NOTE APPLICATIVE

DETECTION EN TEMPS REEL DE LA CROISSANCE MICROBIENNE PAR L'INCUBATEUR INTELLIGENT PERMETTANT D'ACCELERER LES PROCESSUS DE CONTROLE ENVIRONNEMENTAL

Auteurs:::Lauriane SIBILEAU, MSc, INTERSCIENCE, Isibileau@interscience.com Thomas ALEXANDRE, PhD, INTERSCIENCE, talexandre@interscience.com

Appareil: ScanStation® - Version logiciel: 1,30

Introduction

De plus en plus de laboratoires mettent en application pour leurs analyses microbiologiques des méthodes alternatives qui sont plus rapides que la méthode traditionnelle basée sur le comptage manuel de cultures sur boites de Petri. Cependant, la validation de ces nouvelles méthodes (comme la PCR, la spectrométrie de masse) est souvent sous la responsabilité l'utilisateur du INTERSCIENCE a développé le ScanStation® (ISS) dans le but de fournir des résultats anticipés tout en utilisant la méthode traditionnelle (approuvée par la Pharmacopée Européenne et la FDA). Ce système innovant est le fruit du développement de la technologie des compteurs de colonies en point-final qui sont utilisés depuis plus de quarante ans dans les laboratoires^{1,2}. En plaçant ce dispositif dans un incubateur et en automatisant les processus de lecture, le contrôle de la croissance microbienne en temps réelle est maintenant possible.

Le ScanStation® collecte des images de chaque échantillon toutes les 30 ou 60 minutes pendant toute la durée de l'incubation. Ces images, une fois analysées par le logiciel de contrôle, permettent de réaliser la courbe cinétique de la croissance microbienne disponible en temps réel pour l'utilisateur. Un exemple de cette analyse est présenté dans la **Figure 1**,

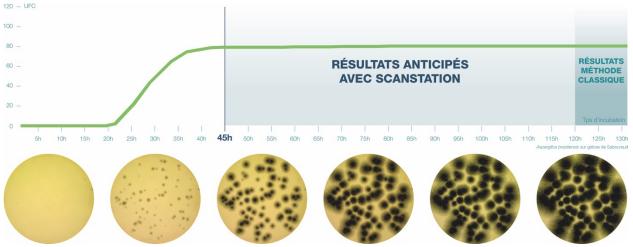


Figure 1 : Exemple d'un rapport d'une culture de *A. brasiliensis* sur milieu TCA réalisé par le ScanStation. Partie haute – courbe de croissance réalisée par le comptage des colonies en temps réel. Partie basse – six photos prises à des temps différents pendant les 24 heures d'incubation.

Le contrôle en temps réel de la croissance des bactéries, des moisissures et des levures permet non seulement la détection anticipée des colonies mais aussi d'améliorer la précision du dénombrement par rapport à la lecture en point-final. En effet, premièrement, l'utilisation de l'image "T0" prise au tout début de l'incubation est utilisée comme une "tare" pour éliminer les débris/particules éventuellement présents dans la matrice et le marquage sur la

points:

boîte qui sont très souvent comptabilisés comme des colonies lors du dénombrement en point final (autant en manuel qu'en automatique) pour ne prendre en compte que les colonies qui vont se former pendant l'incubation, réduisant ainsi les faux positifs. Deuxièmement, la détection et le marquage des colonies dès leur apparition sur la boite de Petri permet d'éviter de les manquer dans le cas où ces colonies deviennent confluentes ou dans le cas où elles sont recouvertes pour une espèce invasive, ce qui réduit les faux négatifs. L'objectif de cette étude se décline en trois

Premièrement, la performance du ScanStation® est évaluée en comparant le décombrement manuel réel dénombrement automatique de cultures pures de cinq microorganismes testés pour le contrôle environnemental dans le domaine pharmaceutique (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans and Aspergillus brasiliensis). Il est important de noter que pour éviter toute variation inter et intra-opérateur, ce qui est courant avec le dénombrement en point-final^{3,4}, la comparaison du dénombrement du ScanStation® n'est pas réalisée avec le dénombrement traditionnel en point final des boites de Petri en fin d'incubation mais sur la vidéo de la croissance générée à partir de la collecte de l'ensemble des photos prises pendant l'incubation. Ainsi, comme dans le domaine sportif, l'opérateur peut revenir en arrière sur la vidéo ce qui lui permet d'éviter tout comptage de faux positif ou de faux négatif. Ce dénombrement sera appelé le "comptage réel".

Deuxièmement, un modèle de ''Time to result'' est évalué pour ces cinq souches de la pharmacopée permettant de définir la durée d'incubation pour laquelle le ScanStation® peut fournir un résultat stable et fiable du comptage d'unités formants colonies (UFC) pour 85% d'échantillons de chaque souche.

