que le Tableau VI : Exemple de calculs de pourcentages) échantillon sans prédilution et titrage fort (dilution sérielle au dixième)

Tableau VII : Exemple de calculs de titres avec la méthode Spearman Karber

Ligne (dilution)	A	B	C	D	E	F	G	H
Dilution	1e-01	1e-02	1e-03	1e-04	1e-05	1e-06	1e-07	1e-08
Lecture de la dilution (puits positifs)	5	5	5	3	0	1	0	0
Nombre de puits négatifs	0	0	0	2	5	4	5	5
log (dilution la plus importante où tous les puits sont positifs)			-3					
Proportion puits positifs (Nbre puits positifs par dilution/ Nbre puits par dilution)	1	1	1	0,6	0	0,2	0	0
Σ (proportions)	$=1+0,6+0,2 = 1,8$							

Titre viral = $(3-2) - (3-1/2+1*1,8)$

Titre viral = 5,3 log CCID₅₀/mL

1.1.9 Comparaison

La méthode de calculs utilisée pour la détermination des titres en CCID₅₀/mL est la méthode de Reed Muench. Une comparaison des titres obtenus avec Reed Muench et Spearman Karber a été effectuée. La différence entre les titres obtenus avec les deux méthodes est faible (de l'ordre de 0,1- 0,2 logCCID₅₀/mL), exceptée pour des échantillons où le nombre de puits positifs n'étaient pas strictement décroissants.

La méthode de Spearman Karber étant recommandée (normes, WHO...), il a été décidé de mettre en place cette méthode de calculs sur le site industriel sans pour autant remettre en cause les résultats obtenus précédemment avec la méthode de Reed-Muench. Il est cependant important de préciser la méthode de calculs d'estimation des titres après la valeur du titre.

1.1.10 Détermination de la LOD

La limite de détection (LOD) associée à la méthode de titrage pour le couple Virus-cellule utilisée pour la validation de la désinfection des surfaces par contact a été calculée en utilisant une suspension de titre connu. Cette suspension a été diluée en cascade afin d'obtenir des titres égaux à 2 log CCID₅₀/mL, 1,5 log CCID₅₀/mL, 1,0 log CCID₅₀/mL, 0,5 log CCID₅₀/mL et 0,0 log CCID₅₀/mL. Ces dilutions ont ensuite été titrées en triplicats. L'opération a été réalisée dans 6 séries indépendantes, par des opérateurs différents. La LOD a été définie comme la valeur limite où il a été possible de détecter des puits positifs aux trois réplicats lors des 6 essais, sans exception. Dans ces essais, les cas où des titres <LOC auraient normalement été annoncés,

ont été calculés. Pour le virus enveloppé 1, la valeur de la LOD est estimée à 1 log CCID₅₀/mL. Pour le virus enveloppé 2, la valeur reste encore à déterminer.

Par ailleurs, les titres obtenus <LOD lors de la validation de la désinfection des surfaces correspondent à des titres dans les suspensions de récupération de 20 mL. Il est donc nécessaire d'appliquer un facteur de dilution. La valeur de la LOD dans ce cadre est donc égale à 2,3 log CCID₅₀. Il n'est pas possible d'affirmer qu'il reste moins de 2,3 log CCID₅₀ sur les coupons après désinfection. Afin de pouvoir observer une réduction virale d'au moins 4 log CCID₅₀/mL, il est nécessaire d'utiliser des suspensions virales de titres supérieurs à 6,3 log CCID₅₀/mL.

1.1.11 Harmonisation

La mise en place de la méthode de calculs Spearman Karber fait partie d'une démarche d'harmonisation plus globale initiée par l'industriel. Les milieux utilisés, le temps d'incubation, la température d'incubation, la méthode de dilution, le nombre de puits, le nombre de réplicats seront alignés sur une méthode préconisée par l'OMS²⁶. La méthode dite de la co-infection sera également mise en place.

1.2 Validation de l'efficacité virucide de la désinfection - Méthode des portes germes

La méthode des porte-germes est une méthode couramment utilisée par les industriels pour démontrer l'efficacité des désinfectants. Une norme de phase 2 étape 2 utilisant cette méthodologie est actuellement en projet et consultable pour commentaires.

Les autorités réglementaires et notamment la FDA demandent l'étude de l'efficacité de la désinfection en utilisant des coupons représentatifs des surfaces trouvées dans les laboratoires.

1.2.1 Validation de la désinfection aérienne

Afin de pouvoir conclure quant à l'efficacité de la désinfection aérienne, il faut

- Tout d'abord des critères généraux : équipements qualifiés, matières libérées (notamment H₂O₂), vérification du respect de la quantité d'H₂O₂ injectée (vérification visuelle du niveau de désinfectant et relevés de la sonde)
- Ensuite sur la validation de la désinfection de bioindicateurs. Il s'agit de coupons d'inox sur lesquels des spores de *Geobacillus stearothermophilus* ont été déposés. 100% des bioindicateurs doivent être tués et une réduction logarithmique d'au moins 6 log doit être observée.
- Enfin sur la validation de la désinfection en utilisant la méthode des porte-germes : des coupons représentatifs des surfaces à désinfecter (Inox : PSM ; PVC : Revêtement du sol) sur lesquels du virus a été déposé. Une réduction de la charge virale d'au moins 4 log CCID₅₀ doit être observée.

3 séries de validation par zones et par virus doivent être réalisées pour valider la désinfection de la zone.

L'impact de chaque modification d'encombrement/d'agencement doit être étudié pour évaluer si une revalidation est nécessaire.

Le protocole comporte un plan de la zone à désinfecter avec les emplacements des ventilateurs, des coupons et des bioindicateurs.

1.2.1.1 Validation de l'efficacité de la désinfection à l'aide de bio indicateurs

Les indicateurs (ou bio indicateurs) sont des préparations normalisées de microorganismes (spores biologiques) sélectionnés et utilisés pour évaluer l'efficacité d'un procédé de stérilisation (ou de désinfection). Ils servent à démontrer que le procédé utilisé a la capacité d'inactiver les microorganismes ayant une résistance connue par rapport au procédé.

Les bio indicateurs peuvent être positionnés au niveau des points les plus difficiles à désinfecter (worst case) ou au niveau de zones critiques (par exemple PSM, c'est à cet endroit que le produit sera ouvert et donc ici que le risque de contamination est le plus élevé).

Geobacillus stearothermophilus et *Bacillus atrophaeus* sont généralement utilisés comme bio indicateurs pour les stérilisations et biodécontaminations au gaz.

Pour évaluer l'efficacité du peroxyde d'hydrogène en phase vapeur, des coupons d'acier inoxydable inoculés avec $\geq 10^6$ spores de *Geobacillus stearothermophilus* sont commercialisés afin d'être utilisés comme indicateurs biologiques (BI).

