



PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N° 8699

Recommandations en matière de validation et de contrôle de l'environnement au sein des banques et structures intermédiaires de matériel corporel humain

Validation and environmental monitoring of controlled environments of tissue establishments

6 juin 2012

1. INTRODUCTION

Conformément à l'Arrêté Royal (AR) du 28 septembre 2009 fixant les normes de qualité et de sécurité pour le don, le prélèvement, l'obtention, le contrôle, le traitement, le stockage et la distribution de matériel corporel humain (AR, 2009), les banques et structures intermédiaires de matériel corporel humain (MCH) doivent disposer d'installations adaptées – salles blanches – si le MCH est exposé à l'environnement durant le traitement. Les traitements doivent se dérouler dans un environnement présentant une qualité d'air et une propreté déterminées afin de réduire les risques de contamination des cellules et tissus, y compris la contamination croisée. L'efficacité de ces mesures doit être validée et contrôlée sur base du nombre de particules et de la numération des colonies microbiennes dans l'environnement.

Le contrôle de la qualité de l'air dans les salles blanches (échantillons d'air et de surfaces) n'a, jusqu'à présent, toutefois été que peu décrit au sein des établissements de MCH. A cet égard, il est indirectement fait référence aux directives internationales telles que l'*European Union's Good Manufacturing Practice* (EU GMP) annexe 1, NBN EN¹ ISO² 14644-1 et NBN EN ISO 14698-1.

Lors du contrôle de la qualité de l'air dans les salles blanches conformément à la réglementation belge, les éléments suivants sont constatés :

- L'AR fixant les normes de qualité et de sécurité précise que la qualité de l'air de l'environnement avec lequel le MCH entre en contact correspond, en ce qui concerne le nombre de particules et la numération des colonies microbiennes, à une classe A telle que décrite dans l'annexe 1 de l'EU GMP. L'environnement d'arrière-fond doit, en ce qui concerne le nombre de particules et la numération de colonies microbiennes au moins correspondre à une classe D. L'arrière-fond de classe D peut contenir 10³ fois plus de particules que l'environnement aseptique de classe A.
- Les techniques pour la détermination des particules dans le but de la validation d'un environnement de salles blanches sont spécifiées dans la NBN EN ISO 14644-2. La mise en pratique du contrôle de la qualité de l'air n'est toutefois que peu standardisée, rendant dès lors très difficile la comparaison des résultats. Des questions relatives au volume de

¹ Normes européennes enregistrées comme normes belges.

² *International Organization for Standardization*.

l'échantillon d'air, au nombre d'endroits échantillonnés, à la fréquence des mesures et à leur réalisation en continu ou non restent sans réponse.

- Les techniques pour la numération des colonies microbiennes sont reprises à l'annexe 1 de l'EU GMP. La NBN EN ISO 14698-1 donne plus d'explications quant à l'organisation d'un système formel de contrôle de la biocontamination. Des questions relatives au volume de l'échantillon d'air ou à la durée de l'exposition, au nombre d'endroits échantillonnés, à la fréquence des mesures, à la sélection du(des) milieu(x) de culture, aux conditions d'incubation et à l'interprétation des résultats ne reçoivent pas non plus les réponses voulues.

Afin de pouvoir répondre à ces questions, un groupe de travail *ad hoc* a été créé, composé d'experts dans les disciplines suivantes : mise en banque de cellules et tissus, thérapie cellulaire, hygiène hospitalière, microbiologie clinique et pharmaceutique. Ce sous-groupe de travail a rédigé le présent avis, qui a ensuite été soumis au groupe de travail permanent « cellules, tissus et organes d'origine humaine et animale » pour approbation.

2. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans le domaine des banques et structures intermédiaires de MCH, il n'existe à ce jour que peu de littérature disponible indiquant un lien direct entre la concentration en micro-organismes dans l'air, le nombre de particules et l'apparition d'une contamination du MCH. On peut sans doute parler de sous-rapportage étant donné que la quantité de contamination est relativement limitée et que la qualité de l'air de l'environnement auquel les cellules et tissus sont exposés ne faisait, jusqu'il y a peu, pas l'objet d'un contrôle systématique dans les établissements de MCH. Dans d'autres secteurs tels que l'hygiène hospitalière et l'industrie pharmaceutique, ce lien a été suffisamment démontré.

Conformément à la réglementation, les banques et structures intermédiaires de MCH doivent disposer d'installations adaptées, valider et contrôler leur fonctionnement. Dans ce contexte, il est fait référence au nombre maximum de particules et de colonies microbiennes autorisées tel que spécifié dans EU GMP annexe 1. Cette directive EU GMP a toutefois été élaborée pour la préparation industrielle de médicaments et ne tient pas compte de la nature du matériel source et des processus du traitement manuel (gros consommateurs de main d'œuvre dans les établissements de MCH) généralement appliqués sur base non routinière.

Le Conseil Supérieur de la Santé (CSS) recommande dès lors d'élaborer un programme de validation et de contrôle recherchant un bon équilibre entre la mise en œuvre efficace des moyens et la périodicité du contrôle de la qualité de l'air dans l'environnement. La validation de la qualité de l'air doit s'effectuer en situation aussi bien « de repos » que « d'activité ». Son contrôle se déroule au minimum en situation de repos. Les salles blanches classées GMP A ou B doivent aussi faire l'objet d'un contrôle périodique en situation « d'activité »

En dérogation aux normes industrielles courantes, il est recommandé de réaliser une validation de la salle blanche:

- lors de la première mise en service;
- après réorganisation ou extension de l'infrastructure si cela a une influence sur la qualité de l'air;
- après modification du plan de base de l'installation *Heating, ventilation, and air conditioning* (HVAC);
- lors du remplacement des filtres *High-efficiency particulate air* (HEPA) ou *Ultra-low particulate air* (ULPA);
- lors du dépassement systématique des valeurs d'alerte ou seuils durant le contrôle;
- au moins 1 fois par an pour des environnements classés en GMP classe A.

En raison des différences au niveau de l'environnement d'arrière-fond et des techniques de traitement très variées au sein des banques de MCH et des structures intermédiaires, il est recommandé de déterminer la fréquence du contrôle sur base d'une analyse de risque dans laquelle les paramètres suivants ont été pris en considération:

- des résultats de la validation;
- de l'évolution de la contamination microbiologique durant une période représentative;
- les risques de contamination à différents moment durant le processus :
 - le risque de contamination des tissus durant le prélèvement (e.a. type d'environnement, durée d'exposition, pathologie sous-jacente chez le donneur, etc);
 - le risque de contamination des tissus durant le traitement (e.a. type de salle blanche, durée d'exposition, type de traitement, etc);
 - le risque de contamination croisée (procédures de nettoyage et de désinfection, type de tissus ou cellules, donneurs infectieux, stérilité des matériaux utilisés, etc);
 - le risque de contamination par l'utilisation de tissus et/ ou cellules: statut immunitaire du patient, localisation de la greffe, forme d'administration, etc.