Troisièmement, les performances du ScanStation® sont testées en conditions réelles par la réalisation de contrôles environnemental de l'air ambiant. La corrélation du dénombrement automatique avec le comptage réel, et le modèle de « Time to result » sont également analysés dans cette partie.

Méthodes

Contexte

Les cinq organismes suivants couramment utilisés pour le contrôle environnemental dans le secteur pharmaceutique ont été sélectionnés pour les études réalisés à l'usine de R&D d'INTERSCIENCE pour un total de 114 échantillons :

- Staphylococcus aureus (ATCC 6538)
- Escherichia coli (ATCC 8739)
- Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)
- Candida albicans (ATCC 10231)
- Aspergillus brasiliensis (ATCC 16404)

Protocole

Inoculation des échantillons

Boites TSA de 90 mm : 100µL de suspensions de *S. aureus, P. aeruginosa, C. albicans* et *A. brasiliensis* ont été inoculés à l'aide d'un ensemenceur automatique sur boites de Petri standards de 90 mm pré-coulées de gélose trypticase de soja (TSA) et placées dans l'incubateur intelligent ScanStation[®].

Géloses contacts : 100 µL de suspensions d'*E. coli* ont été inoculées sur des géloses contacts de 60 mm pré-coulées de gélose trypticase de soja (TSA) et placées dans l'incubateur intelligent ScanStation®.

Pour le contrôle environnemental de l'air, 122 boites de Petri provenant de différents laboratoires d'industries pharmaceutiques ont été collectées après l'inoculation des microorganismes présent dans l'atmosphère soit par une sédimentation passive, soit par l'utilisation d'un collecteur d'air. Ces boites ont été incubées dans le ScanStation® à 30-35°C pour le dénombrement bactérien puis à 20-25°C pour le dénombrement des moisissures et des levures pour un temps total d'incubation de cinq à sept jours.

Incubation

Tous les échantillons de chaque souche ont été incubés aux températures pendant la durée comme indiquées dans le tableau ci-dessous :

Souche	Température (°C)	Durée (jour)
S. aureus	30-35	5
E. coli	30-35	5
P. aeruginosa	30-35	5
C. albicans	20-25	5
A. brasiliensis	20-25	5

Pendant ces cinq jours, la boite de Petri de chaque échantillon a été prise en photo toutes les 30 minutes. Ces images ont ensuite été traitées par la version 1,30 du logiciel du ScanStation® et ce traitement a permis la détection de l'apparition en temps réel de chaque colonie et la génération de la courbe cinétique de chaque échantillon.

Résultats

1, Comparaison de l'énumération manuelle avec celle du ScanStation®

Les tableaux suivants montrent l'énumération automatique du ScanStation® et du comptage réel des cinq souches de la pharmacopées testées. La lecture manuelle est réalisée en comptant les unitéS formant colonie (UFC) qui n'ont pas été marqués pendant l'incubation en visualisant les vidéos générées en temps réel. Ce mode de comptage est plus précis que le dénombrement tradi-tionnel en point-final. En effet, de potentielles colonies cachées par un microorganisme invasif peuvent être manquées lors du dé-nombrement classique de la boite de Petri. C'est la raison pour laquelle la lecture manuelle est qualifiée de "comptage réel" dans cette étude. Toutes les valeurs sont reportées en log d'UFC. La différence entre le comptage automatique et manuel a également été calculée et la moyenne et l'écart-type par souche sont répertoriés dans les tableaux cidessous:

Numéro		nbrement J UFC)	Différence
d'échantillon	тс	ISS	(valeur absolue)
2258	1,66	1,66	0,00
2259	1,54	1,53	0,01
2260	1,63	1,62	0,01
2261	1,61	1,62	0,01
2262	1,69	1,68	0,01
2263	1,59	1,56	0,03
2264	1,74	1,74	0,00
2265	1,75	1,74	0,01
2266	1,71	1,71	0,00
2267	1,65	1,62	0,03
2282	1,59	1,60	0,01
2283	1,60	1,62	0,02
2294	1,69	1,70	0,01
2295	1,68	1,69	0,01
2300	1,60	1,60	0,00
2301	1,71	1,72	0,01
2302	1,62	1,61	0,01
2303	1,62	1,65	0,03
2373	1,00	1,00	0,00
2374	0,78	0,78	0,00
2375	0,30	0,30	0,00
2376	1,08	1,04	0,04
2377	0,85	0,85	0,00
2378	0,85	0,85	0,00
2380	0,60	0,70	0,10
2381	0,60	0,60	0,00
2393	0,90	0,90	0,00
2394	1,04	1,04	0,00
2395	1,00	1,00	0,00
2396	0,90	0,90	0,00
2397	1,18	1,18	0,00
2398	0,70	0,70	0,00
3334	1,97	1,93	0,04
3335	2.01	1,95	0,05
3336	1,83	1,79	0,05
3337	1,87	1,80	0,07
3545	1,88	1,88	0,00
3546	1,83	1,83	0,01