L'article « Influence des matériaux sur l'efficacité de la biodécontamination » publié dans le magazine SallesPropres²⁸ a étudié les différences des valeurs D* obtenues pour des spores de *Geobacillus stearothermophilus* déposés sur des coupons faits de différents matériaux présents dans un isolateur afin d'étudier la pertinence de l'utilisation de coupons d'acier inoxydable pour la validation de la DSVa.

Ils concluent que « Les résultats de cette étude ont mis en évidence différentes propriétés d'inactivation d'une biocharge sur différentes surfaces de matériaux. Certains de ces matériaux sont à exclure de la construction des lignes de remplissage sous isolateurs. Le recours à des coupons en acier inoxydable inoculés à 6 log et conditionnés dans des pochettes en Tyvek représente bel et bien une approche sûre et raisonnable pour le développement et la validation de cycle de biodécontamination. Des essais supplémentaires avec des échantillons de matériaux de construction présentant des valeurs D supérieures peuvent être recommandés afin d'établir, de manière rationnelle, une marge de sécurité.»

* D : temps de réduction décimale : Pour un germe donné, à une température donnée, dans un milieu donné, le temps pour diviser la population bactérienne par dix (=que la droite descende d'un log).

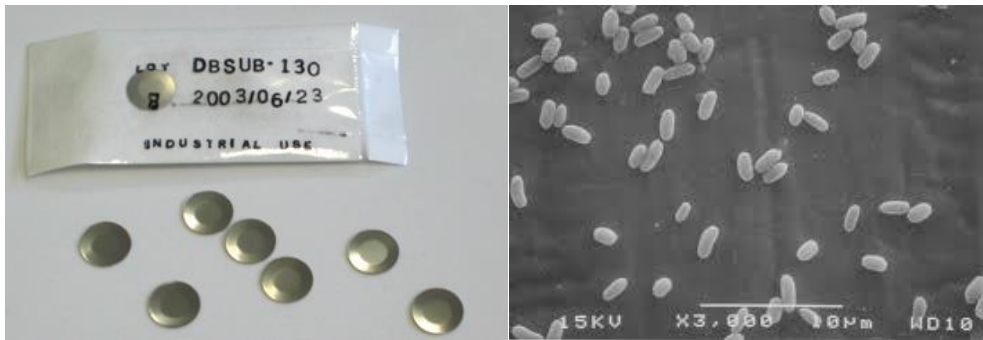


Figure 14 : A gauche coupons concaves enveloppés individuellement dans une enveloppe en Tyvek perméable à l'H₂O₂ (souche ATCC 7953) et à droite *G. stearothermophilus* au microscope (x3000)²⁷

Une fois la désinfection terminée et le taux d'H₂O₂ résiduel évacué, des bouillons TSB sontensemencés avec les indicateurs biologiques présents dans la zone pendant la désinfection et sont incubés dans une étuve à 60°C+/- 2°C en présence d'un témoin positif (bouillon TSB + indicateur biologique n'ayant pas subi la désinfection) et d'un témoin négatif (bouillon TSB nonensemencé). Une observation quotidienne des TSB est réalisée pendant 7 jours. L'analyse des indicateurs biologiques peut être faite uniquement si le contrôle négatif ne présente pas de trouble et que le contrôle positif présente un trouble.

1.2.1.2 Coupons avec suspension virale

Les coupons utilisés au cours de ces validations sont des coupons en Inox représentatifs des surfaces dans les PSM, et en PVC, représentatifs des surfaces au sol.

1 mL de suspension virale de titre connu est déposé sur les coupons qui sont placés dans des boîtes de culture.

Ils sont ensuite transférés dans la zone qui va subir la désinfection aérienne et agencés selon le plan décrit dans le protocole, boîtes de culture ouvertes. A la fin de la désinfection, les boîtes sont refermées et les coupons sont transférés au laboratoire Contrôle Qualité afin de procéder au titrage de la charge virale résiduelle. Après la désinfection, 20mL de milieu de dilution sont déposés sur les coupons et une agitation est réalisée afin de récupérer l'éventuelle charge virale résiduelle. La suspension obtenue est titrée à l'aide de la méthode de titrage détaillée précédemment.

Les titres des suspensions récupérées sur les coupons qui ont subi la DSVA (appelés titres 2) sont comparés à des titres contrôles :

- Le titre 0 : titre de la suspension virale de départ. Le titrage est réalisé immédiatement après la préparation des coupons. Cela permet de connaître la quantité de virus déposée sur les coupons qui ont subi la DSVA.

- Le titre 1 : titre de la suspension virale de départ après dépôt sur les coupons et récupération dans 20 mL de milieu de dilution. Ce contrôle permet de vérifier que le contact avec les coupons ne modifie pas le titre de la suspension virale et que la

méthode de récupération permet de reprendre convenablement les virus éventuellement présents sur les coupons.

- Le titre 3 : titre de la suspension virale après dépôt sur les coupons, attente sous PSM le temps de la désinfection et récupération dans 20 mL de milieu de dilution des virus restants sur les coupons 3. Les coupons 3 sont préparés avec 1 mL de la suspension virale de départ mais ces coupons ne sont pas soumis à la DSVA. Ils sont conservés sous PSM, en contact avec l'air. Ce titre permet de vérifier si la diminution de la charge virale est due à la désinfection aérienne ou à la désinfection aérienne et à une dégradation du virus pendant le temps de la désinfection. La suspension virale va sécher et en fonction du type de virus, une diminution plus ou moins importante du titre de la suspension pourra être observée. Si une proportion importante de la charge virale ($>1 \log$ CCID₅₀/mL) est inactivée, il ne sera pas possible de conclure que l'inactivation est due à la procédure de désinfection mais par contre il sera possible d'affirmer qu'après une DSVA tous les virus sont inactivés (effet du temps sur la viabilité du virus + efficacité de la désinfection aérienne + dessèchement).

- Les titres 4A et 4B : des blancs (coupons avec solution sans virus) sont exposés au cycle de désinfection dans la zone. Ils sont ensuite traités de la même manière que les coupons où des virus ont été déposés. La suspension virale de départ est titrée sur des cellules traitées avec la suspension 4A et 0,5 mL de suspension virale de départ est déposée dans 10 mL de suspension 4B. Ces titres permettent de vérifier que les résidus de désinfectants sur les coupons récupérés à l'aide du milieu de dilution n'interfèrent pas avec la méthode de titrage. La suspension déposée doit ressembler au milieu de la suspension virale. Afin de reproduire les conditions, notamment en SVF, la suspension déposée sur le coupon sera du milieu de culture.

Le titre 4A permet de vérifier qu'il n'y a pas d'effet cytotoxique sur les cellules (qui empêcherait ensuite une infection par le virus et/ou une lecture des plages de lyse correcte). Le terme de susceptibilité cellulaire est utilisé.

