

Les différentes méthodes de décontamination des incubateurs à CO2

La stérilisation à l'air chaud à 180°C – une méthode reconnue et validée pour éliminer les contaminations microbiennes

Introduction

Les contaminations microbiennes, causées par des bactéries, des spores, des virus, des levures ou d'autres microorganismes, représente le problème majeur des expériences en culture cellulaire. Et comme ces contaminations n'apparaissent pas forcément au même rythme que la croissance cellulaire, elles sont souvent détectées trop tard. D'autres paramètres sont plus subtils, comme le manque de certains nutriments essentiels et la ségrégation de certains métabolites microbiens causés par de légers changements du pH, celui-ci devant être maintenu entre 7,4 et 7,6 pour les cellules humaines et de mammifères. Une hyperacidité du milieu de culture peut alors apparaître, ralentissant ainsi la croissance cellulaire et diminuant la confluence des cellules. Des changements de la morphologie de la cellule hôte, voir même des modifications génétiques comme des aberrations chromosomiques ou des translocations, peuvent par exemple être causées par des mycoplasmes. Dans certains cas, un simple germe peut détruire des semaines ou des mois d'un travail de recherche complexe.

Les raisons de l'introduction de germes ou de la dispersion des contaminants sont innombrables : l'utilisation de lignées cellulaires, milieux, sérum, ou autres réactifs déjà contaminés, des bactéries en suspension, un équipement pas ou mal désinfecté ou stérilisé, ou encore un contaminant introduit accidentellement par les manipulateurs.

Et comme la vérification de la présence éventuelle de germes implique des procédures complexes et fastidieuses, des mesures de contrôles de la contamination doivent être instaurées.

Importance du contrôle de la contamination dans la culture de lignées cellulaires et de cellules primaires

Compte tenu du développement de plus en plus important de l'utilisation de cultures cellulaires sensibles, comme l'ingénierie tissulaire, les cellules souches ou la thérapie cellulaire, les exigences concernant les incubateurs à CO2 ont changées.

Un suivi de haut niveau de la perfection et de la reproductibilité est donc appliqué à l'ensemble du process de culture cellulaire, dans laquelle l'incubateur à CO2 occupe une place stratégique, celui-ci devant reproduire les conditions *in vivo* de croissance cellulaire optimale avec le plus de précision possible. Dans toutes les thérapies à base de cellules, comme par exemple une suspension de chondrocytes autologues destinés à être réimplantés chez un patient, le problème réside dans le fait que le produit final ne peut pas être stérilisé comme le serait une substance pharmaceutique. Pour cette raison, des recommandations comme les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF – en anglais GMPⁱ), les bonnes pratiques en culture cellulaireⁱⁱ, ainsi que la directive européenne sur les tissus humainsⁱⁱⁱ, entre autres, recommandent pour la manipulation des cellules et tissus humains l'utilisation de matériel à usage unique et / ou d'équipements pouvant être stérilisés. Des conditions stériles doivent pouvoir être assurées pendant toute la période de culture *in vitro*

des cellules, essentiellement car en plus du risque de dispersion de la contamination, le pronostic vital du patient peut être menacé.

Quelques définitions claires : désinfection, stérilisation, décontamination

Faisons un point rapide sur les concepts de stérilisation, de décontamination et de désinfection. La stérilisation correspond à l'élimination complète et/ou à l'absence de microorganismes viables. La désinfection est définie par l'élimination ou l'inactivation de tous les pathogènes présents, ce qui représente en général seulement une partie des contaminants possibles. Le terme décontamination, lui, peut être utilisé dans plusieurs situations telles que l'élimination de contaminants biologiques, ou chimiques ou radioactifs. Il ne donne souvent pas lieu à des conclusions précises quantifiables à l'égard de son efficacité.