Il ne semble toutefois pas opportun de réaliser chaque méthode de test à la fois en situation de repos et en situation d'activité. La validation ou le contrôle de l'environnement ne peut, à aucun moment, mettre en danger la sécurité et la qualité des cellules ou tissus. Dans ce contexte, il est recommandé d'appliquer au moins les méthodes non optionnelles suivantes en fonction de la situation d'activité :

Tableau 1: Méthodes de test recommandées dans le cadre de la validation et du contrôle des salles blanches

Environnement	Validation		Contrôle		Propreté des surfaces
	GMP	Au repos	En activité (Simulation)	Au repos	
Classe A	Comptage particulaire Plaques de sédimentation Echantillonneur d'air*	Comptage particulaire Plaques de sédimentation Echantillonneur d'air *	Comptage particulaire Plaques de sédimentation Echantillonneur d'air*	Plaques de sédimentation**	Géloses de contact Ecouvillons*
Classe B	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Plaques de sédimentation**	Géloses de contact Ecouvillons*
Classe C	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Comptage particulaire Plaques de sédimentation* Echantillonneur d'air	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Plaques de sédimentation*	Géloses de contact Ecouvillons*
Classe D	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Echantillonneur d'air * Comptage particulaire* Plaques de sédimentation*	Comptage particulaire Echantillonneur d'air Plaques de sédimentation*	Plaques de sédimentation*	Géloses de contact Ecouvillons*

*En option – **A une fréquence déterminée en fonction d'une analyse de risque

Les résultats de la validation doivent être interprétés en fonction de la classification GMP des salles blanches conformément aux directives EU GMP (tableaux 2 et 3). Sur base des résultats de validation et des évolutions constatées durant le contrôle des salles blanches, des « limites d'avertissement et d'action » doivent être élaborées afin d'interpréter les résultats des contrôles et entreprendre des actions.

Si les résultats des tests se situent en dehors des limites spécifiées par la banque, il est alors recommandé d'effectuer également les méthodes de test optionnelles. Les différentes méthodes de test sont décrites de manière plus détaillée dans cet avis.

Le nombre minimum d'emplacements d'échantillonnage pour la validation de la qualité de l'air dans les salles blanches doit être déterminé comme prescrit dans la NBN EN ISO 14644-1:1999.

Le nombre minimum de prises d'échantillonnage pour le contrôle de la qualité de l'air et pour le contrôle de la propreté des surfaces est choisi en fonction des résultats de la validation et d'une analyse de risque. Pour le contrôle de la qualité de l'air, il est recommandé:

- 1) minimum 1 prise d'échantillonnage par flux laminaire de GMP classe A par m²
- 2) minimum 2 prises d'échantillonnage pour les environnements d'arrière-fond d'une superficie de < 25 m²
- 3) minimum 4 prises d'échantillonnage pour les environnements d'arrière-fond d'une superficie ≥ 25 m².

Mots clés

Keywords	Mesh terms*	Sleutelwoorden	Mots clés	Stichworte
Tissue establishments	Tissue banks	Weefselbanken	Banques de tissus	Gewebebanken
Controlled environment, Clean room	Environment, controlled	Gecontroleerde omgeving Clean room	Environnement contrôlé Salle blanche	Kontrollierte Umgebung Reinraum
Environmental monitoring	Environmental monitoring	Controle van de omgeving	Contrôle de l'environnement	Überwachung der Umgebung
Air quality	Air quality, Indoor	Luchtkwaliteit	Qualité de l'air	Luftqualität
Environmental microbiology	Environmental microbiology	Omgevingsmicrobiologie	Microbiologie environnementale	Mikrobiologie der Umgebung
Colony forming unit	Colony Count, Microbial	Kolonievormende eenheid	Unité formant colonie	Koloniebildende Einheit
Particle count	Particulate Matter (Count)	Deeltjestelling	Comptage particulaire	Teilchenzählung

* *MeSH (Medical Subject Headings) is the NLM controlled vocabulary thesaurus used for indexing articles for PubMed.*

3. ELABORATION ET ARGUMENTATION

Liste des abréviations utilisées

AR	Arrêté royal
CE	Communauté européenne
cGTP	<i>Current Good Tissue Practice</i>
CSS	Conseil Supérieur de la Santé
EN	<i>European norms</i>
EU GMP	<i>European Union's good manufacturing practice</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMEA	<i>Failure Mode and Effects Analysis</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
HEPA	<i>High-efficiency particulate air</i>
HVAC	<i>Heating, ventilation, and air conditioning</i>
ICSI	Injection intracytoplasmique de sperme
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MCH	Matériel corporel humain
NBN	Bureau de Normalisation
OMS	Organisation mondiale de la santé
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unité formant colonie
ULPA	<i>Ultra-low particulate air</i>
US	<i>United States</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

Définitions

Classification:	Classer la salle blanche dans une classe spécifique de pureté de l'air (GMP, ISO) en déterminant le nombre de particules dans l'air, exprimé en termes de concentration maximale autorisée de particules d'une certaine taille (particules/m ³) (NBN EN ISO 14644-1, 1999). La classification d'une salle blanche fait partie du processus de qualification des salles blanches (EU, 2001).
Qualification ³ :	Le fait d'apporter la preuve, au moyen de documents, qu'un équipement, un système, un environnement spécifique satisfait aux spécifications du producteur (<i>Installation Qualification</i>), satisfait aux spécifications de l'utilisateur (<i>Operational Qualification</i>) et permet de fabriquer avec un degré de certitude élevé et de manière constante, un produit conforme à ses spécifications et de qualité déterminée au préalable (<i>Performance Qualification</i>) (EU, 2001; AR, 2009).
Validation du processus:	Le fait d'apporter la preuve, au moyen de documents, qu'un processus spécifique permet de fabriquer avec un degré de certitude élevé et de manière constante un produit conforme à ses spécifications et de qualité déterminée au préalable. Un processus est validé afin d'évaluer l'efficacité d'un système pour un usage déterminé. La qualification d'un équipement, d'un système, d'un environnement spécifique peut faire partie de la validation du processus (EU, 2001 ; AR 2009).
Salle blanche au repos:	Situation d'activité de la salle blanche où l'installation de purification de l'air et l'équipement présent dans la salle blanche fonctionnent conformément aux spécifications de l'utilisateur, sans que le personnel soit présent (NBN EN ISO 14644-1, 1999).

³ Si l'on souhaite évaluer l'efficacité d'une salle blanche pour l'usage envisagé, on peut parler aussi bien de validation que de qualification (art.1 §3 AR du 28 septembre 2009 fixant les normes de qualité et de sécurité). Dans cette directive, le terme validation sera toujours utilisé.

Salle blanche en activité:	Situation d'activité de la salle blanche où l'installation de purification de l'air, l'équipement et le personnel sont opérationnels conformément aux spécifications de l'utilisateur (NBN EN ISO 14644-1, 1999). Une autre terminologie utilisée dans le même sens est « opérationnelle ».
Limite d'action:	Nombre maximum d'unité formant colonie (UFC) ou de particules, à établir par l'utilisateur dans le cadre d'un environnement contrôlé et qui requiert une intervention immédiate en cas de dépassement, y compris une analyse des causes de celui-ci ainsi que la prise de mesures correctrices.
Limite d'avertissement:	Nombre maximum d'UFC ou de particules, à établir par l'utilisateur en guise d'avertissement lors d'une déviation par rapport aux valeurs normales et qui, en cas de dépassement de ce nombre maximum, doit donner lieu à une surveillance accrue du processus.

3.1. Méthodologie

L'avis est basé sur un aperçu de la littérature scientifique, les directives internationales, la littérature grise et l'opinion des experts.