Le titre 4B permet de vérifier qu'il n'y a pas de virucidie résiduelle, c'est-à-dire de résidus de désinfectant repris sur les coupons lors de la récupération, qui entraîneraient une inactivation virale lors du titrage et donc un risque de sous-estimer la charge virale résiduelle après désinfection.

Tableau VIII : Tableaux récapitulatifs des étapes de la validation de la désinfection

Jour J : Préparation des coupons

Contrôle Positif (Coupons 1)	Désinfection (Coupons 2)	Contrôle (Coupons 3)	Contrôle Négatif (Coupons 4)
Dépôt de la suspension virale (Titre 0) sur le coupon 1	Dépôt de la suspension virale (Titre 0) sur le coupon 2	Dépôt de la suspension virale (Titre 0) sur le coupon 3	Dépôt de milieu de culture sur le coupon 4
Récupération et titrage	Transfert dans la zone à décontaminer/désinfecter	Attente sous PSM	Transfert dans la zone à décontaminer/désinfecter

La suspension 0 est titrée en même temps que la suspension 1.

Jour J+1 : Récupération et titrage

Table 2 : Récupération et titrage			
Désinfection (Coupons 2)	Contrôle (Coupons 3)	Contrôle Négatif (Coupons 4)	
Récupération des virus infectieux résiduels avec 20 mL de milieu de dilution			
Titrage suspension 2 : Titre 2	Titrage suspension 3 : Titre 3	Suspension 4 pour les études d'interférence	
		10 mL : Etude de la susceptibilité cellulaire Titrage : Titre 4A	10 mL : Etude de la virucidie résiduelle Titrage : Titre 4B

Après désinfection, les coupons sont transférés au laboratoire contrôle qualité. Les virus résiduels sont dilués dans 20 mL de milieu de dilution pour donner les suspensions 1, 2 et 3 et 0,5 mL de la suspension virale de référence est diluée dans 10 mL de la suspension 4 pour donner la suspension 4B. Pour exprimer le titre viral sur les coupons, les titres des suspensions doivent être corrigés par des facteurs de dilution.

Titre viral corrigé ($\log_{10}$ CCID₅₀/mL) = $\log_{10}$ ($10^{\text{titre mesuré}} \times \text{facteur de dilution}$)

Facteur de dilution = 20 pour les suspensions 1, 2, 3 et 4B.

Facteur de dilution = 1 pour les suspensions 0 et 4A.

La conformité avec les critères de validité de l'essai est ensuite vérifiée avec les titres corrigés et selon le tableau suivant :

Tableau IX : Critères de validité de l'essai

Type de test	Formule de calcul	Critère de validité de l'essai
Modification de la susceptibilité cellulaire (PVC, inox)	Titre 0 – Titre 4A	< 1 $\log_{10}$ CCID ₅₀ /mL
Virucidie résiduelle (PVC, inox)	Titre 0 – Titre 4B	< 1 $\log_{10}$ CCID ₅₀ /mL
Réduction virale liée au contact du support (PVC, inox) et vérification de l'efficacité de la récupération de la charge virale	Titre 0 – Titre 1	< 1 $\log_{10}$ CCID ₅₀ /mL

Dans le cas où les titres 4 montrent soit une susceptibilité cellulaire soit une virucidie résiduelle, il peut être nécessaire de modifier le test. Des dilutions de la suspension récupérée peuvent être réalisées afin de limiter les effets du désinfectant mais il sera peut être nécessaire d'augmenter le titre de la suspension virale de départ afin d'être en mesure d'observer une diminution de 4 $\log_{10}$ CCID₅₀ des titres 2.

Si cela n'est pas possible, il peut être envisageable d'effectuer une ultracentrifugation ou un tamisage moléculaire. Cela permettrait de retenir le désinfectant et le titrage des virus pourra alors être effectué. Cependant ces méthodes entraînent souvent une perte de titre. Il est alors nécessaire de connaître avec exactitude le pourcentage de recouvrement.

1.2.2 Validation de la désinfection des surfaces par contact

1.2.2.1 Produits utilisés

Les produits utilisés en zones de production sur le site industriel sont détaillés dans le tableau ci-dessous Tableau X : Produits et lingettes de nettoyage.

Tableau X : Produits et lingettes de nettoyage

PRODUITS DE NETTOYAGE		Composition
Détergent – désinfectant (sol) Pour les zones 1 et 2	Ultrasan Broad Spectrum – Réf : A6-USBS-5LST	Hi speed H2O2 (peroxyde d'hydrogène) 15mg/g, tensioactifs anioniques <5%, acide glycolique
	Surfanios PAE IP Sterile – Réf : 1342278	N-(3-aminopropyl)-N-dodécylpropane-1.3-diamine (0.77mg.g), chlorure de didécyldiméthylammonium (0.03mg/L), chélateurs des ions Ca2+ et K+, détergents non ionique, parfum
Détergent – désinfectant (sol) Pour les zones 3 et 4	Ultrasan Broad Spectrum Réf : A6-USBS-5LST	Hi speed H2O2 (peroxyde d'hydrogène) 15mg/g, tensioactifs anioniques <5%, acide glycolique
	Bactisurf DDC – Réf : G1-920960	Chlorure de dodecyl dimethyl ammonium, carbonate de potassium, monoéthanolamine, tensioactifs non ioniques, EDTA, huile essentielle de pin
Détergent – désinfectant (surfaces)	Ultrasan Broad Spectrum – Réf : A6-USBS-1LST	Hi speed H2O2 (peroxyde d'hydrogène) 15mg/g, tensioactifs anioniques <5%, acide glycolique
	Anioxyspray – Réf : 1752579LK	Peroxyde d'hydrogène (50mg/g), éthanol (91.6mg/g)
Alcool	Bacty Spray Isopropanol stérile – Réf : BACTY.SP IPA PULVE	
LINGETTES DE NETTOYAGE		
Lingettes Stériles Pour les zones 1 et 2	- Tissu d'essuyage stérile pour le sol – Réf : KW-P3036-ST - Tissu d'essuyage stérile pour les surfaces – Réf : KW-P3023-ST	
Lingettes Non stériles Pour les zones 3 et 4	- Tissu d'essuyage non stérile pour le sol – Réf : KW-P3036 - Tissu d'essuyage non stérile pour les surfaces – Réf : KW-P3023	

Seules les lingettes stériles seront utilisées pour le protocole de validation. Après ouverture, les lingettes ne sont pas conservées dans des conditions stériles.

L'alcool ne sera pas validé. Il est notamment utilisé dans le but de ne pas laisser de résidu de désinfectant sur les parties en inox des PSM. L'alcool s'évaporant rapidement, il laisse une surface sèche.

