



ADVIES VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8698

Microbiologische controle van menselijk lichaamsmateriaal voor toepassing op de mens met maximale vrijwaring van microbiologische veiligheid: Praktische aanbevelingen

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

juni 2014 – update 28/07/2014

1 INLEIDING

In het Koninklijk Besluit (KB) tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, wegnemen, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van menselijk lichaamsmateriaal (MLM) (KB, 2009), is het de verantwoordelijkheid van de instellingen voor MLM dat het door hen afgeleverde MLM microbiologisch veilig moet zijn voor de potentiële ontvangers.

De werkgroep "Cellen, weefsels en organen van menselijke en dierlijke oorsprong", belast met het opstellen van de kwaliteits- en veiligheidsnormen (wet van 19 december 2008) voor MLM, acht het bijgevolg noodzakelijk om een aantal microbiologische aspecten inzake MLM zoals controle, securisatie enz. in detail te omschrijven. Deze microbiologische aspecten zullen enerzijds in het algemeen onderzocht worden, daar een aantal van deze aspecten voor weefsels en cellen gemeenschappelijk zijn, maar ook op een specifieke wijze voor elk van de verschillende types weefsels en cellen.

Deze aanbevelingen berusten onder meer op de adviezen 8143, 8763 en 8785 van de Hoge Gezondheidsraad (HGR) (inactivatie en securisatie van weefsels en cellen ten overstaan van prionen, bacteriën of virussen), alsook op de praktijk en de eisen van de nieuwe nationale regelgeving (HGR 8143, 2008; HGR 8763, 2014; HGR 8785, 2012).

Deze aanbevelingen vullen de specifieke kwaliteitsnormen voor weefsels en cellen (HGR 8716, 2013) aan voor wat betreft de normen inzake microbiologie.

Het advies betreft enkel de aërobe en anaërobe bacteriën (incl. mycoplasma voor wat betreft de cellen) en filamenteuze schimmels en gisten, en niet de virussen en prionen.

Om op deze problematiek van de microbiologische veiligheid van het MLM te kunnen antwoorden werd er een *ad hoc* werkgroep opgericht, bestaande uit deskundigen in de volgende disciplines: cel- en weefselbanking, celtherapie, ziekenhuishygiëne, klinische microbiologie en farmaceutische microbiologie. Dit advies werd vervolgens herhaaldelijk besproken in en

uiteindelijk goedgekeurd door de permanente groep "Cellen, weefsels en organen van menselijke en dierlijke oorsprong".

2 AANBEVELINGEN

Elk MLM met toepassing op de mens moet gecontroleerd worden op microbiologisch vlak wat betreft aërobe en anaërobe bacteriën, filamenteuze schimmels en gisten. De microbiologische veiligheid van dit MLM moet verzekerd worden door de afwezigheid van deze micro-organismen bij de microbiologische controle op het finaal product.

Het doel van deze microbiologische controle is om de kwaliteit en biologische veiligheid van het MLM maximaal te garanderen voor de ontvanger.

Toch kan de beheerder van de instelling voor MLM van deze algemene aanbeveling afwijken na een zorgvuldige risicoanalyse van het gecontamineerde MLM en zijn potentiële nevenwerkingen, met name:

- Voor MLM waar gebrek aan is en/of voor (levens)belangrijke klinische indicaties en/of waarvoor er weinig of geen therapeutische alternatieven bestaan;
- Voor MLM dat in origine gecontamineerd is met commensale flora en/of waarop een commensale flora geaccepteerd kan worden tijdens de applicatie (bv. sperma, huid).

Dit gebeurt in overleg met de behandelende/implanterende arts en op basis van een procedure voor de uitzonderlijke vrijgave van MLM.

Deze aanbevelingen hebben als doel hebben specifieke informatie te geven over de microbiële staalname (het te testen materiaal, de minimum hoeveelheid materiaal), de kweekmethodes en de specifieke kenmerken voor detectie en rapportering van microbiologische controle. Ze dienen beschouwd te worden als minimale testen. Het staat de wefselinstellingen vrij uitgebreidere testen uit te voeren voor de wefseltypes die onder hun erkenning vallen.. Indien minder restrictieve normen zouden toegepast worden, wordt dit gevalideerd door de instelling

Sleutelwoorden

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 musculoskeletale 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	Amnionmembranaallogreffen	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 Herzklappentransplantate
Hematopoietic stem cells	Hematopoietic stem cells	Hematopoëtische stamcellen	Cellules souches hématopoïétiques	Hämatopoïetische stammzellen.
Hepatocytes	Hepatocytes	Hepatocyten	Hépatocytes	Hepatozyten
Chondrocytes	Chondrocytes	Chondrocyten	Chondrocytes	Chondrozyten
Beta cells	Insulin-secreting cells	Bètacellen	Cellules bêta	Betazellen
Cord blood	Cord blood	Navelstrengbloed	Sang de cordon ombilical	Nabelschnurblut
Vascular allografts	Vascular grafting	Vaatallogreffen	Allogreffes vasculaires	Allogene Gefäßtransplantate

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

3 UITWERKING EN ARGUMENTATIE

Lijst van de gebruikte afkortingen

ABEF	<i>Association Belge des Embryologistes Francophones</i>
ATMPS	<i>Advanced therapy medicinal products</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i> (kolonievormende eenheid)
HGR	Hoge Gezondheidsraad
ICSI	Intra cytoplasmatische sperma injectie
IVF	In vitro fertilisatie
KB	Koninklijk besluit
MBV	Medisch Begeleide Voortplanting
MLM	Menselijk lichaamsmateriaal
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
QMS	<i>Quality Management system</i>

3.1 INLEIDING EN METHODOLOGIE

3.1.1. Inleiding

Een belangrijke bron van microbiologische besmetting van menselijke weefsels en cellen is het MLM op zich waaruit de weefsels en cellen worden bereid (bronmateriaal). Het percentage besmette organen tijdens uitname schommelt tussen 2,2 % – 84 % (Carroll et al., 1992; Lakey et al., 1995; Lehec et al., 2009; Scharp et al., 1992; Zibari et al., 2000). De huid is permanent gekoloniseerd met huidgerelateerde micro-organismen (Pirnay et al., 2012) en de contaminatiegraad van gepreleveerde weefsels van het locomotorische stelsel schommelt tussen 8,6 % en 50 % (Barbour & King, 2003; Deijkers et al., 1997; Forsell & Liesman, 2000; Ibrahim et al., 2004). Zo ook is meer dan 90 % van de spermastalen bij prelevatie gecontamineerd (Nicholson et al., 2000).

De geobserveerde verschillen in contaminatiegraad tussen de verschillende publicaties kunnen worden toegeschreven aan verschillende factoren:

- 1) Omgevingscondities zijn mee bepalend voor mogelijke contaminatie van het MLM. Zo is de contaminatiegraad van weefsels uitgenomen in een operatiezaal 5 - 11 % lager vergeleken met andere prelevatielocaties zoals mortuaria in hospitaal (Forsell & Liesman, 2000).
Voor richtlijnen inzake de optimalisatie van de prelevatie- en verwerkingsomgeving verwijzen we naar advies 8699 van HGR (2012) inzake de validatie en de bewaking van de omgeving binnen instellingen van MLM.
- 2) Het voorkomen van positieve bloedculturen op het ogenblik van de prelevatie is significant lager bij multi-orgaandonoren dan bij *post-mortem* donoren (Barbour & King, 2003).
- 3) De grootte van het prelevatieteam en het al dan niet uitvoeren van een autopsie alvorens weefsel en celprelevatie spelen een significante rol (Deijkers et al., 1997; Forsell & Liesman, 2000).
- 4) Het type monster dat wordt afgenomen voor het detecteren van de microbiologische contaminatie laat niet toe om de verschillende studies te vergelijken: bloed- of urine-culturen van donoren, microbiologische monsters afkomstig van de perfusievloeistof, sputum of transportmedia, gebruik van wissers, weefselfragmenten of celsuspensies (Deijkers et al., 1997; Zibari et al., 2000)
- 5) Het type orgaan of weefsel, de wijze van prelevatie en de transportduur naar de instelling van MLM spelen een belangrijke rol. De microbiologische contaminatie van het transportmedium van pancreassen uitgenomen in het kader van de isolatie van beta cellen schommelt tussen 19 en 84 % (Bucher et al., 2005; Carroll et al., 1992; Lakey et al., 1995; Scharp et al., 1992). Pancreassen bestemd voor de isolatie van beta cellen worden doorgaans uitgenomen in combinatie met een deel van de dunne darm welke de oorzaak is van de hoge contaminatiegraad van het transportmedium (Bucher et al., 2005). De contaminatiegraad van het transportmedium van levers uitgenomen voor de isolatie van hepatocyten bedraagt gemiddeld 37,5 % bij aankomst in de instelling voor MCH (Lehec et al., 2009).

Het groot aantal stappen vanaf de prelevatie tot distributie, met elk hun risico tot contaminatie van het MLM, leiden tot de noodzakelijkheid om na te gaan in hoeverre deze weefsels en cellen

microbiologisch (met name voor aërobe en anaërobe bacteriën, filamenteuze schimmels en gisten) veilig zijn.

Dit advies stelt aan de instellingen voor MLM praktische aanbevelingen ter beschikking met betrekking tot staalname voor cultuur, microbiologische kweekmethode en detectie/notificatie.

3.1.2. Methodologie

Na analyse van de vraag hebben het College en de voorzitter van de werkgroep de nodige expertises bepaald. De experts van de werkgroep hebben een algemene en een ad hoc belangenverklaring ingevuld en de Commissie voor Deontologie heeft het potentieel risico op belangenconflicten beoordeeld.

Deze aanbevelingen zijn opgesteld op basis van de wetenschappelijke literatuur op dit gebied en op basis van ervaring van de geconsulteerde experts in het betreffende domein.

Na goedkeuring van het voorstel van advies door de ad hoc werkgroep en door de permanente werkgroep “Cellen, weefsels en organen van menselijke en dierlijke oorsprong” werd het advies tenslotte door het College gevalideerd.

3.2 STAALNAME

Macroscopische inspectie, in het bijzonder bij gebruik van standaardmedia, kan indicatief zijn voor een contaminatie (geur, kleur, troebeling, ...).

3.2.1. Methode van de staalname voor cultuur

Volgende types stalen kunnen worden gebruikt:

- Wissers
 - Voordelen:

Deze techniek laat toe om grote oppervlaktes te bemonsteren. Nieuwere wissers gebruik makend van de *flocked swab* techniek met sterkere capillaire actie, resulteren in een hogere bacteriële *recovery* dan bekomen met conventionele bv. katoenen wissers (Saegeman et al., 2011). Een *flocked swab* heeft een tip bedekt met korte nylonvezels die loodrecht op de wisser zijn ingeplant; hierdoor wordt een zeer absorberende laag gecreëerd met een open structuur.
 - Nadelen:

Het gebruik van wissers is een weinig sensitieve methode (Martinez et al., 2003). Bovendien blijft de opbrengst of *recovery efficiency* van elk type wisser een factor van meetonzekerheid (Winters, 2003).
- Fragmenten
 - Voordelen:

Residuele weefselfragmenten geven reële microbiologische informatie over een greffe.
 - Nadelen:
 - De informatie heeft nood aan een representatief staal en betreft slechts een zeer klein deel van het betreffende MLM. Hierdoor is de informatie weinig representatief en is de kans op vals negatieve resultaten reëel.
 - Het gebruik van “begeleidend weefsel” van een greffe is niet steeds een goede indicator voor de eventuele microbiologische contaminatie van de te transplanteren greffe.
 - Contaminatie van het MLM tijdens de prelevatie/het transport of tijdens verwerking betreft voor het merendeel van het MLM een contaminatie van de oppervlakkige delen en niet een contaminatie van interne delen van het MLM. De microbiologische controle van de oppervlakte van het weefsel (spoel/transportmedium of wisser) is daarom complementair aan weefselfragmenten.
- Transportvloeistoffen/media, spoelvloeistoffen, bewaarvloeistoffen/media, vloeibare stalen.

