

Stratégie de validation

de la DSVA dans le
BSL-3 d'une CDMO



NAOBIOS, CDMO certifiée BPF*

NAOBIOS est une société française **certifiée BPF***, spécialisée dans les projets de **développement de bioprocédés**, en particulier les produits viraux. Cette CDMO travaille sur **virus vivants** ou sur **OGM**, en **conditions aseptiques**, en volume de laboratoire jusqu'à 200L en production BPF. Les projets, donc les produits, changent régulièrement ; ajouté à cela la nature des virus manipulés, le **risque de biocontamination est particulièrement élevé** et la désinfection fait l'objet d'une attention et d'une surveillance spécifiques.

Dans ces locaux de type **BSL-2** et **BSL-3**, **classés C à A**, la DSVa est réalisée à chaque fin de campagne, tous les deux à trois mois environ, six mois au maximum. La **configuration** de la zone de travail **évolue** à chaque projet : équipements nécessaires, empreinte au sol et en volume, etc. Pour **chaque configuration**, la nécessité d'une éventuelle **nouvelle qualification de performance (QP)** est évaluée sur la base d'une **analyse de risques** pour **s'assurer** de l'**efficacité** de la **DSVA** de fin de campagne avant de travailler avec un nouveau matériel biologique (virus). Dans tous les cas, la **QP de la désinfection est revalidée** au plus tard tous les deux ans ou plus tôt dans le cadre de changement majeur.



Contexte du projet



Le projet présenté ici se situe dans la zone de production « CM4 », **zone BSL-3 de 270 m³** composée d'une **pièce de production de 140 m³**, d'une **pièce d'extraction de 31 m³** avec un poste de sécurité microbologique (PSM) directement relié au circuit de ventilation (**sorbonne**) et des **vestiaires, sas, et pièces complémentaires** (voir plan de la zone graphe 1). Le matériel de désinfection, un équipement de type VHP, étant vieillissant et obsolète, il a fait l'objet d'un renouvellement. A cette occasion, d'autres solutions de DSVA ont été étudiées ; le cahier des charges utilisateurs mentionnait entre autres :

- ✓ efficacité à **6 log₁₀** de désinfection,
- ✓ **sécurité** du personnel,
- ✓ **innocuité** sur les équipements et la structure de la Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC),
- ✓ **simplicité** de mise en œuvre,
- ✓ **traçabilité** et **conformité** des données.

Contexte du projet

	Phileas® Genius	Phileas® ONE	Phileas® 250
Image			
Volume désinfecté	0,5-5 m3 (PSM, isolateur)	10-165 m3 (pièce, laboratoire, salle d'opération)	20-800 m3 (couloir, multi-pièces, grandes zones)
Module de diffusion	1 module	1 module	2 modules
Débit de diffusion	400 mL/h	1,2 L/h	3 L/h
Capacité de biocide	250 mL	2 L	10 L
Commentaire	Sur batterie	-	Balance intégrée

Tableau 1 : caractéristiques des modèles du parc d'appareils de Naobios

Développement de cycles



Après qualification d'installation et opérationnelle des équipements, la phase de **développement de cycles a débuté** pour les deux parties de la zone. Le choix a été fait de tester des cycles de nuit, conformément aux habitudes du site :

- **lancement** de la désinfection en **fin de journée** (fin d'activité des zones adjacentes),
- **temps de contact long**,
- **redémarrage** de la Centrale de Traitement d'Air (CTA) en **fin de nuit**, pour une reprise d'activité le lendemain matin.

Cette **organisation** permet de ne **pas interrompre les opérations** et de réaliser la désinfection totalement en temps masqué.

