

Pôle Pharmacopée, qualité pharmaceutique des  
Médicaments chimiques, homéopathiques, à base  
de plantes et préparations

Dossier suivi par :

Natacha CHARLIER-BRET / Tél. : 01 55 87 41 34

E-mail : [natacha.charlier-bret@ansm.sante.fr](mailto:natacha.charlier-bret@ansm.sante.fr)

Agnès BERTOCCHI / Tél. : 01 55 87 42 25

E-mail : [agnes.bertocchi@ansm.sante.fr](mailto:agnes.bertocchi@ansm.sante.fr)

Numéro du document : 20220517\_CR\_CFP\_BIO 2

### Comité Français de Pharmacopée « Produits biologiques et thérapies innovantes [CFP BIO] » N°2

Séance du mardi 17 mai 2022 de 9h00 à 16h30

#### Ordre du jour

| Points prévus à l'ordre du jour   | Pour info/avis |
|---|----------------|
| <p><b>9h00 – Ouverture de la session en visioconférence</b></p> <p><b>I – 9h15 Début de la séance :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Introduction</li> <li>- Tour de table</li> <li>- Déclarations Publiques d'Intérêt</li> </ul>   |                |
| <p><b>II – 9h30 Pharmeduropa 34. 1 [Janvier-Mars 2022] :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>PA/PH/Exp.CTP/T(21)18 ANP</b> Titrage des progéniteurs hématopoïétiques humains formant colonie (2.7.28.) / pages 10-13 version française</li> <li>- <b>PA/PH/Exp.CTP/T(21)17ANP</b> Numération et viabilité des cellules nucléées (2.7.29.) / pages 15-22 version française</li> </ul> <p>Analyse des commentaires réceptionnés</p> | Pour Avis      |
| Délibération membres CFP et ANSM  | Pour Avis      |

| Points prévus à l'ordre du jour  | Pour info/avis |
|--|----------------|
| <b>III – 11h00 Points d'information :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retour sur les sujets du CFP N°1 du 14 octobre 2021</li> <li>- Groupe WAT : Microbiologie de l'eau (en présence de l'expert du groupe)<br/>Délibération membres CFP et ANSM</li> <li>- Présentation Pyrogènes sur les évolutions de la Pharmacopée Européenne</li> </ul> <b>12h30 – Pause déjeuner</b>  | Pour Avis      |
| <b>13h30 – Ouverture de la session en visioconférence</b>  |                |
| <b>IV – 13h30 Pharmeuropa 34. 2 [Avril-Juin 2022]</b><br>En présence d'un expert de ces groupes (non-membre) <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>PA/PH/Exp. BET/T (19) 13 ANP</b> : Test d'activation des monocytes (MAT) <b>2.6.30</b> / pages en français 17 à 33<br/>Présentation par l'expert<br/>Analyse des commentaires réceptionnés</li> <li>- <b>PA/PH/Exp. MYC/T (21) 1 ANP</b> : Mycoplasme <b>2.6.7</b> / pages en français 25 à 39<br/>Présentation par l'expert<br/>Analyse des commentaires réceptionnés</li> </ul> | Pour Avis      |
| Délibération membres CFP et ANSM   | Pour Avis      |
| <b>V – 15h30 Projet de demande de révision du chapitre 2.6.27 : Contrôle microbiologique des produits cellulaires</b><br><br>dans l'objectif d'harmoniser les délais d'incubation des essais de fertilité des milieux de culture sur ceux du chapitre 2.6.1/Stérilité : Cas particulier du <i>Bacteroides fragilis</i>   | Pour Avis      |
| Délibération membres CFP et ANSM   | Pour Avis      |
| <b>16h30 - Fin de la réunion</b>   |                |

## Participants

| Nom des participants           |        | Statut<br>(modérateur, membre, évaluateur, ...) | Présent                             |                                     | Absent /excusé |
|--------------------------------|--------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
|                                |        |   | Matin                               | AP<br>Midi                          |                |
| <b>Membres</b>                 |        |   |                                     |                                     |                |
| BLOUIN Véronique               | Membre | <input checked="" type="checkbox"/>             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                |
| COLIAT Pierre                  | Membre | <input checked="" type="checkbox"/>             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                |
| COLIN Thierry                  | Membre | <input checked="" type="checkbox"/>             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                |
| DAYAN-KENIGSBERG<br>Jacqueline | Membre | <input checked="" type="checkbox"/>             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                |
| DECOUSSER Jean-Winoc           | Membre | <input checked="" type="checkbox"/>             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                |
| DOUZIECH EYROLLES<br>Laurence  | Membre | <input checked="" type="checkbox"/>             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |                |
| DUFOUR Nicolas                 | Membre | <input type="checkbox"/>                        | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |                |