Het gaat over vloeistoffen waarin of waarmee weefsels/cellen worden getransporteerd, behandeld/bewerkt of bewaard. Deze vloeistoffen kunnen aldus geënt worden op vaste of in vloeibare media (o.a. ook hemocultuurflessen), of ze kunnen gefilterd worden over een membraanfilter, waarbij dan de filter in cultuur wordt gebracht.

- Voordelen:
 - uniformere bemonstering;
 - concentratie van volumes bij gebruik van een membraanfilter;
 - bij gebruik van hemocultuurflessen zijn er weinig extra manipulaties.

- Nadelen:
 - Men kan er niet van uitgaan dat een enkelvoudige spoeling of onderdompeling van weefsels 100% van de potentieel aanwezige micro-organismen verwijdert. De 'recovery efficiency' van de methode is variabel (Winters et al, 2003);
 - Dilutie-effecten wanneer geen membraanfilter wordt gebruikt;
 - Bij gebruik van membraanfilters zijn er extra manipulaties met extra risico op bijbesmetting van het te analyseren staal (vals positief);
 - Dichtslibben van de membraanfilters;
 - Membraanfiltratie is geen routinetechniek in de meeste microbiologische laboratoria;
 - Risico op vals negatieve resultaten wanneer micro-organismen zich dieper in bepaalde weefsels bevinden.

3.2.2. Hoeveelheid en aantal stalen

Specifieke aanbevelingen over het aantal te nemen stalen worden verderop gegeven bij het microbiologisch onderzoek van de verschillende weefsels/cellen.

Hieronder worden samenvattend de algemene richtlijnen gegeven.

- Weefselstalen verpakt in containers

Tabel 1 toont het aantal vereiste containers te analyseren zoals beschreven in de steriliteitstest volgens de Europese Farmakopee 7.1 2.6.1(2011 en latere uitgaven). Het aantal containers dat microbiologisch te analyseren is, is afhankelijk van het totaal aantal containers afkomstig van een batch van hetzelfde bronmateriaal.

Tabel 1. Minimum aantal stalen te analyseren
(Europese Farmakopee, tabel 2.6.1.3.)

Aantal containers	Minimaal aantal te testen stalen (uitgezonderd andere gerechtvaardigde en toegelaten specificaties)
≤ 4 containers	Elke container
4 < containers ≤ 50	20 % met minimum 4 containers
> 50 containers	2 % met minimum 10 containers

Omwille van de beperkte beschikbaarheid aan MLM stelt de HGR het volgende voor als is het minimum aantal stalen te nemen van het finale product, na verwerking

- 1 staal van elk afzonderlijk verpakte greffe;
- voor materialen die in batch bereid worden, wordt er geopteerd voor een modificatie van wat voorgeschreven is in de Europese Farmakopee 7.1. 2.6.1. (2011 en latere uitgaven). Een batch van:
 - > 50 containers: 5 % van de verpakte stalen/containers met residueel weefselfragment;
 - ≤ 50 containers: 2 verpakte stalen/containers met residueel weefselfragment.

- Vloeibare stalen: transportmedia, spoelvloeistoffen, bewaarmedia, vloeibare stalen

Tabel 2 toont het vereiste monstervolume dat de Europese Farmakopee 7.1 2.6.1. (2011 en latere uitgaven) voorschrijft in de steriliteitstest. De hoeveelheid geënt monster voor microbiologische controle is afhankelijk van het totale volume van het product.

Tabel 2. Te testen volumes van vloeibare stalen
(Europese Farmakopee, tabel 2.6.1.2.)

Totale volume product (mL)	Te inoculeren volume
$V > 40$	10 % van de inhoud met ten minste 20 mL
$1 \leq V \leq 40$	Halve inhoud met ten minste 1 mL
$V < 1$	Hele inhoud van de container

Door het vereiste monstervolume is de steriliteitstest zoals omschreven in de Europese Farmakopee 7.1. 2.6.1. (2011 en latere uitgaven) voor menselijke cellen niet altijd toepasbaar. Voor de microbiologische controle van cellulaire producten worden monsters genomen zoals beschreven in Tabel 3.

Tabel 3. Te testen volumes van beperkte staalvolumes
(Europese Farmakopee, 2.6.27. 2011 en latere uitgaven)

Totale volume product (mL)	Te inoculeren volume
$V \geq 10$	Minstens 1 % van het totale volume
$V < 10$	Minstens 100 µL

In functie van de microbiologische techniek, het type van MLM, de toepassing, het gepreleveerde volume of andere specificaties die verantwoord worden in het *Quality Management System* (QMS) van de betrokken instelling van MLM, kunnen de volumes en/of deze monsters aangepast worden met een gevalideerde methode en dit in samenspraak met de microbioloog.

3.2.3. *Materiaal voor staalafname*

Stalen (residueel weefselfragment of (spoel)vloeistoffen) worden bewaard in een steriel afgesloten recipiënt tot verdere verwerking door het laboratorium.

Stalen van cellulaire producten worden in hemocultuurflessen geïnoculeerd bij gebruik van geautomatiseerde detectiesystemen.

3.2.4. Conclusies

Stalen voor microbiologische controle kunnen worden genomen op de volgende tijdstippen / van de volgende producten

- van bronmateriaal;
- tijdens verwerking;
- van finale product;
- bij de toepassing bij de mens.

De microbiologische controle moet uitgevoerd worden op het **bronmateriaal** tenzij anders vermeld in de MLM specifieke paragrafen. De beheerder van de instelling voor MLM is de enige verantwoordelijke voor de evaluatie van de resultaten van de microbiologische controle van bronmateriaal en de implicatie van deze resultaten op de verdere verwerking en de finale validatie van het betreffende MLM.

Tijdens de verwerking wordt microbiologische controle aanbevolen teneinde de verschillende stappen van de verwerking te controleren op het vlak van aseptisch werken.

Op het finaal product is de microbiologische controle een verplichte test om de microbiologische veiligheid van het vrijgegeven MLM te kunnen garanderen.

Het nemen van stalen **bij de klinische toepassing van het MLM** kan overwogen worden (HGR 8716, 2014). Deze surveillance culturen kunnen indicatief zijn bij later infectieuze problemen van het geïmplanteerde/geapliqueerd/geïnfundeerd MLM.

Deze microbiologische controle valt onder de verantwoordelijkheid van de arts verantwoordelijk voor de toepassing bij de mens van dit MLM en niet van de beheerder van de instelling voor MLM.

3.3. MICROBIOLOGISCHE KWEEKMETHODES

3.3.1. Kweekmedia

De belangrijkste bestanddelen van kweekmedia bestaan uit een bron van eiwitten of eiwithydrolysaat en een specifieke zoutconcentratie.

3.3.1.1. Aërobe en anaërobe bacteriën

Algemene vaste voedingsbodems zoals bloed agar en chocolade agar laten toe om zowel snelgroeiende als moeilijk kweekbare aërobe en anaërobe micro-organismen te kweken.

Algemene vloeibare kweekbodems zijn bv. *Trypticase Soy Broth* en thioglycolaatmedium. Dit laatste medium is door de aanwezigheid van het reducerende thioglycolaat ook geschikt voor de kweek van anaëroben (Greenwood et al., 2007; Verhaegen et al., 2007).

Indien er voor bepaalde weefsels/cellen op anamnestic basis bij de donor een risico bestaat op een mycobacteriële infectie (*Mycobacterium tuberculosis* complex en/of atypische mycobacteriën), worden specifieke cultuurmedia ingezet ter detectie (Löwenstein-Jensen, MGIT, Middlebrook 7H10, incubatie bij 37°C gedurende 6-8 weken, op 30°C voor *M. marinum*) (Warwick et al., 2008).

3.3.1.2. Filamenteuze schimmels en gisten

Voor de selectieve groei van filamenteuze schimmels en gisten worden specifieke media zoals Sabouraud dextrose agar aanbevolen dat wegens de hoge suikerconcentratie en lage pH selectief is voor filamenteuze schimmels en gisten. Bacteriën en saprofytaire filamenteuze schimmels en gisten worden onderdrukt door toevoeging van respectievelijk antibiotica en cycloheximide.

3.3.2. Aanbeveling conform Europese Farmakopee

Voor microbiologische steriliteitscontrole stelt de Europese Farmakopee vloeibaar thioglycolaat voorop, vooral voor het in cultuur brengen van anaërobe micro-organismen. *Soya bean casein digest medium* is geschikt voor de detectie van filamenteuze schimmels, gisten en aëroben (Europese Farmakopee 7.7., 2.6.1., 2011 en latere uitgaven). De test op steriliteit kan uitgevoerd worden ofwel via membraanfiltratie ofwel door onmiddellijke inoculatie van het te testen product in het bewaarmedium. Er worden steeds negatieve controles geïncubeerd. De geïncubeerde media worden voor minstens 14 dagen geïncubeerd en op regelmatige tijdstippen geobserveerd op troebelheid en/of op macroscopische evidentie voor microbiële groei.

Andere microbiologische technieken kunnen worden gebruikt indien ze worden vergeleken in een parallelle validatiestudie met de referentiemethode en dit in samenspraak met de microbioloog. Wanneer het medium waarin de cellen of het weefsel bewaard wordt, antibiotica of anti-mycotica bevat dienen deze potentieel groeiremmende factoren verwijderd te worden uit het te testen medium. Dit kan door gebruik te maken van filtratie of mits toevoegen van neutralisatoren/absorbantia zoals actieve kool aan de microbiologische cultuurmedia.

3.3.3. Manuele versus geautomatiseerde microbiologische incubersystemen

Voor de steriliteitstest van cellulaire producten vermeldt de Europese Farmakopee zowel manuele als geautomatiseerde microbiologische kweekmethodes (Europese Farmakopee, 7.1 2.6.27, 2011 en latere uitgaven).

Door zijn lange incubatieduur (14 dagen) en het vereiste monstervolume is de steriliteitstest zoals omschreven in de Europese Farmakopee 7.1 2.6.1 (2011 en latere uitgaven) voor menselijke cellen niet altijd toepasbaar.

Verschillende studies hebben aangetoond dat geautomatiseerde microbiologische kweekmethodes beter in aanmerking komen voor de detectie van micro-organismen in celproducten. Deze geautomatiseerde kweekmethodes worden gekenmerkt door een hogere sensitiviteit, kortere detectietijd, zeer laag aantal vals positieve resultaten en beperkte werklust in vergelijking met de klassieke steriliteitstest (Khuu et al., 2006; Kielpinski et al., 2005; Plantamura et al., 2011; Vigano et al., 2002). Sinds 2011 worden deze geautomatiseerde microbiologische kweekmethodes in Europa niet alleen aanvaard als alternatief voor de steriliteitstest maar worden ze preferentieel verkozen voor de microbiologische controle van celproducten (Europese Farmakopee 7.1, 2.6.27, 2011 en latere uitgaven).

