

Compte-rendu

Direction : Direction des Métiers Scientifiques

Pôle : Pharmacopée et Préparations pharmaceutiques

Dossier suivi par :

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

E-mail : natacha.charlier-bret@ansm.sante.fr

Agnès BERTOCCHI / Tél. : 01 55 87 42 25

E-mail : agnes.bertocchi@ansm.sante.fr

Numéro du document : 20241003_CR_CFP_BIO 8

Comité Français de Pharmacopée

« Produits biologiques et thérapies innovantes [CFP BIO] »

Séance du Jeudi 3 octobre 2024 de 9h00 à 18h00

Ordre du jour

Points prévus à l'ordre du jour	Pour info/avis
9h00 – Ouverture de la session en visioconférence I – 9h15 Début de la séance : Introduction - Tour de table - Déclarations Publiques d'Intérêt	
II – 9h30 Activités de la Pharmacopée Eur / Retour d'informations	Pour Info
III – 9h45 Pharmeuropa 36.3 : P4BIO Anticorps monoclonaux Présentation par l'expert ANSM présent dans le groupe P4Bio de la Ph Eur 1. Ustékinumab (solution concentrée d') [3165] PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 16 ANP 2. Ustékinumab (préparation injectable d') [3188] PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 18 ANP 3. Golimumab (préparation injectable de) [3187]	Pour Avis

PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP

CTP Thérapie cellulaire

Présentation par l'expert ANSM présidente du groupe CTP de la Ph Eur

4. Numération des cellules CD34/CD45+ dans les produits hématopoïétiques.) [2.7.23]

PA/PH/Exp. CTP/T (23) 6 ANP

6B Produits sanguins

5. Altéplase (solution concentrée d') [3197]
PA/PH/Exp. 6B/T (23) 4 ANP
6. Altéplase pour solution injectable [1170]
PA/PH/Exp. 6B/T (23) 3 ANP

15V Vaccins Vétérinaires

Gestion des agents étrangers dans les médicaments immunologiques vétérinaires [5.2.5.] Annexe 1

13 h50 - Ouverture de la session en visioconférence

IV – 14h00 à 17h30 Méthodes Rapides en Microbiologie :

- 14h00 14h45 Audition **RedBerry**

RedOne Cytométrie phase solide **France (Illkirch Graffenstaden)**

- 14h50 15h35 Audition **Microbs**

IAN Cytométrie phase solide +IA **France (Rennes)**

- 15h40 16h25 Audition **Rapid Micro BioSystems USA**

Growth direct (Autofluorescence)

- 16h30 17h15 Audition **BioMérieux**

ScanRDI Cytométrie phase solide **France (Marcy L'Etoile)**

BACT ALERT Automate basé sur la croissance microbienne

- Délibération membres CFP et ANSM

17h30 /18h00 - Fin de la réunion

Participants

Nom des participants		Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent		Absent /excusé
Membres			Matin	AP Mid i	
BLOUIN Véronique	Membre		☒	☒	☐
COLIAT Pierre	Membre		☐	☐	☒
COLIN Thierry	Membre		☒	☒	☐
DAYAN-KENIGSBERG Jacqueline	Membre		☒	☐	☐
DECOUSSER Jean-Winoc	Membre		☐	☐	☒
DOUZIECH EYROLLES Laurence	Membre		☒	☒	☐
DUFOUR Nicolas	Membre		☒	☒	☐
DUVAL Raphaël	Membre		☒	☒	☐
FAIVRE Lionel	Membre		☒	☒	☐
LORTEAU Céline	Membre		☒	☒	☐
MONTRIBOT-ALBINO Anthia	Membre		☐	☐	☒
NIEL Philippe	Membre		☐	☐	☒
PIROT Fabrice	Membre		☐	☐	☒
Experts Ph Eur					
BONNEVAY Thierry	Expert gp1 Ph Eur (Microbiologie) Partie prenante Sanofi Pasteur		☒	☒	☐
LAPORTE Jérôme	Expert gp1 Ph Eur (Microbiologie) Partie prenante MODERNA		☒	☒	☐
Auditionnés					
Microbs ABLAIN Wilfried (CEO) FOUQUÉ Amélie GADAL Philippe			☒	☐	☐
Redberry MACRON Jonathan (CEO)			☒	☐	☐