Concernant les mécanismes et la vérification de l'efficacité des méthodes de désinfection et de stérilisation, une multitude de recommandations et de normes existent dans le monde, en particulier dans l'industrie pharmaceutique et dans le cadre des essais cliniques. Les pharmacopées font état essentiellement de la stérilisation en autoclave, de la stérilisation à air chaud, de l'utilisation de l'oxyde d'éthylène et de la filtration stérile comme méthodes de stérilisation. L'aptitude d'une méthode spécifique pour une application spécifique doit donc être particulièrement réfléchi et le procédé de stérilisation retenu demande une validation en fonction des organismes testés.

Pour une stérilisation effective, les différentes pharmacopées nationales^{iv} ont toutes retenues une réduction de 6 log des microorganismes viables, ce qui équivaut à un microorganisme viable pour un million, soit 1 pour 1.000.000 d'unités. Il s'agit d'une diminution minimale de 99,9999% du nombre des microorganismes initialement présents.

Les différents concepts de décontamination des incubateurs à CO2

Les différents fabricants d'incubateurs à CO2 ont développé des concepts très différents pour la prévention et le contrôle de la contamination. Récemment, l'accent a été de plus en plus mis sur la sécurisation des procédures, leur efficacité et la réduction de leur coût.

Dans ce contexte, l'exigence de stérilité d'une culture cellulaire dans un incubateur à CO2 a posée des défis techniques significatifs.

Dans le choix d'une méthode de décontamination adaptée, les aspects critiques suivants doivent être pris en compte :

- La chambre intérieure de l'incubateur doit être adaptée à une désinfection périodique par pulvérisation d'un spray et nettoyage manuel, ceci étant la procédure standard pour réduire la charge biologique, c'est-à-dire la charge microbiologique de l'incubateur. On privilégiera des métaux (intérieur de l'incubateur) et surfaces en verre (porte intérieure vitrée fermant l'espace d'expérimentation) faciles à nettoyer, sans soudure, et si possible sans vis ou autres éléments devant être démontés avant la désinfection (ventilateurs, protections des éléments de guidage de l'air). Ceci permettra un nettoyage rapide et uniforme de toutes les surfaces intérieures avec le désinfectant. La réduction des éléments intérieurs comme les supports d'étagères, d'humidification, etc. à leur absolu minimum technique permet de minimiser la contamination potentielle des surfaces intérieures dès le départ.
- La prévention de la condensation, celle-ci constituant le terrain de prédilection des germes pour leur développement dans un incubateur.

- L'élimination des contaminants potentiels par un procédé de stérilisation à l'efficacité vérifiable et vérifiée.

De plus, les supports de culture cellulaire utilisée doivent prévenir l'introduction de germes en suspension dans l'air, présents même dans les salles blanches. Les flasques de culture munies d'un filtre bactérien 0,2µm ont fait leurs preuves dans ce sens.

Les différents procédés de décontamination actuellement présents sur le marché sont :