| Nom des participants      | Statut<br>(modérateur, membre, évaluateur, ...)               | Présent                             |                                     | Absent /excusé                      |
|---------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| DUVAL Raphaël             | Membre  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| FAIVRE Lionel             | Membre  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| LORTEAU Céline            | Membre  | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| MONTRIBOT-ALBINO Anthia   | Membre  | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| NIEL Philippe             | Membre  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| PERSON Jean-Marc          | Membre Et Président du Gp 15V ph Eur                          | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| PIROT Fabrice             | Membre  | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| RAGON Alain               | Membre du CFP Chimie / Invité                                 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| <b>Autres</b>             |   |                                     |                                     |                                     |
| BONNEVAY Thierry          | Expert gp BET et MYC Ph Eur<br>Partie prenante Sanofi Pasteur | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| <b>ANSM</b>               |   |                                     |                                     |                                     |
| BERTOCCHI Agnès           | Evaluateur scientifique pharmacopée DMS Pôle2                 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| CHARLIER-BRET Natacha     | Evaluateur scientifique pharmacopée DMS Pôle2                 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| CLOSSON- CARELLA Violaine | Référente TC TG DEI et Présidente gp CTP Ph Eur               | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| GARINOT Olivier           | Evaluateur DEI CPSE et expert gp 6 PhEur                      | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            |
| GARCIA Dominique          | Evaluateur CTROL et expert gp 15 Ph Eur                       | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| MAITENAZ Solène           | Evaluateur DEI Pôle1et expert gp CTP Ph Eur                   | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| MORGEAUX Sylvie           | Evaluateur CTROL Lyon vaccins                                 | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PANTERNE Béatrice         | Inspecteur Bio DI   | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PASCO Muriel              | Chef de pôle DMS Pôle 2                                       | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PLANA Michèle             | Scientifique CTROL Microbio et expert gp BET MYC de la Ph Eur | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| RIDOUX Valérie            | Scientifique CTROL Montp et expert gp GTP Ph Eur              | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            |
| SALOMON Valérie           | Directrice DMS  | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> |

## I. Introduction

Une rapide introduction sur l'ordre du jour est faite.

### - Point sur les DPI et les situations de conflits d'intérêts

Aucun lien n'a été identifié pour les membres et les experts

- **Engagement de confidentialité et droit de cession à la voix** / réception pour un nouveau membre

Il est rappelé que la session est enregistrée.

### - Tour de table

Un tour de table des participants a été effectué. Un départ et un nouveau membre ont été annoncés. 12 membres sur 14 étaient présents (2 excusés). Un expert du CFP Chimie était invité pour le sujet sur le contrôle microbiologique de l'eau pour hémodialyse.

Le quorum est donc bien atteint.

Des participants ANSM étaient également présents.

## II. Dossiers thématiques : Pharmeuropa 34. 1 [Janvier - Mars 2022]

**Dossier 1 : PA/PH/Exp.CTP/T(21) 18 ANP** Titrage des progéniteurs hématopoïétiques humains formant colonie (2.7.28.) / Pages 10-13 version française

Analyse des commentaires réceptionnés

### « NOTE RELATIVE AU CHAPITRE GÉNÉRAL

Ce chapitre général a été mis à jour pour :

- inclure les systèmes automatisés,
- améliorer la standardisation de la procédure analytique (p. ex. la standardiser en utilisant le nombre de cellulesensemencées et le nombre de cellules CD34/CD45+ensemencées par boîte),
- introduire une description plus détaillée des exigences de validation,
- tenir compte de la possibilité d'utiliser un milieu ne contenant pas de sérum mais des facteurs de croissance recombinants,
- clarifier la définition des cellules formant colonie et de leurs capacités fonctionnelles. »

### a) Paragraphe 3. ASSURANCE QUALITÉ DU TITRAGE DES CFC (Cellules Formant Colonie)

⇒ Traduction non exacte de l'anglais "Therefore, serum-free medium and recombinant growth factors are recommended if suitable".

Il y a nécessité d'ajouter des facteurs de croissance humains recombinants.

Proposition de remplacer la phrase comme suit :

« Par conséquent, il est recommandé, si possible, d'utiliser un milieu sans sérum et contenant des facteurs de croissance humains recombinants.

Cet exemple montre l'importance de relire la version française pendant les enquêtes publiques.

⇒ Remarque réceptionnée d'un prestataire de l'industrie qui souligne un manque de cohérence entre 2 paragraphes concernant la variabilité. Il est écrit **page 4 lignes 2 et 3** « *La variabilité du titrage des CFC est principalement due à l'utilisation de matériaux non caractérisés (sérum bovin fœtal ou sérum-albumine bovine, par exemple).* » et en **paragraphe 5/ validation de la procédure analytique** dans « Principaux points à prendre en compte avant de valider une procédure analytique manuelle » est écrit en premier : « *Le caractère subjectif d'une procédure analytique manuelle peut entraîner une variation significative des résultats, car l'exactitude et la répétabilité dépendent, en grande partie, de l'expertise de l'opérateur* »

Paragraphe 3 : Proposition de retirer "[principalement](#)" et de modifier la phrase comme suit : « [Une des sources de](#) variabilité du titrage des CFC est due à l'utilisation de matériaux non caractérisés »

La version actuelle anglaise est:

« One of the main sources of variability in the CFC assay is the use of undefined materials » à remplacer par "[One of the sources...](#) »

Paragraphe 5 (page 6, ligne 7 version française) **proposition de retirer** le « caractère subjectif » et de remplacer par « [Une procédure analytique manuelle](#) peut entraîner une variation significative des résultats .... »

## **b) Paragraphe 4. TITRAGE DES CFC**

### **4.3. ENSEMENCEMENT**

Information réceptionnée d'un prestataire de l'industrie pharmaceutique qui mentionne que ces valeurs peuvent être étendues en fonction des indications fournisseurs lors de l'utilisation de systèmes automatisés et dans le cadre d'une gamme d'ensemencement validée.

Proposition de rajouter une phrase concernant les systèmes automatisés : «[En cas d'utilisation de systèmes automatisés, la gamme d'ensemencement peut varier en fonction des indications fournisseurs](#)»

### **4.4. COMPTAGE ET IDENTIFICATION DES COLONIES**

« *Une concentration de 50 cellules par colonie* » ne convient pas.