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3547	2.05	2.03	0,02
3548	2.07	2.06	0,00
3549	2.27	2.25	0,01
3562	1,68	1,67	0,01
3563	1,80	1,76	0,04
3564	2.13	2.10	0,04
3565	2.06	2.05	0,02
3566	2.13	2.17	0,03
3567	2.26	2.26	0,00
Différence calculée moyenne			0,02
	0,02		

Tableau 1 : Comparaison du comptage réel (CR) et du comptage automatique (ISS) de S. aureus.

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
2248	1,43	1,43	0,00
2249	1,52	1,52	0,00
2250	1,76	1,73	0,02
2251	1,65	1,65	0,00
2252	1,60	1,57	0,03
2253	1,76	1,76	0,01
2254	1,70	1,68	0,02
2255	1,69	1,69	0,00
2256	1,48	1,46	0,01
2257	1,67	1,64	0,03
3472	2.23	2.20	0,03
3473	2.20	2.16	0,03
Différence calculée moyenne			0,02
	0,01		

Tableau 2 : Comparaison du comptage réel (CR) et du comptage automatique (ISS) d'E. coli

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3460	2.28	2.06	0,22
3461	2.23	2.12	0,10
3462	2.00	1,88	0,12
3463	1,93	1,83	0,10
3556	1,94	1,81	0,13
3557	1,79	1,88	0,08

Numéro		nbrement g UFC)	Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3559	2.29	2.09	0,21
3560	2.5	2.27	0,23
3561	2.48	2.24	0,24
8218	1,00	1,00	0,00
8219	0,95	1,00	0,05
8220	0,95	0,95	0,00
8221	1,04	1,04	0,00
8222	0,85	0,85	0,00
8223	1,00	1,00	0,00
8224	0,9	0,9	0,00
8225	0,78	0,7	0,08
8226	1,18	1,00	0,18
8227	0,9	0,85	0,06
8228	0,9	0,85	0,06
8229	0,95	0,95	0,00
8230	1,08	0,95	0,12
8231	1,11	1,00	0,11
Diffe	Différence calculée moyenne		
	0,08		

Tableau 3 : Comparaison du comptage réel (CR) et du comptage automatique (ISS) de *P. aeruginosa*

Numéro		nbrement UFC)	Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3410	2.20	2.18	0,02
3411	2.38	2.33	0,05
3412	2.17	2.11	0,05
3413	2.12	1,99	0,13
8238	1,11	1,11	0,00
8239	0,78	0,78	0,00
8240	1,08	1,08	0,00
8241	1,15	1,15	0,00
8242	1,00	1,00	0,00
8243	1,08	1,08	0,00
8244	1,04	1,04	0,00
8245	1,04	1,04	0,00
8246	0,95	1,00	0,05
8247	1,00	0,95	0,05
8248	1,04	1,08	0,04
8249	0,78	0,85	0,07

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
8250	1,04	1,00	0,04
8251	1,00	1,00	0,00
Différence calculée moyenne			0,03
Écart type			0,03

Tableau 4 : Comparaison du comptage réel (CR) et du comptage automatique (ISS) de C. albicans

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	тс	ISS	(valeur absolue)
8258	1,00	1,00	0,00
8259	1,04	1,11	0,07
8260	0,78	0,78	0,00
8261	0,78	0,78	0,00
8262	1,11	1,11	0,00
8263	1,04	1,08	0,04
8264	1,18	1,18	0,00
8265	0,90	0,90	0,00
8266	0,78	0,78	0,00
8267	0,60	0,70	0,10
8268	0,78	0,90	0,12
8269	0,95	1,00	0,05
8270	0,48	0,30	0,18
8271	1,00	1,04	0,04
Différence calculée moyenne			0,04
	0,06		

Tableau 5 : Comparaison du comptage réel (CR) et du comptage automatique (ISS) d'A. brasiliensis

La différence calculée pour l'ensemble des échantillons est proche de 0 avec un maximum de 0,24. La moyenne de toutes les différences calculées est égale à 0,04 avec un écart-type de 0,05. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux modes de dénombrement. Par ailleurs, les graphiques ci-dessous présentent les corrélations résumant tous les dénombrements manuels et automatiques réalisés avec ces cinq souches testées de la pharmacopée.