3.2. Elaboration

3.2.1. Cadre juridique

Afin de garantir des normes de qualité et de sécurité de haut niveau pour les cellules et tissus humains au sein de la Communauté Européenne (CE), le Parlement européen et le Conseil ont, en 2004, implémenté une directive relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution de tissus et cellules humains (2004/23/CE). En exécution de la directive 2004/23/CE, 2 directives sœurs ont été promulguées dont la directive 2006/86/CE en ce qui concerne les exigences de traçabilité, la notification des incidents indésirables graves et certaines exigences techniques relatives à la codification, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution de tissus et cellules d'origine humaine. Cette directive stipule que la qualité de l'air durant la transformation des tissus et cellules est très importante en ce qui concerne le risque de contamination de ceux-ci.

En règle générale, la directive stipule que, si les tissus et cellules sont exposés, durant la transformation, à l'environnement et ne sont ensuite pas soumis à une inactivation microbienne, l'air doit être d'une qualité telle que le nombre de particules et la numération des colonies microbiennes satisfont à une classe A telle que décrite à l'annexe 1 de EU GMP (2008) et dans la directive 2003/94/CE de la commission. L'environnement d'arrière-fond doit, pour ce qui est du nombre de particules et de la numération des colonies microbiennes, correspondre au moins à une classe D.

Le 19 décembre 2008, la directive européenne 2004/23/CE a été transposée en droit belge par la loi relative à l'obtention et à l'utilisation de MCH destiné à des applications médicales humaines ou à des fins de recherche scientifique. Les prescriptions techniques relatives notamment aux bâtiments et aux installations telles que décrites dans la directive 2006/86/CE sont détaillées à l'annexe VII de l'AR du 28 septembre 2009 fixant les normes de qualité et de sécurité pour le don, le prélèvement, l'obtention, le contrôle, le traitement, le stockage et la distribution de MCH auxquelles les banques de MCH, les structures intermédiaires de MCH et les établissements de production doivent répondre.

Par dérogation aux directives européennes, le législateur belge stipule, en ce qui concerne les valves cardiaques, les vaisseaux, les greffes de l'appareil locomoteur et les cellules, que si les tissus et cellules sont, durant le traitement, exposés à l'environnement, l'environnement d'arrière-

Le fond doit être au moins équivalent à une GMP classe C plutôt qu'à une classe D en ce qui concerne la numération des colonies microbiennes. Si le traitement s'effectue dans un système fonctionnel fermé ou s'il s'agit de gamètes, il suffit que le nombre d'UFC corresponde au moins à une GMP classe D.

Tableau 2: Nombre maximum de particules autorisé (EU GMP annexe 1, 2008).

Classe	Nombre maximum autorisé de particules par m ³ égales ou supérieures à la taille spécifiée			
	Au repos		En activité	
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Non spécifié	Non spécifié

Tableau 3: Limites recommandées en matière de contamination microbiologique durant l'activité (EU GMP annexe 1, 2008).

Classe	Limites recommandées en matière de contamination microbiologique ^a		
	Echantillon d'air UFC/m ³	Plaques de sédimentation (diamètre 90 mm) UFC/4 heures ^b	Géloses de contact (diamètre 55 mm) UFC/plaque
A	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

a: cela concerne les valeurs moyennes

b: les plaques de sédimentation individuelles peuvent être exposés moins de 4 heures

Les limites microbiologiques telles que mentionnées dans le tableau 3 concernent des limites recommandées. L'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2011) admet que certaines circonstances, notamment l'utilisation de matières premières non stériles, compliquent le processus de production aseptique des vaccins. Dans ces conditions, l'industrie travaille en règle générale dans des armoires de sécurité à flux laminaire avec un environnement d'arrière-fond de GMP classe C ou D.

Dans le cas des cellules et tissus également, le processus de production aseptique ne peut pas toujours être garanti parce que des tissus non stériles tels que la peau, le sperme, les organes, les tissus prélevés à la morgue, etc sont régulièrement utilisés comme produit de départ. Dans ce contexte, le CSS considère que les armoires de sécurité à flux laminaire dans un environnement d'arrière-fond de GMP classe C ou D doivent, en ce qui concerne le nombre de particules et d'UFC et en situation de repos, satisfaire à une GMP classe A telle que définie dans les tableaux 2 et 3. En activité, un écart par rapport aux limites recommandées telles que spécifiées au tableau 3 peut être admis en ce qui concerne le nombre d'UFC. Cet écart doit cependant être étayé sur base de la littérature, de résultats de validation et/ou d'une analyse de risque.

3.2.2. Contamination microbiologique des tissus et cellules dans un environnement contrôlé

La contamination microbiologique des tissus et cellules transplantés à l'homme peut être à l'origine du développement de maladies graves, d'un séjour à l'hôpital de plus longue durée voire du décès du patient. Il était admis jusqu'il y a peu que le nombre de patients ayant reçu des greffes de tissus et cellules contaminées sur le plan microbiologique restait limité à quelques cas individuels. Divers incidents récents, avec issue fatale parfois, ont attiré l'attention sur ce

problème (Eastlund T, 2006; Wang et al., 2007). A la suite de l'introduction des directives de *current Good Tissue Practice* (cGTP) aux Etats-Unis (US) en 2001, la *Food and Drug Administration* (FDA) a élaboré le système MedWatch pour la notification des incidents et réactions indésirables graves dus à une transplantation de cellules ou de tissus. Wang (2007) a examiné tous les incidents et réactions indésirables graves des infections microbiologiques rapportées dans l'année suivant une transplantation pour la période comprise entre 2001 et 2004. Durant cette période, 83 notifications sur base volontaire ont été rapportées par rapport à 6 millions de greffes de tissus et cellules (1,4/100.000). Les rapports n'ont toutefois pas permis d'identifier la source de la contamination.

3.2.2.1. L'opérateur en tant que source de contamination

Différentes études dans les banques de MCH et les salles blanches industrielles ont montré que plus de la moitié des germes retrouvés sur les surfaces dans des environnements contrôlés relève de la flore cutanée normale de l'homme (Cobo & Concha, 2007; Favero et al., 1966; Guns et al., 2012; Herlong et al., 2008). Le corps humain peut produire jusqu'à 10.000 UFC/minute (Thomas et al., 2005). Vanneaux (2007) a rapporté que, durant la période allant de janvier 2003 à février 2006, dix-neuf des 257 (7,4 %) produits de moelle ont été contaminés par des bactéries. Il a, dans ce contexte, été constaté que le nombre de produits de moelle contaminés était plus élevé après traitement qu'initialement au moment de la collecte. Cette différence a été attribuée à la contamination des produits cellulaires durant la manipulation (1,5 %). Dans les études de Prince (1995) et Schwella (1998) également, respectivement 0,8 % et 8,8 % des produits de moelle traités semblaient contaminés durant le traitement.

Cobo (2007) a démontré que l'application correcte ou non des techniques aseptiques induit un risque plus élevé de contamination que l'environnement. Ce risque diminue cependant si les techniques aseptiques sont réalisées dans une salle blanche (Stucki et al., 2009). L'opérateur peut donc constituer directement ou indirectement une source de contamination microbienne. Les contrôles en activité sont importants pour l'évaluation du principal facteur de contamination ; c'est-à-dire l'opérateur.

3.2.2.2. L'environnement (air, surfaces) en tant que source de contamination

Jusqu'à présent, seul un nombre limité de rapports a été publié permettant d'attribuer la source de contamination à l'environnement dans lequel le traitement des tissus et cellules s'est déroulé.

