



AVIS DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N° 8698

Contrôle microbiologique du matériel corporel humain destiné à une application chez l'homme pour garantir un maximum de sécurité microbiologique: Recommandations pratiques

In this science-policy advisory report, the Superior Health Council issues practical recommendations on microbiological control of human body material for human application with maximal protection of the microbiological safety

Juin 2014 – **Update 28/07/2014**

1. INTRODUCTION

Selon l'Arrêté Royal (AR) 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 (MCH) (AR, 2009), les établissements de MCH sont responsables de la sécurité microbiologique du MCH qu'ils ont délivré pour les receveurs potentiels.

Le groupe de travail « Cellules, tissus et organes d'origine humaine et animale » chargé de la rédaction des normes de qualité et de sécurité (Loi du 19 décembre 2008) pour le MCH trouve nécessaire de préciser certains aspects microbiologiques relatifs aux MCH comme le contrôle, la sécurisation, etc. Ces aspects microbiologiques seront examinés non seulement de manière globale (certains étant communs à tous les tissus et cellules), mais également de manière spécifique aux divers types de tissus et cellules.

Ces recommandations seront entre autres basées sur les avis 8143, 8763 et 8785 du Conseil Supérieur de la Santé (CSS) (inactivation et sécurisation des tissus et cellules vis-à-vis, respectivement des prions, des bactéries et des virus) ainsi que sur la pratique et les exigences de la nouvelle réglementation nationale (CSS 8143, 2008 ; CSS 8763, 2014 ; CSS 8785, 2012).

Ces recommandations complètent les standards de qualité spécifiques des tissus et cellules (CSS 8716, 2013) en matière de normes relatives à la microbiologie.

L'avis traite uniquement des bactéries aérobies et anaérobies (inclus les mycoplasmes en ce qui concerne les cellules), les moisissures et levures. Il ne prend pas en compte les virus et prions.

Afin de pouvoir répondre à la problématique de la sécurité microbiologique du MCH, 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. L'avis a été ensuite discuté à maintes et finalement approuvé par le groupe permanent « Cellules, tissus et organes d'origine humaine et animale ».

2. RECOMMANDATIONS

Tout MCH destiné à une application chez l'homme doit être contrôlé sur le plan microbiologique concernant les bactéries aérobies et anaérobies, les levures et les moisissures filamenteuses. La sécurité microbiologique de ce MCH doit être assurée par l'absence de détection de germes par contrôles microbiologiques sur le produit final. Le but de ce contrôle microbiologique est de garantir, pour le receveur, au maximum la qualité et la sécurité biologique du MCH.

Néanmoins, le gestionnaire de l'établissement de MCH peut déroger à cette recommandation générale après une analyse méticuleuse du risque que représente le MCH contaminé et ses effets secondaires potentiels, notamment :

- Pour du MCH en pénurie et/ou pour des indications cliniques majeures ou à risque vital et/ou s'il n'existe que peu d'alternatives thérapeutiques ;
- Pour les MCH naturellement contaminés par la flore commensale et/ou si lors de l'application humaine, une flore commensale peut être acceptée (par exemple : sperme, peau, etc.).

Il décide de cette dérogation en concertation avec le médecin traitant ou le médecin transplantateur et ce, sur base d'une procédure de libération exceptionnelle du MCH.

Ces recommandations ont pour but de donner des informations spécifiques concernant l'échantillon microbien (le matériel à contrôler, la quantité minimale de ce matériel) les méthodes de culture et les spécifications pour la détection et le compte rendu du contrôle microbiologique. Elles doivent être considérées comme étant les tests minimaux. Les établissements de MCH ont la possibilité de réaliser des tests plus approfondis pour les types de MCH faisant l'objet de leur agrément. Si des normes moins restrictives devaient être appliquées, cet état de fait doit être validé par l'établissement.

Mots clés

Keywords	Mesh terms*	Sleutelwoorden	Mots clés	Stichwörter
Microbiology	Microbiology	Microbiologie	Microbiologie	Mikrobiologie
Bacteriology	Bacteriology	Bacteriologie	Bactériologie	Bakteriologie
Mycology	Mycology	Mycologie	Mycologie	Mykologie
Culture methods	Culture techniques	Cultuurmethodes	Méthodes de culture	Kulturverfahren
Human cells	Human, Cells	Menselijke cellen	Cellules humaines	Menschliche Zellen
Tissue allografts	Tissue transplantation	Weefselallogreffen	Allogreffes tissulaires	Allogene Gewebetransplantate
Human body material		Menselijk lichaamsmateriaal	Matériel corporel humain	Menschliches Körpermaterial
Culture medium	Culture media	Kweekmedium	Milieu de culture	Nährboden
Skin allografts	Homograft dressing	Huidallogreffen	Allogreffes de peau	Allogene Hauttransplantate
Cell culture	Cell culture techniques	Celcultuur	Culture cellulaire	Zellkultur
Musculoskeletal allografts	Bone-patellar tendon-bone allograft	Muskuloskeletale allogreffen	Allogreffes musculosquelettiques	Allogene muskuloskeletale Transplantate
Reproductive cells	Germ cells	Reproductieve cellen	Cellules reproductrices	Geschlechtszellen
Tympano-ossicular allografts	Tympanic membrane	Tympano-ossiculaire allogreffen	Allogreffes tympano-ossiculaires	Allogene Gehörknöchelchen- und Trommelfelltransplantate
Amniotic membrane allografts	Amniotic membrane dressing	Amnionmembraan-allogreffen	Allogreffes de la membrane amniotique	Allogene Amniontransplantate
Corneal allografts	Corneal transplantation	Cornea-allogreffen	Allogreffes de cornées	Allogene Hornhauttransplantate
Scleral allografts	Sclera	Sclera-allogreffen	Allogreffes de sclérotiques	Allogene Skleratransplantate
Heart valve allografts	Heart valves/transplantation	Hartklepallogreffen	Allogreffes de valves cardiaques	Allogene Herzklappen-transplantate
Vascular allografts	Vascular grafting	Vaatallogreffen	Allogreffes vasculaires	Allogene Gefäßtransplantate
Hematopoietic stem cells	Hematopoietic stem cells	Hematopoëtische stamcellen	Cellules souches hématopoïétiques	Hämatopoietische stammzellen
Hepatocytes He	Hepatocytes	Hepatocyten	Hépatocytes	Hepatozyten
Keratinocytes	Keratinocytes	keratinocyten	Kératinocytes	Keratinocyten
Chondrocytes	Chondrocytes	Chondrocyten	Chondrocytes	Chondrozyten
Beta cells	Insulin-secreting cells	Bêtacellen	Cellules bêta	Betazellen
Cord blood	Cord blood	Navelstrengbloed	Sang de cordon ombilical	Nabelschnurblut

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

3. ELABORATION ET ARGUMENTATION

Liste des abréviations utilisées

ABEF	Association Belge des Embryologistes Francophones
AR	Arrêté royal
ATMPS	<i>Advanced therapy medicinal products</i>
CSS	Conseil Supérieur de la Santé
CFU	<i>Colony forming unit</i> (Unité formant colonie)
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïde
MCH	Matériel corporel humain
PMA	Procréation médicalement assistée
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
QMS	<i>Quality Management system</i>

3.1 INTRODUCTION ET MÉTHODOLOGIE

3.1.1. Introduction

Le MCH à partir duquel les cellules et les tissus sont préparés (matériel source) constitue en soi la principale source de contamination microbiologique des cellules et tissus humains. Le pourcentage d'organes contaminés lors du prélèvement varie entre 2,2 % et 84 % (Carroll et al., 1992 ; Lakey et al., 1995 ; Lehec et al., 2009 ; Scharp et al., 1992 ; Zibari et al., 2000). La peau est colonisée en permanence par des micro-organismes associés à celle-ci (Pirnay et al., 2012) et le taux de contamination des tissus prélevés en ce qui concerne l'appareil locomoteur varie entre 8,6 et 50 % (Barbour & King, 2003 ; Deijkers et al., 1997 ; Forsell & Liesman, 2000 ; Ibrahim et al., 2004). De même, plus de 90 % des échantillons de sperme sont contaminés lors du prélèvement (Nicholson et al., 2000).

Les différences observées quant au taux de contamination entre les différentes publications peuvent être attribuées à divers facteurs :

- 1) Les conditions environnementales jouent un rôle déterminant dans la contamination potentielle du MCH. Le taux de contamination des tissus prélevés en salle d'opération est de 5 à 11 % inférieur par rapport aux autres lieux de prélèvement comme la morgue dans les hôpitaux (Forsell & Liesman, 2000).
Concernant les directives en matière d'optimisation de l'environnement lors du prélèvement et du traitement, nous nous référons à l'avis 8699 du CSS (2012) relatif à la validation et au contrôle de l'environnement dans les établissements de MCH.
- 2) La survenue d'hémocultures positives au moment du prélèvement est significativement plus faible chez les donneurs multi-organes que chez les donneurs *post-mortem* (Barbour & King, 2003).
- 3) La taille de l'équipe de prélèvement et la réalisation ou non d'une autopsie préalablement au prélèvement du tissu ou des cellules, jouent un rôle significatif (Deijkers et al., 1997 ; Forsell & Liesman, 2000).
- 4) Le type d'échantillons prélevés pour dépister une contamination microbiologique ne permet pas de comparer les différentes études : cultures de sang ou d'urine des donneurs, échantillons microbiologiques provenant du liquide de perfusion, d'expectorations ou de milieux de transport, utilisation d'écouvillons, fragments tissulaires ou suspensions cellulaires (Deijkers et al., 1997 ; Zibari et al., 2000).
- 5) Le type d'organe ou de tissu, le mode de prélèvement et la durée du transport vers l'établissement de MCH jouent un rôle important. La contamination microbiologique du milieu de transport des pancréas prélevés dans le cadre de l'isolement de cellules bêta varie entre 19 et 84 % (Bucher et al., 2005 ; Carroll et al., 1992 ; Lakey et al., 1995 ; Scharp et al., 1992). Les pancréas destinés à l'isolement de cellules bêta sont généralement prélevés en même temps qu'une partie de l'intestin grêle qui est à l'origine du taux élevé de contamination du milieu de transport (Bucher et al., 2005). Le taux de contamination du milieu de transport des foies prélevés pour l'isolement des hépatocytes s'élève en moyenne à 37,5 % à l'arrivée à l'établissement de MCH (Lehec et al., 2009).

Les nombreuses étapes (depuis le prélèvement jusqu'à la distribution) comportant toutes un risque de contamination du MCH, il est nécessaire de vérifier dans quelle mesure ces tissus et

cellules sont fiables au niveau microbiologique (notamment les bactéries aérobies et anaérobies, les moisissures filamenteuses et les levures).

Le présent avis propose aux établissements de MCH des recommandations pratiques en ce qui concerne l'échantillonnage pour la mise en culture, la méthode de culture microbiologique et la détection/notification.

3.1.2. Méthodologie

Après analyse de la demande, le Collège et le président du groupe de travail ont identifié les expertises nécessaires. Les experts du groupe ont rempli une déclaration générale et *ad hoc* d'intérêts et la Commission de Déontologie a évalué le risque potentiel de conflits d'intérêts.

Ces recommandations sont établies sur base de la littérature grise et scientifique en la matière et sur l'expérience des experts consultés dans le domaine concerné.

Après approbation du projet d'avis par le groupe de travail et par groupe permanent « Cellules, tissus et organes d'origine humaine et animale », le Collège a validé l'avis en dernier ressort.

3.2 ECHANTILLONNAGE

L'inspection macroscopique, et plus particulièrement en cas d'utilisation de milieux de culture standards, peut être révélatrice d'une contamination (odeur, couleur, turbidité, etc.).

3.2.1. Méthode d'échantillonnage pour culture

Les types d'échantillons suivants peuvent être utilisés :

- Ecouvillons
 - Avantages :
Cette technique permet d'échantillonner des surfaces importantes. Des écouvillons plus récents utilisant la technique du *flocked swab* et offrant une action capillaire plus importante donnent une récupération bactérienne plus élevée que celle obtenue par les écouvillons conventionnels, p .ex. en coton (Saegeman et al., 2011). Un *flocked swab* possède une pointe couverte de courtes fibres de nylon implantées perpendiculairement sur l'écouvillon ; une couche très absorbante est ainsi créée dont la structure est ouverte.
 - Inconvénients :
L'utilisation d'écouvillons est une méthode peu sensible (Martinez et al., 2003). En outre, le faible degré d'efficacité de récupération (*recovery efficiency*) de chaque type d'écouvillon est un facteur d'incertitude (Winters, 2003).