Onder voorbehoud dat de geautomatiseerde detectiemethode werd gevalideerd overeenkomstig de Europese Farmakopee 7.1 2.6.27 (2011 en latere uitgaven) volstaat het om de monsters gedurende 7 dagen te incuberen bij 35°C-37°C onder aërobe en anaërobe omstandigheden voor de detectie van aërobe en anaërobe bacteriën en filamenteuze schimmels en gisten (Beres et al., 2013; Horvath et al., 2004).

Rekening houdend met de specificiteit van het MLM is het automatische microbiële detectiesysteem dat gebruikt wordt om de afwezigheid van kiemen aan te tonen in het kader van cellulair materiaal ook uit te breiden naar weefsels.

3.3.4. Incubatieduur

Voor medium waarin cellen worden bewaard, worden geïnculeerde kweekmedia gedurende 7 dagen geïncubeerd in automatische detectiesystemen en gedurende 14 dagen bij visuele detectie van microbiële groei (Europese Farmakopee 7.1, 2.6.27, 2011 en latere uitgaven).

Naar analogie hiermee, worden kweken van niet-cellulair MLM gedurende 14 dagen geïncubeerd (Europese Farmakopee 7.1, 2.6.1, 2011 en latere uitgaven).

In de klinische weefselpraktijk voldoet in het algemeen een incubatieduur van minimum 7 dagen om de klinische veiligheid van het MLM te garanderen. Deze incubatieduur laat groei toe van de meeste pathogene micro-organismen betrokken in infectieuze aandoeningen met uitzondering van bepaalde schimmels die een langere incubatie vergen (tot 21 dagen) (McGowan, 2011; Murray & Witebsky, 2010 ; Sutton, 2007).

Indien andere incubatietijden dan deze vermeld in de Europese Farmakopee weerhouden worden, dienen zij voorafgaandelijk gevalideerd te worden en dit in overleg met de microbioloog.

3.3.5. Incubatietemperatuur

Voor de klassieke sterilitest incubeert men thioglycolaat medium op 30°C-35°C en *soya bean caseïne digest medium* op 20°C-25°C (Europese Farmakopee, 7.1., 2.6.1. 2011 en latere uitgaven). Bij het gebruik van automatisch detectiesysteem, vermeldt de Europese Farmakopee een incubatie van de geïnoculeerde kweekmedia op 35°C-37°C.

Indien andere incubatiemperaturen in acht worden genomen, worden deze gevalideerd worden in overleg met de microbioloog.

3.3.6. Inhiberende substanties

Oplossingen met antibiotica/antiseptica/chemicaliën gebruikt bij de verwerking van weefsels en cellen of media die enige bacteriostatische/fungistatische of bactericide/fungicide werking hebben (bv. formaldehyde 4 %, ethanol 70 %, glycerol 85 %, DMSO) worden in de mate van het mogelijke behandeld met neutraliserende agentia (bv. actieve kool, harsen, dilutie, spoeling...) voor/bij hun inoculatie in microbiologische kweekmedia. Het is daarom aangewezen op het labo-aanvraagformulier te vermelden wanneer er restanten van deze mogelijk inhiberende substanties aanwezig kunnen zijn in de stalen voor cultuur en de naam van deze producten te vermelden.

3.4. DETECTIE/RAPPORTERING VAN MICRO-ORGANISMEN

3.4.1. Detectie / rapportering van (afwezigheid van) micro-organismen

De micro-organismen die verplicht gerapporteerd moeten worden bij de microbiologische controle van MLM zijn aërobe en anaërobe bacteriën, filamenteuze schimmels en gisten.

Een specifieke detectie van mycobacteriën wordt eveneens verwacht voor de vrijgave van allogreffes in het geval er op basis van de donoranamnese een mogelijk risico is op mycobacteriële infectie.

De rapportering van de resultaten door het laboratorium gebeurt op afzonderlijke wijze voor aërobe bacteriën, anaërobe bacteriën, filamenteuze schimmels en gisten.

Van het laboratorium wordt een duidelijk kwalitatief (positief / negatief; gedetecteerd / niet gedetecteerd) antwoord verwacht betreffende de aanwezigheid van micro-organismen (aërobe en anaërobe bacteriën, filamenteuze schimmels en gisten) met minstens een identificatie van de gedetecteerde micro-organismen.

3.4.2. Detectie / rapportering van bioburden

3.4.2.1. Concept van *bioburden* toegepast op MLM

In het kader van de microbiologische controle van geneesmiddelen en *medical devices* is de *bioburden* gedefinieerd als de microbiële lading (aantal levende bacteriën) op het bronmateriaal om aan te tonen dat het verwerkingsproces in staat is om deze gekende microbiële lading te elimineren door middel van de beschreven decontaminatie/sterilisatie procedure (GMP, 2008).

Bij gebrek aan specifieke bibliografische referenties is dit concept niet onmiddellijk transposeerbaar op MLM en dient dit concept aangepast te worden aan de specificiteiten van MLM.

In het kader van de microbiologische controle van MLM kan *bioburden* gedefinieerd worden als de microbiële lading op kwantitatief en kwalitatief niveau van het MLM alvorens dit MLM een decontaminatie-, inactivatie- of sterilisatiebehandeling ondergaat. Voor wat het MLM betreft, gaat het voornamelijk om het bronmateriaal, soms na enkele initiële verwerkingsstappen.

De *bioburden* bepaling van het MLM dient vooreerst om de verdere verwerking te oriënteren (destructie of bijkomende securisatie,...) en/of als bijkomende controle, *Polymerase chain reaction* (PCR) ter identificatie,...) om een microbiologische controle op het finale product te verzekeren. Overigens biedt de *bioburden* bepaling een mogelijkheid tot optimalisatie van de MLM verwerking en de middelen ter controle.

3.4.2.2. Kwantitatieve benadering van *bioburden* : microbiële lading

Er is evidentie in de literatuur dat de tijd tot positief worden van (hemo)culturen correleert met de initiële bacteriële *load* (in *colony forming units* (CFU)/mL) (Kassis et al., 2009 Mermel et al., 2001).

Deze correlatie is echter enkel goed bestudeerd voor hemoculturen, met automatische detectiesystemen die de tijd tot positiviteit elektronisch nauwkeurig registreren.

Een vergelijkbaar concept kan echter verondersteld worden voor andere kweekmethodes.

Men kan semikwantitatief kweken door wissers te enten op vaste agar en in aanrijkingsmedium. Indien er geen groei is op de vaste agar maar wel in het vloeibare medium, wijst dit op een eerder lage *bioburden*. Indien er zowel groei is in het vloeibare medium als op de vaste agar, betekent dit een relevante contaminatie of hoge *bioburden* van het betreffende weefsel (Pirnay et al., 2012).

De Europese Farmakopee beschrijft verschillende methodes voor kwantitatieve bepaling om kwantitatief de microbiële lading te bepalen (Europese Farmakopee 7.1., 2.6.12, 2011 en latere uitgaven).

Bij de kwantitatieve benadering van *bioburden* bepaling van het bronmateriaal kan het aanvaardbaar zijn om zich te beperken tot de detectie van micro-organismen na 3-5 dagen incubatie alvorens een re-inoculatie te doen voor identificatie.

Andere methodes, andere incubatieduren en andere criteria kunnen in functie van het MLM, de bewerkingsstappen of klinische indicaties, weerhouden worden en gedocumenteerd door de beheerder van de instelling van MLM en dit in samenspraak met de microbioloog van het laboratorium.

3.4.2.3. Kwalitatieve benadering van *bioburden*: Classificatie van micro-organismen naargelang virulentiegraad

Het identificeren van micro-organismen geïsoleerd tijdens de microbiologische controle van het MLM is belangrijk.

Micro-organismen aangetroffen op gepreleveerd MLM voor de verwerking kunnen ingedeeld worden naargelang hun virulentiegraad (Tabel 4).

De virulentiegraad van bacteriën is multifactorieel: virulentiefactoren van het micro-organisme, de immunestatus van de acceptor van dat specifiek weefsel (o.a. ernstige brandwondenpatiënten, hematologische patiënten...), het weefseltype (externe toepassing of implantatie), de wijze van binnendringen en locatie van het micro-organisme in het lichaam (gekoppeld aan het weefseltype dat geïmplantéerd / toegepast wordt), de antimicrobiële resistentie.

In dit kader is het schade-respons model van Casadevall en Pirofski interessant (HGR 8763, 2014). Dit classificatieschema voor microbiële pathogenen houdt zowel rekening met bijdragen van de gastheer als met deze van het (pathogeen) micro-organisme (Casadevall & Pirofski, 2003). Het model is gebaseerd op de mogelijkheid van micro-organismen om schade te veroorzaken in functie van de gastheer immunerespons (Casadevall & Pirofski, 2000).

'Hoge virulentie' duidt op een potentieel hoog pathogeen risico voor de receptor. Dit MLM dient in principe vernietigd te worden.

Voor bepaalde types MLM waarvan het bronmateriaal gecontamineerd kan zijn voor/tijdens prelevatie (sperma, huid, ...) of voor weefsels waarvan een tekort is en/of die gebruikt worden voor vitale indicaties (huid, amnionmembraan, cardiovasculaire greffen,...) kan de arts-beheerder

van de instelling van MLM in geval van een *bioburden* met micro-organismen uit Tabel 4 beslissen na een *risk/benefit* analyse tot het nemen van bijkomende gedocumenteerde en gevalideerde stappen in het productieproces om de microbiologische veiligheid van de afgeleverde allogreffes te verzekeren. In elk geval moet in dit laatste geval de implanterende arts hiervan op de hoogte gebracht worden.

'Lage virulentie' betekent in principe een laag pathogeen risico voor de receptor en kan aanvaard worden in microbiologische stalen afgenomen vóór de decontaminatie/sterilisatieprocedure.

Tabel 4. Micro-organismen beschouwd als hoog virulent/pathogeen indien gedetecteerd op MLM vóór verwerking (Martinez 2003; Pellet, 1996; AATB, 2002) (niet volledige lijst).

<p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>beta-hemolytische streptokokken, <i>Enterococcus</i> spp.</p> <p>Niet fermenterende micro-organismen : <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Stenotrophomas maltophilia</i>, <i>Sphingomonas paucimobilis</i>, <i>Burkholderia cepacia</i></p> <p>Sporulerende micro-organismen : <i>Bacillus</i> spp (<i>B. anthracis</i>, <i>B. cereus</i>), <i>Clostridium</i> spp,..</p> <p>Enterobacteriaceae (<i>Escherichia coli</i>, <i>Enterobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.,...),</p> <p>Anaërobe Gram-negatieve micro-organismen (o.a. <i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.)</p> <p>Gisten en filamenteuze schimmels</p>
--

3.5. MICROBIOLOGISCH ONDERZOEK VAN SPECIFIEKE WEEFSELS

3.5.1. Huidallogreffen

3.5.1.1. Inleiding

De gezonde menselijke huid is voortdurend bewoond door huidgerelateerde (niet-)pathogene micro-organismen (residente, transiënte en tijdelijk residente flora). Daarom worden lokale ontsmetting en antibiotica veelvuldig gebruikt om huidallogreffen te ontsmetten. Omdat de doeltreffendheid van antibiotica betwifelbaar is, moet er grote aandacht worden besteed worden aan de reinigings- en ontsmettingsprocedure van de donorhuid voor prelevatie.