- La désinfection à air chaud avec une température pouvant aller de 120°C à 140°C, sur des durées variables (parfois combinés à des filtres HEPA), ce qui ne correspond pas à une stérilisation à air chaud telle que recommandée par les pharmacopées (voir Figure 1: Recommandations & Normes internationales pour la stérilisation à air chaud). Pour un système utilisant la chaleur humide à 140°C, il a été indiqué une réduction de 6 log pour *B. subtilis* var. spores Niger ATCC #9372^v.
- La désinfection par vapeur humide à 90°C, qui a montré que les spores les plus résistantes à la chaleur pouvaient ne pas être éliminées totalement^{vi}.
- L'association de la vapeur à 95° avec la chaleur sèche à 145°C et de filtres HEPA, procédure pour laquelle aucune étude d'efficacité n'est disponible, et demandant un remplacement régulier des filtres après la décontamination.
- Les filtres HEPA avec différentes tailles de pores, par exemple 0,3µm, qui permettent une réduction des particules dans l'espace intérieur de l'incubateur^{vii}, mais demandent aussi une maintenance régulière.
- Des chambres intérieures composées de cuivre qui relarguera ses ions bactéricides via une oxydation, agissant ainsi comme des cytotoxines sur la chaîne respiratoire du métabolisme bactérien. Cet effet du cuivre est connu depuis des siècles et a été scientifiquement documenté. Cependant, cette méthode n'est pas adaptée à toutes les bactéries, ni aux spores et pas non plus aux virus ; elle n'offre donc qu'une protection limitée. De plus, les ions cuivre libérés sont aussi toxiques pour les humains. Cette technique provoque aussi une décoloration de toutes les surfaces cuivrées de l'incubateur. L'efficacité des alliages cuivre / inox ainsi que celle du cuivre enrichi en inox sur des organismes référents a été évaluée, par une série d'expériences^{viii}, entre 99,847% et 99,998%, ce qui ne correspond pas aux critères de stérilité (voir plus haut). A proprement parler, pour la désinfection, une réduction de 99,9999% du nombre initial de germes doit être prouvée.
- Les traitements aux UV par application d'UVC d'une longueur d'ondes de 253,7nm. L'effet mutagène des radiations UV a été prouvé, leur efficacité dépend cependant étroitement de l'irradiation directe puisqu'elles ont un pouvoir pénétrant limité et ne sont satisfaisantes que pour un traitement en surface. L'utilisation des radiations UV pour la désinfection de l'eau est particulièrement bien connue. Leur efficacité pour le traitement de l'eau des systèmes d'humidification des incubateurs à CO2 a été décrite^{viii} ; cependant il apparaît que le traitement par les UV n'est pas nécessaire si l'eau du bac à eau est régulièrement remplacée par une eau distillée stérile (les recommandations des fabricants sont en général d'un à deux changements d'eau par semaine). De plus, l'effet bactéricide semble négligeable pour les bactéries en suspension dans l'air puisque leur temps de fixation sur une zone d'irradiation directe est marginal. Wallhäusser & al.^{iv} ont noté un effet diminué des radiations UV lorsque l'humidité relative est supérieure à 80%.

- La stérilisation à air chaud avec des températures supérieures à 160°C, c'est-à-dire en chaleur sèche, pendant une durée définie par les pharmacopées (voir Figure 1: Recommandations & Normes internationales pour la stérilisation à air chaud). Il a été prouvé que la stérilisation était efficace sur les germes tests selon l'USP avec un simple programme de stérilisation à l'air chaud^{VI}.

Standards internationaux concernant la stérilisation en chaleur sèche

Norme	Température	Durée de stérilisation
Pharmacopée US	170°C	120 min
Pharmacopée Européenne	minimum 160°C	minimum 120 min
Americal Dental Association	160°C	120 min
ANSI/AAMI ST63-D	≥ 160°C	Non défini
ANSI/AAMI ST50	160°C	120 min
DIN 58947	180°C	30 min
Pharmacopée Nordica	180°C	30 min
Directive d'Hygiène de l'Institut Robert Koch	160°C ou 180°C	200 min ou 30min
Pharmacopée Japonaise	160 à 170°C ou 170 à 180°C ou 180 à 190°C	120 min ou 60 min ou 30 min
Pharmacopée Britannique	minimum 160°C	minimum 60 min

Figure 1: Recommandations & Normes internationales pour la stérilisation à air chaud

L'une des exigences initiales est que la durée de traitement des surfaces concernées, c'est-à-dire les surfaces de la chambre intérieure dans le cas des incubateurs à CO₂, soit appropriée. En règle générale, plus la température de stérilisation appliquée est élevée, plus la durée de stérilisation nécessaire est courte.

Dans les publications actuelles, un accent est mis sur le temps total de la procédure de décontamination et les éléments nécessaires à une prévention de la contamination. Un examen critique doit aussi considérer le temps actuel de la procédure ainsi que le coût de tous les consommables et accessoires utilisés comme les filtres HEPA et les lampes UV, ainsi que les coûts humains générés par le temps passé à exécuter ces procédures. Enfin, il faut bien réaliser qu'aucune des techniques mentionnées précédemment, à l'exception de la stérilisation à air chaud avec une température ≥ 160°C, ne sont des procédures répondant aux standards des pharmacopées et ne sont donc pas considérées comme des méthodes de stérilisation approuvées.