Développement de cycles

Le graphe 2 présente la **configuration des pièces** de la zone CM4, ainsi que le **positionnement des appareils Phileas®** pour la DSVA des parties 1 et 2. Pour ces développements de cycle, les indicateurs biologiques (IB) sont des ***Geobacillus stearothermophilus log10 6 en enveloppe Tyvek (Mesa Labs)***, triplés à chaque point, accompagnés d'un **indicateur chimique (IC)** à chaque point. Les indicateurs dans le PSM sorbonne de la pièce 93, faisant l'objet d'une validation complémentaire, sont des **triscala** (indicateurs de log10 4, 5 et 6 dans une même enveloppe Tyvek, Mesa Labs), ce qui permet de **vérifier le log** de désinfection atteint. Le nombre et le positionnement des indicateurs dans les pièces avaient fait l'objet d'une **analyse de risque** antérieurement, et il n'y a pas eu lieu de les modifier pour ce projet (voir tableau 2).



Graphe 2 : mise en place de la DSVA des parties 1 et 2 de la zone « CM4 » : appareils, indicateurs

Développement de cycle

Position des IB/IC Partie 1	Position des IB/IC Partie 1	Position des IB/IC PSM sorbonne pièce 93
1 : au centre sur la paillasse	1 : sur le bac de douche de sécurité	1 : sortie de filtre "exhaust"
2 : au centre du PSM	2 : sur l'équipement	2 : paroi de gauche du plénum
3 : sous le Phileas® 250	3 : au sol devant l'équipement	3 : paroi droite du plénum
4 : au centre de l'équipement	4 : sous le Phileas® 250	4 : paroi gauche du plan de travail
5 : sur la grille de reprise (pièce 93)	5 : au sol, ses sortie personnel	5 : paroi droite du plan de travail
6 : au centre de l'équipement	6 : au sol, sas gris personnel	6 : sous le plan de travail à gauche
7 : dans l'équipement	7 : au sol, sas blanc personnel	7 : sous le plan de travail à droite
8 : dans l'équipement	8 : au sol, sas matériel	
9 : sur l'équipement		
10 : au centre de l'équipement		
11 : au centre de l'équipement		
12 : derrière la grille de reprise (pièce 94)		
13 : pas d'IB 13		
14 : au centre de l'équipement		
15 : au centre de l'équipement		

Tableau 2 : positionnement des indicateurs chimiques et biologiques dans les parties 1 et 2 et dans le PSM (pièce 93)

Développement de cycle

La stratégie de désinfection du PSM en sorbonne de la pièce 93 a été longuement discutée (seul PSM sorbonne du site – les autres PSM ne sont pas reliés à la CTA) : le PSM, même à l'arrêt, est ventilé par la CTA. Pour pouvoir le désinfecter, il faut couper la CTA, donc mettre à l'arrêt toute la zone. Une **désinfection du PSM entraîne, par conséquent, une désinfection en suivant de la zone.**

La séquence de DSWA aux campagnes change-over est donc la suivante :

- **nettoyage** de la zone et des équipements
- 16h : **mise en place des équipements** de DSWA : Phileas® 250, Phileas® ONE dans les pièces, Phileas® Genius dans le PSM ; **mise en place des indicateurs**
- 16h30 : **arrêt de la CTA**
- 16h40 : **programme de désinfection du PSM** de type « maintenance » : programme long, visant à désinfecter l'espace de travail autant que le plenum et les filtres, jusqu'au filtre de sortie (a contrario d'un programme court dit « de routine », pour la désinfection de l'espace de travail et en dessous uniquement)
- 17h40 : **lancement des appareils pour les pièces, sortie de zone** du personnel. Inutile de scotcher les portes (hormis si une différence de pression avec la zone adjacente pourrait provoquer une entrée d'air ou une fuite d'H₂O₂ et donc une perte d'efficacité)
- 5h : **reprise de la CTA**
- 8h : **vérification du taux résiduel d'H₂O₂** (<1ppm), **entrée du personnel, reprise d'activité**



Développement de cycle

	CM4 Partie 1		CM4 Partie 2	
Protocoles				
	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 1	Protocole 2
Dose	Dose « sécuritaire »	Dose « sécuritaire » -30%	Dose « sécuritaire »	Dose « sécuritaire » -30%
Temps total de diffusion	1h38	1h18	1h05	52 min
Temps de contact	Nuit	Nuit	Nuit	Nuit
Temps d'aération	3h	3h	3h	3h
Conditions de tests				
Température	23°C	23°C	22°C	22°C
Humidité résiduelle	62-75%	62-72%	75%	68%
Consommables	Mêmes lots d'O2SAFE 7.4®, d'indicateurs chimiques et biologiques			
Taux d'H2O2 mesuré à 8h	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm
Résultats				
Conformité des diffusions	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
% IC conforme	100%	100%	100%	100%
% IB conforme log10 6	100%	100%	100%	100%
Validité du protocole	Validé	Validé	Validé	Validé
Conclusion				
Passage en QP avec le protocole 2				