Une alternance entre deux désinfectants est respectée mais il est préférable d'alterner deux désinfectants qui ont des mécanismes d'action différents, ce qui n'est pas le cas pour l'Anioxyspray et l'Ultrasan Broad Spectrum dont le composant actif principal est le peroxyde d'hydrogène. Cependant l'apparition de résistances au peroxyde d'hydrogène est peu probable en raison du caractère non spécifique du mode d'action de ce produit.

De la même manière que pour la désinfection aérienne, la validation repose sur l'utilisation de coupons représentatifs des surfaces qui vont être désinfectées (Inox : PSM, PVC : Revêtement du sol).

La validation de la méthode de désinfection associée aux désinfectants a été réalisée en reproduisant les gestes réalisés en zones sur les coupons.

1 mL de suspension virale de titre connu est déposé sur un nombre défini de coupons. Ensuite, la désinfection des surfaces est effectuée en suivant la procédure de nettoyage et les consignes, à l'aide des lingettes et désinfectants préconisés (Voir illustration de la méthode utilisée ci-dessous).

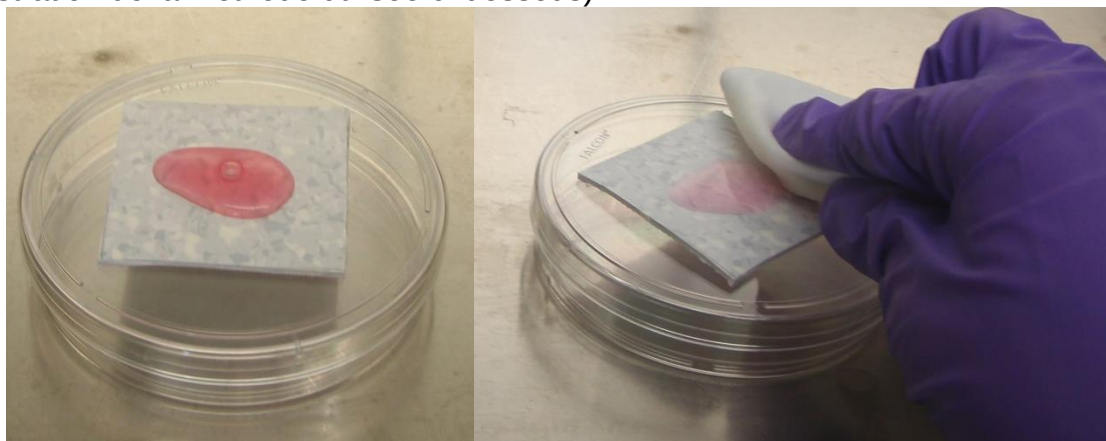


Figure 15 : A gauche : Coupon PVC utilisé pour les études de validation des procédés de désinfection sur PVC, avec suspension virale. A droite : Reproduction du procédé de désinfection

A la fin de la désinfection, 20 mL de milieu de dilution sont déposés sur les coupons (Voir photographie ci-dessous) et une agitation est réalisée afin de récupérer l'éventuelle charge virale résiduelle. La suspension obtenue est titrée.

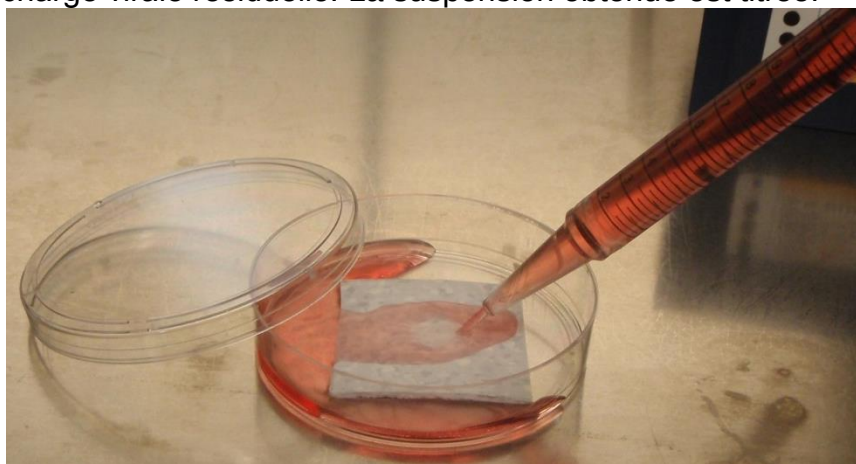


Figure 16: Procédé de récupération virale sur les échantillons de surface

De la même façon que pour la désinfection aérienne, le titre est comparé à plusieurs contrôles :

- Le titre 0 : titre de la suspension virale de départ
- Le titre 1 : titre de la suspension virale de départ après dépôt sur les coupons et récupération dans du milieu de dilution
- Les titres 3A et 3B : Susceptibilité cellulaire et virucidie résiduelle, (équivalents aux titres 4A et 4B de la désinfection aérienne).

Il n'y a pas de coupon correspondant au titre 3 de la désinfection aérienne, en effet le temps entre le dépôt de la suspension virale et la mise en œuvre du procédé de désinfection est trop court et est déjà pris en compte avec le coupon 1.

Les titres obtenus sont corrigés avec les facteurs de dilution et la conformité avec les critères de validité de l'essai est ensuite vérifiée avec ces titres selon le tableau suivant :

Tableau XI : Critères de validité du test

Type de test	Formule de calcul	Critère de validité
Modification de la susceptibilité cellulaire (PVC, inox)	Titre 0 – Titre 4A	$< 1 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{mL}$
Virucidie résiduelle (PVC, inox)	Titre 0 – Titre 4B	$< 1 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{mL}$
Réduction virale liée au contact du support (PVC, inox) et vérification de l'efficacité de la récupération de la charge virale	Titre 0 – Titre 1	$< 1 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{mL}$
Réduction virale suite à la désinfection (PVC, inox)	Titre 1 -Titre 2	$> 4 \log_{10} \text{CCID}_{50}$

1.3 Validation de la désinfection des effluents liquides

La validation de la désinfection repose sur la reproduction à échelle réduite des conditions réelles d'utilisation, en se plaçant dans le « pire cas » (worst case).

La cuve en PPH (polypropylène homopolymère) de 1000L, est mimée par une cuve en PPH de 0,1L dont les dimensions sont proportionnelles.

Le brassage effectué par une pompe est réalisé par un mélange à l'aide d'un agitateur magnétique.

Le virus à utiliser pour la validation est un virus de la même famille que le virus le plus résistant manipulé. Etant donné le mode d'action non spécifique de l'acide peracétique, il a été supposé que les résistances du virus test et du virus manipulé étaient équivalentes.

Le kill tank est placé dans une zone où la température n'est pas régulée, la température peut descendre jusqu'à 15°C en hiver. L'acide peracétique est plus efficace à des températures plus élevées. Pour se situer dans une situation de pire cas, la cuve sera maintenue à une température de 15°C.