Proposition d'une nouvelle rédaction pour plus de précision [à reprendre sur la version anglaise]  
« [Seules les colonies contenant au moins 50 cellules sont prises en compte pour le comptage](#) »

### **4.5. EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Problème de compréhension de la version française : Reprendre la formulation de l'ancien texte « Le nombre moyen de colonies est ensuite rapporté à  $10^4$  ou  $10^5$  cellules nucléées viables mises en culture »

Proposition de compléter comme suit : « [Le nombre moyen](#) de colonies est ensuite rapporté à  $10^4$  ou  $10^5$  cellules nucléées viables initialement mises en culture »

Commentaire issu d'un responsable qualité d'une unité de thérapie cellulaire :

L'indice clonogénique, lié au nombre de cellules CD34+/ CD45 est un indice largement utilisé dans les spécifications produits. L'ANSM dans la pharmacopée française « Recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFU-GM » recommande cet indice clonogénique appelé Test clonogénique dans la monographie française.

La mise en culture est réalisée en CD34/45+, ainsi le calcul de la moyenne de CFC rapportée par  $10^4$ - $10^5$  cellules nucléées viables initialement mises en culture semble inutile vis-à-vis du calcul de l'indice clonogénique proposé ensuite.

Proposition de remplacer la phrase « Cette moyenne est ensuite rapportée par  $10^4$ - $10^5$  cellules nucléées viables initialement mises en culture. » par « [Le nombre moyen de colonies est ensuite rapporté par rapport aux cellules ensemencées, notamment les cellules CD34/CD45+ viables.](#) »  
Ainsi, un indice clonogénique (IC) peut être calculé ... »

La mise en culture inclut systématiquement la prise en compte de la viabilité cellulaire lorsque l'on ensemence avec un nombre précis de cellules CD34/ CD45+ De plus, les chapitres 2.7.24 (cytométrie en flux) et 2.7.23 (numération CD34/ CD45+ dans les produits hématopoïétiques) ainsi que la méthode **ISHAGE** préconisent l'utilisation d'un marqueur de viabilité.

Proposition d'ajouter le terme « [viable](#) » à la désignation « nombre total de cellules CD34/ CD45+ [viables](#)».

### c) Paragraphe 6. GLOSSAIRE :

- Erreur dans les versions française et anglaise : remplacer « CFU-M : abréviation de « *colony-forming unit – megakaryocytic progenitors* » (unité formant colonie – progéniteurs mégacaryocytaires) » à remplacer par « unité formant colonie – progéniteurs [monocytaires](#) » « colony-forming unit– [monocytes](#) progenitors »
- Rajouter à coté de PH, « [PH CD34/CD45+](#) progéniteurs hématopoïétiques CD34/CD45+ » sous entendu "viable"

### **Dossier 2 : PA/PH/Exp.CTP/T(21)17ANP** Numération et viabilité des cellules nucléées (2.7.29.) / Pages 15-22 version française

Analyse des commentaires réceptionnés

#### « **NOTE RELATIVE AU CHAPITRE GÉNÉRAL**

*Le chapitre révisé inclut les nouvelles technologies automatisées de numération cellulaire.*

*Les principaux changements apportés au chapitre sont les suivants :*

- *plan du chapitre : les méthodes manuelles et automatisées font désormais l'objet de deux sections distinctes ;*
- *une section consacrée à la préparation des échantillons et aux conditions de l'essai a été introduite, afin d'améliorer la standardisation de la méthode ;*
- *un tableau résume les informations relatives aux colorants fréquemment utilisés ; les technologies d'imagerie cytométrique sont désormais décrites ;*
- *un tableau résume les principales caractéristiques de la cytométrie en flux et de la cytométrie par imagerie, qui sont les techniques automatisées les plus fréquemment utilisées pour la numération cellulaire et la détermination de la viabilité cellulaire ;*
- *une section consacrée à la validation a été introduite ; elle correspond à la pratique scientifique reconnue et aux recommandations actuelles relatives à la validation analytique, notamment le guideline ICH Q2(R1). »*

#### **a) 2. CONSIDERATIONS TECHNIQUES**

##### **2.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET CONDITIONS DE L'ESSAI**

Dans le cadre de suspensions cellulaires, le terme « homogénéisé » est plus approprié que le terme « mélangé »

Remplacer le terme « mélangé » par « [homogénéisé](#) » : « Les échantillons doivent être soigneusement [homogénéisés](#) »

##### **2.2. MÉTHODES PAR COLORATION D'EXCLUSION**

Remarques d'un responsable contrôle qualité d'une unité de thérapie cellulaire : Les longueurs d'ondes d'excitation, d'émission ainsi que les méthodes ne sont pas exhaustives. Ceci peut entraîner des confusions et favoriser des fournisseurs.

- 7-AAD/IP : peuvent également être excités à 561 nm par un laser jaune qui présentent d'ailleurs de meilleurs résultats d'émission. L'utilisation de 488 nm est liée à l'usage par un laser bleu car plus répandu.

- Proposition de retirer la description des propriétés spectrales et les colonnes longueur d'onde d'excitation et d'émission. : « Le tableau 2.7.29.-1 décrit brièvement les ~~propriétés spectrales des~~ colorants fréquemment utilisés, leur mode d'action et les méthodes dans lesquelles ils sont employés. »

- Rajout dans le tableau pour DAPI et acridine orange de la « [cytométrie en flux](#) »

#### **b) 3. NUMERATION CELLULAIRE ET DETERMINATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE MANUELLES**

##### **3.1. COMPTAGE DES CELLULES**

- Il est décrit uniquement les hémocytomètres composés d'une lame épaisse et d'une lamelle réutilisable. D'autres formats, notamment à usage unique, sont également disponibles et qui ne nécessitent pas la mise en place de la lamelle.