- Fragments
 - Avantages :
Des fragments de tissus résiduels donnent des informations microbiologiques réelles concernant un greffon.
 - Inconvénients :
 - Les informations nécessitent un échantillonnage représentatif et ne concernent qu'une très petite partie du MCH concerné. De ce fait, les informations sont peu représentatives et le risque de résultats faux négatifs est réel.
 - L'utilisation du « tissu accompagnant » le greffon n'est pas toujours un bon indicateur d'une contamination microbiologique éventuelle du greffon à transplanter.
 - La contamination du MCH au cours du prélèvement/transport ou au cours de la préparation est pour la plupart des tissus une contamination des parties superficielles et pas une contamination des parties internes de MCH. Le contrôle microbiologique de la surface du tissu (milieu surnageant/de transport ou écouvillon) est dès lors complémentaire à celui des fragments de tissus.

- Liquides/milieus de transport, liquide de rinçage, liquides/ milieux de conservation, échantillons liquides.

Il s'agit de liquides dans ou avec lesquels les tissus/cellules ont été transportés, traités ou conservés. Ces liquides peuvent alors êtreensemencés sur des milieux de culture solides ou liquides (e.a. aussi des flacons d'hémoculture), ou filtrés sur un filtre membranaire lui-même mis ensuite en culture.

- Avantages :

- échantillonnage plus uniforme;
- concentration de volumes lors de l'utilisation d'un filtre membranaire;
- en cas d'utilisation de flacons d'hémoculture, les manipulations supplémentaires sont peu nombreuses.

- Inconvénients :

- Il n'est pas possible de partir du principe qu'un simple rinçage ou un trempage des tissus éliminera 100 % des micro-organismes potentiellement présents. La *recovery efficiency* de la méthode est variable (Winters et al, 2003) ;
- Effets de dilution si l'on n'utilise pas de filtre membranaire ;
- En cas d'utilisation de filtres membranaires, des manipulations complémentaires sont nécessaires entraînant un risque supplémentaire de contamination secondaire de l'échantillon à analyser (faux positifs) ;
- Obstruction des filtres membranaires ;
- La filtration membranaire n'est pas une technique utilisée en routine dans la plupart des laboratoires de microbiologie ;
- Risque de faux négatifs pour des contaminations commensales à l'intérieur de certains tissus.

3.2.2. Quantité et nombre d'échantillons

Des recommandations spécifiques sur la quantité d'échantillons à prélever sont données plus loin dans le cadre de l'examen microbiologique des différents tissus/cellules.

Ci-dessous figure un résumé des directives générales.

- Echantillons de tissus emballés dans des conteneurs

Le tableau 1 présente le nombre exigé de conteneurs tel que le décrit la Pharmacopée Européenne 7.1. 2.6.1 (2011 et éditions ultérieures) dans le test de stérilité. Le nombre de conteneurs à tester pour le contrôle microbiologique est fonction du nombre total de conteneurs préparés à partir du même matériel source.

Tableau 1. Nombre minimal d'échantillons à tester
(Pharmacopée européenne, tableau 2.6.1.3.)

Nombre de conteneurs	Nombre minimal d'échantillons à tester (sauf spécifications contraires justifiées et autorisées)
≤ 4 conteneurs	Chaque conteneur
4 < conteneurs ≤ 50	20 % avec minimum 4 conteneurs
> 50 conteneurs	2 % avec minimum 10 conteneurs

En raison de la disponibilité réduite de MCH, le CSS propose que le nombre minimal d'échantillons du produit final du MCH à prendre après traitement est le suivant :

- Un échantillon de chaque greffon conditionné séparément ;
- pour les matériaux préparés sous forme de lots, nous optons pour une modification de ce que prescrit la Pharmacopée européenne 7.1 2.6.1 (2011 et éditions ultérieures) ; à savoir, pour un lot de :
 - > 50 conteneurs : 5 % des échantillons emballés/conteneurs de fragment de tissu résiduel ;
 - ≤ 50 conteneurs : 2 échantillons emballés/conteneurs de fragment de tissu résiduel.

- Echantillons liquides : milieux de transport, liquides de rinçage, milieux de conservation, échantillons liquides

Le tableau 2 présente le volume exigé pour l'échantillon tel que le décrit la Pharmacopée européenne 7.1. 2.6.1. (2011 et éditions ultérieures) dans le test de stérilité. La quantité d'échantillons pour le contrôle microbiologique par ensemencement est fonction du volume total du produit.

Tableau 2. Volumes d'échantillons liquides à tester
(Pharmacopée européenne, tableau 2.6.1.2.)

Volume total de produit (mL)	Volume à inoculer
V > 40	10 % du contenu avec minimum 20 mL
1 ≤ V < 40	La moitié du contenu avec minimum 1 mL
V < 1	Tout le contenu du conteneur

En raison du volume exigé pour l'échantillon, le test de stérilité tel que décrit dans la Pharmacopée européenne 7.1 2.6.1 (2011 et éditions ultérieures) pour les cellules humaines n'est pas toujours applicable. Pour le contrôle microbiologique des produits cellulaires, les échantillons à prendre sont décrits dans le tableau 3.

Tableau 3. Volumes à tester d'échantillons au volume limité
(Pharmacopée européenne 7.1. 2.6.27 (2011 et éditions ultérieures))

Volume total de produit (mL)	Volume à inoculer
V ≥ 10	Au moins 1 % du volume total
V < 10	Au moins 100 µL

En fonction de la technique d'analyse microbiologique, du type du MCH, de l'application, du volume de prélèvement ou d'autres spécificités à justifier dans le *Quality Management System*

(QMS) de l'établissement de MCH concerné, ces échantillonnages et/ou ces volumes peuvent être adaptés par une méthodologie validée et ce en concertation avec le microbiologiste.

3.2.3. Matériel pour le prélèvement d'échantillons

Les échantillons (matériel tissulaire résiduel ou liquides (de rinçage)) sont conservés dans un récipient stérile fermé jusqu'au traitement ultérieur par le laboratoire.

Les échantillons de produits cellulaires sont inoculés dans des flacons d'hémoculture en cas d'utilisation de systèmes de détection automatisés.

3.2.4. Conclusions

Les échantillons pour le contrôle microbiologique peuvent être prélevés aux moments suivants :

- sur le matériel source ;
- durant le traitement ;
- sur le produit final ;
- au cours de l'application chez l'homme.

Le contrôle microbiologique doit être effectué **sur le matériel source** sauf s'il est fait mention d'autres considérations dans le paragraphe spécifique du MCH. Le gestionnaire du MCH est seul responsable de l'évaluation des résultats du contrôle microbiologique du matériel source et de l'implication de ces résultats sur le processus et sur la validation finale du MCH concerné.

Durant le traitement, le contrôle microbiologique est recommandé afin de contrôler les différentes étapes de la préparation quant à leur caractère aseptique.

Sur le produit final, le contrôle microbiologique est le test obligatoire permettant de pouvoir garantir la sécurité microbiologique du MCH libéré.

La prise d'échantillons **pendant l'application clinique du MCH** peut être envisagée (CSS 8716, 2013). Ces cultures de surveillance peuvent donner des indications en cas de problèmes infectieux ultérieurs provenant du MCH implanté/appliqué/infusé. Ce contrôle microbiologique relève de la responsabilité du médecin responsable de l'application humaine de ce MCH et pas du gestionnaire de l'établissement de MCH.

3.3 METHODES DE CULTURES MICROBIOLOGIQUES

3.3.1. Milieux de culture

Les composants principaux des milieux de culture sont la source de protéines ou d'hydrolysats de protéines et une concentration spécifique en sel.

3.3.1.1. Bactéries aérobies et anaérobies

Les bouillons de culture solides classiques comme la gélose au sang et la gélose chocolat permettent non seulement de cultiver des micro-organismes aérobies et anaérobies à croissance rapide mais également les micro-organismes difficiles à cultiver.

Les bouillons de culture liquides classiques sont par exemple *Trypticase Soy Broth* et bouillon au thioglycolate. Ce dernier milieu convient aussi pour la culture des bactéries anaérobies en raison de la propriété d'agent réducteur du thioglycolate (Greenwood et al., 2007 ; Verhaegen et al., 2007).

Si, pour certains tissus/cellules ou sur la base de l'anamnèse chez le donneur, il existe un risque d'infection mycobactérienne (*Mycobacterium tuberculosis* complexe et/ou mycobactéries atypiques), des milieux de culture spécifiques sont mis en œuvre pour la détection (par ex. Löwenstein-Jensen, MGIT, Middlebrook 7H10, incubation à 37 °C durant 6 à 8 semaines, à 30 °C pour *M. marinum*) (Warwick et al., 2008).

3.3.1.2. Moisissures filamenteuses et levures

Pour la croissance sélective de levures et moisissures filamenteuses, des milieux spécifiques comme la gélose de Sabouraud au dextrose sont recommandés. En effet, ce milieu est, en raison de sa concentration élevée en sucre et son pH bas, spécifique aux moisissures filamenteuses et levures. Les bactéries, les moisissures filamenteuses et levures saprophytes sont endiguées par l'ajout respectivement d'antibiotiques et de cycloheximide.

3.3.2. Recommandations de la Pharmacopée européenne

En ce qui concerne le contrôle microbiologique de stérilité, la Pharmacopée européenne propose le thioglycolate liquide, principalement pour la mise en culture de micro-organismes anaérobies. Le *soya bean casein digest medium* convient pour la détection des moisissures filamenteuses, des levures et des aérobies (Pharmacopée européenne 7.7, 2.6.1., 2011 et éditions ultérieures). Le test de stérilité peut être réalisé soit par filtration sur membrane ou soit par inoculation directe du produit à tester dans le milieu de conservation. Des contrôles négatifs sont toujours inclus. Le milieu inoculé est incubé pendant 14 jours au moins et fait l'objet d'une observation régulière quant à la présence d'une turbidité et/ou la preuve macroscopique d'une croissance microbienne.

D'autres techniques microbiologiques peuvent être utilisées pour autant qu'elles soient comparées à une méthode de référence lors d'une étude de validation parallèle et en concertation avec le microbiologiste. Si le milieu dans lequel les cellules/tissus sont conservés contient des antibiotiques ou des antimycotiques, ces facteurs d'inhibition de croissance potentiels doivent être éliminés par filtration du milieu à contrôler à moins que des inhibiteurs ou des absorbants tels que le charbon actif n'aient été ajoutés au milieu de culture microbiologique.

3.3.3. Systèmes d'incubation microbiologique manuels versus automatiques

Pour le contrôle de la stérilité des produits cellulaires, la Pharmacopée européenne mentionne l'utilisation de méthodes de culture microbiologique aussi bien manuelles qu'**automatisées** (Pharmacopée européenne, 7.0, 2.6.27., 2011 et éditions ultérieures).

En raison de sa longue durée d'incubation (14 jours) et du volume d'échantillon exigé, le test de stérilité tel que décrit dans la Pharmacopée européenne 7.1 2.6.1 (2011 et éditions ultérieures) n'est pas toujours applicable pour les cellules humaines.

Différentes études ont démontré que des méthodes de cultures microbiologiques automatisées entrent mieux en ligne de compte pour la détection de micro-organismes dans les produits cellulaires. Ces méthodes de cultures automatisées sont caractérisées par une plus grande sensibilité, un temps de détection plus court, un très petit nombre de résultats faux positifs et une charge de travail limitée par rapport au test classique de stérilité (Khuu et al., 2006 ; Kielpinski et al., 2005 ; Plantamura et al., 2011 ; Viganò et al., 2002). Depuis 2011, ces méthodes de culture microbiologique automatisées ne sont pas seulement acceptées en Europe comme alternatives au test de stérilité mais elles sont utilisées de manière préférentielle pour le contrôle microbiologique des produits cellulaires (Pharmacopée européenne, 7.1 2.6.27., 2011 et éditions ultérieures).