Tableau 3 : protocoles testés et résultats

Développement de cycle

Les **diffusions** se sont déroulées de manière **satisfaisante** dans les zones ; en exemple l'image 1, un **rapport de diffusion émis par l'application MyPhileas** sur la diffusion par le Phileas® 250 lors du 1er protocole de la partie 2 (pièce 91) : 1.000mL théoriques à diffuser, 1.002,3mL diffusés (la balance intégrée dans l'appareil Phileas® 250 permet d'avoir avec précision la quantité diffusée réellement). La **zone** étant totalement **étanche**, les **courbes d'humidité** et de **température** sont très **stables**, et la **reprise de CTA** est bien **visible** (graphe 3).

Phileas 250 S/N : 02011112

Version : 01.09/Build 2.0.37

Date : 20/06/2023

Report's time : 17h41

Operator : DEVEA

Zone Data

Room (5) Volume :
Temperature : 0.0°C
Hygrometry: 0.0%

Comments : CM4PARTIE2TEST1PIECE91

Chemical data

Chemical name : O2SAFE Batch number : FR2300002586
Expiry date : 22/04/2025

Program information

Phase 1 : Delay time is beginning: 16h59 (Duration: 0h11)
Phase 2 :
Diffusion starting : 17h10 - Diffusion end: 17h41 (Duration: 31 min)
Phase 3 : Contact time end: 17h41 (Duration: 0h00)
Calculated amount of liquid to spray : 1000.00 mL

Program conclusion

Actual duration of diffusion : 0h31|
Real target amount of liquid sprayed : 1002.3 mL
Dissemination process completed :
Diffusion successful, quantity of disinfectant diffused compliant
Non compliance information :
-

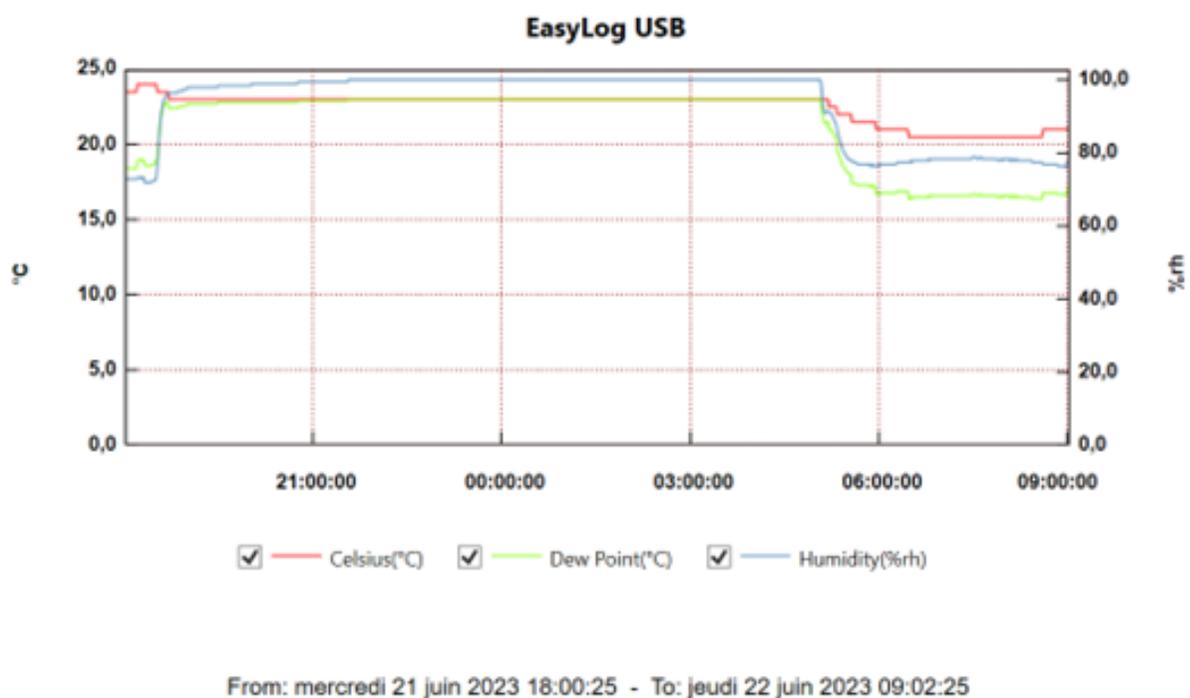
DEVEA SAS
PA du Bois de la Noue - Cellule 5D - Bât MBY4 - 44380 ST ETIENNE DE MONTLUC - FRANCE
www.devea-environnement.com - info@devea-environnement.com - Tél : +33 (0)2 40 57 07 40
Siret : 5185437200040 - APE 2829B - TVA INTRACOM : FR07518154372 - CAPITAL: 167 800 euros