Ajouter une phrase : « [l'utilisation de dispositifs à usage unique est possible.](#) »

- Il serait utile de préciser la nécessité de laisser sédimenter les cellules avant la lecture.

Proposition de compléter la phrase comme suit : « Placez minutieusement l'hémocytomètre sous le microscope, et effectuez la mise au point [une fois les cellules sédimentées](#) » complétez en parallèle la version anglaise

## 5. VALIDATION DE LA PROCEDURE

### Linéarité et étendue de mesure

#### Commentaire reçu d'un responsable qualité d'une unité de thérapie cellulaire :

Il est proposé que la linéarité de la concentration cellulaire soit réalisée en effectuant des dilutions au 1/2, cependant le résultat de viabilité étant en pourcentage, la dilution des échantillons n'entraînera pas de modification de cette valeur.

Proposition de rajouter un exemple applicable pour réaliser la linéarité de la viabilité au même titre qu'il y a un exemple pour le comptage cellulaire. Un mélange de cellules viables et mortes à différents ratios (ex vivant : Mort 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100) pourrait être proposé.

## III Dossiers thématiques : Points d'information

**Point 1 : Retour sur les sujets du CFP du 14 octobre 2021** : Les demandes de révision sont à l'étude à la Pharmacopée Européenne

**Point 2 : Groupe WAT (water/eau) et DIA (Dialyse) de la Ph Eur : Microbiologie de l'eau (en présence de l'expert français des groupes WAT et DIA)**

Demande de révision concernant la monographie [Eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse \(1167\)](#)

Un document de travail accompagné de plusieurs références ont été envoyés aux membres avant le comité pour faciliter les débats. Ces références concernaient des textes réglementaires et des articles scientifiques. Des extraits de l'USP et des normes type AFNOR ou NF EN ISO ont été intégrés au document de travail compte tenu du mode de diffusion particulier de ces documents normatifs.

**Contexte** : L'eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse est à considérer comme un cas particulier : Plusieurs litres de dialysat obtenus par dilution « en ligne » de solutions concentrées par de l'eau pour hémodialyse, sont mis en contact avec le sang du patient (par rétrofiltration interne dans le dialyseur situé sur la circulation extra-corporelle) pendant chaque séance, 3 fois par semaine et ce pendant des années.

Une séance de Dialyse : 120 litres d'eau (débit de 500 ml/min).

Il est estimé une consommation de 19m<sup>3</sup> d'eau par an contre 0,6m<sup>3</sup> par an pour un individu sain (soit 360 litres par semaine).

Le contrôle microbiologique prend donc toute son importance. Le contrôle de l'eau d'hémodialyse, en France, est soumis bien évidemment à la législation des dispositifs médicaux et de son marquage CE européen mais aussi aux circulaires référencées ci-après qui expliquent comment contrôler cette eau et à quelle périodicité par rapport au nombre de dialyse. Il apparaît que la Ph Eur ne propose pas la même méthodologie de contrôle.

Les germes de l'eau sont mieux retrouvés à température ambiante 20-22°C qu'à 30-35°C, la littérature l'atteste et ceci est par ailleurs repris dans la norme NF EN ISO 23500 ainsi que dans les 2 circulaires d'application obligatoire en France.

1 - Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°2000-337 du 20 juin 2000 - Guide pour la production d'eau pour hémodialyse

2 - Circulaire DHOS/E4/AFSSAPS/DGS/2007/52 du 30 janvier 2007 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé

Dans la brochure « **Eaux des établissements de santé** : qualité de l'eau aux points d'usage, partie hémodialyse et hémodiafiltration » (transmise aux membres après le comité) est écrit :

« A partir d'une eau potable ,le but du traitement est d'améliorer à la fois les qualités physico-chimiques et microbiologiques de l'eau pour répondre, au minimum, aux critères définis par la monographie de l'eau pour hémodialyse de la Pharmacopée Européenne. **Paradoxalement**, les indications de cette monographie sont fournies à titre indicatif et ne constituent pas des normes opposables car ce texte européen tient compte de la politique sanitaire des différents Etats membres. »

Il y a donc en France un souci d'harmonisation des normes avec ce qui est préconisé dans la Pharmacopée Européenne. Ce qui est proposé dans les circulaires françaises est, selon les experts membres du CFP Bio, la meilleure façon de faire quand bien même une incubation à deux températures serait le plus proche de l'excellence scientifique (voir plus loin dans le document).

Deux parties à la demande de révision ont été décidées :

a) **1<sup>ère</sup> partie de la demande de révision :**

La limite (DGAT/ Dénombrement des germes aérobies totaux), dans la monographie est :

« 100 UFC/g »,

Il est demandé le remplacement des grammes en millilitres : 100 UFC/ml car c'est un liquide et afin d'éviter l'interprétation mentionnée dans le chapitre 2.6.12 [10<sup>2</sup> UFC : nombre maximal acceptable = 200] et d'harmoniser avec d'autres documents réglementaires ou de recommandations, de rajouter le sigle « inférieur à » : « <100 UFC/ml ».