Le contenu de la cuve doit être représentatif de ce qui sera déversé (eau du nettoyage en place, effluents des Downstream process (DSP), eau des évier, contenus de bioréacteurs...). Il a été décidé de représenter ce contenu par du surnageant de culture cellulaire récupéré au sein de l'entreprise. La question de la

présence ou non de sérum de veau fœtal, et autres substances possiblement interférentes reste posée.

Une suspension virale, de titre connu et le plus élevé possible (afin de voir le facteur de réduction viral le plus élevé possible) est déversée dans la cuve. Le désinfectant est ensuite versé et le contenu de la cuve est prélevé à des temps définis, puis titré en virus infectieux afin de pouvoir dessiner une courbe d'inactivation virale.

L'essai de détermination de l'activité virucide de l'oxyaniolyse 9000 selon la NF EN 14476-A1 a été réalisé sur l'enterovirus Polio type 1 SABIN Lsc-2ab. La société Anios conclut à l'efficacité virucide de ce produit à une concentration de 3 % après un contact de 5 min à 37°C et à une concentration de 0.5 % après un temps de contact de 30 min à 37°C.

Il a été décidé d'utiliser l'oxyaniolyse à la concentration de 3% (à température ambiante). La question de la concentration à tester a été posée. Faut-il se placer à une concentration inférieure à celle qui sera utilisée afin de s'assurer une marge de sécurité ?

Le problème de ce raisonnement est qu'il a déjà été démontré que l'efficacité de la désinfection n'est pas toujours proportionnelle à la quantité de désinfectant. Une augmentation de la concentration peut parfois entraîner par exemple la précipitation d'éléments, diminuant ainsi l'efficacité du désinfectant.

De plus le kill tank a une mesure très peu précise du volume de liquide contenu, et il arrive que la cuve soit traitée et vidée alors qu'elle n'a pas atteint le niveau de 1000L. Il faudrait déterminer si le volume de désinfectant injecté doit être adapté en fonction du remplissage de la cuve ou si une concentration plus importante de désinfectant n'entraîne pas de précipitations.

Un minimum de 2 séries de validation doit être réalisé pour valider la désinfection¹⁵.

L'utilisation de l'oxyaniolyse 9000, risque également de poser problème dans l'avenir, puisqu'il s'agit d'un désinfectant pour dispositifs médicaux, et que selon la réglementation, ce désinfectant est donc un dispositif médical. Or, il est nécessaire d'utiliser un désinfectant régit par la réglementation des biocides pour la désinfection du kill tank. Les désinfectants biocides actuellement sur le marché, sont présentés sous des formes diluées, ce qui pose problème pour l'utilisation de la désinfection d'un kill tank car le déversement du désinfectant dans la cuve entraîne nécessairement une dilution du désinfectant.

Des essais préliminaires à cette validation sont nécessaires pour vérifier que la méthodologie utilisée et le désinfectant n'entraînent pas d'interférences sur les résultats.

Les contrôles des interférences avec la méthode de titrage (modifications de la susceptibilité cellulaire, virucidie résiduelle), doivent être présents. Des étapes d'ultracentrifugations, de filtration ou de tamisage moléculaire peuvent être réalisées en cas d'interférences. Ces étapes devront être validées (pourcentages de recouvrement calculés...).

Afin de réaliser une cinétique d'inactivation, les échantillons prélevés seront congelés, avant d'être décongelés pour le titrage. Cette étape doit être étudiée afin

de vérifier qu'il n'y a pas de perte de titre ou afin de déterminer la quantité perdue à prendre en compte.

Une réduction logarithmique de la charge virale avant et après désinfection de 4 log est le critère minimal que l'on doit obtenir au bout de la durée de désinfection. La cinétique est un paramètre important à connaître afin d'extrapoler quant à l'inactivation des virus au moment du rejet dans le système des eaux usées de la ville.

III. Résultats

1. Résultats de la désinfection aérienne

Pour la zone 2, seules deux séries ont été effectuées pour un virus. Pour la zone 1, seule une série a été effectuée pour un virus.

Les tableaux ci-dessous présentent les résultats obtenus pour la validation des désinfections aériennes.

Tableau XII: Conformité de la méthode de récupération et effet du contact des virus avec les coupons

Zone	Virus	Surface	Titre 0 (log CCID ₅₀ /mL)	Titres 1 corrigés (log CCID ₅₀ /mL)	Réduction de la charge virale due à la méthode de récupération et l'effet du contact des virus sur les coupons (log CCID ₅₀ /mL)	Conformité
2	Virus enveloppé 1	Inox	5,3	5,8	0,5	Conforme
		PVC	5,3	5,7	0,4	Conforme
2	Virus enveloppé 1	Inox	5,7	5,7	0,0	Conforme
		PVC	5,7	5,7	0,0	Conforme
1	Virus enveloppé 2	Inox	7,5	7,1	0,4	Conforme
		PVC	7,5	7,3	0,2	Conforme

Tableau XIII: Vérification de l'absence d'interférence avec la méthode de titrage

Zone	Virus	Surface	Modification de la susceptibilité cellulaire (log CCID ₅₀ /mL)	Virucidie résiduelle (log CCID ₅₀ /mL)	Absence d'interférence avec la méthode de titrage
2	Virus enveloppé 1	Inox	0,0	0,6	Conforme
		PVC	0,0	0,6	Conforme
2	Virus enveloppé 1	Inox	0,3	0,8	Conforme
		PVC	0,3	0,3	Conforme
1	Virus enveloppé 2	Inox	0,1	0,2	Conforme
		PVC	0,2	0,2	Conforme

Tableau XIV : Titres obtenus pour les coupons 2 et 3 et autres paramètres nécessaires à la validation

Zone	Virus	Surface	Titres corrigés coupons 3 (log CCID ₅₀)	Titres corrigés coupons 2 (log CCID ₅₀)	Réduction virale (log CCID ₅₀)	Bioindicateurs	Déroulement du cycle
2	Virus enveloppé 1	Inox	5,2	<LOD	3,5	négatifs	Conforme
		PVC	5,3	<LOD	3,4		
2	Virus enveloppé 1	Inox	4,8	<LOD	3,4	6/12 positifs dès 1er jour ; Contrôle + et - valides ⁽¹⁾	Conforme
		PVC	4,5	<LOD	3,4		
1	Virus enveloppé 2	Inox	<LOD	<LOD	?	négatifs	Conforme
		PVC	<LOD/C	<LOD	?		

Les chiffres en rouge correspondent à la valeur minimale des trois réplicats et non à la valeur de la moyenne car l'écart entre les trois réplicats étaient supérieur à 0,5 et il a été décidé de se placer dans le pire cas.