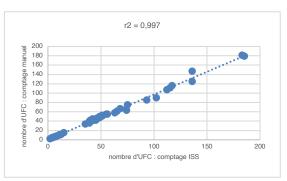


Figure 1 : droite de corrélation entre les dénombrements manuels et automatiques de *S. aureus*.

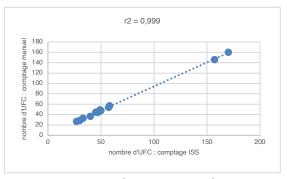


Figure 2 : droite de corrélation entre les dénombrements manuels et automatiques d'E. coli.

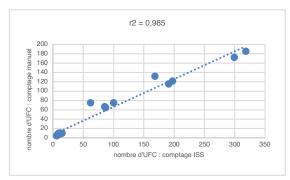


Figure 3 : droite de corrélation entre les dénombrements manuels et automatiques de *P. aeruginosa*.

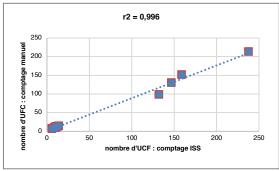


Figure 4 : droite de corrélation entre les dénombrements manuels et automatiques de *C. albicans*.

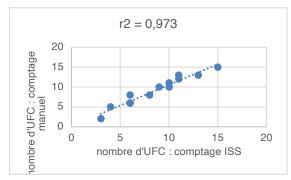


Figure 5 : droite de corrélation entre les dénombrements manuels et automatiques d'A. brasiliensis.

Le coefficient de corrélation R² est compris entre 0,973 et 0,999, démontrant qu'il n'y a pas de variation significative entre le comptage réel et le dénombrement du ScanStation[®].

2. Time to Result

Le ScanStation® capture une image de chaque boite de Petri toutes les 30 minutes. Ces images sont ensuite traitées par la version 1,30 du logiciel de comptage du ScanStation®, ce qui permet la détection en temps réel de l'apparition de chaque colonie et de générer une courbe cinétique pour chaque échantillon. L'ensemble des courbes générées pour chacune des cinq souches de la pharmacopée sélectionnées pour cette étude ont été rassemblée et sont présentées dans les figures 6 à 10 ci-dessous. Ces courbes ont été normalisées au pourcentage de la valeur finale du dénombrement permettant de comparer des échantillons possédant des charges microbiennes variées.

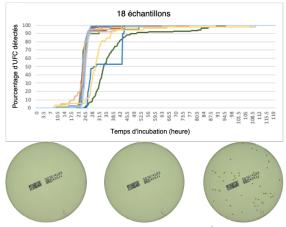


Figure 6 : Ensemble des courbes de 18 échantillons de S. aureus et photos représentatives de la croissance en temps réel de l'échantillon n°2264 à t=0, t=12,5 h et t=21 h.

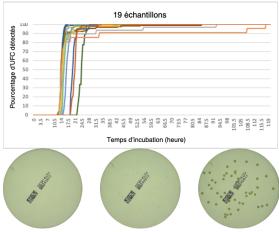


Figure 7 : Ensemble des courbes de 19 échantillons d'E. coli et photos représentatives de la croissance en temps réel de l'échantillon $n^{\circ}2255$ à t=0, t=8 h et t=15,5 h.

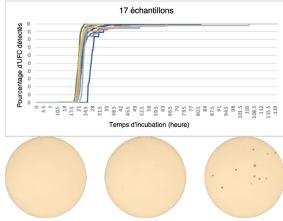


Figure 8 : Ensemble des courbes de 17 échantillons de $\emph{P. aeruginosa}$ et photos représentatives de la croissance en temps réel de l'échantillon n°8221 à t=0, t=6 h et t=12 h.

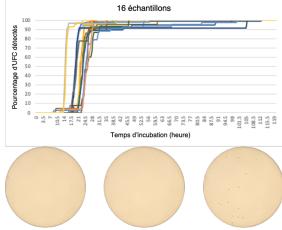


Figure 9 : Ensemble des courbes de 16 échantillons de C. albicans et photos représentatives de la croissance en temps réel de l'échantillon n°8241 à t = 0, t = 9 h et t = 12 h.

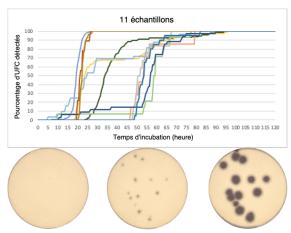


Figure 10 : Ensemble des courbes de 11 échantillons d'A. brasiliensis et photos représentatives de la croissance en temps réel de l'échantillon n°8264 à t=0, t=16,5 h et t=22,5 h.