Tot 20 % van de microbiële huidflora valt buiten het bereik van de gebruikelijke ontsmettingsmethoden. Deze bacteriën bevinden zich in haar- en talgfollikels en op plaatsen waar ze door vetten en het meerlagig verhoord epiteel beschermd worden (Selwyn & Ellis, 1972). Lokale ontsmettingsmiddelen vernietigen enkel de oppervlakkige huidflora die vervolgens door micro-organismen uit diepere lagen wordt vervangen (Schindler et al., 2006).

Veelal zijn de species geïsoleerd uit culturen van huidfragmenten (genomen tijdens prelevatie en/of finale verwerking) coagulase-negatieve stafylokokken (Heck et al., 1981; Ireland & Spelman, 2005; May et al., 1985; Obeng et al., 2001; van Baare et al., 1998; White et al., 1991). Het gaat om laag-virulente micro-organismen die de normale huid koloniseren. Hoog-virulente *S. aureus* wordt in 9 % tot 24 % van de positieve huidculturen geïsoleerd (Ireland & Spelman, 2005; May et al., 1985; van Baare et al., 1998).

3.5.1.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Het nemen van huidstalen gebeurt op het bronmateriaal om de *bioburden* na te gaan, na een fase van ontsmetting (optioneel) en onmiddellijk vóór de definitieve verpakking.

De donorhuid wordt met een dermatoom weggenomen en vervolgens in een steriele container gelegd die gevuld is met een steriel transportmedium met of zonder antibiotica. Een huidstaal kan bij de prelevatie worden genomen als prelevatiecultuur (1-2 % van de totale gepreleverte huidoppervlakte). Microbiologische culturen afgenomen tijdens de huidprelevatie geven een idee van de oorspronkelijke huidbesmetting en dus de species die op de donorhuid aanwezig zijn (*bioburden*) (Neely et al., 2008).

Huidallogreffen kunnen op verschillende wijzen bewaard worden; de meest gebruikte technieken zijn glycerolisatie en cryopreservatie in vloeibare stikstof. We beperken ons tot deze twee methoden.

- Geglyceroliseerde huidallogreffen

Glycerol 85 % bezit een zeker antimicrobieel effect, vooral bij temperaturen hoger dan 24°C en op gramnegatieve bacteriën (Saegeman et al., 2008).

Op het einde van de huidbewerking worden representatieve residuele huidfragmenten gebruikt als finaal controlestaal vóór de definitieve verpakking. Deze representatieve huidfragmenten van apart verpakte greffen omvatten 1 % - 2 % van de oppervlakte van de donorhuid. De geglyceroliseerde huidfragmenten worden gespoeld.

- Gecryopreserveerde huidallogreffen

Bij cryopreservatie kan een staal genomen worden na het wassen (als de antibiotica maximaal verwijderd zijn) (staal van bewerking).

De finaal verwerkte huidstroken worden ingevroren en een verpakking met huidfragmenten (van in totaal minstens 1 - 2 % van de donorhuid oppervlakte) dient als microbiologische cultuur van het finale product (Pirnay et al., 2012). Deze laatste staalnames worden eerst ontdooid in een waterbad bij 37°C en gespoeld in steriel natriumchloride 0,9 % of andere gebufferde zoutoplossing huid (Pirnay et al., 2012).

3.5.1.3. Detectie/rapportering van micro-organismen

3.5.1.3.1. *Indeling volgens bacteriële virulentie*

Instellingen voor MLM proberen de afwezigheid van virulente micro-organismen in huidallogreffen te garanderen en/of leggen voor deze allogreffen een grens van asepsie (*bioburden*) vast (HGR 8716, 2013). Het is zinvol om een lijst van aanvaardbare (laag-virulente) en onaanvaardbare (hoog-virulente) micro-organismen te verstrekken. Een type lijst is terug te vinden in tabel 4; indien een hoog-virulent micro-organisme op de huid geïsoleerd wordt, worden de allogreffen afgekeurd, ontsmet of bijkomend ontsmet of gesteriliseerd (Pellet et al., 1996 (cf Tabel 5)). De instelling voor MLM valideert de decontaminatie- en sterilisatieprocedures.

3.5.1.3.2. *Bacterial bioburden*

Tabel 5 is een voorbeeld van een stappenplan te volgen afhankelijk van de geïdentificeerde micro-organismen op de huidallogreffen. Voor huidallogreffen zijn criteria die rekening houden met de bacteriële lading/*bioburden* wel relevant. Kwantitatieve culturen vereisen homogenaten van de huid. Als alternatief kan men ofwel

- i) de incubatietijd gebruiken die nodig is voor de microbiologische cultuur om positief te worden als een indirecte merker voor de microbiële lading ofwel
- ii) semikwantitatief kweken door wissers te enten op zowel vaste agar als in aanrijksmedium.

Tabel 5. Stappenplan voor verwerking van huidallogreffen volgens aangetroffen micro-organismen voor aanvatten van en na de verwerking (gewijzigd naar Pirnay et al, 2012)

Incubatie tijd	Resultaat	Interpretatie	Actie	Virulentie van geïsoleerde species	Mogelijke acties
Dag 1 tot 7	Groei	<i>Bioburden</i> hoog	Identificatie van species/antibiogram (optioneel, epidemiologische reden, <i>susceptibility pattern</i>)	Hoog virulent Laag virulent	Rejectie of Sterilisatie/decontaminatie* met een gevalideerde methode Rejectie of Sterilisatie/decontaminatie* met een gevalideerde methode
	Geen groei		Verdere incubatie gedurende 7 dagen		
Dag 8 tot 14	Groei	<i>Bioburden</i> laag	Identificatie van species/antibiogram	Hoog virulent	Rejectie of Sterilisatie/decontaminatie* met een gevalideerde methode
	Groei	<i>Bioburden</i> laag	Identificatie van species/antibiogram	Laag virulent	Uitzonderlijke vrijgave van allogrefe
	Geen groei				Huidallogrefe vrijgave

*bij detectie van sporevormers: per definitie rejectie van het MLM (en dus géén mogelijkheid tot sterilisatie/decontaminatie).

Huidgreffen die gebruikt worden bij de behandeling van brandwondenpatiënten zijn vaak schaars en kunnen levensreddend zijn. In levensbedreigende omstandigheden en bij gebrek aan alternatieven kan de verantwoordelijke arts van de instelling voor MLM van bovenstaande regel afwijken na een zorgvuldige risicoanalyse van het gecontamineerde MLM en zijn potentiële nevenwerkingen. Dit gebeurt in overleg met de implanterende arts en op basis van een procedure voor de uitzonderlijke vrijgave van MLM.

Tabel 6. Minimale aanbevelingen voor huidallogreffen.

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Representatief residueel weefsel	Representatief residueel weefsel genomen voor definitieve verpakking allogreffen
Hoeveelheid	1 % – 2 % van de totale huidoppervlakte	1 % – 2 % van de totale huidoppervlakte
Evaluatie-criteria/Detectie	Onderscheid laag en hoogvirulente micro-organismen en bioburden voor huidallogreffen van belang gezien verdere acties hiervan afhangen of aanvullende maatregelen.	Geen detectie van micro-organismen

3.5.2. Placentaire vliezen

3.5.2.1. Inleiding

De placentaire vliezen bestaan uit twee los met elkaar verbonden weefsels, het amnion en het chorion. Het chorion is het deel met het matte uitzicht dat voor diepe (*full-thickness*) huidbeschadigingen wordt gebruikt. Het amnion is het glanzende oppervlak dat voor oppervlakkige (*partial thickness*) huidwonden of als oculair substituuut gebruikt wordt.

De bevallingswijze - keizersnede of vaginaal - is mede bepalend voor de besmettingsgraad van de placentaire vliezen op het moment van prelevatie.

Verschillende antimicrobiële factoren werden in vruchtwater aangetoond. De klinische betekenis van deze antimicrobiële factoren moet in de context gezien worden van de frequente kolonisatie van het vruchtwater met bacteriën van het bovenste deel van de vagina (*E. coli*, groep B en D streptokokken, *Candida albicans*, en difteroïden) bij vrouwen met meer dan 6 uur gebroken vliezen (Harminder et al., 2004).

3.5.2.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Voor de bewerking en bewaring van placentaire vliezen worden verschillende technieken toegepast: drogen, vriesdrogen, cryopreservatie bij -65°C of lager, glycerolisatie en bewaring bij 2°C-8°C (HGR 8716, 2013).

Er wordt een representatieve microbiologische staalname genomen vóór de bewerking van het MLM om de *bioburden* na te gaan, tijdens de bewerking en van het finale product.

- Finaal product van niet bestraalde placentaire vliezen (per donor): representatief staal op het ogenblik van de verpakking met in totaal 1 % - 2 % van het totale placentaire membraanoppervlak, verspreid genomen over de totale oppervlakte;
- Finaal product van bestraalde placentaire vliezen (per donor): de hoeveelheid residueel weefselfragment in verpakte stalen is gelijkwaardig aan de hoeveelheid in de vrij te geven verpakte stalen:
 - 2 verpakte stalen met residueel weefselfragment, van een batch bestraalde vliezen als ≤ 50 verpakte stalen/batch;
 - 5 % van de verpakte stalen met residueel weefselfragment, per batch bestraalde vliezen zo > 50 verpakte stalen/batch.

3.5.2.3. Detectie/rapporteren van micro-organismen

De microbiologische controle op het bronmateriaal mag geen micro-organismen aantonen die niet aanvaardbaar zijn voor placentaire allogreppen (Tabel 4). Indien deze toch aanwezig zijn, dient een gevalideerde sterilisatieprocedure te worden toegepast op de placentaire greppen.

In levensbedreigende omstandigheden, of in het geval van oculaire toepassing voor oogbedreigende omstandigheden en bij gebrek aan alternatieven kan de verantwoordelijke arts van de instelling voor MLM van bovenstaande regel afwijken na een zorgvuldige risicoanalyse van het gecontamineerde MLM en zijn potentiële nevenwerkingen. Dit gebeurt in overleg met de implanterende arts en op basis van een procedure voor de uitzonderlijke vrijgave van MLM.

Tabel 7. Minimale aanbevelingen voor placentaire vliezen.

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Representatief staal van placentaire vliezen	<p><u>Niet bestraalde vliezen</u>: representatief staal voor geheel van apart verpakte greffen, genomen bij de finale verpakking van de greffen.</p> <p><u>Bestraalde vliezen</u>: verpakt staal van finaal product</p>
Hoeveelheid	1-2 % van het totale placentaire membraanoppervlak	<p><u>Niet bestraalde vliezen</u>: 1 % – 2 % van het totale placentaire membraanoppervlak,</p> <p><u>Bestraalde vliezen</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 verpakte stalen van een batch bestraalde vliezen als ≤ 50 verpakte stalen/batch; • 5 % van de verpakte stalen per batch bestraalde vliezen zo > 50 verpakte stalen/batch.
Evaluatie-criteria/Detectie	Geen detectie van hoog virulente micro-organismen of aanvullende maatregelen.	Geen detectie van micro-organismen

3.5.3. Musculoskeletale greffen

3.5.3.1. Inleiding

Onder allogreffen van het locomotorische stelsel, verstaat men in hoofdzaak botten, pezen en kraakbeen. Meer specifiek gaat het hier onder andere om femurkoppen; en ook lange pijpbeenderen van het onderste of bovenste ledemaat, bekken; diafysaire/metafysaire en/of epifysaire botsegmenten; bot van specifieke anatomische locaties (bv.. talus, scapula); halfgewricht met kraakbeen; pezen of halve pezen met of zonder botaanhechting; fascia-lata; meniscus; schedel- en aangezichtsbeenderen.