Pour autant que la méthode de détection automatisée ait été validée conformément à la Pharmacopée européenne 7.1 2.6.27 (2011 et éditions ultérieures), il suffit d'incuber les échantillons durant 7 jours à 35 °C-37 °C dans des conditions aérobies et anaérobies pour la détection de bactéries aérobies et anaérobies, de moisissures filamenteuses et levures (Beres et al., 2013; Horvath et al., 2004).

Compte tenu de la spécificité du MCH, le système automatisé est une méthode de détection utilisée pour tester l'absence de germes, applicable non seulement au MCH cellulaire mais qui peut être également étendue au MCH tissulaire.

3.3.4. Durée d'incubation

Pour les milieux de culture et de conservation des cellules, les milieux inoculés sont incubés durant 7 jours dans le cas de systèmes automatiques de détection et durant 14 jours pour la détection visuelle d'une croissance microbienne (Pharmacopée européenne 7.1, 2.6.27, 2011 et éditions ultérieures).

Par analogie, les cultures du MCH non cellulaires sont incubées durant 14 jours (Pharmacopée européenne 7.1, 2.6.1, 2011 et éditions ultérieures).

Dans la pratique clinique des banques, une durée d'incubation de minimum 7 jours suffit généralement pour garantir la sécurité clinique du MCH. Elle permet la croissance de la plupart des micro-organismes virulents impliqués dans les pathologies infectieuses chez le patient à l'exception cependant de certaines moisissures filamenteuses qui requièrent des durées d'incubation plus longues (jusqu'à 21 jours) (McGowan, 2011 ; Murray & Witebsky, 2010 ; Sutton, 2007).

Si d'autres durées d'incubation que celles mentionnées dans la Pharmacopée européenne devaient être retenues, elles devraient faire l'objet d'une validation en concertation avec le microbiologiste.

3.3.5. Température d'incubation

Dans le cadre du test de stérilité classique, l'incubation se déroule dans des milieux au thioglycolate à 30 °C-35 °C et dans ceux au *soya bean casein digest* à 20 °C-25 °C (Pharmacopée européenne 7.1, 2.6.1., 2011 et éditions ultérieures). Pour la méthode de détection automatisée, la Pharmacopée européenne mentionne une incubation à 35 °C-37 °C des milieux de culture inoculés.

Si d'autres températures d'incubation devaient être retenues, elles devraient faire l'objet d'une validation en concertation avec le microbiologiste.

3.3.6. Substances inhibantes

Les solutions d'antibiotiques/antiseptiques/chimiques utilisées lors du traitement des tissus et cellules ou les milieux ayant une certaine action bactériostatique/fongistatique ou bactéricide/fongicide (p. ex. formaldéhyde 4 %, éthanol 70 %, glycérol 85 %, DMSO) sont, dans la mesure du possible, traitées par des agents neutralisants (p. ex. charbon actif, résines, dilution, rinçage, etc.) avant leur inoculation dans le milieu de culture microbiologique. Il est dès lors indiqué de mentionner sur le formulaire de demande au laboratoire si des restes possibles de substances inhibitrices sont susceptibles d'être présents dans les échantillons de culture ainsi que le nom de ces produits.

3.4 DETECTION/NOTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES

3.4.1. Détection / notification d'absence de micro-organismes

La détection de micro-organismes pour le contrôle microbiologique du MCH porte obligatoirement sur les bactéries aérobies, les bactéries anaérobies ainsi que les levures et moisissures filamenteuses. Une détection spécifique des mycobactéries doit également être faite en cas de risque d'infection mycobactérienne sur base de l'anamnèse du donneur pour pouvoir libérer les allogreffes obtenues.

La notification par le laboratoire des résultats se fait séparément pour les bactéries aérobies, les bactéries anaérobies ainsi que les levures et moisissures filamenteuses.

Une réponse qualitative claire (positive/négative ; détecté/non détecté) est attendue du laboratoire en ce qui concerne la présence de micro-organismes (bactéries aérobies et anaérobies, moisissures filamenteuses et levures) en identifiant au moins les micro-organismes détectés.

3.4.2. Détection / notification du bioburden

3.4.2.1. Concept du *bioburden* applicable au MCH

Dans le cadre du contrôle microbiologique des médicaments et des produits médicaux, le *bioburden* est défini comme la charge microbienne (nombres de bactéries vivantes) du matériel source afin de démontrer que le processus de préparation est capable d'éliminer cette charge connue par le processus de décontamination/stérilisation décrit du procédé (GMP, 2008).

Compte tenu du manque de références bibliographiques spécifiques, ce concept n'est pas transposable directement au MCH mais se doit d'être adapté aux spécificités du MCH.

Dans le cadre du contrôle microbiologique du MCH, le *bioburden* peut être défini comme étant la charge microbienne sur le plan quantitatif et qualitatif du MCH avant l'application d'un traitement de stérilisation, d'inactivation ou de décontamination. Pour le MCH, il concerne principalement le matériel source, parfois après certaines étapes initiales du traitement.

La détermination du *bioburden* du MCH sert avant tout à réorienter le processus (destruction ou étapes complémentaires de sécurisation, etc.) et/ou à renforcer les moyens de contrôle (identification *Polymerase chain reaction* (PCR), etc.) pour assurer un contrôle microbiologique sur le produit final conforme au processus admis. Il offre par ailleurs des opportunités d'amélioration du processus et des moyens de contrôles.

3.4.2.2. Approche quantitative du *bioburden* : charge microbienne

Il existe des preuves dans la littérature que le délai endéans lequel les (hémocultures deviennent positives soit corrélé à la charge bactérienne initiale (en *Colony forming units* (CFU)/mL) (Kassis et al., 2009 ; Mermel et al., 2001).

Cette corrélation n'a toutefois été bien étudiée que dans le cas où les hémocultures où des systèmes automatiques de détection enregistrent électroniquement et très précisément le délai de virage positif.

Cette même approche peut néanmoins être transposée à d'autres méthodes de culture.

Une culture semi-quantitative est possible en inoculant les écouvillons sur une gélose solide et dans un milieu enrichi. Si aucune croissance n'est constatée sur la gélose solide mais bien dans le milieu liquide, cela indique une charge microbienne plutôt faible. Si une croissance est constatée aussi bien dans le milieu liquide que sur la gélose solide, cela est synonyme d'une contamination significative ou de charge microbienne élevée du tissu concerné (Pirnay et al., 2012).

La Pharmacopée européenne décrit différentes méthodes de détermination quantitative de la charge microbienne quantitative (Pharmacopée européenne. 7.1. 2.6.12, 2011 et éditions ultérieures).

Dans le cadre de l'approche quantitative du *bioburden* du MCH source, il peut être acceptable de se limiter à la détection ou non de germes à 3-5 jours avant un réensemencement pour identification.

D'autres méthodes, d'autres temps d'incubation et d'autres critères en fonction du type de MCH, du processus de préparation ou des indications cliniques, peuvent être retenus et documentés par le gestionnaire du MCH en collaboration avec le microbiologiste du laboratoire d'analyse.

3.4.2.3. Approche qualitative du *bioburden* : Classification des micro-organismes en fonction de leur degré de virulence

L'identification des micro-organismes isolés lors du contrôle microbiologique de MCH est importante.

Les micro-organismes rencontrés sur le MCH prélevé et avant le traitement peuvent être classés en fonction de leur degré de virulence (tableau 4).

Le degré de virulence des bactéries est multifactoriel : les facteurs de virulence du micro-organisme, le statut immunitaire du receveur de ce tissu spécifique (c.-à-d. patients gravement brûlés, patients hématologiques, etc.), le type de tissu (application externe ou implantation), le mode de pénétration et la localisation du micro-organisme dans le corps (associés au type de tissu à implanter), la résistance aux antibiotiques.

Dans ce contexte, le modèle dommage-réponse de Casadevall & Pirofski est intéressant (CSS 8763, 2014). Ce schéma de classification des pathogènes microbiens tient compte à la fois des contributions de l'hôte et de celles du micro-organisme (pathogène) (Casadevall & Pirofski, 2003). Ce modèle est basé sur l'aptitude des micro-organismes à provoquer des dommages en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte (Casadevall & Pirofski, 2000).

Une « haute virulence » indique un risque potentiel pathogène élevé pour le receveur. Ce tissu doit en principe être détruit.

Pour certains types de MCH dont le matériel source peut naturellement (avant prélèvement) être contaminé (sperme, peau, etc.) ou pour des tissus en pénurie et/ou utilisés dans des indications vitales (peau, membranes amniotiques, allogreffes cardio-vasculaires, etc.), le médecin

gestionnaire de ce MCH est légitimé, en cas de présence d'un *bioburden* à germes repris au tableau 4, après une analyse de bénéfices/risques à prendre des mesures et/ou étapes complémentaires documentées et validées du processus et/ou du contrôle pour assurer la sécurité microbiologique des allogreffes délivrées. Il doit dans ce cas de toute manière en informer le médecin implantateur.

Une « faible virulence » signifie en principe un risque pathogène faible pour le receveur et peut être acceptée dans les échantillons microbiologiques prélevés avant la procédure de décontamination/stérilisation.

Tableau 4. Micro-organismes considérés comme hautement virulents si détectés sur le MCH prélevé avant traitement (Martinez, 2003 ; Pellet, 1996 ; AATB, 2002) (liste non exhaustive).

<i>Staphylococcus aureus</i>
Streptococcus bêta-hémolytiques, <i>Entérocooccus</i> spp
Micro-organismes non-fermentants : <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Acinetobacter</i> spp, <i>Stenotrophomas maltophilia</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Micro-organismes sporulants : <i>Bacillus</i> spp (<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i>), <i>Clostridium</i> spp
Entérobactériacés : <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp, <i>Salmonella</i> spp, <i>Shigella</i> spp, etc.
Micro-organismes anaérobies Gram négatif : <i>Bacteroides</i> spp, <i>Prevotella</i> spp, <i>Porphyromonas</i> spp, <i>Fusobacterium</i> spp
Levures et moisissures filamenteuses

3.5 EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DES TISSUS SPÉCIFIQUES

3.5.1. Allogreffes de peau

3.5.1.1. Introduction

La peau humaine saine est colonisée en permanence par des micro-organismes (non)pathogènes associés à la peau (flore commensale, transitoire et commensale provisoire). C'est la raison pour laquelle une désinfection topique et un traitement par antibiotiques sont fréquemment appliqués pour la décontamination des allogreffes de peau. Étant donné que l'efficacité des antibiotiques est mise en doute, il faudra être très attentif à la procédure de nettoyage et de désinfection de la peau du donneur avant prélèvement.

Jusqu'à 20 % de la flore microbienne cutanée se trouve hors de portée des méthodes de désinfection habituelles. Ces bactéries sont situées dans les unités pilo-sébacées ou à des endroits où les lipides et des couches superficielles cornifiées de l'épithélium les protègent (Selwyn & Ellis, 1972). Des antiseptiques topiques n'éradiquent que la flore cutanée superficielle et celle-ci est ensuite remplacée par des micro-organismes provenant des couches plus profondes (Schindler et al., 2006).

Nombre de ces espèces isolées à partir des cultures de fragments de peau (prises lors du prélèvement et/ou du traitement final) sont des staphylocoques à coagulase négative (Heck et al., 1981 ; Ireland & Spelman, 2005 ; May et al., 1985 ; Obeng et al., 2001 ; van Baare et al., 1998 ; White et al., 1991). Il s'agit de micro-organismes de faible virulence qui colonisent la peau normale. Des *S. aureus* hautement virulents ont été isolés dans 9 à 24 % des cultures positives de peau (Ireland & Spelman, 2005 ; May et al., 1985 ; van Baare et al., 1998).

3.5.1.2. Échantillonnage pour examen microbiologique

Des échantillons de peau sont pris sur le matériel source pour vérifier le *bioburden*, après une étape de décontamination (optionnelle) et immédiatement sur le produit final.