⁽¹⁾ Enquête et recherche des causes conclut que la cause primaire est très certainement le sens d'installation des indicateurs biologiques. En effet, l'opérateur habituel était en vacances, l'opérateur qui l'a remplacé a installé les indicateurs biologiques sans prendre en compte le sens d'installation. Autre raison possible : lot d'indicateurs biologiques n'a jamais été testé.

La méthode de récupération permet une bonne récupération des virus éventuellement présents sur les coupons ($|T0 - T1| < 1 \log \text{CCID}_{50}/\text{mL}$). Le peroxyde d'hydrogène résiduel sur les coupons n'interfère pas significativement sur la méthode de titrage : $|T1-T4A|$ et $|T1-T4B| < 1 \log \text{CCID}_{50}/\text{mL}$.

Bien qu'ils s'agissent de deux virus enveloppés, leurs résistances au dessèchement dans le milieu extérieur sont très différentes. Le virus enveloppé numéro 2 est quasiment totalement inactivé sans désinfection au peroxyde d'hydrogène.

Il n'est pas possible de conclure quant à l'efficacité virucide de la désinfection, car l'ensemble des 3 séries n'a pas été effectué.

De plus, la suspension virale du virus enveloppé 1 utilisée n'avait pas un titre suffisant pour observer une réduction d'au moins 4 log CCID₅₀. Il sera nécessaire de réitérer les essais de validation lors des prochaines désinfections avec une suspension virale de titre supérieur.

2. Résultats de la désinfection des surfaces par contact

Les tableaux ci-dessous présentent les résultats obtenus lors des 6 essais (3 par surfaces) de validation de la désinfection des surfaces par contact, sur le virus enveloppé 1.

Tableau XV : Conformité de la méthode de récupération et effet du contact des virus avec les coupons

Titre	Surface	Réduction de la charge virale due à la méthode de récupération et l'effet du contact des virus sur les coupons (log CCID ₅₀ /mL)	Conformité
Titre 1	PVC	0,2	Conforme
		0,4	Conforme
		0,5	Conforme
	Inox	0,4	Conforme
		0,3	Conforme
		0,0	Conforme

La méthode de récupération permet une bonne récupération des virus éventuellement présents sur les coupons et le coupon n'a pas d'effet significatif sur le titre de la suspension virale de référence.

Tableau XVI : Vérification de l'absence d'interférence avec la méthode de titrage

Désinfectant	Surface	Modification de la susceptibilité cellulaire	Virucidie résiduelle	Absence d'interférence avec la méthode de titrage
Anioxyspray	Inox	0,3	0,4	Conforme
		0,1	0,2	Conforme
		0,3	0,0	Conforme
	PVC	0,0	0,3	Conforme
		0,3	0,2	Conforme
		0,2	0,2	Conforme
Désinfectant	Surface	Modification de la susceptibilité cellulaire	Virucidie résiduelle	Absence d'interférence avec la méthode de titrage
Bactisurf	PVC	0,0	0,2	Conforme
		0,0	0,1	Conforme
		0,0	0,1	Conforme
Surfanios	PVC	0,0	0,4	Conforme
		0,5	0,2	Conforme
		0,1	0,4	Conforme
Ultrasan	Inox	0,3	0,2	Conforme
		0,1	0,1	Conforme
		0,3	0,0	Conforme
	PVC	0,0	0,2	Conforme
		0,4	0,2	Conforme
		0,1	0,1	Conforme

Il n'y a pas d'interférence significative due au désinfectant résiduel éventuellement présent sur la méthode de titrage.

Tableau XVII : Titres obtenus pour les coupons 2

Désinfectant	Surface	Titres corrigés pour coupons 2 (log CCID ₅₀)	Réduction virale (log CCID ₅₀)
Surfanios	PVC	<LOD	> 3,2
		<LOD	> 3,2
		<LOD	> 3,2
Ultrasan	PVC	<LOC	?
		<LOD	> 3,2
		<LOC	?
	Inox	<LOD	> 3,9
		<LOD	> 3,5
		<LOD	3,6

Désinfectant	Surface	Titres corrigés pour coupons 2 (log CCID ₅₀)	Réduction virale (log CCID ₅₀)
Bactisurf	PVC	<LOD	> 3,2
		<LOC/D	?
		<LOD	> 3,2
Anioxyspray	PVC	<LOC/D	?
		<LOC/D	?
		<LOC	?
	Inox	<LOD	> 3,2
		<LOD	> 3,5
		<LOD	> 3,6

Tous les titres 2 sont inférieurs à la LOD ou à la LOC. Tous les titres obtenus après désinfection sur l'inox sont inférieurs à la LOD. L'Ultrasan Broad Spectrum, le Bactisurf et l'Anioxyspray ont des titres inférieurs à la LOC sur PVC, cela signifie que des virus sont détectés.

Il a été remarqué que les lingettes utilisées pour la désinfection en production ne sont pas très absorbantes et il arrive que des gouttes soient apparentes sur le côté du coupon ou sur la surface non exposée au désinfectant après la désinfection. Or, le coupon est entièrement recouvert de milieu de dilution lors de la récupération de la charge virale. Lorsque des quantités trop importantes ont été vues, la manipulation a été recommencée.

Les coupons PVC possèdent une surface avec des stries sur le verso. Il est possible que des gouttelettes de virus restent dans ces stries.



Figure 17: Verso d'un coupon PVC

De plus, la manipulation ne comportait qu'un seul passage de la lingette imprégnée de désinfectant alors que la méthode de nettoyage utilisée est la méthode de la godille. Cette méthode entraîne le passage de la lingette deux fois par endroit.

Enfin, 1 mL de suspension virale de titre fort est déposé sur des coupons d'environ 25 cm², cela représente des quantités très importantes de virus qui ne feraient pas l'objet d'un nettoyage standard.

Il n'est pas possible de conclure sur l'efficacité virucide de la désinfection des surfaces car la suspension virale n'a pas un titre suffisant pour permettre d'observer

une réduction de 4 log CCID₅₀ (si on considère la LOD à 1 log CCID₅₀, voir paragraphe 3.7).

Dans les essais qui devront être effectués pour réaliser la validation, il peut être proposé de nettoyer/désinfecter les deux faces des coupons.

3. Résultats de la désinfection des effluents liquides

La validation de la désinfection n'a pas été réalisée. Un sous-traitant a été choisi, des devis établis mais il a été choisi de remplacer le kill tank chimique par un kill tank thermique.

En effet, l'inactivation des microorganismes par la chaleur a été très étudiée et de nombreuses données sont disponibles pour déterminer la température nécessaire pour les inactiver.

De plus, il n'y a pas de risques d'interférences avec les substances présentes dans les effluents, le risque de précipitation est faible. Les inconvénients d'un système thermique sont une forte consommation d'énergie et une augmentation du risque de corrosion de la cuve.