Musculoskeletale allogreffen worden aseptisch gepreleveerd en zijn in principe kienvrij. Tijdens de prelevatie is het mogelijk dat er contaminatie optreedt met kiemen afkomstig uit de gastro-intestinale tractus: bv. gramnegatieven, anaëroben, enterokokken, *Clostridium* spp en van kiemen van de huid of uit de omgevingslucht met bv. stafylokokken of corynebacteriën.

De op musculoskeletale allogreffen uit te voeren controles hangen onder meer af van de soort bewerking die de greffen ondergaan vóór hun vrijgave (chemische bewerking, demineralisatie, gammabestraling, cryopreservatie met of zonder cryoprotectans (-40°C of lager), organotypische cultuur of lyofilisatie).

3.5.3.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Verplicht worden er tijdens de prelevatie enkele staalnames (restfragment en/of wisser over hele oppervlak lange beenderen) gedaan om de bacteriële *bioburden* van de gepreleveerde weefsels in te schatten. Dit kan de verdere verwerking van de allogreffen bepalen.

Naast deze stalen afgenomen tijdens prelevatie en deze eventueel afgenomen tijdens de verwerking van musculoskeletale weefsels is het nemen van stalen na de finale processing van de musculoskeletale weefsels vereist.

Van diepgevroren musculoskeletale allogreffen wordt er minimaal van elk apart verpakte greffe een finaal restfragment afgenomen en/of een wisser afgenomen over de hele oppervlakte van elke individueel verpakte greffe. Alternatief wordt voor de wisser spoelvloeistof gebruikt.

Diepgevroren skeletale allogreffen die in batch geproduceerd worden, worden gecontroleerd via representatieve stalen volgens een gevalideerde procedure.

Van bestraalde musculoskeletale fragmenten worden er van een afgewerkte batch minimaal 2 verpakte stalen met residueel weefselfragment per batch getest (wanneer ≤ 50 containers) of 5 % van de verpakte stalen met residueel weefselfragment indien de batch meer dan 50 verpakte stalen (containers) groot is. De hoeveelheid (gewicht) residueel weefselfragment in verpakte stalen is gelijkwaardig aan de hoeveelheid (gewicht finale greffe in verpakking) in de vrij te geven verpakkingen.

De organotypische cultuur volgt de aanbevelingen zoals beschreven onder cellen (3.5.8.).

Lyofilisatie is geen sterilisatietechniek.

3.5.3.3. Detectie/rapportering van micro-organismen

De micro-organismen die geïdentificeerd worden op musculoskeletale greffen op het moment van prelevatie / voor verwerking, zullen afhankelijk van hun virulentie (*Enterobacteriaceae*, sporenvormend ja dan neen) bepalen welke weg de musculoskeletale greffe vervolgens zal volgen: vernietiging, behandelen met gammastralen of een nieuwe decontaminatiestap. In ieder geval dient een nieuwe microbiologische controle te volgen na elke nieuwe decontaminatie- of securisatieprocedure.

Micro-organismen die onaanvaardbaar zijn en leiden tot vernietiging van het weefsel indien gedetecteerd voor de verwerking zijn terug te vinden in Tabel 4.

Voor autologe implantatie van een schedelluik kan bij gebrek aan alternatieven de verantwoordelijke arts van de instelling voor MLM van deze regel afwijken na een zorgvuldige risicoanalyse van het gecontamineerde MLM en zijn nevenwerkingen. Dit gebeurt in overleg met de implanterende arts en op basis van een procedure voor de uitzonderlijke vrijgave van MLM.

Tabel 8. Minimale aanbevelingen voor **musculoskeletale greffen**

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Representatieve stalen van musculoskeletale greffen genomen tijdens prelevatie (restfragment en/of wisser over hele oppervlakte lange beenderen)	<u>Niet-bestraalde musculoskeletale greffen:</u> Restfragment en/of spoelvoestof en/of wisser afgestroken over de hele oppervlakte, dit voor elke individueel verpakte greffe. <u>Bestraalde musculoskeletale greffen:</u> verpakte stalen van finaal product.
Hoeveelheid	Staal per aparte verpakking musculoskeletale greffen	<u>Niet bestraalde musculoskeletale greffen</u> 1 staal (restfragment en/of spoelvoestof en/of wisser) voor elke individueel verpakte greffe. <u>Bestraalde musculoskeletale greffen</u> <ul style="list-style-type: none"> • 2 verpakte stalen per batch van ≤ 50 containers; • 5 % van de verpakte stalen per batch van > 50 containers.
Evaluatie-criteria/Detectie	Geen detectie van hoog-virulente micro-organismen of aanvullende maatregelen.	Geen detectie van micro-organismen

3.5.4. Hartkleppen/vasculaire greffen

3.5.4.1. Inleiding

Hartkleppen of vasculaire greffen worden aseptisch gepreleveerd en zijn in principe steriel. Tijdens de prelevatie is contaminatie mogelijk met gastro-intestinale-, huid- of omgevingsmicro-organismen. De volgende micro-organismen werden uit cardiovasculaire greffen geïsoleerd: coagulase-negatieve *Staphylococcus* spp., *Propionibacterium* spp., Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Candida albicans*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus faecalis* (Fan et al., 2011).

Cardiovasculaire greffen kunnen tijdens het transport of het verwerkingsproces gedecontamineerd worden in een antibiotica cocktail. Vervolgens worden de weefsels afgespoeld en gecryopreserveerd.

3.5.4.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

- Bij het begin van de weefselbewerking wordt een deel van de transportvloeistof uit het recipiënt met MLM genomen (minstens 1 % van het totale volume);
- Tijdens de verwerking wordt een staal (minstens 20 mL) van het laatste bereidingsmedium genomen;
- Na de verwerking bestaat de microbiologische controle uit
 - 1 finaal representatief residueel weefselfragmenten per apart verpakte greffe;
 - EN in het geval van cardiale greffen, eveneens
 - staal van de cryopreservatie oplossing afgenomen vlak voor de definitieve verzegeling van het binnenste recipiënt en dit voor elk van de individueel verpakte allogreffes.

3.5.4.3. Detectie/rapportering van micro-organismen

Bij de microbiologische controle tijdens prelevatie of voor verwerking mogen er nog laag-virulente micro-organismen gedetecteerd worden.

De onaanvaardbare micro-organismen die in principe tot de vernietiging van het weefsel leiden, indien ze voor de behandeling gedetecteerd worden, staan in tabel 4.

Er is vaak schaarste aan cardiovasculaire allogreffes die van levensbelang kunnen zijn en waarvoor er vaak geen therapeutische alternatieven bestaan die voor de ontvanger aanvaardbaar zijn. De arts-beheerder van dit MLM mag van deze regel afwijken. Bij aanwezigheid van een *bioburden* met kiemen die in tabel 4 zijn opgenomen en na een zorgvuldige risicoanalyse kan hij aanvullende gedocumenteerde en gevalideerde maatregelen nemen op het vlak van processen en/of controles om de microbiologische veiligheid van de geleverde allogreffes te garanderen. In dit geval moet de implanterende arts absoluut op de hoogte worden gebracht.

Tabel 9. Minimale aanbevelingen voor cardiovasculaire greffen

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Representatief microbiologisch staal	Representatief microbiologisch staal
Hoeveelheid	1% van het totale volume transportvloeistof 20 mL van het laatste bereidingsmedium	<ul style="list-style-type: none">• 1 fragment per individueel verpakte greffe EN, voor cardiale greffen,• een staal van de cryopreservatie oplossing afgenomen vlak voor de definitieve interne verzegeling.
Evaluatie-criteria/Detectie	Geen detectie van hoog-virulente micro-organismen of aanvullende maatregelen.	Geen detectie van micro-organismen

3.5.5. Gehoorbeentjes en trommelvlies

3.5.5.1. Inleiding

Na prelevatie wordt het tympano-ossiculair weefsel getransporteerd in een gebufferde 2,7 % - 4 % formaldehyde-oplossing met pH 5–6 en in de instelling voor MLM verder op 2°C-8°C bewaard. Bewerking gebeurt ofwel tijdens de prelevatie ofwel na kortdurende bewaring in gebufferde formaldehyde oplossing. Na de definitieve verpakking worden de allogrepen gedurende tenminste 14 dagen in gebufferde formaldehyde-oplossing bewaard (de eerste 2 – 5 dagen op kamertemperatuur gevolgd door bewaring tussen 2°C en 8°C). Om de pH van de gebufferde formaldehyde oplossing te verzekeren is het aan te bevelen kleine verpakkingen te gebruiken. Formaldehyde in de vermelde concentratie is bactericied, fungicied, virucied en traag sporicied. De werking van formaldehyde wordt negatief beïnvloed door aanwezigheid van organisch materiaal. Bijgevolg moeten zeer lange contacttijden gebruikt worden.

3.5.5.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Daar de tympano-ossiculair grepen gedurende ten minste 14 dagen worden bewaard in 2,7 % - 4 % formaldehyde mag men aannemen dat door deze langere contacttijden een cultuur van bronmateriaal en een cultuur van het finale product van tympano-ossiculair grepen kan worden weggelaten.

Microbiologische testen kunnen uitgevoerd worden op een representatief staal van de laatste bewaarvloeistof (minstens 1 % van het totale volume).

3.5.5.3. Detectie/rapportering van micro-organismen

Tympano-ossiculair allogrepen moeten kiemvrij zijn (aërobe en anaërobe bacteriën, filamenteuze schimmels en gisten) op het ogenblik van hun vrijgave.

Bij positieve kweekresultaten zal de allogreffe ofwel vernietigd worden ofwel een gevalideerde inactivatieprocedure ondergaan alvorens vrijgave.

Tabel 10. Minimale aanbevelingen voor **tympano-ossiculair grepen**

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Geen microbiologische controle zo procedure met 14 dagen formaldehyde onderdompeling gerespecteerd wordt <u>Optioneel:</u> staal van laatste bewaarvloeistof	
Hoeveelheid		Minstens 1 % van het totale volume (optioneel).
Evaluatie-criteria/Detectie		Geen detectie van micro-organismen.

3.5.6. Cornea/ sclera

3.5.6.1. Inleiding

Oculaire weefsels zijn in de regel gecontamineerd. *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp. en difteroïden zijn vaak voorkomende contaminanten op de corneairand (Farrell et al., 1991). Verschillende *case-reports* beschrijven ook oculaire infecties met *Candida* spp. en niet-fermenterende micro-organismen (HGR 8763, 2014).

Extra maatregelen met betrekking tot microbiologische veiligheid (vb. decontaminatie van de peri-oculaire huid van de corneadonor op het moment van prelevatie) worden aanbevolen. Bij prelevatie van de volledige bulbus kan deze ontsmet worden met oplossingen van antiseptica en/of antibiotica. Bewaar- en ontzwellingsmedia kunnen antibiotica bevatten.