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Statut		
		Présent	Absent /excusé	
Rapid Micro Biosystems		☒	☐	☐
OHRESSER Serge		☒	☐	☐
GADAL Philippe				
BioMérieux		☒	☐	☐
LECOENT Virginie				
KASSIM HOUSSENALY Caroline		☒	☐	☐
JURGUTIS Auktumas		☒	☐	☐
GADAL Philippe		☒	☐	☐
ANSM				
BERTOCCHI Agnès	Evaluateur scientifique pharmacopée DMS Pôle4	☒	☒	☐
CHARLIER-BRET Natacha	Evaluateur scientifique pharmacopée DMS Pôle4	☒	☒	☐
BOULEY Martine	Cheffe de pole pharmacopée préparations pharmaceutiques DMS	☐	☒	☐
SALOMON Valérie	Directrice DMS (Direction des métiers scientifiques)	☐	☐	☒
DUCHEZ Sophie	DEI/PEPITHE	☐	☒	☐
MESLIER Yann	Direction des Contrôles / BIOMIC	☐	☒	☐
GARCIA Dominique	Direction des Contrôles- membre groupe 15 Ph Eur / LISBIO	☐	☒	☒
MORGEAUX Sylvie	Direction des Contrôles / LISBIO	☐	☐	☒
RIDOUX Valérie	Direction des Contrôles/ BIOMIC	☐	☐	☒
CLOSSON-CARELLA Violaine	Présidente du groupe CTP/ DEI	☒	☐	☐
MAITENAZ Solène	Membre groupe CTP / DEI	☒	☒	☐
PANTERNE Béatrice	Direction de l'Inspection /INSBIO1	☐	☐	☒
PLANA JEANNAUD Michèle	Direction des Contrôles / BIOMIC	☒	☒	☐
HAMADI Kheira	Direction de l'Inspection /ISMP	☐	☒	☐
BARTOLI Mathilde	Direction de l'Inspection /INSBIO1	☐	☒	☐
BOULAY Maylis	Direction de l'Inspection /IPPLF	☐	☒	☐

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent			Absent /excusé
SEZER Rudi	Direction de l'Inspection /IPPLF	☐	☒	☐	
Korimbocus Jehanara	Direction des Contrôles / LISBIO	☒	☐	☐	
Ourlin Jean Claude	Direction des Contrôles / BIOMIC	☒	☐	☐	

I. Introduction

La séance est ouverte par les secrétaires de séance.

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

Le sujet de la deuxième partie de réunion sur les méthodes rapides en microbiologie est expliqué. Il est à considérer comme une suite du CFP BIO du 14 octobre 2021 dont le compte rendu est disponible sur le site internet de l'ANSM : <https://ansm.sante.fr/evenements/comite-francais-de-pharmacopee-produits-biologiques-et-therapies-innovantes-2>

Comme en 2021 des industriels de méthodes rapides en microbiologie sont auditionnés.

Par ailleurs, la Pharmacopée européenne étudie un projet de certification de ces méthodes notamment sur la partie concernant la validation primaire de ces dispositifs (se référer au site internet de l'EDQM :

https://www.edqm.eu/fr/w/save-the-date-edqm-workshop-exploring-a-certification-system-for-the-validation-of-rapid-microbiological-methods-1?p_l_back_url=%2Ffr%2Fsearch%3Fq%3Dm%25C3%25A9thodes%2Bmicrobiologie%2Brapide

C'est donc aussi dans ce cadre que l'ANSM poursuit son intérêt sur le sujet.

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

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

- Tour de table

8 membres sur 13 étaient présents

Le quorum est donc bien atteint.

Le sujet de l'après-midi a permis d'avoir des participants ANSM supplémentaires intéressés par les méthodes rapides en microbiologie. Les experts au groupe 1 microbiologie de la Ph.Eur ont répondu positivement à notre invitation et ont été autorisé à suivre la totalité des échanges par les industriels auditionnés.

II. Activités de la Pharmacopée Européenne / Retour d'informations

Le dernier CFP BIO datant du 25 juin 2024, il n'y a pas eu de commission européenne de pharmacopée entre les 2, la prochaine session est la commission 180 des 19 & 20 novembre 2024. Il n'y a donc pas eu de nouvelles adoptions depuis.

Les monographies en enquête publique au pharমেuropa 36.3 constituent le programme de la matinée. Le retour des commentaires à la Pharmacopée européenne est à effectuer par l'autorité française de pharmacopée avant le 30 novembre.

► Groupe P4BIO : Produits Biologiques « monofabricant »

Dossier 1 : Ustekinumab (solution concentrée d') [3165]

PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 16 ANP

Dossier 2 : Ustekinumab (préparation injectable d') [3188]

PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 18 ANP

Ce sont deux nouvelles monographies de substance active et de produit fini d'Ustekinumab, élaborées dans le groupe P4Bio, groupe qui concerne les médicaments encore sous brevet. Le brevet touche à sa fin et deux biosimilaires ont déjà été acceptés mais ne sont pas encore commercialisés en France. C'est la première monographie concernant un antagoniste de l'interleukine. Ustekinumab a une activité antagoniste de l'interleukine 12 et 23.

Le test d'activité est seulement cité mais non décrit dans la monographie. Il ne correspond pas à celui utilisé par le fabricant car celui-ci utilise des réactifs « maison », ne pouvant être commercialisés. La technique proposée dans la monographie utilise des cellules HEK blue inductibles à l'IL12, permettant la mesure du blocage de l'IL12 par Ustekinumab. Elle a été testée par plusieurs laboratoires dont celui de l'ANSM mais les résultats n'ont pas été suffisamment reproductibles pour conclure à une validation complète. Des commentaires sont très attendus pour alimenter la réflexion dans le groupe qui continue à travailler sur cet essai biologique. Deux scientifiques de laboratoire de l'ANSM ont présenté le sujet : les difficultés rencontrées lors de la mise en œuvre du test d'activité et la logique suivie pour la rédaction de ces monographies.