L'analyse en temps réel de la croissance microbienne permet à l'utilisateur d'anticiper le nombre total d'UFC sur une boite de Petri dès que la courbe a atteint le plateau. Dans cette étude, la détection anticipée (définie comme le temps d'incubation où 85% des échantillons donnent un nombre stable et fiable d'UFC) a été comparée avec l'analyse classique après les trois à cinq jours (72 - 120 heures) d'incubation recommandée par les directives de la pharmacopée pour le contrôle environnemental de l'industrie pharmaceutique⁵. Cette comparaison a montré que l'analyse en temps réel avec le ScanStation® permet de gagner entre 67% et 88% d'un temps d'incubation exigé pour la lecture en point-final. Ces résultats sont détaillés dans la figure 11,

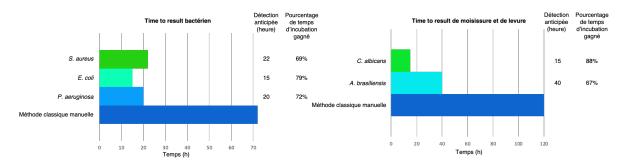


Figure 11 : Détection anticipée (85% des échantillons à 100% du nombre de UFC final) comparée à la lecture en point-final à 72 heures (3 jours) pour les bactéries et à 120 heures (5 jours) pour les levures et les moisissures. Le temps d'incubation gagné est de 67% pour *A. basiliensis* à 88% pour *C. albicans*.

3. Evaluation des performances du ScanStation[®] lors de contrôles environnementaux

3.1, Comparaison de l'énumération manuelle avec celle du ScanStation®

La même méthode que pour le dénombrement des cultures pures présentée dans le paragraphe 1 a été utilisée pour celui des boites de Petri de contrôle environnemental en milieu pharmaceutique par sédimentation d'air ou par collecteur d'air. Le tableau ci-dessous répertorie les lectures automatiques et les comptages réels de 122 boites de Petri après la croissance microbienne. La différence entre le comptage automatique et manuel a été calculée et ainsi que la moyenne et l'écart-type.

Numéro	(log of c)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3170	1,38	1,38	0,00
3171	1,30	1,18	0,12

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3172	1,59	1,57	0,02
3173	1,49	1,46	0,03
3174	1,59	1,54	0,05
3175	1,41	1,41	0,00
3176	1,45	1,45	0,00
3177	1,67	1,69	0,02
3178	1,79	1,74	0,05
3179	1,64	1,66	0,02
3180	1,76	1,72	0,04
3181	1,72	1,70	0,03
3183	1,52	1,51	0,01
3184	1,63	1,57	0,07
3191	1,32	1,38	0,06
3192	1,48	1,48	0,00
3193	1,32	1,36	0,04

Numéro	Dénomb (log l		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
3194	1,48	1,48	0,00
3195	1,57	1,46	0,11
3196	1,67	1,64	0,03
3198	1,46	1,41	0,05
3200	1,67	1,67	0,00
3201	1,61	1,59	0,02
3202	1,71	1,69	0,02
3204	1,66	1,62	0,04
3207	1,70	1,66	0,04
3208	1,20	1,20	0,00
3209	1,54	1,58	0,04
3210	1,48	1,40	0,08
3211	1,46	1,40	0,06
3212	1,48	1,46	0,01
3213	1,51	1,48	0,03
3218	1,66	1,67	0,01
3219	1,59	1,65	0,06
3223	1,70	1,66	0,04
3224	1,53	1,51	0,03
3226	1,54	1,51	0,04
3227	1,62	1,61	0,01
3228	1,63	1,61	0,02
3230	1,38	1,40	0,02
3231	1,40	1,36	0,04
3232	1,62	1,57	0,06
3233	1,60	1,52	0,08
3234	1,58	1,54	0,04
3235	1,43	1,40	0,03
3236	1,43	1,48	0,05
3238	1,49	1,43	0,06
3239	1,45	1,45	0,00
3240	1,49	1,52	0,03
3241	1,20	1,15	0,06
3242	1,46	1,32	0,14
3243	1,54	1,46	0,08
3244	1,61	1,62	0,01
3245	1,51	1,52	0,01
3246	1,52	1,48	0,04
3249	1,68	1,62	0,06
3250	1,52	1,51	0,01

