

## NOTE TECHNIQUE PRO PHARMACOPOEA N° 1231

### NOTE RELATIVE AU CHAPITRE GÉNÉRAL PROPOSÉ

La cornée est la membrane transparente située à l'avant de l'œil. Elle peut être greffée à un receveur à partir de prélèvements issus de donneurs en post mortem (prélèvement dans les 24 heures suivant le décès) ou en prélèvement multi organes (PMO). Après prélèvement, parallèlement au contrôle sérologique du donneur la validation du greffon sur le plan sanitaire doit être réalisée. Cette validation comprend d'une part la détermination de la densité cellulaire endothéliale (2000 cellules /mm<sup>2</sup> requis) et d'autre part des contrôles bactériologiques et fongiques pour assurer la sécurité microbiologique. Le chapitre général proposé concerne le **contrôle bactériologique et fongique des greffons cornéens conservés en organoculture**. Il a été rédigé en prenant en compte l'expérience pratique des banques de cornée, des microbiologistes habituellement en charge de ce type de contrôle, de l'Afssaps exerçant des activités de contrôle en laboratoire et des études collaboratives, et ayant un rôle d'évaluation et autorisation des procédés dans ce domaine. Le chapitre général sera publié dans la Pharmacopée française à titre de recommandation et a été proposé comme support aux travaux de la Pharmacopée européenne où il est actuellement en cours d'étude dans un contexte de contrôle des tissus.

### CONTRÔLE BACTÉRIOLOGIQUE ET FONGIQUE DES GREFFONS CORNÉENS CONSERVÉS EN ORGANOCULTURE

Le contrôle bactériologique et fongique des greffons cornéens, s'effectue par une prise d'échantillon du milieu d'organoculture. Il peut être effectué par méthode conventionnelle ou à l'aide d'un système automatisé, ce dernier permettant en général d'obtenir des résultats plus rapidement.

Un contrôle bactériologique et fongique positif doit entraîner l'élimination systématique de la cornée d'un usage thérapeutique.

Avant distribution d'un greffon cornéen, il est recommandé de disposer des résultats définitifs du contrôle bactériologique et fongique du milieu de prélèvement ainsi que de résultats, même intermédiaires, du milieu de conservation ayant contenu le greffon.

Dans le cas où le délai pour l'obtention des résultats définitifs du contrôle bactériologique et fongique du milieu de conservation n'est pas compatible avec la date de distribution du greffon, il est souhaitable d'utiliser une technique suffisamment sensible et rapide telle que les techniques automatisées pour hémoculture.

De plus, au moment de la greffe, il est recommandé d'effectuer un contrôle bactériologique et fongique du milieu de déturgescence et/ou de l'anneau cornéo-scléral résiduel.

### PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES

L'essai est réalisé dans des conditions d'asepsie, selon les réglementations en vigueur concernant les matières potentiellement infectieuses.

Les précautions prises pour éviter une contamination microbienne ne doivent pas affecter les microorganismes recherchés. L'essai est réalisé dans des conditions régulièrement vérifiées par des prélèvements adéquats effectués dans la zone de travail et par des contrôles appropriés.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

2011.

56 **VALIDATION DES MILIEUX DE CULTURE POUR MICROORGANISMES**

57 Un contrôle de stérilité et un essai de fertilité sont effectués sur chaque lot de milieu par le  
 58 fournisseur et/ou l'utilisateur.

60 **Contrôle de stérilité des milieux**

61 Confirmez la stérilité de chaque lot de milieu, par incubation de 2 récipients d'essai de chaque  
 62 milieu de culture représentatifs à 35-37 °C pendant au moins 7 jours plus un milieu à 20-25 °C  
 63 destiné à la détection des moisissures ne cultivant pas à 37 °C.

65 **Essai de fertilité**

66 Effectuer l'essai de fertilité sur chaque lot de milieu en ensemençant au moins 2 milieux de  
 67 culture enrichis appropriés destinés à la détection des bactéries aérobies et anaérobies, des  
 68 levures et des moisissures avec 10-100 microorganismes viables de chacun des genres  
 69 bactériens cités dans le tableau-1 (Les espèces sont précisées à titre d'exemples) puis en  
 70 incubant à température et délais appropriés.

72 Résultat : Les milieux de culture sont satisfaisants si une croissance est clairement observée  
 73 pendant cette période d'incubation dans les milieuxensemencés.