Au regard des méthodes utilisées pour les produits qui arrivent sur le marché, seul un laboratoire semble mentionner les cellules HEK blue utilisées dans la monographie pour le test d'activité. Il sera donc demandé de ne pas mentionner explicitement ces cellules mais seulement que :

« Le test d'activité pourrait être basé sur l'action inhibitrice de l'ustekinumab sur l'activité biologique de l'IL-12 humaine recombinante, avec une interprétation appropriée pour évaluer cet effet inhibiteur. » Par ailleurs, des représentants de l'évaluation ont exprimé leur souhait de conserver une grande flexibilité dans les spécifications pour permettre le développement des biosimilaires.

Un commentaire a été fait en ce sens pour les limites des essais :

« Les spécifications sur ces paramètres sont plus resserrées sur les biosimilaires. Mettre les spécifications dans cette monographie bloquerait une amélioration des procédés. Ces spécifications sont dépendantes des procédés et l'évaluation globale de la biosimilarité doit se faire lors des exercices de comparabilité et des essais cliniques supplémentaires. Les spécifications du princeps peuvent être citées à titre d'exemple. »

Il est ainsi proposé d'ajouter en complément des spécifications pour l'expression des résultats :

« Maximum x% ou moins selon la limite acceptée par l'autorité compétente en fonction des performances du procédé »

De même pour le test d'activité il est demandé « Limite approuvée par l'Autorité compétente. Les résultats doivent être exprimés en pourcentage par rapport à la substance de référence. »

Les mêmes remarques sont faites pour la solution concentrée et la préparation injectable (produit fini).

Dans le paragraphe production de la monographie de produit fini, un tampon de formulation est décrit.

Cela a motivé une remarque : « La composition des princeps et des biosimilaires peut être différente et ne devrait donc pas être obligatoire dans la section de production mais indiqué pour exemple. » Il est donc proposé d'ajouter "Par exemple".

Décision : Au total **15** commentaires ont été reportés sur la monographie de substance active et **17** commentaires sur la monographie de produit fini.

Dossier 3 : Golimumab (préparation injectable de) [3187]

PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP

La monographie de solution concentrée a été acceptée et publiée dans le supplément 11.6 de la Ph.Eur, elle sera opposable en janvier 2025. Sa publication a été soumise à la mise à disposition de références validées, BRP lot 1 pour l'essai biologique et la SCR lot 1 pour les tests physicochimiques.

Il s'agit ici de la monographie de produit fini. C'est un anti TNF alpha IgG1 kappa produit sur hybridome de souris. La monographie est calquée sur la monographie de la substance active. Les différences sont quelques tests en production pour la substance active, non repris dans le produit fini et quelques essais spécifiques au produit fini ajoutés dans le paragraphe essai.

Dans le paragraphe production un tampon de formulation est décrit, comme précédemment il est demandé de préciser qu'il s'agit d'un exemple.

Les mêmes remarques que pour Ustekinumab seront faites sur les spécifications afin de garder une certaine flexibilité. Il est demandé d'ajouter aux spécifications « ... selon la limite acceptée par l'autorité compétente en fonction des performances du procédé »

Décision : **8** commentaires ont été transmis sur cette monographie

► Groupe CTP : Thérapie cellulaire

Dossier 4 : Numération des cellules CD34/CD45+ dans les produits hématopoïétiques.

[2.7.23] PA/PH/Exp. CTP/T (23) 6 ANP

Les commentaires ont été revus en présence de la présidente du groupe CTP (Cell Therapy Product) de la Ph Eur et d'un expert français du groupe

- La notion de la viabilité est très importante pour les produits et le chapitre 2.7.29 Numération et viabilité des cellules nucléées permet d'aborder ce point. Ceci n'est pas précisé dans le texte alors qu'il est fait mention de marqueur de viabilité. En pratique, Le résultat rendu est systématiquement une quantité de cellules CD34/45+ viables. Il sera donc rapporté de préciser « cellules CD34/45+ viables »

Proposition de reformuler comme suit :

« Il est recommandé de réaliser un marquage approprié des acides nucléiques afin de retirer les marquages non spécifiques liés aux cellules mortes et de déterminer la viabilité des cellules CD34/CD45+, à l'aide d'un colorant qui ne traverse pas la membrane cellulaire intacte (par exemple, la 7-aminoactinomycine D). »

Erreur de traduction : remplacer par « Tout en réduisant au maximum... » ou « "tout en minimisant les interférences »

Concernant la partie sur la Cytométrie en flux faire référence au 2.7.24 et déplacer 2 paragraphes dans la partie « stratégie de fenêtrage »

Simple plateforme et double plateforme :

Simple plateformes : un seul appareil qui détermine directement les CD34 dans l'échantillon

Double plateforme : on numère en premier lieu les globules blancs et ensuite le cytomètre détermine le pourcentage de CD34 dans les CD 45 qui sont assimilées aux cellules nucléées totales numérées par l'automate. On a 2 appareils.