Proposition de remplacer les grammes par des millilitres : 100 UFC/ml car c'est un liquide et de rajouter le symbole « inférieur à » : <100 UFC/ml

b) **2<sup>ème</sup> partie de la demande de révision : révision des températures d'incubation.**

Un membre du CFP informe que l'eau potable du réseau est testée à 2 températures : 22°C (limite à 100 UFC) et 36°C (limite à 20 UFC) : il s'agit de la recherche de germes aérobies revivifiables à 22°C et 36°C, visibles dans les 2 tableaux ci-dessous extraits d'un rapport de l'AFSSA (maintenant ANSES) « Appui scientifique et technique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments pour la révision de la directive européenne 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine juillet 2009 »

**Tableau 1**  
Contenu des analyses microbiologiques types du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution

| Paramètres   | RESSOURCE |    | POINT DE MISE EN DISTRIBUTION   |    | DISTRIBUTION (au robinet du consommateur) |    |
|--|-----------|----|---|----|---|----|
|  | RP        | RS | P1  | P2 | D1  | D2 |
| <i>E. coli</i>   | x         | x  | x   |    | x   |    |
| Entérocoques intestinaux                                       | x         | x  | x   |    | x   |    |
| Bactéries coliformes   |           |    | x   |    | x   |    |
| Spores d'ARS   |           |    | x (eaux d'origine superficielle ou influencées par une eau d'origine superficielle) |    |   |    |
| Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22°C et 36°C |           |    |   |    | x   |    |
| Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> et kystes de <i>Giardia</i> |           |    | x (seulement si présence de spores d'ASR ou si turbidité > 0,5 NFU)                 |    |   |    |

**Tableau 2**  
**Contenu des analyses microbiologiques types du contrôle sanitaire pour les eaux conditionnées,**  
**à l'exclusion des eaux minérales naturelles**

| Paramètres   | Analyse à l'émergence | Analyse des eaux conditionnées |
|--|-----------------------|--------------------------------|
| <i>E. coli</i>   | x                     | x                              |
| Entérocoques intestinaux                                       | x                     | x                              |
| Bactéries coliformes   | x                     | x                              |
| Spores d'ARS   | x                     | x                              |
| Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22°C et 36°C | x                     | x                              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                  | x                     | x                              |

La monographie 1167 mentionne uniquement les critères du DGAT/ Dénombrement des germes aérobies totaux, mais ne comporte pas de paragraphe spécifique de contrôle microbiologique.

La monographie de l'Eau pour préparation injectable (0169) préconise la filtration sur membrane 0,45 µm de 200 mL d'eau pour préparations injectables en vrac et l'utilisation du milieu gélosé R2A, incubé à 30-35 °C pendant au moins 5 jours.

Après discussion il apparaît qu'une incubation de même ordre que pour l'eau « distribuée » serait une bonne chose c'est-à-dire deux températures.

La température d'incubation présente dans la Pharmacopée Européenne (30 - 35 °C) n'est pas celle à privilégier selon les experts du CFP Bio qui s'accordent sur le fait que s'il faut privilégier une seule température d'incubation c'est celle à faible température ou température ambiante (22°C).

Pour rappel, les **circulaires** citées en introduction du sujet, préconisent les conditions suivantes

Milieux pauvres : TGEA ou R2A

Température : 20 – 22°C

Durée minimale : 7 jours

**La norme AFNOR NF S 93-315** de novembre 2008. « Fluides pour hémodialyse et recommandations aux utilisateurs » recommande également les milieux TGEA ou R2A à 20-22°C pendant 7 jours.

Deux articles ont été consultés pour compléter l'argumentaire :

- **Slavica Ciric & al, Low nutrient R2A medium in monitoring microbiological quality of drinking water, chemical industry & chemical Engineering quarterly 16 (1) 39-45 (2010)**

Cet article concerne la comparaison du milieu R2A à 20°C et à 37°C sur 250 échantillons prélevés pendant une année.

Etude de la croissance à 48, 72, 120 et 168 heures

Résultat : 10 fois plus de colonies sur R2A 20°C 168h qu'à 37°C

(Voir les diagrammes dans l'article)

Conclusions : Préconise une inoculation R2A 5 à 7 jours à température ambiante

- **Tim Sandle - Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system- A metadata study – Symbiosis 2015**

Cet article est un état des lieux des genres et espèces bactériennes retrouvées dans l'eau à partir de 1151 isolats retrouvés en culture et identifiés. Certains germes sont connus pour croître à des températures plus basses (ex *P. fluorescens*)

**La norme NF EN ISO 23500** de mars 2019 mentionne un meilleur recouvrement à 17-23°C mais mentionne également la TSA à 35 37°C. Cette proposition additionnelle est reprise d'un article de **J A B Maltais & al, comparison of techniques for culture of dialysis water and fluid Hemodialysis international 2017 21: 197-205**. Dans cette article les auteurs comparent R2A et TGEA 22°C et TSA 35°C et bien qu'ils s'accordent sur la différence entre les deux méthodes (TSA / TGEA R2A), ils concluent à l'absence de différences significatives.

Tableau 3 - Techniques de culture

| Milieu de culture                                 | Température d'incubation | Temps d'incubation |
|---|--------------------------|--------------------|
| Gélose glucose tryptone (TGEA)                    | 17 °C à 23 °C            | 7 jours            |
| Gélose de Reasoner n° 2 (R2A)                     | 17 °C à 23 °C            | 7 jours            |
| Gélose de Sabouraud ou gélose à l'extrait de malt | 17 °C à 23 °C            | 7 jours            |
| Gélose trypticase soja (TSA) <sup>a</sup>         | 35 °C à 37 °C            | 48 h               |

50 UFC/ml est défini comme le taux d'alerte nécessitant une action et 25 comme une alerte ne nécessitant pas d'action à proprement parlé mais un suivi. Dans l'étude, le TSA est utilisé sur des échantillons dont le nombre de bactéries a atteint **le seuil d'intervention** de 50 UFC/mL. A ce seuil, signe d'une contamination importante, la mise en culture TSA 35°C peut être utile pour prendre rapidement des mesures pour réduire la charge microbienne. A ce niveau de contamination, il est imaginable que tout pourra croire quel que soit la procédure utilisée.