- Arnow (1991) a rapporté que, sur une période de 3 mois, 2 patients avaient été contaminés par *Aspergillus fumigatus* après avoir reçu des *lymphokine-activated killer cells* d'origine autologue. L'étude a montré que la contamination provenait d'une hotte à flux laminaire et d'un incubateur contaminés.
- Friberg (1999a; 1999b) a constaté que la contamination de surface des patients, des plaies et du matériel chirurgical dans une salle d'opération est fortement corrélée au degré de contamination de l'environnement immédiat.
- Ritter (2003) a constaté une diminution significative du nombre de greffes de cellules souches de sang périphérique contaminées (3,6 % à 0,8 %) lorsque le traitement s'effectue dans un environnement de salle blanche (GMP classe A en B) plutôt que dans une hotte à flux laminaire (GMP classe A) dans un environnement de laboratoire non qualifié ($p < 0,0001$).
- Klykens (*submitted article*) a constaté qu'un environnement d'arrière-fond de GMP classe B avait un impact positif sur la contamination de surface des armoires de sécurité à flux laminaire par rapport à un environnement d'arrière-fond de classe D. Le nombre de géloses de contact contaminées dans les armoires de sécurité à flux laminaire passait de 5,6 % dans un arrière-fond de GMP classe D à 1,8 % avec un arrière-fond de GMP classe B.

3.2.3. Validation et contrôle d'une salle blanche

Conformément à l'AR (2009) fixant les normes de qualité et de sécurité, les banques et les structures intermédiaires de MCH doivent valider et contrôler l'environnement sur base du nombre de particules et de la numération des colonies microbiennes.

La validation de la salle blanche constitue un processus formel de validation où l'établissement prouve que la qualité de l'air satisfait à la classe de pureté demandée telle que fixée dans l'AR durant le traitement du MCH. Les NBN EN ISO 14644-1 (1999) et 2 (2000) précisent que la validation peut être réalisée tant en activité qu'en situation de repos alors que l'annexe 1 de EU GMP impose les deux situations.

Il est recommandé de valider la qualité de l'air tant en situation de repos qu'en activité. Les valeurs mesurées en « situation de repos » (pas d'activité ni de personnel présent dans la salle blanche) constituent une référence pour la qualité de l'air dans l'environnement concerné. La validation s'effectue conformément à la NBN EN ISO 14644-1 (1999) et entraîne la qualification du local.

Les valeurs mesurées en « situation d'activité » sont une résultante de la pollution générée, de l'arrière-fond et de la capacité de l'installation de traitement de l'air à assainir le local concerné de manière adéquate. La validation s'effectue de préférence avant la mise en service de la salle blanche ou avant l'introduction de nouveaux processus. Durant la validation en activité, les processus sont de préférence simulés. Il faut également tenir compte des facteurs de risque potentiels. La validation de l'environnement ne peut à aucun moment mettre en danger la qualité et la sécurité des produits tissulaires et cellulaires. Sur base du nombre de particules constatées et de la numération des colonies microbiennes, l'institution peut proposer des limites d'avertissement et d'action.

Le contrôle de l'environnement se distingue de la validation de celui-ci en ce sens qu'il se déroule en routine dans le but de détecter des modifications de tendances de la contamination microbiologique et de la flore biologique (Sandle, 2006). Les valeurs obtenues fournissent des informations concernant la construction physique de la salle blanche, la performance du système de traitement de l'air ou HVAC, le travail aseptique du personnel, le bon fonctionnement de l'appareillage et les procédures de nettoyage et de désinfection.

Le processus de production aseptique des tissus et cellules ne peut cependant pas toujours être garanti:

- Utilisation de tissus sources non stériles tels que la peau, le sperme, les organes, les tissus prélevés à la morgue, etc.
- Certaines techniques telles que l'injection intracytoplasmique de sperme (ICSI) doivent s'effectuer sur un microscope. La présence de microscopes dans une hotte perturbe fortement le flux d'air, ce qui ne permet pas de garantir un environnement aseptique.
- Le milieu de culture des cellules doit être renouvelé régulièrement. Les plateaux ou flacons de culture proviennent d'un environnement non stérile. Il n'est cependant pas toujours possible de désinfecter ces récipients.

3.2.3.1. Fréquence

La fréquence de la validation telle que spécifiée dans la NBN EN ISO 14644-2 part du principe d'une fermeture périodique des installations en vue de l'entretien et de la validation comme il est d'usage dans l'industrie. La situation spécifique à laquelle de nombreuses banques de MCH sont confrontées, à savoir une culture de cellules ou tissus en continu et la relative pénurie de tissus et cellules disponibles, n'est toutefois pas prise en compte. De ce fait, une fermeture périodique des installations de la salle blanche est, pour certains tissus et cellules, exclue. La NBN EN ISO 14698-1 précise que la validation microbiologique des salles blanches doit être effectuée:

- lorsque les limites d'avertissement et d'action sont systématiquement dépassées;
- après fermeture prolongée des activités;

- après détection d'agents infectieux dans des environnements critiques;
- après modification significative du plan de base de l'installation HVAC;
- après modification d'un processus ayant un impact sur l'environnement de la salle blanche;
- après constatation de résultats inhabituels lors du contrôle;
- après modification de la méthode de nettoyage et de désinfection;
- après des incidents imprévus ayant pu entraîner une biocontamination.

Il n'existe en Europe que peu ou pas de directives concernant la fréquence de contrôle des environnements de salle blanche. Les directives se limitent généralement à des descriptions telles que le contrôle « en routine » ou « fréquent » de l'environnement (EU, 2008; NBN EN ISO 14698-1, 2003; NBN EN ISO 14644-1, 1999). Dans l'industrie pharmaceutique, il est d'usage de déterminer la fréquence de contrôle sur base d'une analyse de risque. Les méthodes les plus utilisées sont la méthode *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) et la méthode *Failure Mode and Effects Analysis* (FMEA) (Whyte & Eaton, 2004).

3.2.3.2. Choix de la méthode de test

En se référant au nombre maximum de particules et d'UFC comme décrit dans EU GMP annexe 1 et la directive 2003/94/CE de la commission, le législateur détermine indirectement les méthodes de test pour la validation des salles blanches:

- Mesure du nombre de particules (NBN EN ISO 14644-1, 1999);
- Mesure du nombre d'UFC dans les échantillons d'air (NBN EN ISO 14698-1, 2003);
- Mesure du taux de sédimentation des UFC (NBN EN ISO 14698-1, 2003);
- Mesure du nombre d'UFC sur les surfaces (NBN EN ISO 14698-1,2003).

La ou les méthodes de test qui emportent la préférence ne ressortent toutefois pas clairement. Il est tout aussi peu clair si les différentes méthodes de test doivent être réalisées lors de chaque situation d'activité et tant dans le cadre de la validation que du contrôle.

L'annexe 1 de EU GMP stipule que l'environnement doit être validé conformément à la NBN EN ISO 14644-1 (1999). La NBN EN ISO 14644-1 prescrit la mesure du nombre de particules au moyen d'un compteur de particules comme méthode de référence pour la classification des salles blanches. En outre, le nombre de particules doit faire l'objet d'une surveillance en continu dans un environnement GMP de classe A. L'appareil de mesure doit être positionné dans un rayon de 30 cm autour du produit exposé à l'environnement afin d'obtenir une mesure pertinente (FDA, 2004; OMS, 2011).