Numéro d'échantillon	Dénombrement (log UFC)		Différence
	TC	ISS	(valeur absolue)
3251	1,56	1,54	0,01
3252	1,41	1,40	0,02
3253	1,58	1,51	0,07
3254	1,57	1,57	0,00
3256	1,46	1,43	0,03
3258	1,41	1,51	0,09
3259	1,56	1,51	0,05
3260	1,41	1,40	0,02
3261	1,36	1,30	0,06
3262	1,28	1,28	0,00
3264	1,49	1,45	0,04
3265	1,23	1,23	0,00
3266	1,49	1,45	0,04
3267	1,60	1,59	0,01
3268	1,68	1,70	0,02
3269	1,63	1,60	0,03
3895	1,62	1,61	0,01
3896	2.36	2.38	0,02
3897	1,70	1,70	0,00
3898	1,95	1,96	0,01
3899	1,81	1,81	0,01
3900	2.05	2.12	0,08
3902	1,76	1,77	0,01
3906	1,76	1,76	0,00
3907	1,97	1,96	0,01
3908	1,61	1,61	0,00
3909	1,69	1,72	0,03
3912	1,79	1,78	0,01
3913	1,69	1,68	0,01
3914	1,56	1,56	0,00
3915	1,53	1,51	0,03
3916	1,64	1,65	0,01
4158	0,48	0,48	0,00
4166	0,3	0,30	0,00
4168	0,00	0,00	0,00
4170	0,78	0,78	0,00
4172	0,30	0,48	0,18
4173	0,48	0,48	0,00
4176	0,78	0,78	0,00
4177	0,30	0,30	0,00

Numéro	Dénombrement (log UFC)		Différence
d'échantillon	TC	ISS	(valeur absolue)
4178	1,04	1,00	0,04
4179	0,78	0,90	0,12
4180	0,78	0,70	0,08
4181	0,00	0,30	0,30
4182	0,30	0,30	0,00
4402	0,60	0,70	0,10
4403	1,08	1,00	0,08
4404	0,78	0,90	0,12
9072	1,00	0,95	0,05
9073	1,00	0,90	0,10
9074	0,30	0,30	0,00
9075	0,85	0,90	0,06
9076	0,78	0,78	0,00
9077	1,52	1,52	0,00
9078	0,48	0,48	0,00
9079	0,95	0,95	0,00
9080	1,04	1,04	0,00
9081	1,38	1,40	0,02
9082	2.08	2.07	0,01
9083	1,54	1,54	0,00
9084	1,45	1,43	0,02
9086	0,90	0,90	0,00
9087	1,28	1,26	0,02
9090	0,85	0,85	0,00
9091	0,95	0,95	0,00
Différence calculée moyenne			0,03
Écart type			0,04

Tableau 6 : Comparaison du comptage réel (CR) et du comptage automatique (ISS) du contrôle de l'air sur 122 boites de Petri.

La différence calculée pour l'ensemble des échantillons est proche de 0 avec un maximum de 0,30 avec une différence moyenne totale égale à 0,03 et un écart-type de 0,04. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux modes de dénombrement. Par ailleurs, le graphique cidessous présente la corrélation résumant tous les dénombrements manuels et automatiques réalisés avec ces 122 boites de Petri.

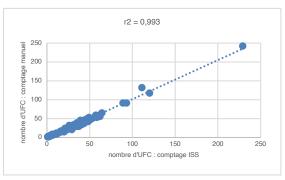


Figure 12 : droite de corrélation entre les dénombrements manuels et automatiques du contrôle de l'air sur 122 boites de Petri.

Le coefficient de corrélation R² est égal à 0,993, démontrant qu'il n'y a pas de variation significative entre le comptage réel et le dénombrement du ScanStation®.

3.2. Time to result

La courbe cinétique de la croissance en temps réel de chaque échantillon a été réalisée. Un Time to result a également été implémenté lorsque la valeur des UFC atteignait 85% du résultat final.

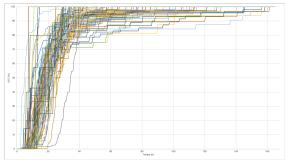


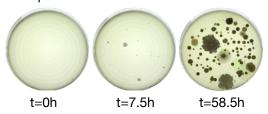
Figure 13 : Ensemble des courbes des 122 boites de Petri de contrôle d'air.

L'analyse en temps réel de la croissance microbienne permet à l'utilisateur d'anticiper le nombre total d'UFC sur une boite de Petri dès que la courbe a atteint le plateau. Dans cette étude, la détection anticipée (définie comme le temps d'incubation où 85% des échantillons donnent un nombre stable et fiable d'UFC) a été comparée avec l'analyse classique après les trois à cinq jours (72 - 120 heures) d'incubation recommandée par les directives la pharmacopée pour le contrôle environnemental de l'industrie pharmaceutique⁵. Cette comparaison a montré que l'analyse en temps réel avec le ScanStation® permet de gagner entre 67% et 88% d'un temps d'incubation exigé pour la lecture en point-final. Ces résultats sont détaillés dans la figure 11.