En revanche, lorsqu'il y a un faible nombre de colonies ou des bactéries d'origine hydrique à croissance lente associées à un biofilm résiduel, il est important d'utiliser un milieu TGEA ou R2A à 22°C sous peine de ne rien retrouver en TSA.

Le contrôle de la ligne de production d'eau dans sa totalité et ce de manière périodique tel que réalisé en France a montré son intérêt. Maitriser l'ensemble du processus par un programme de maîtrise de risque et ce en dehors de l'urgence est le point clef pour éviter un risque de contamination microbienne au patient hémodialysé. Pour bien comprendre, un expert expose l'exemple des endoscopes qui sont contrôlés, non pas pour le patient « lambda » qui vient ce jour subir une endoscopie mais dans le cadre d'un programme de contrôle de maîtrise du risque.

Pour la gestion de l'eau pour hémodialyse, le fait d'attendre 5 jours n'est donc *in fine* pas un problème car ce n'est pas une analyse microbiologique faite dans l'urgence.

Pour faciliter la démarche, Il est au final décidé une première étape sur la seule « eau pour hémodialyse ». Il est décidé de demander une révision de la monographie 1167 « Eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse » et d'y rajouter un paragraphe contrôle microbiologique dans lequel sera préconisé un contrôle sur milieu R2A à 22°C.

Proposition de révision de la monographie **Eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse (1167)** pour y intégrer un chapitre microbiologie mentionnant le milieu R2A à 20 22°C afin d'être cohérent avec les circulaires appliquées en France et la norme NF EN ISO 23500 de mars 2019.

La question de continuer les contrôles via la culture microbienne pour le contrôle de l'eau a été évoquée. Des technologies basées par exemple sur la cytométrie de flux en phase solide, l'ATPmétrie seront certainement des techniques intéressantes à l'avenir. Ces techniques avaient été évoquées au CFP Bio d'octobre 2021.

**Point 3** ; Présentation sur l'évolution à la Pharmacopée de la détection des Pyrogènes afin d'introduire les sujets de l'après-midi.

Une présentation préparée par l'expert ANSM (gp BET de la Ph Eur) de la direction des contrôles et présentée par l'équipe pharmacopée a été faite sur la recherche des pyrogènes (2.6.8). Cette recherche sera supprimée de la Pharmacopée Européenne en janvier 2026 et devra être remplacée selon les cas par le test d'activation des monocytes (2.6.30), la recherche d'endotoxine classique (2.6.14) ou par le facteur recombinant C (2.6.32). Ces évolutions de techniques permettent de limiter les tests sur animaux (règle des 3Rs).

Toutes les informations ont été reprises dans la présentation de l'expert externe au gp BET de la Ph Eur en deuxième partie du comité.

- Reprise à 13h30 -

## IV Dossiers au Pharmeuropa 34. 2 [Avril - Juin 2022]

En présence d'un expert français (non membre du CFP) nommé dans les groupes de la Pharmacopée Européenne BET (endotoxines) et MYC (mycoplasmes).

**Dossier 1 : PA/PH/Exp. BET/T (19) 13 ANP** : Essai d'activation des monocytes (MAT) 2.6.30 / pages en français 17 à 33

L'expert invité a présenté un power point très complet sur le sujet et son évolution.

Le test « MAT », Essai d'activation des monocytes, est le test *in vitro* de remplacement du test des pyrogènes *in vivo* sur lapin. Ce dernier devant être supprimé d'ici 2026, le test MAT sera le seul en vigueur pour la détection de l'ensemble des pyrogènes. Ce test est encore peu utilisé en routine par les industriels et reste compliqué à mettre en œuvre. Il est nécessaire de disposer de pyrogènes non endotoxines de référence.

Les commentaires réceptionnés ont été analysés mais il est à noter que d'autres commentaires peuvent être transmis à l'ANP fr jusqu'à fin juin 2022.

Proposition de demander le remplacement dans le titre « Essai » par « Test » plus explicite, plus proche de la version anglaise et surtout de l'acronyme utilisé : MAT (Test d'Activation des Monocytes).

- **Définitions**, Page 4 lignes 37-38 : Dans la phrase : « ... d'un étalon d'endotoxine étalonné par rapport à l'étalon international... » Remplacer « étalonné » par « validé ».

Proposition de corriger comme suit « La solution mère étalon d'endotoxine est préparée à partir d'un étalon d'endotoxine validé par rapport à l'étalon international »

- **6-4 Interférences dans le système de détection**. Page 9 lignes 13 à 15 :

**Question de fond** : Pourquoi mentionner « ne doivent pas s'écarter de plus de 20 pour cent de la densité optique, par exemple. », ce paragraphe concerne la vérification de l'absence d'interférence mais sans fixer de limites " opposables" n'y a-t-il pas de risque d'avoir des écarts encore plus importants ?