Ces directives ont toutefois été élaborées dans le cadre de systèmes de remplissage statiques dans l'industrie du médicament et ne tiennent pas compte des limites techniques des processus spécifiques aux banques de MCH telles que la découpe des tissus, les armoires de sécurité à flux laminaire avec microscopes, les incubateurs, agitateurs ou les méthodes de culture consommatrices de main-d'œuvre. Le positionnement fixe et correct de l'appareil de mesure pour un contrôle en continu est quasi impossible étant donné que la plupart des banques de MCH utilisent des processus et des installations variables. Une alternative possible est la mise en place d'un appareil de mesure dans un coin derrière la hotte. L'utilité d'une telle position de mesure peut toutefois être mise en doute.

Etant donné qu'il est quasi impossible de positionner correctement l'appareil de mesure dans le cadre des processus spécifiques des banques de MCH, le contrôle en continu des particules dans un environnement de GMP classe A durant l'activité est déconseillé. Il faut toutefois, à intervalles réguliers, démontrer que l'environnement de GMP classe A satisfait aux spécifications en situation de repos.

La détermination du nombre d'UFC par la collecte d'un échantillon d'air au moyen d'un échantillonneur d'air est proposée, tant par la pharmacopée américaine (USP), EU GMP que la

cGMP (FDA, 2001), comme méthode de référence pour le contrôle et la validation de la pollution microbiologique dans les salles blanches. De grandes différences sont toutefois constatées au niveau de l'efficacité de la collecte entre les différents échantillonneurs d'air disponibles sur le marché (Bonadonna & Marconi, 1994; Gangneux et al., 2006; Lee K, 2004; Ljungqvist & Reinmuller 2000; Pasquarella et al., 2000; Shintani et al., 2004; Whyte et al., 2007; Yao & Mainelis, 2006). Ces différences sont dues à la technologie utilisée au niveau de l'appareil. La protection du potentiel de croissance et de l'intégrité biologique des micro-organismes après l'impact sur le milieu de culture est cruciale. Le nombre de bactéries simples, d'un diamètre de 0,5 à 1,0 µm est surtout sous-estimé (Yao & Mainelis, 2006). Compte tenu du fait qu'un tiers des particules viables produites par les opérateurs sont inférieures à 2,1 µm (Ljungqvist & Reinmuller, 2007), la préférence doit être accordée à des échantillonneurs d'air présentant un diamètre « cut-off » le plus petit possible (d_{50}). Ces valeurs « cut-off » peuvent être remises par le fournisseur de l'appareil.

Friberg (1999a; 1999b) a constaté, sur base des plaques de sédimentation, une relation entre les infections de plaies et la contamination microbiologique de l'environnement direct dans les salles d'opération sous flux laminaire. Cette relation n'a pas été constatée lorsqu'il est fait usage d'un échantillonneur d'air (Friberg et al., 1999a). Dans les salles d'opération à flux d'air turbulent, une relation a bien été constatée entre les infections de plaies et la contamination microbiologique au moyen d'un échantillonneur d'air (Friberg et al., 1999b). Whyte (1996) est parvenu à une conclusion similaire dans un environnement de production pharmaceutique. Il a constaté que l'utilisation de plaques de sédimentation constituait la meilleure méthode pour quantifier une contamination microbiologique potentielle dans les systèmes de remplissage.

L'utilisation d'un compteur de particules et d'un échantillonneur d'air microbiologique a un impact direct sur l'environnement de la mesure en raison de la présence physique de ces derniers et de l'aspiration de l'échantillon d'air à un débit de 28 à 100 L/minute (Pasquarella et al., 2000). La stérilité d'un échantillonneur d'air est particulièrement difficile à garantir. Etant donné que l'utilisation d'un échantillonneur d'air comporte un risque de contamination, la méthode est déconseillée pour le contrôle et la validation d'environnements entrant en contact avec des cellules et tissus.

3.2.3.3. Nombre d'endroits échantillonnés

Le nombre minimum d'endroits échantillonnés pour la validation de la qualité de l'air dans les salles blanches est déterminé comme prescrit dans la NBN EN ISO 14644-1 (1999) en appliquant la formule ci-dessous, où la surface de l'espace à tester est exprimée en m². Les endroits minimums doivent être répartis équitablement dans l'environnement à tester.

$$N = \sqrt{\text{surface}}$$

Des endroits d'échantillonnage supplémentaires peuvent être sélectionnés en fonction d'une analyse de risque. Aucune directive stricte n'est d'application pour déterminer la manière de mesurer le nombre d'UFC dans les échantillons d'air, après sédimentation et sur les surfaces. Bien que, jusqu'à présent, aucun lien n'ait été constaté entre le nombre de particules et d'UFC (Ljungqvist et al., 2007), il est recommandé, pour des considérations pratiques, de reprendre les endroits d'échantillonnage du comptage des particules dans le plan de validation microbiologique.

Le nombre minimum d'endroits échantillonnés pour le contrôle des salles blanches est déterminé sur base de la validation microbiologique de la salle blanche et d'une analyse de risque (NBN EN ISO 14698-1, 2003; OMS, 2011).

3.2.4. Comptage des particules

3.2.4.1. Appareil

Les compteurs de particules déterminent le nombre et la concentration de particules dans l'air. Ils détectent sans aucune distinction les particules viables et non viables. Le choix d'un compteur de particules doit se faire en fonction de l'application souhaitée (validation versus contrôle), compte tenu du débit d'air de l'appareil en fonction du temps de collecte de l'échantillon d'air. Un choix peut donc s'opérer entre des appareils de mesures à main, portatifs et continus. Les compteurs de particules doivent être calibrés chaque année (ISO 21501-4, 2007).

3.2.4.2. Mesure

Le volume minimum d'un échantillon d'air pour la détermination du nombre de particules dépend de la pureté de l'environnement et de la situation d'activité. La NBN EN ISO 14644-1 (1999) stipule que, pour la validation de l'environnement, un volume d'air doit être mesuré dans lequel au moins 20 particules sont détectées. La norme spécifie en outre qu'au moins 2 L d'air doivent être mesurés durant 1 minute minimum. Le volume d'air à mesurer peut être calculé sur base de la formule ci-dessous où C représente le nombre maximum de particules autorisé, spécifié pour la taille des particules les plus grandes de la classe concernée (NBN EN ISO 14644-1, 1999).

$$V = \frac{20}{C} \times 1000$$

L'orifice de l'appareil de mesure doit être positionné en direction du flux laminaire. En cas de flux d'air à turbulence, l'orifice de l'appareil de mesure doit être positionné verticalement vers le haut.

3.2.4.3. Interprétation

- Dans le cadre de la validation, toutes les valeurs individuelles de chaque endroit d'échantillonnage doivent se situer dans les limites de la classe GMP dans laquelle le local est classifié.
- Dans le cadre du contrôle, chaque banque de MCH doit déterminer des limites d'avertissement et d'action par local qualifié. Ces limites peuvent être déterminées et modifiées sur base des tendances constatées durant la validation et le contrôle des locaux et après concertation avec une équipe multidisciplinaire.

3.2.5. Plaques de sédimentation

3.2.5.1. Mesure

Pour la détermination du nombre d'UFC par sédimentation, il est fait usage de milieux de culture stériles (Ø 90 mm). Les milieux de culture sont exposés durant une période déterminée à l'environnement. Le taux de contamination est exprimé en UFC/4 heures/milieu de culture (Ø 90 mm) (EU GMP, 2008; FDA, 2004; USP, 2010).