La validation de l'efficacité de ce système sera une validation paramétrique.

IV. Discussion - Conclusions

Afin de valider la désinfection des surfaces par voie aérienne et par contact, les essais devront être recommencés avec des suspensions virales plus concentrées, permettant d'observer une réduction logarithmique du titre viral d'au moins 4 log.

La procédure de nettoyage des coupons doit être revue avant les essais afin de s'assurer de l'absence de gouttes résiduelles après passages des lingettes.

La limite de détection du titrage du virus enveloppé 2 reste à évaluer afin de déterminer la réduction logarithmique du titre viral suite à l'application des désinfectants.

La validation de la désinfection du kill tank chimique n'a pas été effectuée et un kill tank thermique va le remplacer. La validation de son efficacité sera plus simple car il y a peu d'interférences et de nombreuses données sur l'inactivation des microorganismes par la chaleur sont disponibles.

Des normes de type phase 2/étape 2 (essais de laboratoire quantitatifs simulant les conditions pratiques, par exemple des essais sur des surfaces) sont actuellement en projet, comme par exemple la prEN 16777:2014 « Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de surface non-poreuse sans action mécanique pour l'évaluation de l'activité virucide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine médical - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape 2) » et « Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic, and institutional areas- Test method and requirements (phase 2, step 2) ».

Ces normes devraient permettre une harmonisation des méthodes porte-germes utilisées par les industriels pour démontrer l'efficacité des désinfections.

La prEN 16777:2014, préconise (pour le moment) l'utilisation d'une suspension d'essai de virus dans une solution de substances interférentes qui sera déposée sur un disque d'essai en acier inoxydable. La suspension est séchée avant application de l'échantillon de désinfectant testé sur le film séché. Il est préconisé de n'utiliser les coupons en acier qu'une seule fois. Etant donné que cette norme préconise une étape de séchage avant la désinfection elle est donc plus pertinente pour les essais sur virus nus que sur virus enveloppés et la norme considère que si un désinfectant est actif sur virus nus alors il le sera sur virus enveloppés.

Dans tous les cas, dès lors que l'utilisation d'une norme est requise, il est nécessaire d'adopter une approche critique et d'évaluer les limites des normes pour être en mesure de les adapter correctement aux particularités des situations réelles.

V. Bibliographie

- 1- La stérilisation, F. Galtier ; Editeur : Arnette
- 2- Norme ISO14698-2 :2003 : Salles propres et environnements maîtrisés apparentés -- Maîtrise de la biocontamination - Partie 2: Évaluation et interprétation des données de biocontamination
- 3- NF T 72-10, remplacée par la norme NF EN 14885 Février 2007 : Antiseptiques et désinfectants chimiques - Application des Normes européennes relatives aux antiseptiques et désinfectants chimiques
- 4- http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Doc_Reco/FichePratique/FIP_2012_BonUsageAntispetiques.pdf
- 5-ISO14644-5 : Salles propres et environnements maîtrisés apparentés -- Partie 5: Exploitation
- 6- <http://www.developpement-durable.gouv.fr/La-reglementation-biocide,37426.html> consulté le 22 juillet 2014
- 7- Documents « Antiseptiques et désinfectants » de Mai 2000 du CCLIN Paris-Nord <http://pharmacie.hug-ge.ch/infomedic/cappinfo/cappinfo46.pdf> et http://pharmacie.hug-ge.ch/ens/conferences/cf_desinfectants_bloc_op.pdf consultés le 17 juillet 2014
- 8- Bonnes Pratiques de Fabrication page 65
- 9- http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf
- 10- Disinfection: is it time to reconsider Spaulding? G. McDonnell, P. Burke
McDonnell G. Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action and resistance. Washington, DC: ASM Press; 2007.
- 11- Cleaning, disinfection and sterilization, Sethu Veerabadran, Ian M Parkinson
- 12- Antiseptiques et désinfectants, document du Cclin Paris-Nord de mai 2000
- 13- NF EN 14476 : Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine médical - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)
- 14- Recommandations de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé relatives aux critères de choix des procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne en milieu de soins
- 15- http://www.cclinparisnord.org/NCHH/2011/290911/DVT_locaux.pdf
- 16- ISO 14644-5 : Salles propres et environnements maîtrisés apparentés -- Partie 5: Exploitation

17-

http://system.paraschool.com/soutien/flashcours/cappe/tech/cappe_tech_entr_godille.swf consulté le 26 août 2014

18- [http://cclin-sudest.chu-](http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Doc_Reco/guides/FCPRI/Bionettoyage/B_techniques.pdf)

[lyon.fr/Doc_Reco/guides/FCPRI/Bionettoyage/B_techniques.pdf](http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Doc_Reco/guides/FCPRI/Bionettoyage/B_techniques.pdf) et <http://e-learning-formation.com/plateforme/formation/local/cerfpa/assistante3age/Mod1/12-auxiliaire/nettoyage-lieux-vie.html> consulté le 26 août 2014

19-

http://www.biosafety.be/CU/PDF/2012_EffluentDeconSystems_SBB_2505_58.pdf

20- Commission SFSTP, Validation du nettoyage, 1996

21- Bonnes pratiques de fabrication, bulletin officiel N°21014/1 bis. LD.15. Qualification et validation <Validation des procédés <Validation du nettoyage <paragraphe 39 et 40

22- Bonnes pratiques de fabrication, bulletin officiel N°21014/1 bis. LD.15. Qualification et validation <Validation des procédés < Revalidation<paragraphe 39 et 45

23- Finney, D. J. (1978) Statistical Methods in Biological Assay, 3rd ed., Hafner, New York

24- L. J. Reed et H. Muench, publié dans « The American Journal of Hygiene » en 1938

25- OMS Monographie 23 Laboratory techniques in Rabies third edition (disponible ici : [http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_23_\(3ed\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_23_(3ed).pdf)) et ses annexes

(disponible ici : [http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_23_\(3ed\)_appendices.pdf](http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_23_(3ed)_appendices.pdf))

26- Manual of laboratory methods – For testing of vaccines used in the who Expanded Programme on Immunization (1997) disponible ici : [http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_VSQ_97.04_\(parts1-2\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_VSQ_97.04_(parts1-2).pdf) (07 Août 2014)

27- Visuel coupons inox avec spores : http://www.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.amilabo.com%2F2006%2Fimages%2F749004.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.amilabo.com%2Fbdd%2Fdetail.php%3Freference%3D749004%26UID%3D&h=383&w=510&tbnid=5myyHeq_x0h4hM%3A&zoom=1&docid=p98EIVxqWL4-KM&ei=1BvSU-3nCoXP4QS0IIDICA&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=119&page=1&start=0&ndsp=24&ved=0CCgQrQMwAg