**Question de forme** : La version anglaise est : « *The agreement between the results obtained from a dilution series of the standard for the chosen read-out, in the presence and absence of the preparation to be examined, is to be within, for example  $\pm 20$  per cent of the optical density.* »

Proposition d'être plus proche du texte anglais :

« Les résultats obtenus avec une série de dilutions de l'étalon du marqueur choisi, en la présence et en l'absence de la préparation à examiner doit se situer, par exemple, à  $\pm 20$  % de la densité optique »

### - Recommandations pour la réalisation de l'essai

**Page 14, lignes 34-35** : est écrit : « *Dans le MAT, les réponses à l'étalon d'endotoxine disparaissent généralement sur une gamme de dilutions d'environ 1 log10 et les réponses obtenues vis-à-vis de produits contaminés par des contaminants non endotoxiques (seuls ou associés à des endotoxines) suivent souvent, lorsqu'est testée leur capacité à stimuler les monocytes, des courbes dose-réponse à très forte pente, généralement sur l'intervalle de 1 ou 2 étapes de dilution seulement.* ».

Le mot « étapes » signifie-t-il « facteurs » (de dilution) ? Proposition de remplacer par « 1 ou 2 facteurs de dilution seulement »

Proposition de remplacer par : « *Dans le MAT, les réponses à l'étalon d'endotoxine disparaissent généralement sur une gamme de dilutions d'environ 1 log10 et les réponses obtenues vis-à-vis de produits contaminés par des contaminants non endotoxiques (seuls ou associés à des endotoxines)* »

suivent souvent, lorsqu'est testée leur capacité à stimuler les monocytes, des courbes dose-réponse à très forte pente, généralement sur l'intervalle de 1 ou 2 [facteurs de dilution](#) seulement. »

- **2-3. Calcul de la Concentration Limite en Contaminants** / Tableau 2.6.30.-4

**Page 16, ligne 21** : il est écrit « Des valeurs de K sont proposées dans le tableau 2.6.30.-4. », Ces valeurs étant définies par rapport à la voie d'administration et utilisées telles quelles, le terme « proposées » n'est pas adapté.

Proposition de remplacer par « [Les](#) valeurs de K sont [indiquées](#) dans le tableau 2.6.30.-4. »

**Dossier 2** : PA/PH/Exp. MYC/T (21) 1 ANP : Mycoplasme 2.6.7 / pages en français 25 à 39

L'expert invité a présenté le chapitre, son historique et son évolution de façon détaillée. Ce chapitre a été largement révisé.

Il a été procédé à l'analyse des commentaires réceptionnés. Comme le sujet précédant, le chapitre est encore en enquête publique jusque fin juin 2022 et d'autres commentaires seront certainement transmis à l'ANP.

a) **2.7 Milieux recommandés pour la méthode par culture. / Milieu solide** Page 5, lignes 28-29 :

Dans la version française, Il est fait état de « gélose » et de « gélose purifiée » « [...] 15 g/L de gélose ». Idem page 5, ligne 47 et autres occurrences dans le document.

Le terme « gélose » est trop imprécis, faisant référence ici à l'agent gélifiant « générique ». Ce terme désigne le résultat de cet agent gélifiant (une « gélose », *i.e.* le milieu de culture solide). Cet agent gélifiant peut être de différente nature (agar-agar, agar ou agarose en première approximation) selon le degré de pureté requis.

La version anglaise du document utilise sans ambiguïté le terme « [Agar](#) ». Il convient donc de se mettre en accord.

Proposition de remplacer le terme « Gélose » par « [Agar](#) » et plus loin par « [Agar purifié](#) »

b) **3.3. Mode opératoire** : Page 9, ligne 5-6 :

Dans la version française est écrit « Si le bisbenzimidazole est utilisé comme colorant un filtre de lumière excitatrice 330 nm/380 nm et un filtre de lumière excitatrice non absorbée LP 440 nm conviennent ».

La version anglaise est : « for bisbenzimidazole stain a 330 nm/380 nm excitation filter and an LP 440 nm barrier filter are suitable »

Après excitation du fluorophore (Hoechst 33342 ici), il s'agit de recueillir le rayonnement émis qui n'est aucunement la lumière excitatrice non absorbée mais celle émise par le fluorochrome (pic d'émission 460 nm ici).

Proposition de revoir la version française et de modifier la phrase comme suit : « Si le bisbenzimidazole est utilisé comme colorant un filtre de lumière excitatrice 330 nm/380 nm [et un filtre passe-haut type LP 440 nm conviennent](#) ».

## V Dossier thématique : projet de demande de révision du chapitre 2.6.27 / Contrôle microbiologique des produits cellulaires

L'objectif de la révision du chapitre 2.6.27 est d'harmoniser les délais d'incubation des essais de fertilité des milieux de culture sur ceux du chapitre 2.6.1/Stérilité : Cas particulier du *Bacteroides fragilis*

L'essai de fertilité, entre les chapitres 2.6.27 et 2.6.1 n'a comme différence que l'ajout d'une souche anaérobie supplémentaire dans le chapitre 2.6.27 : *Bacteroides fragilis*. La démarche argumentaire a donc été de savoir si *B fragilis* pouvait être retrouvé en 3 jours (et non plus en 7 jours, exigence actuelle du 2.6.27)

Un argumentaire a été présenté par l'équipe pharmacopée en séance, celui-ci comprenait les éléments suivants :

- Extrait d'une étude collaborative de l'afssaps réalisée en 2005 pour la bactérie *Bacteroides fragilis*  
A partir des données brutes (pas d'information détaillées), il a été constaté que sur 39 laboratoires ayant identifiés *Bacteroides fragilis*, 36 laboratoires l'ont retrouvé dans les 3 jours ( $\leq 72h$ ).  
2 dépassaient de peu : 74 heures et 3,1 jours  
1 sur un système Signal Oxoid le retrouvait en 120 jours
- Extrait d'une étude collaborative datée de mai 2005 (afssaps- direction des contrôles) avec une trentaine de laboratoires qui ont reçus des échantillons de cellules mononuclées de sang placentaire contaminées par *B fragilis* à  $2.10^4/ml$  :