La peau du donneur est prélevée au moyen d'un dermatome et placée ensuite dans un conteneur stérile rempli d'un milieu de transport stérile avec ou sans antibiotique. Un échantillon de peau peut être prélevé au moment du prélèvement pour servir de culture de prélèvement (1 à 2 % de la surface totale de la peau prélevée). Les cultures microbiologiques réalisées durant le prélèvement de la peau donnent une idée préliminaire de la contamination cutanée initiale et de l'espèce présente sur la peau du donneur (*bioburden*) (Neely et al., 2008).

Les allogreffes de peau peuvent être stockées de plusieurs manières: la glycérolisation et la cryoconservation dans de l'azote liquide constituent les techniques les plus fréquemment utilisées. Nous limitons cette partie à ces deux méthodes.

- Allogreffes de peau glycérolisées

Le glycérol à 85 % possède un effet antimicrobien certain, en particulier à des températures supérieures à 24 °C et sur des bactéries à Gram négatif (Saegeman et al., 2008).

A la fin du traitement de la peau, des fragments représentatifs résiduels de peau sont utilisés comme échantillons finaux de contrôle avant l'emballage définitif. Ces fragments de peau

représentatifs des greffons emballés séparément comprennent 1 à 2 % de la surface de peau du donneur. Les fragments de peau glycérolisés sont rincés.

- Allogreffes de peau cryoconservées

Dans le cadre de la procédure de cryoconservation, un échantillon peut être prélevé après le lavage (si un maximum d'antibiotique est éliminé) (échantillon de traitement).

Les bandes de peau traitées au final sont congelées et un emballage contenant des fragments de peau (au total au moins 1 % à 2 % de la surface de peau du donneur) servira à la culture microbiologique du produit final (Pirnay et al., 2012). Ces derniers échantillons sont tout d'abord décongelés dans un bain d'eau à 37 °C et rincés dans du chlorure de sodium stérile à 0,9 % (ou toute autre solution saline tamponnée de peau (Pirnay et al., 2012).

3.5.1.3. Détection/notification de micro-organismes

3.5.1.3.1. Classification en fonction de la virulence bactérienne

Les établissements de MCH essaient de garantir l'absence de micro-organismes virulents dans les allogreffes de peau et/ou fixent une limite d'asepsie (« *bioburden* ») à atteindre pour ces allogreffes (CSS 8716, 2013). Il est judicieux de fournir une liste de micro-organismes acceptables (faiblement virulents) et inacceptables (hautement virulents). Une liste type figure au tableau 4 ; si l'un des micro-organismes hautement virulents est isolé sur la peau, cela entraînera le rejet, une décontamination ou une stérilisation/décontamination complémentaires des allogreffes (Tableau 5) (Pellet et al., 1996). Les procédures de décontamination et de stérilisation seront validées par l'établissement de MCH.

3.5.1.3.2. Charge bactérienne

Le tableau 5 constitue un exemple des étapes à entreprendre en fonction des micro-organismes identifiés sur les allogreffes de peau. Des critères qui tiennent compte de la charge bactérienne sont pertinents pour les allogreffes de peau. Des homogénats de peau sont exigés pour des cultures quantitatives. A titre alternatif, on peut soit :

- i) utiliser le temps d'incubation nécessaire pour que la culture microbiologique devienne positive comme marqueur indirect de la charge microbienne, soit
- ii) mettre en culture semi-quantitative en inoculant les écouvillons à la fois sur une gélose solide et un milieu d'enrichissement.

Tableau 5. Schéma décisionnel pour le traitement des allogreffes de peau selon les micro-organismes rencontrés avant et après entreprendre le traitement (*modifiée par Pirnay et al, 2012*)

Temps d'incubation	Résultat	Interprétation	Action	Virulence des espèces isolées	Actions possibles
Jour 1 à 7	Croissance	Charge « élevée »	Identification de l'espèce/antibiogramme (optionnel, raison épidémiologique, modèle de sensibilité)	Hautement virulent	Refus ou stérilisation/décontamination* avec une méthode validée
				Faiblement virulent	Refus ou Stérilisation/décontamination* par une méthode validée
	Pas de croissance		Poursuite de l'incubation durant 7 jours		
Jour 8 à 14	Croissance	« Charge faible »	Identification de l'espèce//antibiogramme	Hautement virulent	Refus ou Stérilisation/décontamination* par une méthode validée
	Croissance	Charge « faible »	Identification de l'espèce /antibiogramme	Faiblement virulent	Libération exceptionnelle de l'allogreffe de peau
	Pas de croissance				Libération de l'allogreffe de peau

*lors de la détection de bactéries sporulantes, le MCH est par définition rejeté (et donc, il n'y a pas de possibilité de stérilisation ni de décontamination)

Les allogreffes de peau utilisées dans le traitement des patients brûlés sont souvent en pénurie et donc peuvent avoir un caractère vital. En cas de risque vital et en l'absence d'alternatives, le médecin responsable de l'établissement de MCH peut déroger à la règle précédente après une analyse de risque minutieuse du MCH contaminé et de ses effets secondaires potentiels. Cette décision est prise en concertation avec le médecin implantateur et sur la base d'une procédure de libération exceptionnelle du MCH.

Tableau 6. Recommandations minimales pour les allogreffes de peau.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Tissu résiduel représentatif	Tissu résiduel représentatif pris avant l'emballage définitif des allogreffes
Quantité	1 à 2 % de la surface totale de peau	1 à 2 % de la surface totale de peau
Critères d'évaluation/détection	Distinction importante entre micro-organismes faiblement et hautement virulents et la charge microbienne étant donné que les actions ultérieures en dépendent ou prise de mesures complémentaires	Pas de détection de micro-organismes

3.5.2. Membranes placentaires

3.5.2.1. Introduction

Les membranes placentaires se composent de deux tissus lâchement reliés, l'amnios et le chorion. Le chorion est la partie à l'aspect trouble qui est utilisé pour des dommages cutanés très profonds (*full thickness*). L'amnios par contre est la surface translucide utilisée pour des blessures de la peau de faible profondeur (*partial thickness*) ou comme substitut oculaire.

Le mode d'accouchement, par césarienne ou délivrance vaginale, détermine logiquement le degré de contamination des membranes placentaires au moment du prélèvement.

Plusieurs facteurs antimicrobiens ont été mis en évidence dans le liquide amniotique. La signification clinique de ces facteurs antimicrobiens doit être considérée dans le contexte de la colonisation fréquente du liquide amniotique par des bactéries provenant de la partie supérieure du vagin (*E. coli*, streptocoques des groupes B et D, *Candida albicans*, et diphtéroïdes) chez les femmes dont la membrane s'est rompue depuis plus de 6 heures (Harminder et al., 2004).

3.5.2.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

Pour le traitement et la conservation des membranes placentaires, différentes techniques sont appliquées : séchage, lyophilisation, cryoconservation à une température de - 65 °C ou inférieure, glycérolisation et conservation entre 2 °C et 8 °C (CSS 8716, 2013).

Un échantillon microbiologique représentatif est prélevé sur le MCH source pour évaluer le *bioburden*, éventuellement durant le traitement et sur le produit final :

- Pour le produit final des membranes placentaires non irradiées (par donneur) : échantillon représentatif au moment de l'emballage comprenant au total 1 % à 2 % de la superficie totale de la membrane placentaire, prélevés sur toute la surface ;
- Pour le produit final des membranes placentaires irradiées (par donneur) : la quantité de fragment tissulaire résiduel dans les échantillons emballés est équivalente à la quantité présente dans les échantillons emballés à libérer.
 - 2 échantillons emballés contenant du fragment tissulaire résiduel d'un lot de membranes placentaires irradiées si ≤ 50 échantillons emballés/lot ;
 - 5 % des échantillons emballés contenant du fragment tissulaire résiduel d'un lot de membranes placentaires irradiées si > 50 échantillons emballés/lot.

3.5.2.3. Détection/notification des micro-organismes

Le contrôle microbiologique sur le matériel source ne devrait pas détecter des micro-organismes inacceptables pour les allogreffes placentaires (Tableau 4). Si des micro-organismes sont présents, les allogreffes placentaires devraient faire l'objet d'un processus de stérilisation validé.

Dans des circonstances mettant la vie en danger ou lors d'une application oculaire dans des conditions de danger pour l'œil et en l'absence de toute alternative, le médecin responsable de l'établissement de MCH peut déroger à la règle précédente après une analyse de risque minutieuse du MCH contaminé et de ses potentiels effets secondaires. Cette décision est prise en concertation avec le médecin transplantateur et sur la base d'une procédure de libération exceptionnelle du MCH.

Tableau 7. Recommandations minimales pour les membranes placentaires.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Echantillon microbiologique représentatif des membranes placentaires	<p><u>Membranes non irradiées</u> : Échantillon représentatif de l'ensemble des greffons emballés séparément, pris lors de le l'emballage final des greffons.</p> <p><u>Membranes irradiées</u> : échantillons emballés du produit final.</p>
Quantité	1 % à 2 % de toute la surface membranaire placentaire	<p><u>Membranes non irradiées</u> : 1 % à 2 % de toute la surface membranaire placentaire,</p> <p><u>Membranes irradiées</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 échantillons emballés d'un lot de membranes irradiées si ≤ 50 échantillons emballés/lot • 5 % des échantillons emballés par lot de membranes irradiées si > 50 échantillons emballés /lot.
Critères d'évaluation/détection	Pas de détection de micro-organisme hautement virulent Ou prise de mesures complémentaires	Pas de détection de micro-organismes

3.5.3. Allogreffes musculo-squelettiques

3.5.3.1. Introduction

Par allogreffes musculo-squelettiques, on entend principalement les os, tendons et cartilages. Il s'agit plus particulièrement notamment de têtes fémorales, ainsi que d'os longs des membres inférieurs ou supérieurs, du bassin; de segments osseux diaphysaires/métaphysaires ou/et épiphysaires; d'os anatomiques isolés (par ex. talus, scapula); d'hémi-articulations avec cartilage; de tendons ou hémi-tendons avec ou sans insertion osseuse ; de *fascia lata*; ménisques; d'os crâniens et de la face.

Les allogreffes musculo-squelettiques sont prélevées de manière aseptique et sont en principe exemptes de germes. Durant le prélèvement, il est possible qu'une contamination soit provoquée par des germes provenant du tractus gastro-intestinal (par ex : à Gram négatif, anaérobies, entérocoques, *Clostridium* spp) et des germes de la peau ou via l'air ambiant par des staphylocoques ou corynébactéries par exemple.

Les contrôles à réaliser sur les allogreffes musculo-squelettiques dépendent notamment du type de traitement que les greffons subiront avant d'être libérés (traitement chimique, déminéralisation, irradiation gamma, cryoconservation avec ou sans agent cryoprotecteur (- 40°C ou inférieure), culture organotypique ou lyophilisation).

3.5.3.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

La prise de quelques échantillons (fragment résiduel et/ou écouvillon sur toute la surface des os longs) s'effectue obligatoirement durant le prélèvement afin d'évaluer la charge bactérienne des tissus prélevés. Ceci peut être déterminant pour le traitement ultérieur des allogreffes.

Outre ces échantillons réalisés durant le prélèvement et ceux éventuellement réalisés pendant le traitement des tissus musculo-squelettiques, la prise d'échantillons après le traitement final des tissus musculo-squelettiques est exigée.

Pour les allogreffes musculo-squelettiques congelées, il convient au minimum de prélever, au final, pour chaque greffon emballé séparément, un fragment résiduel et un écouvillon pris portant sur la totalité de la surface de chaque greffon emballé individuellement. Le liquide de rinçage peut être utilisé comme alternative à l'écouvillon.

Les allogreffes musculo-squelettiques congelées produites en lot sont contrôlées avec des échantillons représentatifs selon une procédure validée.

Pour les fragments musculo-squelettiques irradiés, 2 échantillons emballés au moins contenant du fragment tissulaire résiduel sont testés par lot traité (lorsque ≤ 50 conteneurs) ou 5 % des échantillons emballés contenant du fragment tissulaire résiduel si le lot comporte plus de 50 échantillons emballés (conteneurs). La quantité (poids) de fragment tissulaire résiduel dans les échantillons emballés est équivalente à la quantité (poids de la greffe finale dans l'emballage) présente dans les échantillons emballés à libérer.