28- « Influence des matériaux sur l'efficacité de la biodécontamination » publié dans le magazine SallesPropres n°046 (. | 1 novembre 2006 | Johannes Rauschnabel et Beatriz Unger, Robert Bosch GmbH SallesPropres n°046)

VI. ANNEXES

1. Fichier Excel de calculs des titres (Reed Muench)

1.1 Onglet 1 « Preparation and reading »

Product:

Assay number:

Assay starting date:

Assay documentation: I-0089, C-00XX

				Operator (date, visa):.....			Operator (date, visa):.....								Titer calculated
Sample reference				Dilutions			Reading								Titer calculated
Plate	Replicate	CQ number	Sample information	Pre dilution	1st well : Dilution reason	Serial dilution	A	B	C	D	E	F	G	H	(Log CCID ₅₀ /mL)

1.2 Onglet 2 « Calculation sheet »

Product:

Assay number:

Assay starting date:

Assay documentation: I-0089, C-00XX

Sample reference			Dilutions			Reading								Percentage value of the first dilution where	Percentage value of the first dilution where	log of the value of the dilution where less than	Correction factor	Titer calculated (Log CCID ₅₀ /mL)
CQ number	Sample information		Pre dilution	1st well : Dilution reason	Serial dilution	A	B	C	D	E	F	G	H					
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
0	0	0	Dilution			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				#DIV/0!	
			Number of negative wells			5	5	5	5	5	5	5	5					
			Cumulative number of positive wells for the dilution superior or equal to the			0	0	0	0	0	0	0	0					
			Cumulative number of negative wells for the dilution inferior or equal to the			5	10	15	20	25	30	35	40					
			%Positive well (N _{cum_pos} / N _{cum_pos+neg})			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00					
			50			INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	0				
			49			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				#DIV/0!	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0		#DIV/0!	
0	0	0	Dilution			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
			Number of negative wells			5	5	5	5	5	5	5	5					
			Cumulative number of positive wells for the dilution superior or equal to the			0	0	0	0	0	0	0	0					
			Cumulative number of negative wells for the dilution inferior or equal to the			5	10	15	20	25	30	35	40					
			%Positive well (N _{cum_pos} / N _{cum_pos+neg})			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00					
			50			INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	0				
			49			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				#DIV/0!	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0		#DIV/0!	
0	0	0	Dilution			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
			Number of negative wells			5	5	5	5	5	5	5	5					
			Cumulative number of positive wells for the dilution superior or equal to the			0	0	0	0	0	0	0	0					
			Cumulative number of negative wells for the dilution inferior or equal to the			5	10	15	20	25	30	35	40					
			%Positive well (N _{cum_pos} / N _{cum_pos+neg})			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00					
			50			INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	0				
			49			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				#DIV/0!	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0		#DIV/0!	
0	0	0	Dilution			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
			Number of negative wells			5	5	5	5	5	5	5	5					
			Cumulative number of positive wells for the dilution superior or equal to the			0	0	0	0	0	0	0	0					
			Cumulative number of negative wells for the dilution inferior or equal to the			5	10	15	20	25	30	35	40					
			%Positive well (N _{cum_pos} / N _{cum_pos+neg})			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00					
			50			INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	INF	0				
			49			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				#DIV/0!	

1.3 Onglet 3 Details of results et onglet 4 Results

[illegible][illegible]

2. Comparaison entre les désinfectants pour la cuve de traitements des effluents liquides

	Vetanos QG	Vetanos C50	Oxyaniolyse 9000
Composition	- Glutaraldehyde - Chlorure d'alkyl C12-16 diméthylbenzyl ammonium	- Percarbonate de sodium (47%, poudre) - Tétracétyléthylène diamine (25%, poudre) - Chlorure de N-alkyl(C12-14)-N-benzylN,N-diméthylammonium (0,023%, solution à 1 %) → Acide peracétique (1500±200ppm, solution à 1 %)	- Acide peracétique 1% - Peroxyde d'hydrogène - Acide acétique 300ppm, solution à 3%
Virucidie	En 30 min à 0,5% Virus Talfan, HCC, aphteux, de la Myxomatose, de la Peste Porcine, de la maladie de Newcastle (Norme NF T 72-180)	En 30 min à 1%, 10°C ECBO (+10°C et en conditions de saleté), Virus de la Peste Porcine Classique, Maladie de Newcastle (EN 14675)	En 5 min à 3 %, Poliovirus (En conditions de propreté : à 3 %, à 37°C en 5 min; à 0,5%, à 37°C en 30 min), HIV-1, PRV (virus modèle HBV, BVDV (virus modèle HCV), Herpes virus (EN 14476)
Etat et stabilité	Liquide - Stabilité pur : 2 ans	Poudre (Après reconstitution, stabilité 8 heures)	Liquide : stabilité 18 mois
Quantités injectées	5-6L	Minimum 33L	Maximum 30L
Dangers	Personnel Environnement	Manutention	Personnel

Vu, le Président du jury,

Christine HERRENKNECHT

Vu, le Directeur de thèse,

Virginie FERRE

Vu, le Directeur de l'UFR,

Virginie FERRE

Nom - Prénoms : Chevrier Céline, Anita, Hélène, Odette

Titre de la thèse : Validation de l'efficacité virucide de désinfectants

Résumé de la thèse :

Afin de garantir l'absence de contamination des produits et des locaux, les laboratoires manipulant des virus doivent valider l'efficacité virucide des désinfectants et des procédés associés utilisés dans les laboratoires de production.

Le sujet de cette thèse repose sur une expérience de stage, durant laquelle des protocoles de validation des désinfections des surfaces aérienne et par contact sur les virus manipulés ont été mis au point et réalisés.

La technique utilisée est celle des porte germes, qui sont des échantillons des surfaces représentatifs des surfaces les plus susceptibles de recevoir une contamination. Une réduction de 4 log (CCID₅₀) de la charge virale avant et après processus de désinfection est requise pour valider les désinfections. Les titrages sont réalisés par la méthode du CCID₅₀.

Un protocole de validation de l'efficacité virucide de la désinfection d'une cuve d'effluents liquides a également été rédigé.

Les méthodes statistiques de calculs des titres viraux Reed Muench et Spearman Karber ont été étudiées et des fichiers de calculs des titres ont été mis au point.

MOTS CLÉS

VALIDATION – EFFICACITE VIRUCIDE– DESINFECTION – REED MUENCH – SPEARMAN KARBER

JURY

PRÉSIDENT : Mme Christine HERRENKNECHT, Professeur en Chimie Analytique

**ASSEESSEURS : Mme Virginie FERRE, Professeur en Virologie
Mme Céline BRED, Docteur en pharmacie**

Adresse de l'auteur : La piltière, 85710 Bois de Cené