Mise en place simple des différents concepts de décontaminations : sécurité, efficacité, et coûts.

A présent, comparons la pertinence des procédures vis-à-vis des normes de stérilisation, leur sécurité, leur efficacité et leur coût.

- Désinfection par chaleur humide à 90°C : ici l'avantage est de pouvoir générer un grand volume de vapeur germicide avec un volume relativement faible d'eau. Cependant, cette technique n'est pas comparable à la stérilisation en autoclave avec

une vapeur à 121°C. Il a été démontré que les spores des bactéries *Bacillus subtilis* et *Bacillus stearothermophilus* étaient résistantes à ces températures et que le résultat n'était donc pas satisfaisant^{vi,ix}. Parfois, un cycle d'au moins 25h est nécessaire, suivi par une recalibration conséquente de la sonde de mesure du CO2. La condensation produite par le refroidissement de la vapeur d'eau implique un risque potentiel de recontamination des surfaces traitées. Le fabricant recommande d'ailleurs après le cycle une désinfection manuelle supplémentaire avec un produit adapté et le port d'une tenue stérile.

- L'utilisation de filtres HEPA afin de réduire la concentration en particules dans les salles blanches est reconnue et un procédé à l'efficacité vérifiable. Cependant, leur application dans le contrôle de la contamination dans les incubateurs à CO2 est subordonnée aux conditions suivantes :
 - L'air de l'incubateur est aspiré à travers un filtre HEPA dont l'efficacité d'élimination est définie par la vitesse du ventilateur ; avec des filtres adaptés une diminution de la charge en particules de l'incubateur peut être obtenue.
 - Dans certains modèles d'incubateurs, cette recirculation forcée de l'air est aussi utilisée pour obtenir une température homogène et/ou une répartition homogène du CO2 dans l'incubateur.
 - Cependant, les filtres HEPA contiennent alors des germes viables, ce qui requiert un remplacement régulier du filtre. Un autoclavage prolongé est recommandé avant l'installation du nouveau filtre.
 - Les cycles de désinfection en chaleur humide ou sèche dans des incubateurs équipés de filtre HEPA exige un remplacement systématique du filtre, c'est-à-dire que les éléments de filtration doivent être changés avant chaque procédure de décontamination. Lorsque cette procédure doit être effectuée fréquemment, le coût peut devenir considérable.
 - Dans les expériences nécessitant des supports de culture ouverts, c'est-à-dire lorsque les germes peuvent facilement passer d'une culture à l'autre, le travail en environnement propre (salle blanche) est impératif afin de garder les germes loin des cultures.
 - Alors que la réduction des particules dans l'atmosphère de l'incubateur peut minimiser le risque de contamination dans les supports ouverts, il faut noter que des supports de haute qualité intégrant des filtres antibactériens dans le bouchon existent et bloquent le passage des germes venant de l'atmosphère de l'incubateur, évitant ainsi toute contamination croisée.
 - Des conditions stériles sont absolument essentielles dans les flasques de culture cellulaire. Dans ce cas, la réduction des particules n'est pas nécessaire.
- L'application d'UV en combinaison avec un alliage cuivre / inox a été décrite précédemment^{viii}. Pour un traitement intensif des surfaces intérieures, le fabricant recommande une irradiation UV directe de 24 heures, ce qui requiert le démontage préalable des systèmes de fixation des étagères ainsi que des composants permettant le guidage de l'air, incluant le ventilateur. Suite au cycle UV, toutes les surfaces intérieures doivent être de nouveau désinfectées avec de l'alcool isopropylique à 70%, par un opérateur en tenue stérile. Dans les procédures de routine, qui doivent pouvoir être appliquées n'importe quand, ce process peut paraître relativement coûteux et long comparé à une stérilisation à l'air chaud s'effectuant sur la nuit. Malgré la durée de vie apparemment longue des systèmes de

lampes UV (1000 heures, d'après les données fabricant), le remplacement des lampes devient assez cher lorsque la procédure est effectuée régulièrement.