Décision : 5 commentaires sur la version française ont été rapportés depuis à la Ph Eur

► Groupe 6B : Produits dérivés du sang

Dossier 5 :

Altéplase (solution concentrée d') [3197] PA/PH/Exp. 6B/T (23) 4 ANP

Altéplase pour solution injectable [1170] PA/PH/Exp. 6B/T (23) 3 ANP

Une seule spécialité d'Altéplase est commercialisée en France par BOEHRINGER INGELHEIM, Actilyse[®] à 2 dosages différents. C'est un thrombolytique, activateur tissulaire du plasminogène.

Altéplase solution concentrée 3197 : Cette monographie est nouvelle et concerne la substance active.

La monographie 1170, telle que publiée actuellement (sous le titre « Altéplase pour solution injectable »), décrit les exigences relatives aux substances actives comme aux médicaments contenant de l'altéplase. Les exigences applicables à l'altéplase sous forme de substance active ont été supprimées de la monographie Altéplase pour solution injectable (1170) et insérées dans la présente monographie solution concentrée. Elles ont été revues afin de refléter les pratiques actuelles. Les principales modifications sont énumérées ci-dessous :

- La procédure de focalisation isoélectrique a été remplacée par une procédure détaillée d'électrophorèse capillaire à focalisation isoélectrique par imagerie,
- L'analyse glycanique est désormais décrite en détail,
- La procédure SDS-PAGE a été remplacée par une procédure d'électrophorèse capillaire sur gel,
- L'analyse de la teneur en altéplase de type I et de type II par SDS-PAGE a été remplacée par une procédure de chromatographie liquide,
- La cartographie peptidique, les procédures applicables à l'altéplase à chaîne unique et le dosage d'activité ont été actualisés

La monographie Altéplase pour solution injectable (1170) a fait l'objet de corrections éditoriales et a été restructurée de façon à couvrir uniquement l'altéplase sous forme de médicament produit fini.

Décision : Aucun commentaire réceptionné pour ces monographies
--

► Autres sujets : cités pour information

Groupe 6B : Produits dérivés du sang

Albumine humaine (solution d') 0255 PA/PH/Exp. 6B/T (24) 4 ANP

Pour l'électrophorèse de zone de l'essai composition en protéines, l'acétate de cellulose a été supprimé. La possibilité d'utiliser l'électrophorèse capillaire a été ajoutée.

Groupe 6 : Produits Biotechnologiques

Sodium Hyaluronate [1472] PA/PH/Exp. 6/T (24) 15 ANP

Deux essais ont été révisés :

- Perte à la dessiccation : l'usage du pentoxyde de diphosphore a été supprimé
- Chlorures : la méthode a été révisée pour être plus performante. Un fabricant travaille sur une méthode quantitative.

Pas de commentaire reçu.

► Groupe 15V : Vaccins vétérinaires

Dossier 6 :

Gestion des agents étrangers dans les médicaments immunologiques vétérinaires [5.2.5.] Annexe 1

La liste des agents étrangers à prendre en compte lors de l'évaluation du risque a été mise à jour (ajout d'agents aviaires et équinés) ; le nom de l'agent viral « Virus de l'hépatite du canard, type I » a été mis à jour et remplacé par « Virus de l'hépatite A du canard (*Avihepatovirus ahepatii*) ».

Cette annexe consiste en un listing de tous les agents étrangers (agents viraux et agents bactériens) à prendre en compte dans le cadre d'une évaluation du risque. On s'intéresse à l'origine de toutes les matières premières utilisées lors de la production (ex lot de semence, cultures cellulaire, gélatine ...). Ces matières premières peuvent par ailleurs être d'une autre espèce que l'espèce qui sera traitée par le vaccin ou le médicament en question.

Le but final sera de garantir l'absence de risque de transmettre des contaminants via des médicaments biologiques. La gamme des virus recherchés est choisie en fonction de l'état des connaissances scientifiques du moment.

Les agents viraux et bactériens sont énumérés pour chaque espèce animale (rongeurs, bovins, ovins/caprins, porcins, oiseaux, équidés, canins, félins, lapins, primates, salmonidés, poissons ...)

Un commentaire d'un expert virologue nous a été fait concernant la classification virale de l'ICTV (international Committee on Taxonomy of Viruses) qui n'est pas reprise dans ce chapitre. En effet le nom de la maladie a été privilégié par rapport à la nomenclature officielle de l'ICTV qui est en constante évolution. Ce choix délibéré a été décidé pour faciliter la tâche des utilisateurs. En théorie et sur le plan strictement scientifique, il est vrai qu'une conformité à l'ICTV aurait été optimale mais les conséquences en terme de monographies impactées, de l'habitude des utilisateurs (à qui cela n'a pas posé de problème jusqu'ici) est à prendre en compte et une décision pragmatique doit être recherchée.