La culture organotypique suit les recommandations comme décrites sous le chapitre relatif aux cellules (3.5.8.).

La lyophilisation n'est pas une technique de stérilisation.

3.5.3.3. Détection/notification des micro-organismes

Les micro-organismes identifiés sur les allogreffes musculo-squelettiques détermineront, au moment du prélèvement/avant le traitement, en fonction de leur virulence (*Enterobacteriaceae*, sporulés ou non), la voie que le greffon musculo-squelettique suivra ensuite: destruction, traitement aux rayons gamma ou une nouvelle étape de décontamination. En tout cas, un nouveau contrôle microbiologique doit être réalisé après chaque nouvelle procédure de décontamination ou de sécurisation.

Les micro-organismes inacceptables qui entraînent la destruction du tissu en cas de détection avant le traitement sont repris dans le tableau 4.

Pour l'implantation autologue du volet crânien, le médecin responsable de l'établissement de MCH peut, en l'absence d'alternatives, déroger à la règle précédente après une analyse de risque minutieuse du MCH contaminé et de ses effets secondaires. Cette décision est prise en concertation avec le médecin transplantateur et sur la base d'une procédure de libération exceptionnelle du MCH.

Tableau 8. Recommandations minimales pour les **allogreffes musculo-squelettiques**.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Echantillons représentatifs des greffes musculo-squelettiques pris pendant le prélèvement (fragment résiduel et/ou écouvillon) sur toute la surface des os longs	<u>Greffons musculo-squelettiques non irradiés :</u> Fragment résiduel et/ou liquide de rinçage et/ou écouvillon frotté sur la totalité de la surface et ce pour chaque greffon emballé individuellement. <u>Greffons musculo-squelettiques irradiés</u> échantillons emballés du produit final.
Quantité	Echantillon par emballage individuel de greffons musculo-squelettiques	<u>Greffons musculo-squelettiques non irradiés</u> 1 échantillon (fragment résiduel et/ou liquide de rinçage et/ou écouvillon) pour chaque greffon emballé individuellement. <u>Greffons musculo-squelettiques irradiés</u> <ul style="list-style-type: none"> • 2 emballages par lot de ≤ 50 conteneurs ; • 5 % des emballages par lot de > 50 conteneurs.
Critères d'évaluation/détection	Pas de détection de micro-organisme hautement virulent ou prise de mesures complémentaires	Pas de détection de micro-organismes

3.5.4. Valves cardiaques/allogreffes vasculaires

3.5.4.1. Introduction

Les valves cardiaques ou les allogreffes vasculaires sont prélevées de manière aseptique et sont en principe stériles. Durant le prélèvement, il est possible qu'une contamination se produise par des micro-organismes gastro-intestinaux, cutanés ou environnementaux. Par ordre décroissant, les micro-organismes suivants sont isolés à partir d'allogreffes cardio-vasculaires: *Staphylococcus* spp. à coagulase négative, *Propionibacterium* spp., Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Candida albicans*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus faecalis* (Fan et al., 2011).

Les allogreffes cardio-vasculaires peuvent être décontaminées durant le transport ou le processus de préparation dans un cocktail d'antibiotiques. Ensuite, les tissus sont rincés et cryoconservés.

3.5.4.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

- Au début du traitement du tissu, une portion du liquide de transport est prélevée du récipient contenant le MCH (au moins 1 % du volume total) ;
- Durant le traitement, un échantillon (minimum 20 mL) du dernier milieu de préparation est prélevé ;
- Après le traitement, le contrôle microbiologique consiste en
 - 1 fragment représentatif du tissu résiduel final par greffe emballée séparément
 - ET, dans le cas des greffes cardiaques, aussi
 - Un échantillon de la solution cryoprotectrice récolté juste avant le scellage définitif du conditionnement interne à l'intérieur de ce conditionnement interne pour chacune des allogreffes conditionnées séparément.

3.5.4.3. Détection/notification des micro-organismes

Au moment du contrôle microbiologique durant le prélèvement ou avant le traitement, des micro-organismes de faible virulence peuvent être détectés.

Les micro-organismes inacceptables qui entraînent en principe la destruction du tissu en cas de détection avant le traitement sont repris dans le tableau 4.

Les allogreffes cardio-vasculaires sont souvent en pénurie et peuvent avoir un caractère vital et souvent ne pas présenter d'alternatives thérapeutiques acceptables pour le receveur. Le médecin gestionnaire de ce MCH peut dès lors être légitimé à déroger à cette règle. En présence d'un *bioburden* à germes repris au tableau 4 concernant le matériel source et après une analyse de risque minutieuse, il peut prendre des mesures complémentaires documentées et validées au processus et/ou au contrôle pour assurer la sécurité microbiologique des allogreffes délivrées. Il doit dans ce cas de toute manière en informer le médecin implantateur.

Tableau 9. Recommandations minimales pour les greffons cardiovasculaires.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Echantillon microbiologique représentatif	Echantillon microbiologique représentatif
Quantité	1 % du volume du total du liquide de transport 20 mL de la dernière solution de préparation	<ul style="list-style-type: none"> • 1 fragment par greffon emballé individuellement ET, pour les greffes cardiaques, • Un échantillon de la solution cryoprotectrice récoltée juste avant le scellage définitif du conditionnement interne
Critères d'évaluation/détection	Pas de détection de germes hautement virulents ou prise de mesures complémentaires	Pas de détection de micro-organismes

3.5.5. Tympan et osselets

3.5.5.1. Introduction

Après le prélèvement, le tissu tympano-ossiculaire est transporté dans une solution tamponnée de formaldéhyde 2,7 % - 4 % de pH 5 – 6 et conservé ensuite dans l'établissement de MCH à une température comprise entre 2°C et 8°C. Le traitement s'effectue soit durant le prélèvement soit après une conservation de courte durée dans une solution tamponnée de formaldéhyde. Après emballage définitif, les allogreffes sont conservées durant 14 jours au moins dans une solution de formaldéhyde (les 2 – 5 premiers jours à température ambiante ensuite entre 2°C et 8°C). Pour garantir le pH de la solution tamponnée de formaldéhyde, il est recommandé d'utiliser de petits conditionnements.

Le formaldéhyde est, à la concentration mentionnée, bactéricide, fongicide, virucide et un sporocide lent. La présence de matières organiques peut avoir une action inhibitrice sur le formaldéhyde. Les temps de contact appliqués doivent être très longs.

3.5.5.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

Les greffes tympano-ossiculaires sont conservées durant 14 jours au moins dans du formaldéhyde à 2,7 % - 4 %. On peut dès lors considérer que ces temps de contact plus longs permettent de ne pas réaliser de culture du matériel source et une culture du produit final des greffes tympano-ossiculaires.

Les tests microbiologiques peuvent être réalisés sur un échantillon représentatif du dernier liquide de conservation (au moins 1 % du volume total).

3.5.5.3. Détection/notification de micro-organismes

Les allogreffes tympano-ossiculaires doivent être exemptes de germe (bactéries aérobies et anaérobies, levures et moisissures filamenteuses) au moment de leur libération.

En cas de résultats de culture positifs, l'allogreffe sera soit détruite, soit subira une procédure validée d'inactivation avant libération.

Tableau 10. Recommandations minimales pour les **greffons tympano-ossiculaires**.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Pas de contrôle microbiologique si la procédure incluant une immersion durant 14 jours dans du formaldéhyde est respectée. <u>En option</u> : échantillon du dernier liquide de conservation	
Quantité		Au moins 1 % du volume total (optionnel).
Critères d'évaluation/détection		Pas de détection de micro-organismes

3.5.6. Cornée/sclérotique

3.5.6.1. Introduction

Le MCH source oculaire est en principe contaminé. *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp. et les diphtéroïdes sont des contaminants courants sur les bords de la cornée (Farrell et al., 1991). Néanmoins, plusieurs rapports de cas décrivent aussi des infections oculaires à *Candida* spp et par des micro-organismes non fermentants (CSS 8763, 2014).

Des mesures complémentaires en matière de sécurité microbiologique (p. ex. décontamination de la peau péri-oculaire du donneur de cornée au moment du prélèvement) sont recommandées. Au moment du prélèvement, le bulbe complet peut être désinfecté au moyen de solutions d'antiseptiques et/ou d'antibiotiques. Les milieux de conservation et de décongestionnement peuvent contenir des antibiotiques.

Les cornées peuvent être conservées dans un milieu de conservation entre 30°C et 37°C (conservation à chaud) durant maximum 5 semaines (incluant la période dans le milieu avec les macromolécules) ou dans un liquide de conservation à une température comprise entre 2°C et 8°C durant maximum 7 jours (conservation à froid). En cas de conservation à chaud, la cornée est transférée peu avant la transplantation proprement dite dans un milieu contenant des macromolécules (CSS 8716, 2013).

La sclérotique peut être décontaminée dans une solution contenant des antibiotiques avant d'être transférée dans le milieu de conservation final (éthanol à minimum 70 %). L'éthanol à 70 % est actif contre les bactéries, mycobactéries, moisissures filamenteuses, levures et virus mais n'est pas sporicide.

3.5.6.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

3.5.6.2.1. Matériel source

Des échantillons de peau sont pris sur le matériel source pour déterminer le *bioburden*. Cela présuppose le contrôle microbiologique de matériel résiduel ou de liquide de rinçage (1 % du volume global, au minimum 100 µL).

3.5.6.2.2. Cornée – produit final

Un échantillon au moins doit être prélevé pour examen microbiologique sur le milieu de conservation (conservation à froid et à chaud) et sur le milieu de transport (conservation à chaud), au plus tôt 24h après que la cornée y ait été transférée. Cet échantillon se compose à 1 % du milieu de conservation ou de transport de la cornée (minimum 100 µL).

Durant la conservation, et jusqu'au moment précédant l'implantation, la couleur et la limpidité du milieu doivent en outre être contrôlées.

3.5.6.2.3. Sclérotiques – produit final

Un contrôle du dernier liquide de rinçage représentatif (1 % du volume total) ou d'un fragment de tissu est souhaitable lors de la conservation dans l'éthanol 70 %. A titre alternatif, un contrôle microbiologique est réalisé sur 1 % du volume total de la solution éthanolique à 70 % (au moins 100 µL, 1/10 de l'éthanol dilué). L'éthanol a une action désinfectante très puissante. La mise en culture d'une dilution d'éthanol à 70 % peut conduire à une bactériostase ce qui nécessite une procédure de neutralisation validée.

Le résultat de la culture du milieu de la cornée peut être utilisé comme alternative étant donné qu'il n'est pas évident de prélever un fragment de sclérotique. Les micro-organismes éventuellement présents peuvent parfaitement se multiplier dans le milieu de la cornée.

3.5.6.3. Détection/notification de micro-organismes

Avant que la cornée ne soit délivrée, il faut vérifier si les contrôles microbiologiques les plus récents sont toujours négatifs. Ce résultat (provisoire) est communiqué avant l'implantation au médecin transplantateur. Les milieux de culture restent toutefois plus longtemps en incubation (au total au minimum 7 jours et 21 jours (pour les moisissures) à 25°C-37°C (en fonction du système de culture: automatisé ou visuel). Si une positivité microbiologique devait apparaître, le médecin transplantateur doit en être immédiatement informé conformément aux procédures d'application dans l'établissement.

Les résultats de cultures microbiologiques de cornées sont de préférence pris en considération dans l'évaluation de l'acceptation des greffes de sclérotiques. Si des germes pathogènes sont retrouvés sur les cornées, il est indiqué de détruire non seulement la cornée mais également la sclérotique de ce donneur.