La période de première détection varie de 3 heures à 16 heures d'incubation avec une moyenne égale à 8,3 heures ± 1,9. De plus, 85% des résultats sont atteints après une moyenne de 35,2 heures $\pm 10,1$ d'incubation. Cette large fourchette de valeurs est expliquée par les conditions intrinsèques de l'échantillonnage. En effet, ces échantillons ont été analysés en suivant les conditions réelles de laboratoire ce qui par conséquent entraine une variabilité des conditions de stresse entre les échantillons qui ont des impacts variés sur la croissance microbienne. Cependant, la lecture des courbes de Time to result permet d'obtenir des résultats anticiper et par conséquent de donner la possibilité à l'opérateur de définir une action corrective en avance, le cas échéant.

3.3. Photos représentatives de la croissance en temps réel d'un contrôle d'air air sur milieu TSA

Exemple de l'échantillon n°3900 :



Discussion

Le ScanStation® réalise le dénombrement de boites de Petri par la détection de la formation dynamique de chaque colonie. Cette méthode permet un comptage aussi proche que possible du nombre réel de colonies sur la boite. En effet, la possibilité de contrôler la croissance des colonies en temps réel permet d'éviter l'oubli de colonies confluentes donnant des faux négatifs, ce qui peut se produire avec un compteur de colonie automatique en point final ou lors d'un comptage manuel. De plus, la première photo T0, prise au tout début de l'incubation juste après le chargement de la boite dans le ScanStation® et donc avant toute croissance microbienne, est utilisée comme une tare de référence pour l'analyse. Par conséquent, cette première photo permet d'éliminer virtuellement tous les potentiels artéfacts (bulle dans le milieu, fragment solide provenant de la matrice...) qui pourraient être présents sur la gélose, pour prendre en compte uniquement l'apparition dynamique colonies pendant l'incubation, réduisant ainsi les faux positifs.

Dans cette étude, le "comptage réel" a été réalisé par un opérateur qui a analysé les aénérées vidéos par le loaiciel ScanStation®. D'une manière similaire au ScanStation® qui permet de mieux éviter le comptage de faux positifs et de faux négatifs qu'un compteur de colonie en point final, cet opérateur fourni un résultat de dénombrement qui est plus proche du nombre réel de colonies que celui obtenu avec la méthode de lecture classique. C'est la raison pour laquelle, la méthode du comptage réel a été considérée comme la meilleure méthode de référence pour évaluer la performance de dénombrement du ScanStation®.

La comparaison du dénombrement réalisé par le ScanStation® avec le comptage réel de cinq souches de la pharmacopée européenne a montré une forte corrélation entre les deux méthodes. En effet, le coefficient de corrélation R² est très proche de 1 pour les cing souches testée (figures 1 à 5). Ce résultat prouve que la méthode de dénombrement du ScanStation® est précise et fiable. Par conséquent, le ScanStation® est un équipement adapté au contrôle qualité d'un laboratoire pharmaceutique qui peut s'intégrer aussi bien en production qu'en R&D. En effet, le contrôle de la matière première et/ou du produit fini est une étape cruciale de la production pharmaceutique parce qu'il permet d'assurer la sécurité et la qualité du produit médical comme il est exigé par les directives de la FDA 21CFR211,84 ou ICH Q76,7. Le contrôle qualité consiste au suivi de la charge microbienne présente dans la matière première et à déterminer si le produit fini tombe dans une limite très stricte de cette charge microbienne. Aussi, le ScanStation® permet de réaliser ces contrôles en temps réel et si les limites imposées sont atteintes, une alerte anticipée peut être donnée, permettant ainsi une gestion plus précise des stocks.

Le contrôle en temps réel de la croissance des colonies par le ScanStation® met en évidence les trois phases de croissance des microorganismes. La première phase est la phase de latence pendant laquelle les colonies ne sont pas encore visibles à l'œil nu, suivies par la phase exponentielle où le nombre de colonies augmente très rapidement, et enfin la phase stationnaire pendant laquelle plus aucune apparition de colonie n'est observée; vient ensuite la phase de déclin où le nombre de

colonies décroit de manière exponentielle8. Ces trois premières phases sont modélisées dans la figure 1, Les directives de la pharmacopée⁹ impose un minimum de cinq jours d'incubation pour fournir un résultat conforme d'une culture microbienne. Ces cing jours assurent la possibilité d'atteindre la phase stationnaire sans manquer aucune colonie. L'étude du time to result des cinq souches testées de la pharmacopée ainsi que l'étude du contrôle de l'air réalisées avec le ScanStation® démontre que la phase stationnaire est atteinte bien avant les cinq jours recommandés. Ces résultats prouvent que le ScanStation® peut être utilisé pour les analyses de contrôle environnemental ou de bioburden pour fournir, après validation, un résultat anticipé confirmant qu'une salle blanche est toujours stérile pour une production pharmaceutique. De plus, dans le cas d'une contamination, le ScanStation® peut aussi fournir une détection précoce du contaminant offrant l'opportunité d'engager une alerte anticiper. En prenant l'exemple de l'analyse réalisée avec une culture pure d'E. coli dans cette étude (figure 9, tableau 6), la première détection se déroule après une moyenne de 40 heure d'incubation. Le contaminant peut être détecter 105 heures plus la méthode qu'avec classique recommandée par les directives de la pharmacopée. Par conséquent, la production peut être arrêtée, le cas échéant, beaucoup plus tôt permettant ainsi de réduire les coût de production^{10,}