En conséquence, il a été proposé de revoir l'intitulé de la colonne « agents viraux » (puisque ce ne sont pas des noms d'agents viraux) et de parler plutôt de « maladies » ainsi que de mentionner que la dénomination ICTV n'a pu être reprise dans ce chapitre.

En vétérinaire, les monographies de vaccins sont contre des maladies (exemple : **Vaccin inactivé de la bronchite infectieuse aviaire** : est une préparation de une ou plusieurs souches appropriées de un ou plusieurs sérotypes de **virus de la bronchite infectieuse aviaire**).

Il est fait remarquer que concernant la partie «bactérie» il y a bien la dénomination taxonomique.

Décision : Suggestion de remplacer « agents viraux » par « agents impliqués dans des pathologies virales »

Une demande a été faite de regarder comment au niveau des vaccins humains cela se passait. Voici 3 exemples avec l'absence du nom taxonomique bactérien dans le titre :

- **Vaccin coquelucheux (adsorbé, copurifié, acellulaire)**

Le vaccin coquelucheux adsorbé à cellules entières est une suspension stérile de cellules entières inactivées d'une ou de plusieurs souches de Bordetella pertussis

- Vaccin méningococcique groupes A, C, W135 et Y conjugué

Le vaccin méningococcique polysidique est une préparation cryodesséchée d'un ou de plusieurs polysides capsulaires purifiés obtenus à partir d'une ou de plusieurs souches appropriées de Neisseria meningitidis, groupe A, groupe C, groupe Y et groupe W135 qui sont capables d'assurer de façon régulière la production de polysides.

- Vaccin typhoïdique

Le vaccin typhoïdique est une suspension stérile de Salmonella typhi inactivés qui contient au minimum 5×10^8 et au maximum 1×10^9 bactéries (S. typhi) par dose humaine.

RedBerry / RedOne Cytométrie phase solide

La société Redberry a développé l'appareil **RedOne** basé sur la cytométrie en phase solide (SPC nouvelle génération).

Les étapes sont toutes automatisées avec un résultat dès 10 minutes :

- Filtration par un dispositif de filtration à usage unique, de 10 µl à 250 ml
- Coloration basée sur une dégradation d'un dérivé fluorescent par les estérases des cellules vivantes
- Analyse grâce à un algorithme analysant les images de fluorescence (une image est prise par minute pendant la phase de coloration des cellules). Il n'y a plus besoin d'un opérateur au microscope.

Les cellules viables sont détectées et différenciées des particules inertes grâce à la cinétique de coloration.

Les applications possibles :

- Comptage direct : en 10min
- Biocharge /Bioburden en 24 heures (avec possibilité d'identification, résultats intermédiaires possibles)
- Test de stérilité (test de stérilité rapide) en 96 heures

Cet appareil est utilisable par les industries pharmaceutiques, pour le contrôle de l'eau, par les industries cosmétiques.

Directement sans pré enrichissement avec une étape d'activation (tampon d'activation),

Cette approche permet aux microorganismes fragiles ou stressés de retrouver une activité métabolique et une intégrité membranaire suffisante pour être colorée avec une cinétique.

Cette phase d'activation peut se dérouler directement sur le consommable en phase solide, similaire à une boîte de Pétri, et permettant un résultat le même jour en **4 à 6 h** avec une limite de quantification de 5 cellules par échantillon.

Ou après enrichissement en milieu liquide, par exemple, pour le test de stérilité (incubation 3 ou 4 jours), ce qui permettra d'avoir de quoi réaliser l'identification si nécessaire à partir du volume de milieu non analysé. La limite de détection pour le test de stérilité est d'1 CFU / échantillon.

Il s'agit d'un appareillage de petit format facilement intégrable sous une hotte.



Le test de stérilité rapide : pour rappel résultat qualitatif : Présence - Absence

Il se déroule à la phase initiale comme la méthode de référence :

2 milieux de culture : milieu liquide Trypticase soja (TSB) et milieu liquide à base de thioglycolate (FTM) pour les anaérobies, incubés idéalement 4 jours.

Après agitation, prélèvement (5 à 10 ml), filtration et lecture du filtre.

Les 6 souches préconisées par la Ph Eur (1-100 CFU) sont détectées ainsi que *Cutibacterium acnes*, connu pour sa croissance lente.

Au final un résultat est obtenu en maximum 4 jours au lieu de 14 jours.

Les données de validation primaire (au sens de l'EP 2.6.1) sont disponibles auprès du fournisseur.

Exemple d'utilisation :

Intérêt pour les produits radio actifs avant administration au patient : test de stérilité rapide

Utilisation pour les médicaments de thérapie innovante (exemple CAR-T cells, cellules diverses,...) avec utilisation d'un tampon de lyse : dénombrement entre 10 mn (hors spores) et 6h (selon EP 2.6.27)

Publications récentes :

La Vague N° 80 | Janvier 2024 :

<https://www.a3p.org/rapid-bioburden-sterility-testing-exploring-detection-limits-automated-solid-phase-cytometry-system/>

La Vague N°83 | Octobre 2024 :

<https://www.a3p.org/rapid-testing-cell-gene-therapy-products-cytometry-system/>

MICROBS / IAN Cytométrie phase solide + IA

La société Microbs a développé et commercialisé IAN®, un automate basé sur la cytométrie en phase solide couplée à de l'intelligence artificielle.