Tableau 11. Recommandations minimales pour les cornées et sclérotiques.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Fragment résiduel ou liquide	<u>Cornée</u> <ul style="list-style-type: none"> milieu de conservation (méthode de conservation à froid et à chaud) et milieu de transport en cas de méthode de conservation à chaud <u>Sclérotique</u> <ul style="list-style-type: none"> éthanol à 70 % ou ; dernier milieu de rinçage ou ; milieu de conservation de la cornée (méthode de conservation à froid) ou milieu de transport de la cornée (méthode de conservation à chaud) ou; fragment résiduel de sclérotique.
Quantité	Matériel résiduel ou 1 % du liquide de rinçage (minimum 100 µL)	<u>Cornée</u> Au moins 1 % du volume du milieu de transport et/ou de conservation de la cornée (pas moins de 100 µL) <u>Sclérotique</u> <ul style="list-style-type: none"> éthanol à 70 %: au moins 1 % du volume (avec dilution finale de l'éthanol 1/10) (min 100 µL d'échantillon) ; au moins 1 % du volume du dernier rinçage de la sclérotique (min 100 µL d'échantillon).
Critères d'évaluation/détection	Les tissus oculaires sont généralement contaminés. Éventuellement prise de mesures complémentaires	Pas de détection de micro-organismes

3.5.7. Cellules reproductrices

3.5.7.1. Introduction

Les spermatozoïdes et ovocytes sont sélectionnés respectivement dans le liquide séminal (1) ou dans le liquide folliculaire après une ponction folliculaire (2). Dans certains cas, il s'agit de prélèvements de (parties de) gonades (3).

3.5.7.1.1. Liquide séminal

Le liquide séminal contenant les spermatozoïdes, obtenu par masturbation, est par définition non stérile et contient principalement des bactéries appartenant à la peau ou/et la flore fécale (staphylocoques à coagulase négative, entérocoques). Cette flore commensale peut avoir, selon sa concentration, un impact sur la procréation médicalement assistée (PMA). Une procédure stricte de prélèvement du sperme doit être appliquée par le patient afin de garantir les conditions optimales d'hygiène et réduire le risque de contamination au minimum.

Ces germes ne sont généralement plus retrouvés après sélection et lavage des spermatozoïdes (Cottel et al., 1997). Il est recommandé, si la qualité du sperme le permet, d'utiliser la sélection des spermatozoïdes par centrifugation sur gradient discontinu de densité pour éliminer ces germes (Nicholson et al., 2000).

Le sperme peut également contenir des micro-organismes pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mycoplasmes (principalement *Ureaplasma urealyticum*) et *Chlamydia trachomatis*. La présence de germes pathogènes dans le sperme observée lors de l'examen diagnostique est éventuellement suivie d'un traitement antimicrobien du donneur afin que les spermatozoïdes soient utilisés dans une phase thérapeutique ultérieure *in vitro*.

Un sondage effectué auprès d'un certain nombre de centres de PMA en Belgique par l'ABEF (Association Belge des Embryologistes Francophones) a montré que le pourcentage moyen de contamination bactérienne des cultures d'embryons lors d'un traitement de fécondation *in vitro* (FIV) était inférieur à 5/1.000. L'étude de Kastrop et al (2007) sur les risques de contamination microbienne des cultures embryonnaires en PMA montre également un pourcentage de contaminations d'environ 0,5 % par cycle de FIV, principalement causées par *E. coli* (58,9 %) et *Candida* spp. (25,3 %). Ces contaminations sont observées uniquement dans des cultures où les spermatozoïdes sont mis en présence des ovocytes pour la FIV. Aucune contamination n'a été détectée lorsque la technique de micro-injection du spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI) est utilisée.

3.5.7.1.2. Les liquides folliculaires

Les ovocytes sont obtenus par ponction transvaginale stérile des follicules sous échographie. Bien que le tractus génital ne soit pas stérile (Pelzer & Allan, 2012), la présence de germes provenant du vagin (lactobacilles, *Candida* spp, etc) dans les milieux de culture est extrêmement rare et très peu relatée dans la littérature (Kastrop et al., 2007).

Les procédés habituels de stérilisation (alcool, etc) ne peuvent être appliqués aux cellules reproductrices mais les milieux de traitement contiennent en général des antibiotiques.

Les embryons ou le sperme sont déposés dans l'utérus, ce qui présente un risque de contamination moins élevé que l'implantation ou l'application d'autres types de MCH. De plus,

dans le cadre du don entre partenaires, le risque de contamination est moindre que celui encouru lors d'un rapport sexuel.

3.5.7.1.3. *Le tissu gonadique*

Le tissu gonadique ou les fragments gonadiques sont prélevés chirurgicalement (aseptiquement). Il faut distinguer d'une part les fragments ovariens ou testiculaires qui seront congelés tels quels en vue d'une préservation de la fertilité avant un traitement gonadotoxique et d'autre part les fragments testiculaires (ou prélèvements épидидymaires) desquels seront extraits les spermatozoïdes et dont le produit final est une suspension de spermatozoïdes qui peut être assimilée à du sperme qui doit être contrôlé comme tel.

3.5.7.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

L'analyse microbiologique des tissus ou cellules reproducteurs avant application n'est pas possible pour le matériel frais car celui-ci est appliqué directement après préparation. Les résultats ne sont connus qu'après l'utilisation du MCH chez le receveur et sont donc rétrospectifs. Ils peuvent toutefois être utilisés pour vérifier le mode de travail aseptique/décontaminant des manipulations parallèlement aux contrôles microbiologiques périodiques réalisés dans une salle blanche (CSS 8699, 2012).

En cas de cryoconservation du matériel avant implantation, une analyse microbiologique peut être réalisée avant que le MCH ne soit implanté.

Les cellules et tissus reproducteurs constituent du matériel génétique précieux dont une partie peut rarement être conservée en vue d'une analyse. Seul le sperme présente généralement (mais pas toujours) un volume suffisant pour en consacrer une petite partie à l'analyse microbiologique. Une alternative peut être l'analyse des milieux de transport/traitement du MCH. Cependant, il n'existe pas suffisamment de données dans la littérature au sujet de la réalisation de contrôles microbiologiques sur les derniers milieux avec lesquels ces cellules ou tissus reproducteurs ont été en contact durant la préparation (milieu de rinçage des ovocytes après collecte, milieux de culture des embryons, etc).

En ce qui concerne les fragments gonadiques qui constituent en général des autogreffes, un contrôle microbiologique doit être réalisé sur chaque don avant cryoconservation (tissus résiduels ou milieu de rinçage/traitement final ovarien/testiculaire : 1 % du volume total, ajusté à 100 µL). S'agissant ici de matériel autologue crucial, il sera toujours conservé, quel que soit le résultat du contrôle microbiologique. Le suivi des résultats microbiologiques est toutefois important en guise de surveillance et pour éviter une éventuelle contamination croisée.

En ce qui concerne le sperme à usage allogénique, le contrôle microbiologique (y compris la détection de *Chlamydia trachomatis* par PCR dans l'urine) doit se faire pour chaque donneur, sur le sperme brut pendant les tests de sélection (avant les dons), et/ou d'une façon périodique durant les dons ou en cas d'indication (1 % du volume total, ajusté à 100 µL) (AR, 2009).

Pour les dons de sperme entre partenaires, il n'y a pas d'arguments dans la littérature qui plaident en faveur d'un contrôle microbiologique à l'exception de celui réalisé au début de l'exploration de l'infertilité (CSS 8292, 2009).

3.5.7.3. Détection/notification de micro-organismes

Le sperme brut de donneurs allogéniques n'est, par définition, pas stérile mais ne sera rejeté que le sperme contenant des **micro-organismes hautement virulents** (Tableau 4).

Outre ces analyses microbiologiques réalisées sur le matériel reproducteur lui-même ou sur les milieux de préparation, un contrôle visuel du MCH au cours de sa transformation (culture) peut être exercé puisque le matériel reproducteur est fréquemment observé de façon macroscopique (trouble) et microscopique.

Une croissance microbienne rapide est favorisée par les conditions de culture (pH, température, etc) et provoque une altération complète du MCH qui ne sera donc pas utilisé. Il peut arriver que seulement une partie du MCH présente une contamination avérée. Il appartiendra alors au gestionnaire de l'établissement de MCH d'évaluer le risque et de prendre la décision d'appliquer le matériel ne présentant pas de contamination avérée ou de le rejeter.

Tableau 12. Recommandations minimales pour les cellules/tissus reproducteurs.

	Sur le matériel
Matériel à tester	<p><u>Prélèvement gonadique</u> au moment du prélèvement ou après le préparation :</p> <ul style="list-style-type: none">• ovaires: milieu de rinçage/traitement ou tissu gonadique résiduel ;• testicules: milieu de rinçage/traitement. <p><u>Sperme pour don allogénique</u>: échantillon de sperme de chaque donneur durant les tests de sélection (avant les dons) et/ou de manière périodique durant les dons ou si indiqué. Ne s'applique pas pour le don entre partenaires.</p>
Quantité	<p><u>Prélèvement gonadique</u>: lors de chaque don, au moins 1 % du volume total de milieu de rinçage/traitement (ajusté à 100 µL) ou le tissu résiduel.</p> <p><u>Sperme</u>: au moins 1 % de la quantité totale de sperme non traité, ajusté à 100 µL.</p>
Critères d'évaluation/détection	<p><u>En cas de don entre partenaires ou d'autogreffes</u>, le contrôle microbiologique est surtout important afin d'éviter toute contamination croisée et en guise de surveillance.</p> <p><u>En cas de don allogénique de sperme</u>, le matériel contaminé par des micro-organismes hautement virulents est rejeté.</p>

3.5.8. Cellules sauf les cellules de sang de cordon, donneurs lymphocytes, cellules souches hématopoïétiques et ATMPs

3.5.8.1. Introduction

La transplantation de cellules d'origine humaine est un secteur en constante évolution mais complexe, présentant des possibilités très étendues de traitement de maladies. Afin d'isoler des cellules humaines, on part d'un produit d'aphérèse, de fragments d'organe ou de tissus.

3.5.8.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

Matériel source: des analyses microbiologiques peuvent être effectuées sur:

- le milieu de transport de l'organe du donneur ;
- une petite quantité de matériel cellulaire après prélèvement.

Isolats de cellules

Certains types de cellules humaines comme les cellules bêta et les hépatocytes peuvent être transplantés immédiatement (< 24 heures) après l'isolement des cellules primaires chez l'homme (Matsumoto et al., 2005; Puppi et al., 2008). Cela ne permet pas un contrôle microbiologique prospectif basé sur la croissance de micro-organismes, étant donné que l'on ne disposera pas des résultats d'une culture au moment où l'on souhaitera implanter le greffon. Dans ces conditions, il est nécessaire de réaliser, durant le processus de production et à des moments réguliers, un contrôle visuel macroscopique et microscopique.

A la fin du processus de production, juste avant le produit final des cellules, un échantillon du milieu de conservation doit être prélevé en vue d'un dépistage rétrospectif de bactéries aérobies et anaérobies, de moisissures filamenteuses et levures.

Conservation de cellules primaires

Les cellules humaines peuvent être conservées durant quelques jours dans un milieu de conservation avant leur transplantation à l'homme (Keymeulen et al., 2006), ou leur cryoconservation. Un échantillon du milieu de conservation doit au moins être collecté juste avant le produit final des cellules en vue du dépistage de bactéries aérobies et anaérobies, de moisissures filamenteuses et levures.

Pour les cellules transplantées immédiatement après conservation, ce contrôle microbiologique arrive trop tard. Dans ces conditions, il est recommandé de récolter un échantillon microbiologique plus tôt déjà. Le moment de cette prise d'échantillon et la sensibilité de la technique d'analyse sont d'importance cruciale pour obtenir des résultats microbiologiques valables. Cette procédure constitue donc une libération exceptionnelle.

Une prise d'échantillon immédiatement après l'isolement des cellules primaires peut être à l'origine de résultats faux négatifs parce que la contamination potentielle est fortement diluée par les différentes étapes de lavage réalisées après la digestion enzymatique du matériel du donneur (Bucher et al., 2005; De Corte et al., 2012; Lehec et al., 2009; Tew et al., 2008). En outre, les conditions de conservation des cellules constituent généralement un environnement idéal pour une croissance de micro-organismes (pH, milieu de culture, température). De ce fait, le moment de la prise d'échantillons peut être différé de 1 à 3 jours sans perte d'efficacité de détection. En raison de ce report, le risque de résultats faux négatifs diminue fortement (Dreier et al., 2008).