Les résultats concernaient 29 utilisateurs de milieux pour hémocultures /dont 13 Bact Alert, 9 Bactec et 7 hémocultures non automatisées

**Hémoculture**

afssaps 

• Variabilité entre méthodes d'hémoculture

| Délai moyen en heures  | Candida glabrata | Acinetobacter 15 UFC | Acinetobacter 150 UFC | Bacteroides fragilis |
|------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>BACT ALERT</b>      | 26               | 31                   | 26                    | 49                   |
| <b>BACTEC</b>          | 102              | 18                   | 14                    | 18                   |
| <b>Non automatisée</b> | 39               | 101                  | 85                    | 43                   |

- Les notices des fabricants et les performances annoncées pour *B fragilis*
- Des publications non exhaustives (en possession de l'équipe pharmacopée) :

**D. Hocquet et col**, Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products, Cytotherapy, 2013; 0: 1-7

The aim of this study was to assess the ability of the Bactec system (Becton-Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) to detect the microorganisms that could contaminate cell therapy products.

Table IV. Microorganisms identified in 250 contaminated cell therapy products (of 3,107 tested at University Hospital of Besançon, France) and their mean time of detection.

| Microorganisms                              | No. contaminated cell therapy products | Mean time of detection (h) |
|---|--|----------------------------|
| <i>Bacteroides</i> spp.                     | 87                                     | 34.6                       |
| Coagulase-negative<br><i>Staphylococcus</i> | 56                                     | 33.7                       |
| <i>Corynebacterium</i> spp.                 | 28                                     | 107.1                      |

**C Mastronardi & al**, Evaluation of the sterility testing process of hematopoietic stem cells at Canadian Blood Services, TRANSFUSION Volume 52, August 2012

| Organism              | HSC component* | Recovered concentration (CFUs/mL) | BacT/ALERT culture bottle: mean detection time (hr) |          |          |
|-----------------------|----------------|-----------------------------------|---|----------|----------|
|                       |                |                                   | BPA   | BPN      | SA       |
| <i>S. epidermidis</i> | Apheresis      | 240                               | 15.0  | 16.8     | 17.1     |
|                       | Marrow         | 500                               | 15.6  | 14.8     | 18.2     |
|                       | Cord           | 475                               | 17.9  | 16.3     | 23.3     |
|                       | Fresh cord     | 195                               | 33.7  | 21.5     | 39.0     |
|                       | TSB (control)  | 490                               | 17.8  | 14.2     | 21.0     |
| <i>P. aeruginosa</i>  | Apheresis      | 30                                | 15.6  | Negative | 8.2      |
|                       | Marrow         | 75                                | 15.7  | 15.4     | 8.2      |
|                       | Cord           | 155                               | 15.6  | Negative | 11.0     |
|                       | Fresh cord     | 180                               | 15.7  | 15.5     | 11.0     |
|                       | TSB (control)  | 105                               | 15.7  | 13.4†    | 8.2      |
| <i>B. cereus</i>      | Apheresis      | ≈10 <sup>3</sup>                  | 7.4   | 8.5      | 3.7      |
|                       | Marrow         | ≈10 <sup>3</sup>                  | 7.4   | 8.0      | 3.7      |
|                       | Cord           | ≈10 <sup>3</sup>                  | 8.9   | 9.1      | 5.1      |
|                       | Fresh cord     | ≈10 <sup>3</sup>                  | 12.7  | 13.8     | 9.6      |
|                       | TSB (control)  | ≈10 <sup>3</sup>                  | 7.6   | 7.9      | 3.7      |
| <i>B. fragilis</i>    | Apheresis      | 40                                | Negative  | 22.4     | Negative |
|                       | Marrow         | 145                               | Negative  | 43.8     | Negative |
|                       | Cord           | 75                                | Negative  | 39.8     | Negative |
|                       | Fresh cord     | 65                                | Negative  | 61.6     | Negative |
|                       | TSB (control)  | 65                                | Negative  | 53.8     | Negative |
| <i>C. albicans</i>    | Apheresis      | 65                                | 26.8  | ND‡      | 19.9     |
|                       | Marrow         | 40                                | 26.4  | ND‡      | 19.1     |
|                       | Cord           | 55                                | 26.9  | ND‡      | 18.6     |
|                       | Fresh cord     | 60                                | 27.6  | 24.6     | 19.2     |
|                       | TSB (control)  | 35                                | 26.2  | 24.1     | 19.3     |

\* Cryopreserved product unless specified otherwise.  
† TSB spiked with *P. aeruginosa* was detected in only one of the two duplicate BPN bottles.  
‡ Not detected.

Après échanges avec les membres des CFP Bio, le retour de leur expérience a été que *B fragilis* ne posait pas de problèmes particuliers et était capable de croître en 48 h.

Proposition d'adresser une demande de révision à la Ph Eur du chapitre 2.6.27 afin que l'essai de fertilité des milieux de culture soit désormais de 3 jours, comme c'est le cas dans le chapitre 2.6.1 Stérilité.

La Commission européenne de Pharmacopée se réunissant les 21-22 juin 2022, la demande de révision a été envoyée par l'équipe pharmacopée, immédiatement après le CFP BIO et La Pharmacopée européenne nous a informés de la mise à l'ODJ de cette commission.