Cornea's kunnen bewaard worden in bewaarmedium tussen 30°C-37°C (warme bewaring) gedurende maximaal 5 weken (inclusief periode in medium met macromoleculen) of in bewaarvloeistof tussen 2°C en 8°C gedurende niet meer dan 7 dagen (koude bewaring). In geval van warme bewaring wordt de cornea kort voor de eigenlijke transplantatie overgezet in een medium met macromoleculen (HGR 8716, 2013).

De sclera kan gedecontamineerd worden in een antibioticahoudende oplossing alvorens ze over te brengen in het finale bewaarmedium (ethanol minimum 70 %). Ethanol 70 % is actief ten opzichte van bacteriën, mycobacteriën, filamenteuze schimmels en gisten en virussen, maar het is niet sporicide.

3.5.6.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

3.5.6.2.1. Bronmateriaal

Het nemen van een staal van het bronmateriaal gebeurt om de *bioburden* te bepalen. Dit veronderstelt de microbiologische controle van residueel materiaal of spoelvloeistof (1% van het totale volume, minimum 100 µL).

3.5.6.2.2. Cornea – finaal product

Er dient minstens 1 staalname voor microbiologisch onderzoek te gebeuren op het bewaarmedium (koude en warme bewaring) en transportmedium (warme bewaring), ten vroegste 24u nadat de cornea erin werd overgebracht. Dit staal bestaat uit 1% van het cornea bewaar- of transportmedium (minimum 100 µL).

Tijdens bewaring en tot vlak voor de implantatie dient bovendien kleur en helderheid van het medium gecontroleerd te worden.

3.5.6.2.3. Sclera – final product

Een controle van de laatste, relevante spoelvloeistof (1 % van het totale volume) of weefselfragment is wenselijk bij bewaring in ethanol 70 %. Alternatief controleert men microbiologisch 1 % van het totale volume van de 70 % ethanoloplossing (minstens 100 µL, 1/10 dilutie ethanol). Ethanol heeft een zeer sterk ontsmettende werking. Het in cultuur zetten van een

dilutie van ethanol 70 % kan aanleiding geven tot bacteriostase wat een gevalideerde neutralisatie procedure noodzaakt.

Het resultaat van de cultuur van het cornea medium kan als alternatief gebruikt worden vermits het nemen van een sclerafragment niet voor de hand ligt. Eventuele aanwezige micro-organismen kunnen zich immers goed vermenigvuldigen in het cornea medium.

3.5.6.3. Detectie/rapportering van micro-organismen

Vooraleer de cornea wordt afgeleverd, moet worden nagegaan of de meest recente microbiologische controles nog negatief zijn. Dit (voorlopige) resultaat wordt vóór de implantatie aan de implanterend arts gemeld. De kweekmedia blijven echter nog langer geïncubeerd (in totaal minstens 7 en tot 21 dagen (voor schimmels) op 25°C-37°C (afhankelijk van het kweekstelsel: automatisch of visueel). Wanneer alsnog microbiologische positiviteit zou optreden wordt de implanterend arts hiervan onmiddellijk op de hoogte gebracht volgens de in de instelling van toepassing zijnde procedures.

Microbiologische kweekresultaten van cornea worden best meegenomen in de beoordeling van de acceptatie van scleragreffes. Wanneer pathogene kiemen gevonden worden op de cornea is het aangewezen om naast cornea ook de sclera van deze donor te vernietigen.

Tabel 11. Minimale aanbevelingen voor **cornea en sclera**.

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Restfragment of vloeistof	<u>Cornea</u> <ul style="list-style-type: none"> • bewaarmedium (koude en warme bewaarmethode) en transportmedium in geval van warme bewaarmethode <u>Sclera</u> <ul style="list-style-type: none"> • ethanol 70 % of • laatste spoelvloeistof of • cornea bewaarmedium (koude bewaarmethode) of; • cornea transportmedium (warme bewaarmethode) of; • sclera restfragment.
Hoeveelheid	Residueel materiaal of 1% spoelvloeistof (min 100 µL)	<u>Cornea</u> Minstens 1 % van het volume van cornea bewaar- en/of transportmedium (niet minder dan 100 µL). <u>Sclera</u> <ul style="list-style-type: none"> • ethanol 70 %: minstens 1 % van het volume (met finale dilutie van ethanol 1/10) (min 100 µL staal); • minstens 1 % van het laatste sclera spoelvolumen (min 100 µL staal).
Evaluatie-criteria/Detectie	Oculaire weefsels zijn in de regel gecontamineerd. Eventueel aanvullende maatregelen.	Geen detectie van micro-organismen.

3.5.7. Reproductieve cellen

3.5.7.1. Inleiding

Spermatozoïden en eicellen worden respectievelijk geselecteerd in het zaadvocht (1) of in het follikelvocht na een follikelpunctie (2). In bepaalde gevallen betreft het prelevaties van (delen van) gonaden (3).

3.5.7.1.1. Zaadvocht

Het via masturbatie verkregen zaadvocht met spermatozoïden is per definitie niet steriel en bevat voornamelijk bacteriën die behoren tot de huid en/of faecale flora (coagulase-negatieve stafylokokken, enterokokken). Deze commensale flora kan, naargelang de concentratie ervan, een impact hebben op de medisch begeleide voortplanting (MBV). De patiënt moet een strikte prelevatieprocedure voor sperma toepassen om optimale hygiënische omstandigheden te waarborgen en het besmettingsrisico te minimaliseren.

Deze kiemen worden doorgaans niet meer aangetroffen na selectie en wassen van de spermatozoïden (Cottel et al., 1997). Indien de kwaliteit van het sperma voldoende is, is het aanbevolen om de spermatozoidenselectie via discontinue dichtheidsgradiëntcentrifugatie uit te voeren om deze kiemen te verwijderen (Nicholson et al., 2000).

Sperma kan pathogene micro-organismen bevatten zoals *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mycoplasma (voornamelijk *Ureaplasma urealyticum*), en *Chlamydia trachomatis*. Wanneer pathogene kiemen in het sperma vastgesteld worden bij het diagnostisch onderzoek, volgt eventueel een antimicrobiële behandeling van de donor voordat spermatozoa verkregen worden voor de eigenlijke *in vitro* verwerking met het oog op therapeutisch gebruik.

Een peiling afgenomen bij een aantal MBV-centra in België door de ABEF (*Association belge des embryologistes francophones*) toonde aan dat het gemiddelde percentage van bacterieel besmette embryoculturen bij een *in vitro* fertilisatie (IVF)-behandeling lager lag dan 5/1.000. De studie van Kastrop et al. (2007) over de microbiële besmettingsrisico's van embryonale culturen bij MBV toont eveneens een besmettingspercentage aan van ongeveer 0,5 % per IVF-cyclus, voornamelijk veroorzaakt door *E. Coli* (58,9 %) en *Candida spp.* (25,3 %). Deze contaminaties worden enkel waargenomen in culturen waar spermatozoïden bij eicellen worden geplaatst voor de IVF. Er werd geen enkele besmetting vastgesteld bij de techniek van micro-injectie van de spermatozoïde in de eicel (ICSI).

3.5.7.1.2. Follikelvocht

De eicellen worden verkregen via echogeleide steriele transvaginale punctie van follikels. Hoewel de genitale tractus niet steriel is (Pelzer & Allan, 2012), is de aanwezigheid van vaginale kiemen (Lactobacillen, *Candida spp.*, ...) in kweekmedia uiterst zeldzaam en weinig vermeld in de literatuur (Kastrop et al., 2007).

De routine sterilisatie procedures (alcohol,...) kunnen niet toegepast worden op reproductieve cellen. De behandelingsmedia bevatten in de regel echter antibiotica.

De embryo's ofwel het sperma worden teruggeplaatst in de uterus, wat een minder groot contaminatierisico inhoudt dan de implantatie of applicatie van andere types MLM. Meer nog, in

het kader van partnerdonatie is het risico op contaminatie kleiner dan het risico opgelopen door een seksueel contact.

3.5.7.1.3. Gonadaal weefsel

Gonadaal weefsel of gonadale fragmenten worden chirurgisch (aseptisch) gepreleveerd.

Er moet een onderscheid gemaakt worden tussen enerzijds ovariële of testiculaire fragmenten die als dusdanig diepgevroren worden met het oog op bewaring van de vruchtbaarheid bij een gonadotoxische behandeling en anderzijds de testiculaire fragmenten (of epididymis prelevaties) waaruit de spermatozoa geëxtraheerd worden en waarvan het finale product (een suspensie van spermatozoa, gelijkwaardig aan sperma) als dusdanig moet gecontroleerd worden.

3.5.7.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Microbiologische analyse van reproductieve cellen/ weefsels voor hun toepassing is niet mogelijk op vers materiaal daar dit onmiddellijk na de bereiding wordt toegepast. Deze resultaten zijn pas na gebruik van het MLM bij de ontvanger gekend en zijn dus retrospectief, maar kunnen gebruikt worden om de aseptische/ontsmettende werkwijze te verifiëren naast de periodieke microbiologische controles uitgevoerd in de clean room (HGR 8699, 2012).

Indien het materiaal gecryopreserveerd wordt voor de inplanting, is microbiologische analyse wel mogelijk voor de toepassing van het humaan lichaamsmateriaal.

Reproductieve cellen en weefsels zijn waardevol genetisch materiaal waarvan zelden een deel kan worden opzij gehouden voor een analyse. Enkel het sperma is doorgaans (doch niet altijd) van een voldoende groot volume om een klein deel aan microbiologische analyse te besteden. Een mogelijk alternatief is een analyse van de transport-/verwerkingsmedia van het MLM. Er is onvoldoende evidentie om microbiologische controles uit te voeren van de laatste media waarmee deze reproductieve cellen of weefsels tijdens de bereiding in contact kwamen (spoelmedium van eicellen na inzameling, kweekmedia van embryo's,...)

Voor de gonadale fragmenten die in de regel autogreppen zijn, moet een microbiologische controle uitgevoerd worden op elke donatie voor de cryopreservatie (residuele ovariële fragmenten of finaal ovarieel/testiculair spoel/verwerkingsmedium: 1 % van het totale volume, aanvullen tot 100 µL). Gezien het hier gaat om cruciaal autoloog materiaal zal het steeds bewaard worden, ongeacht het resultaat van de microbiologische controle. Het opvolgen van de microbiologische resultaten is echter van belang als surveillance en om eventuele kruiscontaminatie te vermijden.

Wat het allogeen gebruik van sperma betreft, moet de microbiologische controle (met inbegrip de detectie van *Chlamydia trachomatis* met behulp van PCR op urine) uitgevoerd worden op het onverwerkte sperma voor elke donor tijdens de selectietesten (voor de donaties) en/of op een periodieke manier tijdens de donaties of indien indicatie (1 % van het totale volume, aanvullen tot 100 µL) (KB ,2009).

Voor de partnerdonatie van sperma wordt er in de literatuur geen argumenten gevonden ten voordele van een microbiologische controle behalve voor die uitgevoerd bij de aanvang van het infertiliteitsonderzoek (HGR 8292, 2009).

3.5.7.3. Detectie/rapportering van micro-organismen

Het onverwerkte sperma van de allogene donor is per definitie niet steriel maar wordt enkel verworpen wanneer het sperma **hoog virulente micro-organismen** (Tabel 4) bevat.

Naast de microbiologische analyses op het reproductief materiaal zelf en eventueel op de bereidingsmedia kan men een visuele controle op het MLM uitoefenen tijdens de transformatie (cultuur) daar het reproductief materiaal vaak macroscopisch (troebelheid) en microscopisch wordt bekeken.