Ce dispositif est dédié à l'analyse de matrices liquides, mais peut être utilisé pour des matrices solides, si ces dernières sont dissoutes dans un solvant.

Cette technologie permet de quantifier les microorganismes vivants dès 15 minutes puisqu'elle ne nécessite pas de pré-enrichissement. Elle reste simple d'utilisation grâce à une automatisation des étapes, décrites ci-dessous :

- Filtration de l'échantillon :

Les consommables sont des capsules à usage unique prêtes à l'emploi. Un volume de 100 µL à 5 ml peut être directement filtré sur la capsule. L'ajout d'un entonnoir permet de filtrer des volumes allant jusqu'à 200 ml (membrane de porosité calibrée).

- Marquage :

Une étape de marquage, basée sur un cocktail de molécules chimiques et de marqueurs fluorescents complexe, en passe d'être breveté, est ensuite réalisée en réhydratant les réactifs contenus dans la capsule. Ce marquage est séquentiel permettant la mesure des signaux au fur et à mesure de la captation par les cellules.

- Détection & analyse :

La présence de multi capteurs de fluorescence et de non-fluorescence permet de collecter les signaux en continu qui seront analysés par l'Intelligence artificielle. Après un entraînement sur plus de 40 millions d'événements microbiologiques et un auto-apprentissage, l'IA mise au point est capable de distinguer précisément les microorganismes vivants et morts grâce à l'analyse de plus de 100 paramètres.

- Résultats :

Un certificat d'analyse est généré avec différentes informations de traçabilité sur les lots de consommable utilisé ainsi que le dénombrement uniquement des microorganismes vivants présents dans l'échantillon.

Les applications possibles :

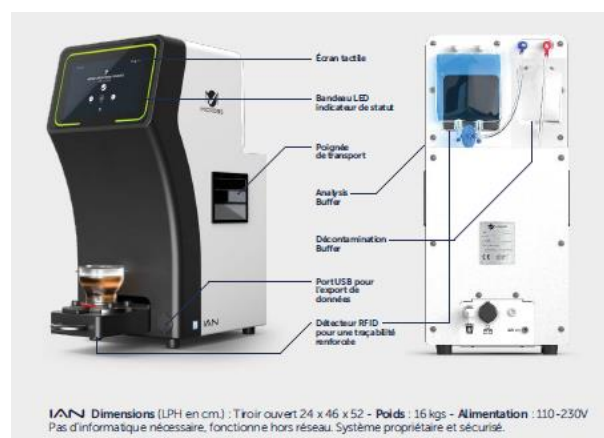
- Biocharge /Bioburden : contrôle des produits intermédiaires, des matières premières, contrôle de l'eau.
- Test de stérilité (test de stérilité rapide)
- Contrôle de l'environnement (écouvillonnage de surface, contrôle de l'air)
- Investigation rapide de sources de contamination

Présentation d'un résumé des performances analytiques sur plus de 200 souches et des projets de développement en cours.

Un protocole sur les produits cellulaires de type Jurkat cells, CEM ou T2 a été développé permettant une réduction de 4 log des cellules avec un recouvrement de plus de 70% sur les souches obligatoires de la pharmacopée européenne.

Le résultat est obtenu après 1 heure (incluant 45mn de préparation de l'échantillon.)

Il s'agit d'un appareillage de petit format annoncé comme laboratoire nomade et autonome utilisable en pied de production. Cet appareil se positionne en screening haut débit de négatif en 15 minutes. Il est préconisé de doubler l'échantillon. Si en 15 mn il est positif il est possible de reprendre le «duplicate» pour une mise en culture /identification (l'échantillon n'ayant pas été altéré).



Rapid Micro Bio Systems : Growth direct Autofluorescence

La société Rapid Micro Biosystem a développé l'appareil **Growth direct** basé sur l'autofluorescence.

Le principe de la méthode permet en effet de détecter et quantifier les colonies à la surface des membranes classiquement utilisées dans les applications de contrôle QC Microbiologique. Basé sur la détection d'autofluorescence émise par les microorganismes en croissance (par les flavines contenues dans les cellules en croissance) suite à une courte exposition à une lumière dans le spectre du bleu (450 to 500 nm). Utilisant une analyse sophistiquée d'images, la technologie détecte des microcolonies de microorganismes en croissance, permettant une détection et une énumération rapide.

Les étapes sont toutes automatisées (chargement, Incubation, comptages réguliers toutes les 4h, transfert éventuel de température, transfert des résultats) avec un résultat en moitié moins de temps des techniques de référence pharmacopée.