Il n'est pas toujours possible d'exposer les milieux de culture durant 4 heures à des flux laminaires et turbulents car cela entraîne jusqu'à plus de 10 % de perte de poids de l'agar (Guns et al., 2012) et une perte en viabilité des micro-organismes de 8 % (Deschenes, 2008). Exposer les milieux de culture durant minimum 2 heures à l'environnement et multiplier le nombre d'UFC constaté par un facteur 2 constitue une méthode acceptable. En cas de processus courts, la durée de l'exposition peut se limiter à la durée du processus (OMS, 2011).

3.2.5.2. Milieu de culture

La NBN EN ISO 14698-1 (2003) recommande l'utilisation d'un milieu de culture non sélectif pour le dépistage d'une biocontamination dans les salles blanches. L'utilisation éventuelle de milieux de culture sélectifs pour les levures et les champignons fait l'objet d'un débat depuis de longues années parmi les microbiologistes pharmaceutiques (Clontz, 2009). L'USP a récemment accepté la *Tryptic Soy Agar* (TSA) comme milieu de culture pour le dépistage et la quantification de la

plupart des germes environnementaux dans les salles blanches et ce tant pour les bactéries que pour les levures et les champignons. Des milieux de culture alternatifs sont également autorisés pour autant qu'il puisse être prouvé qu'ils satisfont à l'objectif fixé.

3.2.5.3. *Culture*

Les conditions idéales de culture dépendent du type de micro-organismes (NBN EN ISO 14698-1, 2003; FDA, 2001, FDA, 2004; Clontz, 2009). Il est recommandé d'incuber 2/3 des milieux de culture durant 5 jours entre 30 et 35 °C pour le dépistage des bactéries. 1/3 des milieux de culture doit être incubé pendant 5-7 jours entre 20 et 25 °C pour le dépistage des levures et des champignons. Une culture échelonnée durant 5-7 jours au cours de laquelle les milieux de culture sont incubés durant un certain nombre de jours entre 30 et 35 °C et ensuite durant un certain nombre de jours entre 20 et 25 °C constitue une méthode alternative (Guns et al., 2012; Herlong et al., 2008; Moldenhauer, 2005 ; OMS, 2011).

3.2.5.4. *Interprétation*

- Les limites telles que spécifiées dans EU GMP annexe 1 concernent les limites recommandées en situation d'activité.
- Dans le cadre de la validation et du contrôle, les résultats doivent être évalués comme décrit dans la NBN EN ISO 14698-2 (2003):
 - en fonction du type de germe ;
 - en fonction des limites d'avertissement et d'action établies ;
 - en fonction du nombre d'échantillons et du lieu d'échantillonnage ;
 - en fonction des méthodes de détection ;
 - en tenant compte du processus de nettoyage et de désinfection ;
 - en effectuant le suivi des tendances et écarts.
- Dans le cadre du contrôle en situation d'activité, chaque banque de tissus doit déterminer des limites d'avertissement et d'action par local qualifié. Ces limites peuvent être déterminées et modifiées sur base des tendances constatées durant la validation et le contrôle des locaux et après concertation.

3.2.6. *Géloses de contact*

3.2.6.1. *Mesure*

Pour le dépistage du nombre d'UFC sur des surfaces, on utilise de manière standard des géloses de contact stériles (Ø 55 mm) associées à un milieu de culture. Les géloses de contact sont pressées légèrement durant quelques dizaines de secondes sur la surface. Le taux de contamination est exprimé en UFC/plaque (Ø 55 mm) (EU, 2008; FDA, 2001 ; FDA; 2004 ; USP, 2010).

En cas de surfaces inégales, on peut envisager de passer à la méthode par écouvillonnage où une surface de 24 à 30 cm² est grattée. L'écouvillon est ensuite placé dans un tampon stérile de volume connu dont 0,1 ml est ensemencé sur un milieu de culture (USP, 2010).

3.2.6.2. *Milieu de culture*

On peut opter pour un milieu identique à celui examiné sous [3.2.5.2 Milieu de culture](#) complété par des agents inhibant les résidus de désinfectants utilisés dans la salle blanche concernée. Jusqu'à présent, aucun agent neutralisant disponible dans le commerce ne permet de neutraliser tous les types de désinfectant. Les fournisseurs utilisent fréquemment un mélange d'agents neutralisants de composition et concentration variables ce qui rend toute comparaison quasi impossible. Sutton (2002) a mis en contact 6 milieux de culture contenant différents mélanges d'agents neutralisants avec 13 biocides disponibles dans le commerce. Aucun des milieux de culture ne s'est ensuite avéré adéquat pour faire croître tous les micro-organismes prescrits à l'index. Le choix des agents neutralisants doit s'effectuer en fonction du désinfectant utilisé.

3.2.6.3. *Culture*

Voir [3.2.5.3. Culture](#)

3.2.6.4. Interprétation

- Les limites telles que précisées dans EU GMP annexe 1 concernent les limites recommandées en situation d'activité.
- Dans le cadre de la validation et du contrôle, les résultats doivent être évalués comme décrit dans la NBN EN ISO 14698-2 (2003):
 - o en fonction du type de germe ;
 - o en fonction des limites d'avertissement et d'action établies ;
 - o en fonction du nombre d'échantillons et du lieu d'échantillonnage ;
 - o en fonction des méthodes de détection ;
 - o en tenant compte du processus de nettoyage et de désinfection ;
 - o en effectuant le suivi des tendances et écarts.
- Chaque banque de tissus doit déterminer des « limites d'avertissement et d'action » par local qualifié ou par type de surface (matériel, vêtements, gants, ...). Ces limites peuvent être déterminées et modifiées sur base des tendances constatées durant la validation et le contrôle des locaux et après concertation.

3.2.7. **Echantillonneur d'air**

3.2.7.1. Appareil

Comme mentionné déjà sous [Choix de la méthode de test](#), il n'apparaît pas clairement à ce jour quel échantillonneur d'air mérite la préférence. Les directives nationales et internationales ne se prononcent pas ou optent pour un type différent d'échantillonneur d'air (Pasquarella et al., 2000). Dans le monde de l'hygiène hospitalière, il est recommandé de choisir un échantillonneur d'air à haut volume d'un débit de minimum 100L/minute et une vitesse d'impact de < 20 m/sec (CSS n° 8364, 2010). Le débit d'air de l'échantillonneur d'air doit être calibré chaque année.

3.2.7.2. Mesure

Le volume minimum d'un échantillon d'air pour la détermination du nombre d'UFC dans l'air dépend de la pureté de l'environnement et de la situation d'activité. Il est préférable de mesurer un volume le plus grand possible afin de garantir un échantillon d'air représentatif d'un volume minimum de 250 L.

3.2.7.3. Milieu de culture et culture

Voir [3.2.5.2 Milieu de culture](#) et [3.2.5.3. Culture](#)

3.2.7.4. Interprétation

- Les limites telles que spécifiées dans EU GMP annexe 1 concernent les limites recommandées en situation d'activité
- Dans le cadre de la validation et du contrôle, les résultats doivent être évalués comme décrit dans la NBN EN ISO 14698-2 (2003):
 - o en fonction du type de germe ;
 - o en fonction des limites d'avertissement et d'action établies ;
 - o en fonction du nombre d'échantillons et du lieu d'échantillonnage ;
 - o en fonction des méthodes de détection ;
 - o en tenant compte du processus de nettoyage et de désinfection ;
 - o en effectuant le suivi des tendances et écarts.
- Dans le cadre du contrôle en situation d'activité, chaque banque de tissus doit déterminer des limites d'avertissement et d'action par local qualifié. Ces limites peuvent être déterminées et modifiées sur base des tendances constatées durant la validation et le contrôle des locaux et après concertation avec une équipe multidisciplinaire.