DEVEA Validation



Image 1 : exemple de rapport de diffusion de MyPhileas

Développement de cycle



Graph 3 : courbe de température et humidité lors d'un traitement de DSV



Image 2 : pièce 94 prête pour la DSV

Développement de cycle



Image 3 : pièce 160 (sas gris) prête pour la DSV

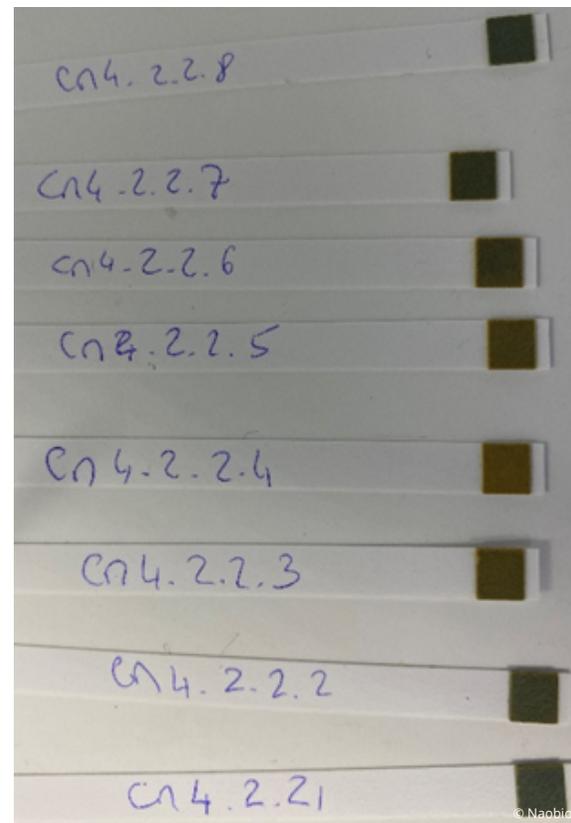


Image 4 : indicateurs chimiques colorés après DSV (CM4 / partie 2 / protocole 2 / IC 1 à 8)

Développement de cycle



© Naobios

Tous les **indicateurs biologiques** ont été **conformes** en **log10 6** dans les pièces pour les deux protocoles. Dans le **PSM**, les **résultats** sont également **excellents** : les IB jusqu'à log10 6 de l'espace de travail et en dessous ont été désinfectés comme attendu (également en cycle court) ; le plénum du PSM et la sortie du filtre exhaust ont été désinfectés à log10 5, ce qui dépassait les attentes du site.

Qualification des performances

Pour la QP, le protocole 2 est choisi. Des coupons viraux sont ajoutés aux indicateurs biologiques *Geobacillus stearothermophilus*, pour **refléter l'activité de ces zones de production**. Une étude bibliographique fait porter le choix sur la **souche de virus Minute Virus of Mice** (référence ATCC VR-1346), parmi les plus résistantes. A chaque nouveau projet client, une analyse portera sur le matériel biologique et déterminera si celui-ci est plus ou moins résistant que cette souche utilisée en validation.