Een snelle microbiële groei wordt bevorderd door de culturomstandigheden (pH, temperatuur...) en veroorzaakt meestal een volledige aantasting van het MLM dat daardoor verloren gaat en niet meer gebruikt kan worden. Het kan gebeuren dat enkel een deel van het MLM een bewezen besmetting vertoont. Het is dan de beheerder van de MLM-instelling die het risico zal beoordelen en zal beslissen om het materiaal dat geen bewezen besmettingen vertoont toe te passen of af te keuren.

Tabel 12. Minimale aanbevelingen voor **reproductieve cellen**.

	Op materiaal
Te testen materiaal	<u>Gonadale afname</u> : bij prelevatie of na bereiding <ul style="list-style-type: none">• ovaria: spoel- of verwerkingsmedium of residueel gonadaal materiaal;• testes: spoel/verwerkingsmedium. <u>Sperma voor allogene donatie</u> : spermastaal voor elke donor tijdens de selectietesten (voor de donaties) en/of op een periodieke manier tijdens de donaties of indien indicatie. Niet van toepassing in het kader van partnerdonatie.
Hoeveelheid	<u>Gonadale afname</u> : bij elke donatie, minstens 1 % van het totale volume spoel/verwerkingsmedium (aanvullen tot 100 µL) of restweefsel. <u>Sperma</u> : minstens 1 % van de totale hoeveelheid onverwerkt sperma, aanvullen tot 100 µL.
Evaluatie-criteria/Detectie	<u>Voor partnerdonatie of autogreffen</u> is microbiologische controle vooral van belang voor het vermijden van kruiscontaminatie en als surveillance kweek. <u>Bij allogene donatie van sperma</u> wordt materiaal gecontamineerd met hoog virulente micro-organismen verworpen.

3.5.8. Cellen behalve cellen van navelstrengbloed, donorlymfocyten, hematopoiëtische stamcellen en ATMPs

3.5.8.1. Inleiding

De transplantatie van cellen van humane oorsprong is een sterk evoluerende, maar complexe sector met zeer uitgebreide mogelijkheden voor de behandeling van ziekten. Voor het isoleren van humane cellen vertrekt men van een afereseproduct, orgaan of weefsel(fragmenten).

3.5.8.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Bronmateriaal: microbiologische analyses kunnen worden uitgevoerd op:

- het transportmedium van het donororgaan;
- kleine hoeveelheid celmateriaal na prelevatie.

Celisolaten

Bepaalde menselijke celtypes, zoals betacellen en hepatocyten, kunnen onmiddellijk (< 24 uur) na het isoleren van de primaire cellen worden getransplanteerd bij de mens (Matsumoto et al., 2005; Puppi et al., 2008). Dit laat een prospectieve microbiologische controle gebaseerd op de aangroei van micro-organismen niet toe, aangezien men niet zal beschikken over de resultaten van een kweek op het moment dat men de greffe wil implanteren. In deze omstandigheden dient er tijdens het productieproces op regelmatige tijdstippen een visuele macroscopische en microscopische controle te worden uitgevoerd.

Op het einde van het productieproces, net voor het finale product van de cellen, moet een monster van het bewaarmedium worden genomen voor een retrospectieve opsporing van aërobe- en anaërobe bacteriën en filamenteuze schimmels en gisten.

Bewaring van primaire cellen

De humane cellen kunnen gedurende enkele dagen bewaard worden in bewaarmedium alvorens ze getransplanteerd worden bij de mens (Keymeulen et al., 2006), of alvorens ze gecryopreserveerd worden. Er dient minimaal een monster van het bewaarmedium te worden gecollecteerd net voor het finale celproduct bekomen wordt, voor de opsporing van aërobe- en anaërobe bacteriën en filamenteuze schimmels en gisten.

Voor cellen die na bewaring onmiddellijk worden getransplanteerd, komt deze microbiologische controle te laat. In deze omstandigheden wordt aanbevolen om al vroeger een microbiologisch monster te collecteren. Het tijdstip van deze monsternamen en de sensitiviteit van de analysetechniek zijn van cruciaal belang om valide microbiologische resultaten te bekomen. Deze procedure is bijgevolg te beschouwen als een uitzonderlijke vrijgave.

Monsternamen onmiddellijk na de isolatie van de primaire cellen leidt mogelijk tot vals negatieve resultaten omdat de potentiële besmetting sterk wordt verdund door de verschillende wasstappen uitgevoerd na de enzymatische digestie van het donormateriaal (Bucher et al., 2005; De Corte et al., 2012; Lehec et al., 2009; Tew et al., 2008). Bovendien vormen de bewaaromstandigheden van cellen doorgaans een ideale omgeving voor de aangroei van micro-organismen (pH, voedingsbodem, temperatuur) waardoor het tijdstip van monsternamen verlaat kan worden met 1 tot 3 dagen zonder in te boeten aan detectie-efficaciteit. Door dit uitstel neemt het risico op vals negatieve resultaten sterk af (Dreier et al., 2008).

Celculturen

Bij celculturen die in verschillende passages worden bereid (bv. mesenchymale stamcellen, keratinocyten), wordt aanbevolen om elke invriezing als een eindproduct te zien voor microbiologische controle. Een microbiologische controle voor aërobie en anaërobe bacteriën en filamenteuze schimmels en gisten van het eindproduct is verplicht.

Voor *Master Cell Banken* dient men ook controles op de aanwezigheid van mycoplasma uit te voeren (HGR 8318, 2007).

3.5.8.3. Microbiologische kweekmethodes

Bij celculturen, waarvan het celmateriaal vastgehecht is aan de cultuurfles, kan het bovenstaande bewaarmedium (supernatans) worden gepooled, waaruit dan een monster voor microbiologische controle kan worden genomen. Indien de cultuur uitgevoerd wordt in meerdere flessen, dient men supernatans van de verschillende bewaarmedia te poolen en een staal te nemen dat representatief is voor het geheel.

Bij cellen in suspensie kan het bewaarmedium worden gecollecteerd na een korte sedimentatie, hoewel dit de kans op vals negatieve kweekresultaten door sedimentatie van bacteriën eveneens doet toenemen. Indien de cultuur uitgevoerd wordt in meerdere flessen, dient men supernatans van de verschillende kweekmedia te poolen en een staal te nemen dat representatief is voor het geheel.

In het algemeen moet minstens één controle uitgevoerd worden (op supernatans of eindproduct), waarbij preferentieel een staal van het eindproduct getest wordt.

Er dient minimaal 1% monster (minimum 100 µL monster) te worden geënt voor microbiologische controle (*European Pharmacopoeia* 7.0, 2011; Kielpinski et al., 2005; Plantamura et al., 2012). Indien het monster niet onmiddellijk kan worden geënt moet het worden bewaard bij 2°C-8°C om fagocytose te vermijden.

3.5.8.4. Detectie/rapportering van micro-organismen

In celculturen mogen geen micro-organismen gedetecteerd worden.

In principe kan in welbepaalde / welomschreven omstandigheden een vrijgave gebeuren op basis van deels voorlopige resultaten (m.n. laatste controle). Vooraleer de cellen worden vrijgegeven / afgeleverd, moet worden nagegaan of de meest recente microbiologische controles nog negatief zijn. Dit (voorlopige) resultaat wordt vóór de implantatie aan de implanterend arts gemeld. De kweekmedia blijven echter nog langer geïncubeerd (in totaal minstens 7 tot 21 dagen op 25-37°C (afhankelijk van het kweekstelsel: automatisch of visueel). Wanneer alsnog microbiologische positiviteit zou optreden, dient de implanterende/behandelende arts hiervan onmiddellijk op de hoogte gebracht volgens de in de instelling van toepassing zijnde procedures.

Tabel 13. Minimale aanbevelingen voor cellen.

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Transportmedium of celmateriaal	<u>Adherente cellen:</u> supernatans van het celbewaarmedium. Indien meerdere flessen voor cultuur: gepooled supernatans <u>Cellen in suspensie:</u> celbewaarmedium na korte sedimentatie. Indien meerdere flessen voor cultuur: gepooled supernatans.
Hoeveelheid	Minimum 1% van het totale volume (minstens 100µL).	Minimum 1% van het totale volume (minstens 100 µL)
Evaluatie-criteria/Detectie		Geen detectie van micro-organismen.

3.5.9. Hematopoiëtische stamcellen, donor lymfocyten en navelstrengbloed

3.5.9.1. Inleiding

Celproducten met hematopoiëtische stamcellen, donor lymfocyten en navelstrengbloed, kunnen na afname in geringe mate microbiologisch gecontamineerd zijn. Er zijn echter zeer weinig meldingen van onmiddellijke of uitgestelde ernstige reacties die verband houden met bacteriële contaminatie van toegediend navelstrengbloed of stamcellen (Honohan et al., 2002, Klein et al, 2006).

Hematopoiëtische stamcellen kunnen na mobilisatie met een hematopoiëtische groeifactor geïsoleerd worden uit perifere bloed door aferese. Hiervoor wordt de donor of patiënt (in geval van autologe transplantatie) aangeprikt ter hoogte van een armvene. De huid wordt vooraf ontsmet. De afname van donorlymfocyten gebeurt op een analoge manier (zonder mobilisatie). De cellen zijn in beide gevallen finaal beschikbaar onder de vorm van een celconcentraat. Een beenmergafname gebeurt ter hoogte van de *ossa iliaca* van de donor of de patiënt, na verdoving en ontsmetting van de huid.

Stamcellen uit beenmerg en perifere bloed, evenals donorlymfocyten, kunnen in een gesloten systeem bewerkt en ingevroren worden. Volumereductie voor invriezen is soms aangewezen maar gebeurt niet altijd.

Voor het verzamelen van **navelstrengbloed** uit de navelader is een ontsmetting van deze ader (bv. 70 % ethanol, povidon-iodine, chlorhexidine gluconaat 0,5 %) de eerste stap. Bij het bewerken (in een gesloten systeem) leiden verschillende stappen van centrifugatie en separatie (minimale manipulaties) tot de productie van het finale celproduct dat in een cryopreservatie oplossing bewaard wordt. Dit finale celproduct wordt ingevroren via een gecontroleerd protocol en vervolgens bewaard bij een temperatuur beneden -130°C.

3.5.9.2. Staalnames voor microbiologisch onderzoek

Er moet een microbiologische cultuur afgenomen worden van elk gepreleveerd celproduct.

Voor navelstrengbloed verwijzen we hiervoor naar de meest recente versie van de *standards van NetCord Fact- D10.2.6.: Microbiological cultures using a system validated for the growth of aerobic and anaerobic bacteria and fungi.*

Opdat zo weinig mogelijk stamcel materiaal verloren zou gaan, wordt er gebruik gemaakt van de residuele erythrocyten fractie en/of de plasmafractie die als supernatans overblijft na bewerking en vòòr invriezen van het finale product. Honohan et al toonden aan dat deze residuele fracties vergelijkbare microbiologische resultaten geven aan een cultuur van het stamcelconcentraat na ontddoijing. De grootte van de te testen fracties zijn 1mL (minimaal) tot 5 mL (Honohan et al., 2002; Sparrow, 2004).