4. REFERENCES

- Arnow PM, Houchins SG, Richards JM, Chudy R. Aspergillus fumigatus contamination of lymphokine-activated killer cells infused into cancer patients. *J Clin Microbiol* 1991;29(5):1038-41.
- Bonadonna L, Marconi A. A comparison of two air samplers for recovery of indoor bioaerosols. *Aerobiologia* 1994;10.2:153-6.
- Clontz L. Microbial limit and bioburden tests. Validation approaches and global requirements. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2009.
- Cobo F, Concha A. Environmental microbial contamination in a stem cell bank. *Lett Appl Microbiol* 2007;44(4):379-86.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé - Recommandations en matière de contrôles bactériologiques de l'environnement dans les institutions de soins. Bruxelles : CSS ; 2010. Avis n° 8364.
- Deschenes PD. Viable environmental microbiological monitoring. In: Agalloco J, Carleton FJ, eds. Validation of pharmaceutical processes. New York: Informa Healthcare; 2008;357-369.
- Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank* 2006;7(3):147-66.
- EU – Europese Unie. Richtlijn 2003/94/EG van de Commissie van 8 oktober 2003 tot vaststelling van de beginselen en richtsnoeren inzake goede praktijken bij het vervaardigen van geneesmiddelen voor menselijk gebruik en geneesmiddelen voor onderzoek voor menselijk gebruik.
- EU - Europese Unie. Richtlijn 2004/23/EG van het Europees Parlement en de Raad van 31 maart 2004 tot vaststelling van kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van menselijke weefsels en cellen.
- EU - Europese Unie. Richtlijn 2006/86/EG van de commissie van 24 oktober 2006 ter uitvoering van Richtlijn 2004/23/EG van het Europees Parlement en de Raad wat betreft de traceerbaarheidsvereisten, de melding van ernstige bijwerkingen en ernstige ongewenste voorvallen en bepaalde technische voorschriften voor het coderen, bewerken, conserveren, bewaren en distribueren van menselijke weefsels en cellen.
- EU - European Union. EU Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version). 91/356/EEC, EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines 2008.
- EU - European Union. EU Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 15 Qualification and validation, EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines 2001.
- Favero MS, Puleo JR, Marshall JH, Oxborrow GS. Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. *Appl Microbiol* 1966;14(4):539-51.
- FDA - Food and Drug Administration. Current Good Tissue Practice for human cell, tissue, and cellular and tissue-based product establishments. 21CFR1271, Subpart C-subpart D; 2001.
- FDA - Food and Drug Administration. Guidance for industry. Sterile Drug Products. Produced by aseptic processing - Current good manufacturing practice; 2004.
- Friberg B, Friberg S, Burman LG. Inconsistent correlation between aerobic bacterial surface and air counts in operating rooms with ultra clean laminar air flows: proposal of a new bacteriological standard for surface contamination. *J Hosp Infect* 1999a;42(4):287-93.
- Friberg B, Friberg S, Burman LG. Correlation between surface and air counts of particles carrying aerobic bacteria in operating rooms with turbulent ventilation: an experimental study. *J Hosp Infect* 1999b;42(1):61-8.

- Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Gicquel G, Tanquerel JJ, Chevrier S, Poisson M, et al. Bacterial and fungal counts in hospital air: comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27(12):1405-8.
- Guns J, Janssens R, Vercammen M. Air quality management. In: Nagy ZP, Varghese AC, Ashok A, editors. *A Practical manual of in vitro fertilization: Advanced methods and novel devices* Type: Generic; 2012.
- Herlong JL, Reubish K, Higdon HL, Boone WR. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in an assisted reproductive technology facility. *Fertility and Sterility* 2008;89:847-853.
- ISO – International Organization for Standardization. *Cleanrooms and associated environments - Part 1: Classification of air clearness*. ISO14644-1:1999; 1999.
- ISO - International Organization for Standardization. *Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control - Part 1: General principles and methods*. ISO14698-1:2003; 2003.
- ISO - International Organization for Standardization. *Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control - Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination data*. ISO14698-2:2003; 2003.
- ISO - International Standard Organisation. *Cleanrooms and associated environments - Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO14644-1*. ISO14644-2:2000; 2000.
- ISO - International Standard Organisation. *Determination of particle size distribution - single particle light interaction methods - Part 4: Light scattering airborne particle counter for clean spaces*. ISO 21501-4:2007. 2007.
- Klykens J, Pirnay JP, Verbeken G. Clean rooms and tissue banking how happy I could be with either GMP or GTP. Submitted 2011.
- Lee KS, Bartlett KH, Brauer M, Stephens GM, Black WA, Teschke K. A field comparison of four samplers for enumerating fungal aerosols I. Sampling characteristics. *Indoor Air* 2004;14:360-366.
- Ljungqvist B, Reinmuller B. Airborne viable particles and total number of airborne particles: comparative studies of active air sampling. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000;54:112-116.
- Ljungqvist B, Reinmuller, B. Monitoring of Airborne Viable Particles. In: Dixon M, editor. *Environmental monitoring for cleanrooms and controlled environments*. Drugs and Pharmaceutical Sciences. J. Swarbrick. New York: Informa Healthcare, 2007.:61-71.
- Moldenhauer J. Practical issues in designing and implementing an environmental control program. In: Moldenhauer J, ed. *Environmental monitoring. A comprehensive Handbook*. Volume1. PDA books; 2005;7-26.
- Pasquarella C, Pitzurra O, Savino A. The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection* 2000;46:241-256.
- Prince HM, Page SR, Keating A, Saragosa RF, Vukovic NM, Imrie KR, et al. Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(1):87-91.
- Ritter M, Schwedler J, Beyer J, Movassaghi K, Mutters R, Neubauer A, Schwella N. Bacterial contamination of ex vivo processed PBPC products under clean room conditions. *Transfusion* 2003;43:1587-1595.
- Royaume de Belgique. Arrêté royal du 28 septembre 2009 fixant les normes de qualité et de sécurité pour le don, le prélèvement, l'obtention, le contrôle, le traitement, le stockage et la distribution de matériel corporel humain, auxquelles les banques de matériel corporel humain, les structures intermédiaires de matériel corporel humain et les établissements de production doivent répondre. MB du 23 octobre 2009, p. 69409.
- Royaume de Belgique. Loi du 19 décembre 2008 relative à l'obtention et à l'utilisation de matériel corporel humain destiné à des applications médicales humaines ou à des fins de recherche scientifique. MB du 30 décembre 2008, p. 68774.
- Sandle, T. Environmental monitoring risk assessment. *Journal of GXP Compliance* 10[2]. 2006.