Les cellules microbiennes en croissance sont fluorescentes dans le spectre jaune-vert lorsqu'elles sont éclairées par un flash de lumière bleue à une certaine longueur d'onde utilisée dans ce dispositif.

Une lecture est réalisée toutes les 4 heures.

Un algorithme complexe va traiter les signaux pour analyser les événements de fluorescence (sont regardé entre autre surface, nombre de pixels activés, images en 3D successives). A partir de 12 heures on peut avoir des comptages possibles. L'utilisateur peut voir la courbe de croissance en temps réel permettant de l'alerter au plus tôt d'une détection.

La technologie Growth Direct détecte les colonies bien plus tôt que les opérateurs procédant à une inspection visuelle des plaques. Une microcolonie avec 100 bactéries est détectable. La précision du comptage est bien supérieure à l'œil humain.

La détection est basée sur quatre paramètres :

- Temps écoulé avant que les cellules ne commencent à se diviser
- Temps de doublement des cellules
- Le volume des cellules
- Nombre de cellules par UFC (unité formant colonie)

Le principe consiste en des «cassettes» d'agar, incubées dans 2 incubateurs à 2 températures (32,5°C et 22,5°C) qui seront analysées par un système optique haute définition captant et analysant des images.

Les applications possibles :

- Contrôle de l'environnement : Contrôle de l'air, des surfaces, du personnel ([Growth direct environmental system](#)): cassettes d'agar de taille identiques aux géloses contacts du marché avec un milieu TSA contenant 2 ou 4 neutralisants.

- Biocharge /Bioburden cassettes d'agar ([Growth direct Bioburden](#)) disponibles avec R2A TSA SDA pour le contrôle de l'eau, de matières premières et produits. La filtration est effectuée sur un dispositif de filtration à usage unique (membrane 0,45 µm)

La membrane est ensuite déposée sur une « cassette » qui contient un milieu de culture et qui pourra être fermée par un couvercle transparent

- Récemment : Test de stérilité ([Growth direct rapid sterility system](#)) : il s'agit d'un appareil dédié à cette activité avec des consommables différents.

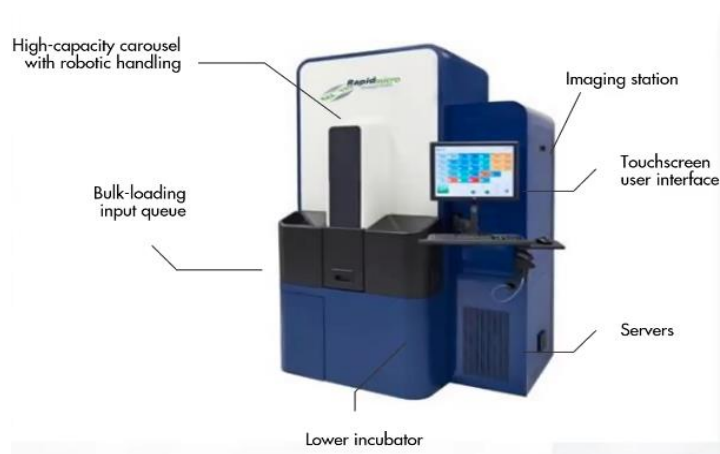
Un seul milieu de culture est utilisé contrairement à la méthode de référence (milieu propriétaire) et au lieu de filtration dans 2 tubes /canisters de milieux (TSB, FTM), il y a filtration dans 3 cassettes :

1 Aérobie à 32,5°C, 1 anaérobie à 32,5°C (grâce à un capteur d'O₂), et 1 aérobie à 22,5°C. La membrane qui retiendra les bactéries sera mise en contact avec du milieu de culture liquide placé sous la membrane, la croissance s'effectuant en phase solide.

Il y aura ensuite mise en incubation aux 2 températures. Le temps de détection peut atteindre 12h, le temps de résultat entre 1 et 3 jours au lieu de 14 jours.

126 tests de stérilité peuvent être réalisés simultanément.

Il s'agit d'un appareil d'assez grande taille avec une capacité d'incubation de centaines d'échantillons, entièrement automatisé comprenant un système optique de haute résolution analysant les échantillons toutes les 4 heures. Il est non destructif permettant de procéder à l'identification quand un échantillon est détecté positif.



bioMérieux :

SCANRDI Cytométrie phase solide

BACT/ALERT système basé sur la détection automatique de la croissance microbienne dans un milieu de culture

Au CFP BIO d'octobre 2021, une audition concernant ces dispositifs avait déjà fait l'objet d'un compte rendu disponible sur le site internet de l'ansm : <https://ansm.sante.fr/evenements/comite-francais-de-pharmacopée-produits-biologiques-et-therapies-innovantes-2>

SCAN RDI

La société bioMérieux a développé l'appareil **SCANRDI** basé sur la cytométrie en phase solide.

Ce dispositif est sur le marché américain depuis une vingtaine d'année.

Nécessite des échantillons filtrables.