Cultures de cellules

Pour les cultures de cellules préparées en différents passages, (p. ex. les cellules souches mésenchymateuses, les kératinocytes), il est recommandé de considérer la congélation comme un produit final pour le contrôle microbiologique. Un contrôle microbiologique pour les bactéries aérobies et anaérobies, moisissures filamenteuses et levures sur le produit final est obligatoire.

Selon *Master Cell Banken*, des contrôles quant à la présence de mycoplasmes doivent également être réalisés (CSS 8318, 2007).

3.5.8.3. Méthodes de cultures microbiologiques

Pour les cellules adhérentes à la boîte de culture, le milieu de culture (supernageant) peut être *poolé* avant prélèvement d'un échantillon pour réaliser le contrôle microbiologique. Si la culture est réalisée en plusieurs flasques, il est nécessaire de *pooler* le surnageant des différents milieux de conservation et de prélever un échantillon représentatif de l'ensemble.

Pour les cellules en suspension, le milieu de conservation peut être collecté après une courte sédimentation, bien que cela accroisse également le risque de résultats de culture faux négatifs en raison de la sédimentation des bactéries. Si la culture est réalisée en plusieurs flasques, il est nécessaire de *pooler* le surnageant des différents milieux de culture et de prélever un échantillon représentatif de l'ensemble.

D'une manière générale, un contrôle au moins doit être effectué (sur le surnageant ou le produit final), la préférence étant accordée au test sur l'échantillon du produit final.

Il fautensemencer un échantillon de 1 % (au moins 100 µL) pour le contrôle microbiologique (Pharmacopée européenne 7.0, 2011 et éditions ultérieures; Kielpinski et al., 2005; Plantamura et al., 2012). Si l'échantillon ne peut pas êtreensemencé immédiatement, il doit être conservé à 2°C-8°C pour éviter la phagocytose.

3.5.8.4. Détection/notification de micro-organismes

Aucun micro-organisme ne peut être détecté dans les cultures cellulaires.

En principe, une libération peut avoir lieu dans des circonstances bien déterminées/décrites sur la base de résultats provisoires partiels (à savoir le dernier contrôle). Avant que les cellules ne soient délivrées, il faut vérifier si les contrôles microbiologiques les plus récents sont toujours négatifs. Ce résultat (provisoire) est communiqué avant l'implantation au médecin transplanteur. Les milieux de culture restent toutefois plus longtemps en incubation (au total au minimum 7 jours et 21 jours (pour les moisissures) à 25°C-37°C (en fonction du système de culture: automatisé ou visuel). Si une positivité microbiologique devait apparaître, le médecin transplanteur doit en être immédiatement informé conformément aux procédures d'application dans l'établissement.

Tableau 13. Recommandations minimales pour les **cellules**.

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Milieu de transport ou matériel cellulaire	<p><u>Cellules adhérentes</u>: surnageant du milieu de conservation cellulaire. Si plusieurs flasques à mettre en culture: surnageant <i>poolé</i>.</p> <p><u>Cellules en suspension</u>: milieu de conservation cellulaire après courte sédimentation. Si plusieurs flasques à mettre en culture: surnageant <i>poolé</i>.</p>
Quantité	Minimum 1 % du volume total (au moins 100 µL).	Minimum 1 % du volume total (au moins 100 µL) du milieu de conservation.
Critères d'évaluation/détection		Pas de détection de micro-organismes

3.5.9. Cellules souches hématopoïétiques , lymphocytes de donneur et sang de cordon

3.5.9.1. Introduction

Les produits cellulaires contenant des cellules souches hématopoïétiques, des lymphocytes de donneur et du sang de cordon peuvent, après prélèvement, être contaminés sur le plan microbiologique dans une faible mesure. Il n'existe toutefois que très peu de notifications de réactions immédiates ou graves différées en relation avec la contamination bactérienne du sang de cordon administré ou des cellules souches (Honohan et al., 2002, Klein et al, 2006).

Les **cellules souches hématopoïétiques** peuvent, après mobilisation au moyen d'un facteur de croissance hématopoïétique, être collectées à partir du sang périphérique par aphérèse. Pour ce faire, le donneur ou patient (en cas de transplantation autologue) subit une piqûre au niveau d'une veine du bras. La peau est préalablement désinfectée. Le prélèvement de lymphocytes de donneur s'effectue de manière analogue (sans mobilisation). Dans les deux cas, les cellules sont finalement disponibles sous forme de concentré cellulaire. En cas de prélèvement de moelle osseuse, le donneur ou le patient subit une ponction de l'os iliaque après désinfection de la peau.

Les cellules souches provenant de la moelle osseuse et du sang périphérique, tout comme les lymphocytes de donneur, peuvent être traités dans un système fermé et congelés comme mentionné précédemment pour le sang de cordon. Une réduction de volume avant congélation est parfois indiquée mais n'est pas toujours réalisée.

Lors de la collecte de **sang de cordon** à partir de la veine ombilicale, la désinfection (par exemple au moyen d'éthanol 70 %, par de la povidone iodée, du gluconate de chlorhexidine 0,5%) constitue la première étape. Lors du traitement (dans un système fermé), plusieurs étapes de centrifugation et de séparation (manipulations minimales) amènent à la production du produit cellulaire final qui est conservé dans une solution de cryoconservation. Ce produit cellulaire final est congelé au moyen d'un protocole contrôlé et stocké à une température inférieure -130°C.

3.5.9.2. Echantillonnage pour examen microbiologique

Une culture microbiologique doit être réalisée sur chaque produit cellulaire prélevé.

En ce qui concerne le sang de cordon, nous nous référons à la plus récente version des normes de *NetCord FACT- D10.2.6.: Microbiological cultures using a system validated for the growth of aerobic and anaerobic bacteria and fungi.*

Afin de perdre le moins possible de matériel de cellules souches, on utilise la fraction érythrocytaire résiduelle et/ou la fraction plasmatique surnageante après traitement et avant congélation du produit final. L'étude de Honohan et al. a montré que ces fractions résiduelles donnent des résultats comparables à une culture du concentré de cellules souches après décongélation. La taille des fractions à tester va de 1mL (minimum) à 5 mL (Honohan et al., 2002; Sparrow, 2004).

A titre alternatif, un contrôle microbiologique peut être effectué sur au moins 1 % du volume total de la suspension cellulaire (sans cryoprotecteur ou fractionnement) ou au moins 1 % du volume total de produit final auquel un cryoprotecteur a été ajouté (pas moins de 100 µL). Le cryoprotecteur n'a pas d'effet bactériostatique sur la culture microbiologique (Larrea et al., 2004)

3.5.9.3. Méthodes de cultures microbiologiques

Tant pour les cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes de donneur que pour le sang de cordon, il est possible d'inoculer un échantillon dans des flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie qui sont incubés durant 7 jours dans un système à monitoring continu à 35°C-37°C.

3.5.9.4. Détection/notification de micro-organismes

Aucun micro-organisme ne peut être détecté dans les cellules souches hématopoïétiques et de sang de cordon.

3.5.9.4.1. Cellules souches hématopoïétiques

Les standards JACIE et FACT Netcord (*International standards for cellular therapy product collection, processing, and administration – version 5.2, chap. D4.9*) mentionnent que le manuel de qualité doit prévoir des procédures et protocoles relatifs à l'utilisation de produits cellulaires souches dont la culture microbiologique est positive pour la transfusion lors de transplantation chez des patients allogéniques ou autologues. S'il s'agit de la contamination microbiologique d'un produit cellulaire congelé, le gestionnaire du MCH doit se concerter avec le médecin traitant et éventuellement avec le microbiologiste afin de décider si la libération et l'administration du produit cellulaire est indiquée/justifiée. Dans ce cas, une détermination de la sensibilité doit être réalisée.

Si une contamination microbiologique est constatée après injection du MCH, le médecin traitant en est informé afin de mettre en place les dispositions adéquates en fonction du micro-organisme identifié.

3.5.9.4.2. Sang de cordon

Les NetCord-FACT *International Cord Blood Standards* recommandent de détruire les unités présentant une culture microbiologique positive dans le cas d'une application allogénique non apparentée. Dans le cadre du stockage intrafamilial, en cas de culture microbiologique positive, il faut réaliser d'une part un test de sensibilité sur le(s) micro-organisme(s) isolé(s) et d'autre part une évaluation des risques et bénéfiques au moment de la greffe. Le médecin implantateur est informé de la positivité de ces tests.

Tableau 14. Recommandations minimales pour les **cellules souches hématopoïétiques/sang de cordon.**

	Sur le matériel source	Sur le produit final
Matériel à tester	Suspension cellulaire (sans fractionnement ni cryoconservation).	Quantité résiduelle (Erythrocytes ou fraction plasmatique). OU <u>Produit à congeler</u> après ajout d'un cryoprotecteur au produit final avant cryoconservation.
Quantité	<u>Erythrocytes ou fraction plasmatique</u> : 1-5 mL. <u>Suspension cellulaire</u> : au moins 1 % du volume total (pas moins de 100 µl)	<u>Produit final avec cryoprotecteur</u> : au moins 1 % du volume total (pas moins de 100 µL).
Critères d'évaluation/détection		Pas de détection de micro-organismes.

4. REFERENCES

- American Association of Tissue Banks, Standards for Tissue Banking, 10th ed - McLean, VA: American Association of Tissue Banks, April 2002.
- Barbour SA, King W. The safe and effective use of allograft tissue--an update. *Am J Sports Med* 2003;31(5):791-7.
- Beres et al. Introduction of iFA Plus and iFN Plus Neutralizing media for BacT Alert 3D Systems. Poster BioMérieux; 2013.
- Bucher P, Oberholzer J, Bosco D, Mathe Z, Toso C, Buhler LH, et al. Microbial surveillance during human pancreatic islet isolation. *Transpl Int* 2005;18(5):584-9.
- Carroll PB, Ricordi C, Fontes P, Rilo HR, Phipps J, Tzakis AG, et al. Microbiologic surveillance as part of human islet transplantation: results of the first 26 patients. *Transplant Proc* 1992;24(6):2798-9.
- Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* 2000;68(12):6511-8.
- Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2003;1(1):17-24.
- Cottell E, Lennon B, McMorrow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF. Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;67(1):98-103.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Standards de qualité particuliers pour les cellules humaines pour lesquelles aucun autre standard de qualité particulier n'existe et qui sont destinées à une application chez l'homme. Bruxelles: CSS, 2007. Avis n° 8318.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Inactivation et sécurisation des tissus et cellules vis-à-vis des bactéries, virus et prions – Partie I: Prions. Bruxelles: CSS; 2008. Avis n° 8143.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Standards de qualité pour les tissus et cellules reproducteurs. Bruxelles: CSS; 2009. Avis n° 8292.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Inactivation et sécurisation des tissus et cellules vis-à-vis des bactéries, virus et prions – Partie III: Virologie. Bruxelles: CSS; 2012. Avis n° 8785.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Recommandations en matière de validation et de contrôle de l'environnement au sein des banques et structures intermédiaires de matériel corporel humain. Bruxelles: CSS; 2012. Avis n° 8699.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Inactivation et sécurisation des tissus et cellules vis-à-vis des bactéries, virus et prions – Partie II : Bactéries. Bruxelles : CSS; 2014. Avis n° 8763.
- CSS – Conseil Supérieur de la Santé. Standards de qualité pour les différents types de matériels corporels humains destinés à une application humaine ; les tissus. Bruxelles : CSS ; 2013. Avis n°8716.
- De Corte P, Verween G, Verbeken G, Rose T, Jennes S, De Coninck A, et al. Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: improved performance, usability, quality and safety. *Cell Tissue Bank* 2012;13(1):175-89.
- Deijkers RL, Bloem RM, Petit PL, Brand R, Vehmeyer SB, Veen MR. Contamination of bone allografts: analysis of incidence and predisposing factors. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79(1):161-6.