Le concept Binder pour minimiser les surfaces potentielles de contamination et éliminer efficacement les contaminants.

Les séries C et CB d'incubateurs à CO₂ de Binder sont conçues pour une désinfection facile par pulvérisation d'un spray et nettoyage manuel et une stérilisation automatique de routine. Ce design optimisé facilite le travail et ne demande aucune pièces de rechange onéreuses, comme les filtres et les lampes UV notamment. Il est constitué des éléments suivants :

- Une chambre intérieure emboutie, sans soudure, facile à nettoyer, avec 27% de surface potentielle de contamination en moins, et un système intégré de support d'étagère pour minimiser les surfaces potentielles de contamination.
- L'absence de condensation, même lorsque la culture s'effectue dans un air saturé en humidité, et des surfaces en inox poli sans aucune soudure pour prévenir la fixation et la prolifération des germes en suspension.
- Une stérilisation à l'air chaud à 180°C, prouvée et efficace, en accord avec les standard, qui peut être confortablement effectuée sur la nuit et correspondant aux exigences internationales en terme de stérilisation à air chaud.

Le texte ci-dessus est une comparaison des différents concepts de décontamination des incubateurs des CO₂ du point de vue des utilisateurs. Les spécialistes de la culture cellulaire peut ainsi passer en revue les différentes options proposées par les fabricants et trouver le concept correspondant à leur besoin.

Liste de Recommandations Internationales :

- US Pharmacopoeia www.usp.com
- Pharmacopeia Europea 1997 5.1.1
- American Dental Association www.ada.org
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) www.aami.org
- German Institute for Standardization (DIN) www.din.de
- Pharmacopoeia Nordica Online Reference via www.dekker.com
- Federal Law Gazette 22, No. 10, performing sterilization, Appendix to sub-paragraph 7.1 of the Guideline for the identification, prevention and control of infection in hospitals, Ordinance for the prevention of infectious disease (Hygiene Directive)], Robert-Koch-Institut, 2003
- Japanese Pharmacopoeia www.jpdb.nihs.go.jp/jp14e
- British Pharmacopoeia Commission Methods of Sterilization. London, UK: Appendix X VIII, 2003

ⁱ <http://www.fda.gov/>

ⁱⁱ S. Coecke & al., Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture (GCCP), ATLA 33, 261-287, 2005

ⁱⁱⁱ European Human Tissue Directive, 2006/17/EC implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissue and cells

^{iv} K.H. Wallhäußer, Practice of Sterilization, disinfection – Conservation, Germ Identification, 5. edition, 1995

^v J. Dalamasso, APEX Laboratories, Effective Heat Sterilization in CO₂-incubators , Vol. 4, No. 3, Thermo Electron Corporation's Heat Sterilization White Paper, 2003

^{vi} P. Distler, 180 °C Hot air sterilization: a safe method against microbiological contamination in CO₂-incubators Lab Asia, November 2003, p. 11

^{vii} A. Campbell, D. Figel, Importance of Class 100 Air in a CO₂-incubator, Vol. 4, No. 1, Thermo Electron Corporation's Class 100 Air White Paper, 2003

^{viii} H. Basujima, D. Mistry, Technical Development Report, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd. A Comparative Analysis of Ultra-violet Light Decontamination versus High-Heat Sterilization in the Cell Culture CO₂-incubator, with the Use of Copper-Enriched Steel Construction to Achieve Background Contamination Control™, 2007

^{ix} Biosafety Investigation Unit, CAMR, Efficacy of a CO₂-incubator heat disinfection cycle on dried microbes, 1998