Les étapes sont en partie automatisées mais pas totalement avec un rendu de résultat en 4 heures :

- Filtration par un dispositif de filtration à usage unique, de 1 à 1000 ml
- Marquage fluorescent des microorganismes viables présents dans l'échantillon filtré. Le marqueur pénètre dans le microorganisme, seulement les microorganismes vivants clivent le substrat par l'intermédiaire des enzymes du type estérase, et libèrent la partie fluorescente du marqueur qui s'accumulera dans le microorganisme.
- Balayage de la membrane par le laser du SCANRDI qui va exciter le marqueur fluorescent et permettre ainsi la détection par le système des cellules fluorescentes.
- Confirmation au microscope disponible avec l'appareillage permettant à un opérateur de vérifier chaque évènement décompté.

En cas de résultat positif, la membrane peut être reprise pour mise en culture afin d'obtenir une identification. Il est possible aussi de garder un duplicata de l'échantillon qui n'a pas eu le temps de s'altérer. La microscopie permet de reconnaître la morphologie du microorganisme ce qui donne une idée de l'agent contaminant.

Le résultat est attendu en 4 heures.

Les applications possibles :

- Biocharge/Bioburden sur les matières premières
- Biocharge/Bioburden sur l'eau
- Test de stérilité (test de stérilité rapide) en 4 heures. 21 échantillons par jour

Le seuil de sensibilité est de 1 microorganisme (bactérie, levure et moisissure) par échantillon filtré.

Cet appareil est utilisable par les industries pharmaceutiques, pour le contrôle de l'eau, contrôle des matières premières, contrôle environnementaux. Plus de 200 médicaments sont compatibles avec cette méthodologie.

Des nouveautés en 2023 2024 portent sur le dispositif de filtration afin d'avoir un dispositif plus simple à utiliser, à déconnecter, à récupérer la membrane.

Des études sur les produits cellulaires sont en cours de développement afin de rendre ces produits thérapeutiques filtrables (CART cells par exemple) avec un résultat en 6 heures (au lieu de 4). Une étape de lyse des cellules spécifique a été mise au point

**BACT/ALERT 3D pour une application de test de stérilité rapide**

Plus de 1500 systèmes installés dans le monde

Il s'agit d'une technologie de la détection de la croissance microbienne grâce au monitoring de l'évolution du pH du milieu de culture due à la production de CO₂ des microorganismes pendant la croissance.

C'est une méthode automatisée en continu avec des alertes dès 2 jours d'incubation et un résultat au maximum en 7 jours.

Les étapes sont :

- Inoculation directe via une seringue dans les bouteilles de milieux de culture. Le volume inoculé est de 0,5 à 10 ml
- Scan des bouteilles via leur code barre
- Chargement dans l'instrument et incubation à différentes températures
- Détection automatique grâce à un détecteur colorimétrique qui va changer de couleur en fonction du changement de PH et de la production de CO₂. La lecture est réitérée toutes les 10 minutes via un détecteur colorimétrique.

Différents algorithmes permettent une analyse selon la phase de croissance bactérienne et permet une détection précoce.

Différents milieux de cultures sont proposés, certains avec résine, certains spécifiques des champignons et différentes températures d'incubation sont possibles (basse 20-25°C et haute 30-37°C)

Application pour un test de stérilité rapide : 3 bouteilles sont conseillées : Une aérobie à 32,5°C, Une anaérobie à 32,5°C, Une pour les levures moisissures à 22,5°C.

Les températures peuvent être augmentées comme en biologie médicale selon les besoins spécifiques de l'utilisateur.

Il est non destructif permettant de procéder à l'identification quand un échantillon est détecté positif.

Les résultats sont obtenus en 4 à 6 jours.

bioMérieux nous informe que les données de validation primaire sont mises à disposition des clients et s'appuient sur les pharmacopées et le PDA TR 33. bioMérieux propose son expertise pour les autres parties de validation qui sont à réaliser avec le produit de l'utilisateur et ce pour aider l'utilisateur.

Une information a été donnée par bioMérieux en fin de présentation, sur une approche de température « mono température » pour le contrôle de l'environnement. Ce sujet était en dehors de la thématique du CFP BIO mais est un sujet à suivre.



Ex : BACT/ALERT 3D 240

Conclusion :

Rappel : le chapitre **5.1.6** est actuellement en révision complète, il devrait être mis en enquête publique au pharমেuropa d'avril 2025. Le but de la révision est de rappeler quelles sont les étapes de validation et qui est en charge de celles-ci.

La Pharmacopée européenne est en cours de réflexion d'un système de certification de la validation primaire par un groupe d'experts. Le workshop d'octobre 2024 organisé par l'EDQM est mis en place pour permettre des échanges entre fabricants et utilisateurs sur ce sujet.

L'annexe 1 des bonnes pratiques de fabrication (mai 2024) oblige à l'identification du contaminant et c'est une réflexion qui a été apportée. Ces BPF sont disponibles sur le site internet de l'ANSM.

Prochain CFP BIO : 24 Janvier 2025 (Pharমেuropa 36.4)