- Schwella N, Rick O, Heuft HG, Miksits K, Zimmermann R, Zingsem J, et al. Bacterial contamination of autologous bone marrow: reinfusion of culture-positive grafts does not result in clinical sequelae during the posttransplantation course. *Vox Sang* 1998;74(2):88-94.
- Shintani H, Taniai E, Miki A, Kurosu S, Hayashi F. Comparison of the collecting efficiency of microbiological air samplers. *Journal of Hospital Infection* 2004;56:42-48.
- Stucki C, Sautter AM, Favet J, Bonnabry P. Microbial contamination of syringes during preparation: the direct influence of environmental cleanliness and risk manipulations on end-product quality. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66(22):2032-6.
- Sutton SVW, Proud DW, Rachui S, Brannan DK. Validation of microbial recovery from disinfectants. *Pda Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2002;56:255-266.
- Thomas M, Sanborn MD, Couldry R. I.V. admixture contamination rates: traditional practice site versus a class 1000 cleanroom. *Am J Health Syst Pharm* 2005;62(22):2386-92.
- UE – Union Européenne. Directive 2003/94/CE de la Commission du 8 octobre 2003 établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain.
- UE – Union Européenne. Directive 2006/86/CE de la Commission du 24 octobre 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences de traçabilité, la notification des réactions et incidents indésirables graves, ainsi que certaines exigences techniques relatives à la codification, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution des tissus et cellules d'origine humaine.
- UE – Union Européenne. Directive 2004/23/CE du Parlement Européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains.
- USP – U.S. Pharmacopeia. USP29-NF24. Chapter 1116. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments. United States Pharmacopeia. Baltimore; 2010.
- Vanneaux V, Fois E, Robin M, Rea D, de Latour RP, Biscay N, et al. Microbial contamination of BM products before and after processing: a report of incidence and immediate adverse events in 257 grafts. *Cytotherapy* 2007;9(5):508-13.
- Wang S, Zinderman C, Wise R, Braun M. Infections and human tissue transplants: review of FDA Med Watch reports 2001-2004. *Cell Tissue Bank* 2007;8(3):211-9.
- WHO – World Health Organization. Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities. Eighth draft, 27 February 2011.
- Whyte W, Green G, Albisu A. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *Journal of Aerosol Science* 2007;38:97-110.
- Whyte W, Eaton T. Microbiological risk assessment in pharmaceutical cleanrooms. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences* 2004;9(1):16-23.
- Whyte W, Green G, Albisu A. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *Journal of Aerosol Science* 2007;38(1):97-110.
- Yao, MS, Mainelis G. Investigation of cut-off sizes and collection efficiencies of portable microbial samplers. *Aerosol Science and Technology* 2006;40(8):595-606.

5. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Tous les experts ont participé *à titre personnel* au groupe de travail. Les noms des experts du CSS sont annotés d'un astérisque *.

Les experts suivants ont participé à l'élaboration de l'avis :

DE VOS Daniel	Technologie cellulaire	LabMCT MHKA
DUFRANE Denis	Thérapie cellulaire endocrine, BMCH, appareil locomoteur	UCL
ECTORS Nadine*	Médecine, anatomo-pathologie	KUL
GIET Olivier	Biologiste, coordinateur qualité	ULG
GORDTS Bart*	Microbiologie et Hygiène hospitalière	AZ Brugge
GUNS Johan*	Sciences médico-sociales	UZ Brussel
IEVEN G	Microbiologie	UZA
MARICAU Daniel	Biologie clinique, Inspecteur MCH	AFMPS
MUYLLE Ludo*	Médecine, biologie clinique	AFMPS - Vigilance, UA
SAEGEMAN Veroniek	Médecine, biologie clinique, hygiène hospitalière	UZ Leuven
THONON Fabienne*	Médecine reproductive, embryologie	CHR de la Citadelle de Liège
VAN GEYT Caroline*	Sciences médico-sociales	UZ Gent
VANSTEENBRUGGE Anne*	Médecine reproductive, embryologie	CHR Namur
VERBEKEN Gilbert	Biologie, QA/QC/RA	LabMCT MHKA

Le groupe de travail a été présidé par Johan GUNS et le secrétariat scientifique a été assuré par Muriel BALTES.

Les experts suivants ont participé à l'approbation de l'avis :

BEELE Hilde*	Médecine, dermatologie	UZ Gent
CORNU Olivier*	Médecine, chirurgie orthopédique	UCL
DE SUTTER Petra*	Médecine reproductive	UZ Gent
DELLOYE Christian*	Médecine, chirurgie orthopédique	UCL
DELFORGE Alain*	Médecine, thérapie cellulaire	ULB
HEINEN Ernst	Histologie humaine	ULg
PIRNAY Jean-Paul*	Sciences médicales	LabMCT HCB-KA
TIMMERMANS Jean-Pierre*	Histologie, cytologie, biologie cellulaire	UA
VAN DEN ABBEEL Etienne	Médecine reproductive, embryologie	UZ Gent
VANDERKELEN Alain*	Médecine, chirurgie générale	HMRA

L'administration a été représentée par :

BONTEZ Walter	Coordination Sang, cellules, tissus et organes	AFMPS
VANTHUINE Kimberly	Coordination Sang, cellules, tissus et organes	AFMPS

Le groupe de travail a été présidé par Hilde BEELE; le secrétariat scientifique a été assuré par Muriel BALTES.

Au sujet du Conseil Supérieur de la Santé (CSS)

Le Conseil Supérieur de la Santé est un service fédéral relevant du SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement. Il a été fondé en 1849 et rend des avis scientifiques relatifs à la santé publique aux ministres de la santé publique et de l'environnement, à leurs administrations et à quelques agences. Ces avis sont émis sur demande ou d'initiative. Le CSS ne prend pas de décisions en matière de politique à mener, il ne les exécute pas mais il tente d'indiquer aux décideurs politiques la voie à suivre en matière de santé publique sur base des connaissances scientifiques les plus récentes.

Outre son secrétariat interne composé d'environ 25 collaborateurs, le Conseil fait appel à un large réseau de plus de 500 experts (professeurs d'université, collaborateurs d'institutions scientifiques), parmi lesquels 200 sont nommés à titre d'expert du Conseil. Les experts se réunissent au sein de groupes de travail pluridisciplinaires afin d'élaborer les avis.

En tant qu'organe officiel, le Conseil Supérieur de la Santé estime fondamental de garantir la neutralité et l'impartialité des avis scientifiques qu'il délivre. A cette fin, il s'est doté d'une structure, de règles et de procédures permettant de répondre efficacement à ces besoins et ce, à chaque étape du cheminement des avis. Les étapes clé dans cette matière sont l'analyse préalable de la demande, la désignation des experts au sein des groupes de travail, l'application d'un système de gestion des conflits d'intérêts potentiels (reposant sur des déclarations d'intérêt, un examen des conflits possibles, et un comité référent) et la validation finale des avis par le Collège (ultime organe décisionnel). Cet ensemble cohérent doit permettre la délivrance d'avis basés sur l'expertise scientifique la plus pointue disponible et ce, dans la plus grande impartialité possible.

Les avis des groupes de travail sont présentés au Collège. Après validation, ils sont transmis au requérant et au ministre de la santé publique et sont rendus publics sur le site internet (www.css-hgr.be), sauf en ce qui concerne les avis confidentiels. Un certain nombre d'entre eux sont en outre communiqués à la presse et aux groupes cibles parmi les professionnels du secteur des soins de santé.

Le CSS est également un partenaire actif dans le cadre de la construction du réseau EuSANH (*European Science Advisory Network for Health*), dont le but est d'élaborer des avis au niveau européen.

Si vous souhaitez rester informé des activités et publications du CSS, vous pouvez envoyer un mail à l'adresse suivante : info.hgr-css@health.belgium.be .