Conclusion

A la lumière des résultats discutés dans cette étude qui montrent une forte et significative corrélation entre le comptage automatique des UFC par le ScanStation® avec le comptage réel vérifié par un opérateur humain de l'ensemble photos prises pendant le cycle d'incubation, nous recommandons en toute confiance l'utilisation du ScanStation® pour le contrôle environnemental ou les analyses bioburden. De plus, les études de time to result nous donne un aperçu de la cinétique de la croissance des cinq principales souches de la pharmacopée ce qui est peut être utilisé, si elles sont répliquées et validées dans le laboratoire où le ScanStation® peut être installé, pour raccourcir le temps détection du contrôle environnemental et donc de réduire les coûts de production dans l'industrie pharmaceutique. Le ScanStation® répond parfaitement aux recommandations de la FDA et son logiciel est conforme au 21 CFR Part 11 offrant une intégrité et une traçabilité complètes des données pour l'utilisateur.

D'autres recherches sont en cours pour évaluer les performances du ScanStation® dans d'autres domaines d'applications comme l'industrie agro-alimentaire ou cosmétique.

Remerciements

Les auteurs souhaiteraient exprimer leur gratitude pour toutes les personnes impliquées dans la rédaction, la relecture et l'édition de cette note applicative. En particulier, nous remercions les clients qui ont travaillé avec nous à travers de nombreuses itérations du logiciel et partagé leurs données pour nous aider à créer la version la plus efficace à ce jour. En interne, nous remercions nos experts en microbiologie Sylvie Viboud, Emilie Tran et Manon Laborie, pour leurs conseils et leur aide dans le traitement des données.

Références

1, Evaluation of Electronic Colony Counters.

M. G. Fleming and F. O'Connor; Irish Journal of Agricultural Research Vol. 14, No. 1 (Apr., 1975), pp. 21-26.

DOI: 10,2307/25555750

2. Predictors of bacterial resistance using in vitro dynamic models: area under the concentration—time curve related to either the minimum inhibitory or mutant prevention antibiotic concentration.

Elena N. Strukova, Yury A. Portnoy, Stephen H. Zinner, Alexander A. Firsov; Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 71, No. 3 (Mar., 2016), pp. 678–684.

DOI:10,1093/jac/dkv387

3. Current practices and Prospects for Standardization of the Hematopoietic Colony-Forming-Unit (CFU) assay: A Report by the Cellular Therapy Team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative.

Derwood Pamphilon, Eileen Selogie, David McKenna, Jose Cancelas-Peres, Zbigniew M. Szczepiorkowski, Ron Sacher, John

McMannis, Hermann Eichler, Henk Garritsen, Minoko Takanashi, Leo van de Watering, David Stroncek, and Jo-Anna Reems; Cytotherapy, Vol. 15, No. 3 (Mar., 2013), pp. 255-262.

DOI: 10,1016/j.jcyt.2012.11,013

4. Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: Comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts.

Basil Jarvis, Alan J. Hedges, Janet E. L. Corry; International Journal of Food Microbiology, Vol. 116, No. 1 (May 2007), pp. 44-51,

DOI: 10,1016/j.ijfoodmicro.2006.12.037

- 5. Pharmaceutical Microbiology Manual, 2015 https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/Pharmaceutical-Microbiology-Manual.pdf accessed 02SEP20
- 6. FDA Code of Federal Regulations 21CFR211,84, Revised 2019.

https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs%20/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211,84 accessed 02SEP20

- 7. ICH Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients, 2016

 https://www.fda.gov/files/drugs/published/Q7-Good-Manufacturing-Practice-Guidance-for-Active-Pharmaceutical-Ingredients-Guidance-for-Industry.pdf accessed 02SEP20
- 8. "Bacterial Growth Curve", revised 2004. Fankhauser, David B. University of Cincinnati Clermont College.

https://web.archive.org/web/20160213221827/http://biology.clc.uc.edu/Fankhauser/Labs/Microbiology/Growth Curve/Growth Curve.htm accessed 02SEP20

- 9. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition
- 10, Bai, Ge, et al. "THE COST OF MANUFACTURING DISRUPTIONS." Strategic Finance, <u>sfmagazine.com/post-entry/december-2015-the-cost-of-</u>

manufacturing-disruptions/ 02SEP20

accessed