Sept points au total sont choisis pour la localisation des coupons viraux, sur la base d'une analyse de risque (manipulation, fuite, risque de déversement) : sur les plans de travail, dans les enceintes et à l'intérieur des PSM (dans l'espace de travail). Les coupons viraux sont préparés par le laboratoire de Contrôle Qualité interne, avec une population initiale de 10^6 CFU, pour une population finale visée inférieure ou égale à 10^2 CFU, soit une réduction minimale de 4 log₁₀ de virus.



Qualification des performances

	Partie 1			Partie 2			PSM		
Conditions environnementales									
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
Température initiale	21,2°C	19,0°C	18,6°C	19,1°C	20,5°C	19,4°C	23,1°C	21,9°C	18,1°C
Humidité résiduelle initiale	48,3 – 52,5%	37,5 – 44,3%	62,8%	43,3%	54,0%	58,5%	53,0%	59,5%	38,5%
Consommables	Lots O2SAFE 7.4® : FR230169, FR237949, FR2300002586, FR2300010434, FR2300006440 Lots d'indicateurs chimiques : 312327, 312302, 312245 Lots d'indicateurs biologiques : AZ-008, AH-216, AH-224, 23003, 23029, AP-048, AP-054 6-log10 pop. 1.3 à 2.4.10e6 CFU, d-value 1.3min								
Résultats									
Conformité des diffusions	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
% IC conforme	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
% IB conforme log10 6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100% *	100% *	100% *
IB Triscale (objectif du site 4 log10)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Réduction 5 log10 **	Réduction 5 log10 **	Réduction 5 log10 **
Conformité du test de QP	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Tableau 4 : tests de QP et résultats sur indicateurs biologiques (* dans l'enceinte classe A, ** dans le plénum technique du PSM)

Qualification des performances

	Partie 1			Partie 2			PSM		
Conditions environnementales									
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3
Température initiale	21,0-23,0°C	20,4-21,0°C	18,6-21,2°C	20,8°C	21,0°C	21,1°C	23,1°C	21,9°C	20,0°C
Humidité résiduelle initiale	60-64,5%	52,8-64,0%	48,3-52,5-62,8%	48,8 %	64,5%	87,5%	53,0%	59,5%	77,0%
Consommables	Voir tableau 4								
Résultats									
Conformité des diffusions	Conforme								
% IC conforme	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Réduction virale minimale : objectif 4 log ₁₀ (TCID ₅₀ /mL)	> 5,5 log ₁₀	> 5,9 log ₁₀	> 4,3 log ₁₀	> 5,9 log ₁₀	> 6,2 log ₁₀	> 6,1 log ₁₀	> 5,5 log ₁₀	> 5,9 log ₁₀	> 5,5 log ₁₀
Conformité du test de QP	Conforme								

Tableau 5 : tests de QP et résultats sur coupon virus

Conclusion



En moins de six mois, le développement de cycles et la QP de ce laboratoire BSL-3 de biotechnologies ont permis de valider un protocole de DSVa avec **6 log₁₀ de désinfection (IB) et 4 log₁₀ (coupons viraux MVM)**, pour la zone et le PSM en sorbonne qui lui est lié (6 log₁₀ dans l'enceinte de travail de classe A, 5 log₁₀ atteint dans le plénum technique). Les équipes de cette zone de production ont gagné notamment :

- en sécurité pour les opérateurs,
- en facilité de mise en œuvre et
- en sobriété énergétique (trois machines par zone uniquement, diffusion à froid).

La DSVa est robuste et répétable, et inclut désormais le PSM, avec des résultats excellents pour le plénum et les filtres, avec une mise en place optimale.

Les qualifications des trois autres zones de production sont en cours sur ce site.

Merci !

Les auteurs souhaitent remercier les équipes de Naobios pour leur implication dans ce projet, en particulier Clarisse Pineau, ingénieure Support Production / Qualité.

**Pour toute question complémentaire :
ysaline.roland@naobios.com et
cgourraud@devea-environnement.com**