- Dreier J, Stormer M, Pichl L, Schottstedt V, Grolle A, Bux J, et al. Sterility screening of platelet concentrates: questioning the optimal test strategy. *Vox Sang* 2008;95(3):181-8.
- European Pharmacopoeia, 7.0, 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests, 2010.
- European Pharmacopoeia 7.0. 2.6.27 Microbiological control of cellular products 2011. p 191-2. Internet:
http://www.pharmabooks.com.br/livros/images/livros/Index_7th_Edition_70.pdf
- European Pharmacopoeia 7.1. 2.6.1 Sterility. 2011. P. 2071-82. Internet:
https://www.edqm.eu/store/images/majbdd/201111211218560.Index_7.5_E.pdf
- European Pharmacopoeia, 7.0, Microbiological control of cellular products, 2011.
- EU – European Union. Commission Directive 2006/17/EG. Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. Official Journal of the European Union 2006.
- Fan Y-D, Van Hoeckk B, Holovska V, Jashari R. Evaluation of decontamination process of Heart valve and artery tissues in European Homograft Bank (EHB): a retrospective study of 1.055 cases. *Cell Tissue Bank* 2012;13:297-304.
- Farrell PL, Fan JT, Smith RE. Trousdale MD. Donor cornea bacterial contamination. *Cornea* 1991;10(5):38.
- Forsell JH, Liesman J. Analysis of potential causes of positive microbiological cultures in tissue donors. *Cell Tissue Bank* 2000;1(2):111-5.
- Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M. *Medical Microbiology*. 17th ed. New-York: Churchill Livingstone; 2007.
- Harminder SD, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS Maharajan. The amniotic membrane in ophthalmology, *Survey of Ophtalmology* 2004;49:51.
- Heck E, Blood S, Baxter C. The importance of the bacterial flora in cadaver homograft donor skin: bacterial flora in cadaver homograft. *J Burn Care Rehabil* 1981;2(4):212-4.
- Honohan A, Olthuis H, Bernards AT, van Beckhoven JM, Brand A. Microbial contamination of cord blood stem cells. *Vox Sang* 2002;82(1):32-8.
- Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for candida growth detection. *J Clin Microbiol* 2004;42(1):115-8
- Ibrahim T, Stafford H, Esler CN, Power RA. Cadaveric allograft microbiology. *Int Orthop* 2004;28(5):315-8.
- Ireland L, Spelman D. Bacterial contamination of tissue allografts - experiences of the donor tissue bank of Victoria. *Cell Tissue Bank* 2005;6(3):181-9.
- JACIE - 5th edition of international standards for cellular therapy product collection, processing, and administration *jacie et fact fact* (<https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=amFjaWUub3JnfGphY2llfGd4OjJmYzQzY2NkYjJiMjlhMml>)
- Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. Differentiating culture samples representing coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination by use of time-to-positivity and quantitative blood culture methods. *J Clin Microbiol*. 2009 47(10):3255-60.
- Kastrop PM, de Graaf-Miltenburg LA, Gutknecht DR, Weima SM. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Hum Reprod* 2007;22(8):2243-8.

- Keymeulen B, Gillard P, Mathieu C, Movahedi B, Maleux G, Delvaux G, et al. Correlation between beta cell mass and glycemic control in type 1 diabetic recipients of islet cell graft. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(46):17444-9.
- Khuu HM, Patel N, Carter CS, Murray PR, Read EJ. Sterility testing of cell therapy products: parallel comparison of automated methods with a CFR-compliant method. *Transfusion* 2006;46(12):2071-82.
- Kielpinski G, Prinzi S, Duguid J, du Moulin G. Roadmap to approval: use of an automated sterility test method as a lot release test for Carticel, autologous cultured chondrocytes. *Cytotherapy* 2005;7(6):531-41.
- Klein MA, Kadidlo D, McCullough J, McKenna DH, Burns LJ Microbial contamination of hematopoietic stem cell products: incidence and clinical sequelae. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006 Nov;12(11):1142-9.
- Lakey JR, Rajotte RV, Warnock GL. Microbial surveillance of human islet isolation, in vitro culture, and cryopreservation. *Clin Invest Med* 1995;18(3):168-76.
- Larrea L, de la Rubia J, Soler MA, Ribas P, Fernández JM, Picón I et al. Quality control of bacterial contamination in autologous peripheral blood stem cells for transplantation. *Haematologica.* 2004;89(10):1232-7.
- Lehec SC, Hughes RD, Mitry RR, Graver MA, Verma A, Wade JJ, et al. Experience of microbiological screening of human hepatocytes for clinical transplantation. *Cell Transplant* 2009;18(8):941-7.
- Martinez OV. Chapter 5. Microbiological screening of cadaver donors and tissues for transplantation. In: Phillips G, editor. *Advances in Tissue Banking.* World Scientific Publishing Co. Ptd. Ltd 2003;7:143-55.
- Matsumoto S, Yamada Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, et al. Simple evaluation of engraftment by secretory unit of islet transplant objects for living donor and cadaveric donor fresh or cultured islet transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(8):3435-7.
- May SR, Wainwright JF, DeClement FA. The role of sampling in the detection of microbial contamination on cadaveric allograft skin used as a biological wound dressing. *Burns Incl Therm Inj* 1985;12(1):36-48.
- McGowan KL Specimen collection, Transport, and Processing: Mycology. In: *Manual of Clinical Microbiology.* Eds: Versalovic J, Carroll KC, Funke G et al. 10 th edition, vol.2, 2011, ASM Press, p. 1756-1766.
- Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad, II, O'Grady N, Harris JS, et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22(4):222-42.
- Murray PR, Witebsky FG. The clinician and the microbiology laboratory. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of Infectious Diseases*, 7th ed; 2010;17:233-67.
- NetCord-FACT International Cord Blood Standards 4th edition: D10.2.6.2 International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release. 2007.
- Neely AN, Plessinger RT, Stamper B, Kagan RJ. Can contamination of a patient's allograft be traced back to the allograft donor? *J Burn Care Res.* 2008;29(1):73-6.
- Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Hum Reprod.* 2000;15(3):662-6.
- Obeng MK, McCauley RL, Barnett JR, Hegggers JP, Sheridan K, Schutzler SS. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. *Burns* 2001;27(3):267-71.

- Pellet S, Kearny J, Dziedzic-Goslawska A, Masselis M, Panakova E, van Baare J. European Association of Tissue Banks. Standards for skin banking; 1996.
- Pelzer ES, Allan JA. The isolation and identification of microorganisms in the reproductive environment: the potential impact on the IVF culture system and on IVF outcomes. *Journal of Clinical Embryology*, 2012;15(3), pp. 44-53.
- Plantamura E, Huyghe G, Panterne B, Delesalle N, Thepot A, Reverdy ME, et al. Validation of the BacT/ALERT((R))3D automated culture system for the detection of microbial contamination of epithelial cell culture medium. *Cell Tissue Bank* 2012;13(3):453-9.
- Pirnay JP, Verween G, Pascual B, Verbeken G, De Corte P, Rose T, et al. Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. *Cell Tissue Bank* 2012;13(2):287-95.
- Puppi J, Tan N, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Mieli-Vergani G, et al. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Transplant* 2008;8(2):452-7.
- Royaume de Belgique. Loi du 19 décembre 2008 relative à l'obtention de matériel corporel humain destiné à des applications médicales humaines ou à des fins de recherche scientifique. MB du 30 décembre 2008, p. 68774.
- 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, n° 2009-3602/18414, p. 69409.
- Saegeman VS, Ectors NL, Lismont D, Verduyck B, Verhaegen J. Short- and long-term bacterial inhibiting effect of high concentrations of glycerol used in the preservation of skin allografts. *Burns* 2008;34(2):205-11.
- Saegeman VS, Flamaing J, Muller J, Peetermans WE, Stuyck J, Verhaegen J. Clinical evaluation of the Copan ESwab for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection and culture of wounds *Eur J Clin Microbiol Infect dis* 2011;30:943-9.
- Scharp DW, Lacy PE, McLear M, Longwith J, Olack B. The bioburden of 590 consecutive human pancreata for islet transplant research. *Transplant Proc* 1992;24(3):974-5.
- Schindler OS, Spencer RF, Smith MD. Should we use a separate knife for the skin? *J Bone Joint Surg Br* 2006;88(3):382-5.
- Selwyn S, Ellis H. Skin bacteria and skin disinfection reconsidered. *Br Med J* 1972;1(5793):136-40.
- Sparrow RL. Microbial screening of UC blood units by an automated culture system: effect of delayed testing on bacterial detection. *Cytotherapy* 2004;6(1):23-9.
- Sutton DA. Specimen collection, transport, and processing: Mycology. In: Murray PR and Baron, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed; 2007. 2:1734.
- Tew SR, Murdoch AD, Rauchenberg RP, Hardingham TE. Cellular methods in cartilage research: primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells. *Methods* 2008;45(1):2-9.
- van Baare J, Ligtvoet EE, Middelkoop E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation* 1998;65(7):966-70.
- Verhaegen J, Lagrou K, Pyckavet M. *Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen, deel 2*. ACCO; 2007.

- Vigano EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44(3):235-40.
- Warwick RM, Magee JG, Leeming JP, Graham JC, Hannan MM, Chadwick M et al. Mycobacteria and allograft heart valve banking: an international survey, *J Hosp Infection* 2008; 68:255-261.
- White MJ, Whalen JD, Gould JA, Brown GL, Polk HC, Jr. Procurement and transplantation of colonized cadaver skin. *Am Surg* 1991;57(6):402-7.
- Winters M. Methods of culturing, problems associated and radiation sterilisation options. In: Phillips G, editor. *Advances in tissue banking* 1 ed. Singapore: World Scientific Publishing Co Pte Ltd; 2003. p. 193-210.
- Zibari GB, Lipka J, Zizzi H, Abreo KD, Jacobbi L, McDonald JC. The use of contaminated donor organs in transplantation. *Clin Transplant* 2000;14(4 Pt 2):397-400.

5. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Tous les experts ont participé **à titre personnel** au groupe de travail. Les noms des experts nommés du CSS par AR ainsi que les membres du Bureau et du Collège sont disponibles sur notre site web (page : [composition et fonctionnement](#)).

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

BAUDOUX Etienne	Médecine, thérapie cellulaire	ULg
BEELE Hilde	Médecine, dermatologie	UZ Gent
CAREMANS Jeroen	Sciences biomédicales	UZA
DE SUTTER Petra	Médecine reproductive	UZ Gent
DE VOS Daniel	Technologie cellulaire	MHKA
DELFORGE Alain	Médecine, thérapie cellulaire	ULB
DELLOYE Christian	Médecine, chirurgie orthopédique	UCL
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
HEINEN Ernst	Histologie humaine	ULg
IEVEN Greet	Microbiologie	UZA
JASHARI Ramadan	Médecine, chirurgie cardio-vasculaire	EHB/clinique St-Jean, Bruxelles
KLYKENS Johan	Ingenieur biochimie, QA/QC	UZLeuven
MARICAU Daniel	Biologie clinique	AFMPS
MUYLLE Ludo	Médecine, biologie clinique	AFMPS, UZA, UA
PIRNAY Jean-Paul	Sciences médicales	MHKA
SAEGEMAN Veroniek	Médecine, biologie clinique, hygiène hospitalière	UZ Leuven
THONON Fabienne	Médecine reproductive, embryologie	CHU de Liège
VAN DEN ABBEEL Etienne	Médecine reproductive, embryologie	UZ Gent
VAN GEYT Caroline	Sciences médico-sociales	UZ Gent
VAN RIET Ivan	Médecine, thérapie cellulaire	UZ Brussel
VANDERKELEN Alain	Médecine, chirurgie générale	HMRA
VANSTEENBRUGGE Anne	Médecine reproductive, embryologie	CHR Namur
VERBEKEN Gilbert	Biologie, QA/QC/RA	MHKA

L'administration était représentée par :

DE VOS Claire Gestionnaire des agréments des AFMPS
banques de MCH

Le groupe de travail a été présidé par Veroniek SAEGEMAN et Hilde BEELE, le secrétariat scientifique a été assuré par Muriel BALTES.

Les déclarations générales d'intérêts des experts ayant approuvé ou validé l'avis sont accessibles sur notre site web (page : [Conflits d'intérêts](#)).

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, acteurs de terrain, etc.), parmi lesquels 300 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 une Commission de Déontologie) et la validation finale des avis par le Collège (organe décisionnel du CSS, constitué de 40 membres issus du pool des experts nommés). 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), avec parfois une période d'embargo de durée variable pour les avis confidentiels ou sur un projet d'Arrêté Royal. 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