Als alternatief kan een microbiologische controle uitgevoerd worden op minstens 1 % van de totale celsuspensie (zo geen cryopreservatie of fractionering) of minstens 1 % van het totale volume finaal product waar cryoprotectans aan toegevoegd werd (niet minder dan 100 µL). Cryoprotectans heeft geen bacteriostatisch effect op de microbiologische cultuur (Larreal, et al., 2004).

3.5.9.3. Microbiologische kweekmethodes

Voor zowel hematopoiëtische stamcellen, donorlymfocyten als navelstrengbloed kan men een staal inoculeren in aërobe en anaërobe hemocultuur flessen die gedurende 7 dagen worden geïncubeerd in een continu monitoring systeem op 35°C-37°C.

3.5.9.4. Detectie/rapportering van micro-organismen

In hematopoëtische stamcellen en navelstrengbloed mogen geen micro-organismen gedetecteerd worden.

3.5.9.4.1. Hematopoiëtische stamcellen

De JACIE/FACT standards (*International standards for cellular therapy product collection, processing, and administration – version 5.2, chap. D4.9*) vermelden dat het kwaliteitshandboek moet voorzien in procedures en protocollen betreffende het gebruik van stamcelproducten met een positieve microbiologische cultuur voor de infusie, bij gerichte allogene of autologe transplantatie. In geval het microbiologische contaminatie van een ingevroren celproduct betreft, dient de beheerder van het MLM met de behandelende arts en eventueel ook met de microbioloog te overleggen of vrijgave en toediening van het celproduct aangewezen/verantwoord is. In die gevallen dient ook een gevoeligheidsbepaling te worden uitgevoerd.

In het geval de microbiologische contaminatie na infusie van het MLM vastgesteld wordt, wordt de behandelende arts hiervan op de hoogte gebracht om de passende maatregelen te treffen afhankelijk van het geïdentificeerde micro-organisme.

3.5.9.4.2. Navelstrengbloed

De NetCord-FACT *International Cord Blood standards* bevelen aan om eenheden met positieve microbiologische cultuur bij niet-verwante allogene toepassing te vernietigen (NetCord). In het kader van de intrafamiliale opslag en bij positieve microbiologische cultuur moet er enerzijds een gevoeligheidstest worden uitgevoerd op het/de geïsoleerde micro-organisme(n) en moeten anderzijds de risico's en voordelen op het ogenblik van de implantatie worden geëvalueerd. De implanterende arts wordt van de positieve microbiologische testen op de hoogte gebracht.

Tabel 14. Minimale aanbeveling voor **hematopoiëtische stamcellen/navelstrengbloed**.

	Op bronmateriaal	Op het finale product
Te testen materiaal	Celsuspensie (zo geen fractionering en cryopreservatie) Residuele hoeveelheid erythrocyten of plasmafractie	Residuele hoeveelheid erythrocyten of plasmafractie OF <u>In te vriezen product na toevoeging cryoprotectans aan finaal product alvorens cryopreservatie.</u>
Hoeveelheid	<u>Erythrocyten of plasmafractie:</u> 1-5 mL <u>Celsuspensie:</u> minstens 1% van het totale volume (niet minder dan 100 µl).	<u>Finaal product met cryoprotectans:</u> minstens 1 % van het totale volume (niet minder dan 100 µL).
Evaluatie-criteria/Detectie		Geen detectie van micro-organismen.

4. REFERENTIES

- 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.
- Belgisch Koninkrijk. Wet van 19 december 2008 inzake het verkrijgen en het gebruik van menselijk lichaamsmateriaal met het oog op de geneeskundige toepassing op de mens of het wetenschappelijk onderzoek. BS van 30 december 2008, nr 2008 - 4682, blz 68774.
- Belgisch Koninkrijk. Koninklijk besluit van 28 september 2009 tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, wegnemen, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van menselijk lichaamsmateriaal, waaraan de banken voor menselijk lichaamsmateriaal, de intermediaire structuren voor menselijk lichaamsmateriaal en de productie-instellingen moeten voldoen. BS van 23 oktober 2009, nr 2009-3602/18414, blz. 69409.
- 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.
- 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/maibdd/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.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Specifieke kwaliteitsnormen voor humane cellen waarvoor geen andere specifieke kwaliteitsnormen bestaan en die voor toepassing op de mens bestemd zijn. Brussel: HGR; 2007. Advies nr 8318.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Inactivatie en securisatie van weefsels en cellen ten overstaan van bacteriën, virussen of prionen. Deel I: Prionen. Brussel: HGR: 2008. Advies nr 8143.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Kwaliteitsnormen voor reproductieve weefsels en cellen. Brussel: HGR: 2009. Advies nr 8292.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Aanbevelingen inzake de validatie en bewaking van de omgeving binnen banken en intermediaire instellingen voor menselijk lichaamsmateriaal. Brussel: HGR; 2012. Advies nr 8699.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Inactivatie en securisatie van weefsels en cellen ten overstaan van bacteriën, virussen of prionen. Deel 3: Virologie. Brussel: HGR; 2012. Advies nr 8785.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Inactivatie en securisatie van weefsels en cellen ten overstaan van bacteriën, virussen of prionen. Deel 2: microbiologie. Brussel: HGR; 2014. Advies nr 8763.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Kwaliteitsnormen voor verschillende types van menselijk lichaamsmateriaal die voor toepassing op de mens bestemd zijn: weefsels. Brussel: HGR; 2013. Advies nr 8716.
- 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 <https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=amFjaWUub3JnfGphY2lfGd4OjJmYzQzY2NkYjJiMjIhMml>
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Heggors 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.
- 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, McLearn 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. SAMENSTELLING VAN DE WERKGROEP

Al de deskundigen hebben **op persoonlijke titel** aan de werkgroep deelgenomen. De namen van de deskundigen van de HGR benoemd per KB alsook de leden van het Bureau en het College zijn beschikbaar op onze website (link: [samenstelling en werking](#)).

De volgende deskundigen hebben hun medewerking verleend bij het opstellen van het advies:

BAUDOUX Etienne	Geneeskunde, celtherapie	ULg
BEELE Hilde	Geneeskunde, dermatologie	UZ Gent
CAREMANS Jeroen	Biomedische wetenschappen	UZA
DE SUTTER Petra	Voortplantingsgeneeskunde	UZ Gent
DE VOS Daniel	Cell technologie	MHKA
DELFORGE Alain	Geneeskunde, celtherapie	ULB
DELLOYE Christian	Geneeskunde, orthopedisch chirurgie	UCL
DUFRANE Denis	Endocrienceltherapie, BMLM, locomotorisch stelsel	UCL
ECTORS Nadine	Geneeskunde, pathologische anatomie	KUL
GIET Olivier	Biologie, kwaliteitscoördinator	Ulg
GORDTS Bart	Microbiologie, ziekenhuishygiëne	AZ Brugge
GUNS Johan	Medisch-sociale wetenschappen	UZ Brussel
HEINEN Ernst	Humane histologie	ULg
IEVEN Greet	Microbiologie	UZA
JASHARI Ramadan	Geneeskunde, cardiovasculaire heelkunde	EHB/clinique St-Jean, Brussel
KLYKENS JOHAN	Ingenieur biochemie, QA/QC	UZLeuven
MARICAU Daniel	Klinische biologie	FAGG
MUYLLE Ludo	Geneeskunde, klinische biologie	FAGG,UZA, UA
PIRNAY Jean-Paul	Medische wetenschappen	MHKA
SAEGEMAN Veroniek	Geneeskunde, klinische biologie, ziekenhuishygiëne	UZ Leuven
THONON Fabienne	Voortplantingsgeneeskunde, embryologie	CHU de Liège
VAN DEN ABBEEL Etienne	Voortplantingsgeneeskunde, embryologie	UZ Gent
VAN GEYT Caroline	Medisch-sociale wetenschappen	UZ Gent
VAN RIET Ivan	Geneeskunde, celtherapie	UZ Brussel
VANDERKELEN Alain	Geneeskunde, algemene chirurgie	HMRA
VANSTEENBRUGGE Anne	Voortplantingsgeneeskunde, embryologie	CHR Namen
VERBEKEN Gilbert	Biologie, QA/QC/RA	MHKA

De administratie werd vertegenwoordigd door:

DE VOS Claire Beheer van de erkenningen van banken FAGG
voor MLM

Het voorzitterschap werd verzekerd door Veroniek SAEGEMAN en Hilde BEELE en het wetenschappelijk secretariaat door Muriel BALTES.

De algemene belangenverklaringen van de experts die het advies hebben goedgekeurd of gevalideerd zijn beschikbaar op onze website (link: [Belangenconflicten](#)).

Over de Hoge Gezondheidsraad (HGR)

De Hoge Gezondheidsraad is een federale dienst die deel uitmaakt van de FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Hij werd opgericht in 1849 en geeft wetenschappelijke adviezen i.v.m. de volksgezondheid aan de ministers van volksgezondheid en van leefmilieu, aan hun administraties en aan enkele agentschappen. Hij doet dit op vraag of op eigen initiatief. De HGR neemt geen beleidsbeslissingen, noch voert hij ze uit, maar hij probeert het beleid inzake volksgezondheid de weg te wijzen op basis van de recentste wetenschappelijk kennis.

Naast een intern secretariaat van een 25-tal medewerkers, doet de Raad beroep op een uitgebreid netwerk van meer dan 500 experten (universiteitsprofessoren, medewerkers van wetenschappelijke instellingen, praktijk beoefenaars, enz.), waarvan er 300 tot expert van de Raad zijn benoemd; de experts komen in multidisciplinaire werkgroepen samen om de adviezen uit te werken.

Als officieel orgaan vindt de Hoge Gezondheidsraad het van fundamenteel belang de neutraliteit en onpartijdigheid te garanderen van de wetenschappelijke adviezen die hij aflevert. Daartoe heeft hij zich voorzien van een structuur, regels en procedures die toelaten doeltreffend tegemoet te komen aan deze behoeften bij iedere stap van het tot stand komen van de adviezen. De sleutelmomenten hierin zijn de voorafgaande analyse van de aanvraag, de aanduiding van de deskundigen voor de werkgroepen, het instellen van een systeem van beheer van mogelijke belangenconflicten (gebaseerd op belangenverklaringen, onderzoek van mogelijke belangenconflicten, en een referentiec comité) en de uiteindelijke validatie van de adviezen door het College (eindbeslissingsorgaan van de HGR, samengesteld uit 40 leden van de pool van benoemde experten). Dit coherent geheel moet toelaten adviezen af te leveren die gesteund zijn op de hoogst mogelijke beschikbare wetenschappelijke expertise binnen de grootst mogelijke onpartijdigheid.

De adviezen van de werkgroepen worden voorgelegd aan het College. Na validatie worden ze overgemaakt aan de aanvrager en aan de minister van volksgezondheid en worden de openbare adviezen gepubliceerd op de website (www.hgr-css.be), soms met een embargo periode van variabele duur voor vertrouwelijke adviezen of projecten m.b.t. een Koninklijk Besluit. Daarnaast wordt een aantal onder hen gecommuniceerd naar de pers en naar doelgroepen onder de beroepsbeoefenaars in de gezondheidssector.

De HGR is ook een actieve partner binnen het in opbouw zijnde EuSANH netwerk (*European Science Advisory Network for Health*), dat de bedoeling heeft adviezen uit te werken op Europees niveau.

Indien U op de hoogte wil blijven van de activiteiten en publicaties van de HGR kan U een mailtje sturen naar info.hgr-css@health.belgium.be.