76 Tableau-1. – Exemples de microorganismes à utiliser pour l'essai de fertilité des milieux  
 77 de culture pour microorganismes

<b>Milieu aérobie</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Par exemple, ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	Par exemple, ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Par exemple ATCC 9027, CIP 82.118, NCIMB 8626,
<i>Candida albicans</i>	Par exemple, ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<b>Milieu anaérobie</b>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	Par exemple, ATCC 19404, CIP79.3, NCTC532 ou ATCC 11437
<i>Bacteroides fragilis</i>	Par exemple, ATCC 25285, CIP77.16, NCTC9343
<b>Milieu pour Recherche de Moisissures</b>	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Par exemple ATCC 16404, IP 143183, IMI 149007

79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85

**VALIDATION DE LA MÉTHODE**

Sauf exception justifiée et autorisée, le système d'essai choisi est validé en termes de  
 spécificité (absence de résultats faussement positifs), de sensibilité (limite de détection) et de  
 reproductibilité. Lors de la validation et notamment pour la détermination de la limite de  
 détection, l'essai est effectué sur la préparation délibérément contaminée, à des degrés divers,

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

**2011.**

86 avec des microorganismes choisis pour leur probabilité d'être contaminants des prélèvements  
87 cornéens et leurs exigences de croissance par exemple :

- 88
- 89 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
- 90 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, CIP 82.118, NCIMB 8626
- 91 - *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 29837
- 92 - *Escherichia coli* ATCC 25922
- 93 - *Candida albicans* ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
- 94 - *Penicillium expansum* UMIP 1668.86
- 95 - *Propionibacterium acnes* ATCC 11628
- 96 - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, CIP 104340, NCTC 12977
- 97 - *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, IP 143183, IMI 149007

98

99 D'autres approches de validation peuvent également être utilisées, par exemple, la  
100 comparaison inter-laboratoires.

101

102

### 103 **ESSAI DE LA PRÉPARATION À EXAMINER**

104

#### 105 **Milieu de culture pour microorganismes**

106 Les milieux choisis et validés comme précédemment décrits comporteront à minima un milieu  
107 de culture pour germes aérobies et un milieu de culture pour germes anaérobies. Ces milieux  
108 permettront également la culture des levures. Le milieu de culture permettant la recherche  
109 spécifique des moisissures incubé à température ambiante ou si nécessaire à 20-25 °C est  
110 recommandé.

111 L'utilisation des techniques d'hémocultures sont à privilégier et notamment dans la mesure du  
112 possible, les techniques automatisées qui par leur système d'agitation et de lecture en continu  
113 permettent un rendu plus rapide des résultats.

114

#### 115 **Echantillon : Milieu d'organoculture**

116 Un échantillon représentatif du milieu de transport, de conservation et/ou de déturgescence de  
117 la cornée est examiné. Une fois prélevé, l'échantillon est ajouté dès que possible aux milieux  
118 de culture précédemment validés. Le volume d'échantillon ensemencé dans chacun des milieux  
119 doit être représentatif de la quantité de milieu à contrôler et respecter les indications données  
120 par les fabricants de milieux d'hémoculture et autres milieux. Sont recommandés un volume  
121 minimal de **5 à 10 mL** pour les milieux dédiés d'un automate d'hémoculture, de **1 à 5 mL** pour  
122 un milieu liquide (tenir compte du volume final du récipient) et d'au minimum **100 µL** pour les  
123 milieux solides (ex boîte de Pétri). Il est recommandé de ne pas omettre d'ensemencer un  
124 milieu pour recherche des moisissures (par exemple, un milieu Sabouraud incubé à 20-25 °C).

125

126 Un contrôle visuel du milieu d'organoculture et de la cornée doit être réalisé à chaque étape du  
127 procédé de conservation des cornées. Ce contrôle visuel est réalisé dans le but de détecter tout  
128 changement de couleur et de pousse du milieu d'organoculture ainsi que la mise en évidence  
129 d'éventuels éléments mycéliens et/ou levures. De même, pour les laboratoires ou banques qui  
130 n'ensemenceraient pas de milieux spécifiques des moisissures et levures, il est recommandé  
131 de renforcer leur attention sur l'observation des milieux d'organoculture conservé à 22°C après  
132 ensemencement des contrôles microbiologiques dans leur laboratoire.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

**2011.**

133 **Analyse**

134 Pour les milieux d'hémoculture, les milieux sont incubés à 35-37 °C pendant au moins 7 ou 14  
135 jours, en fonction du système de détection utilisé (respectivement automatisé ou manuel).

136 Le milieu spécifique des moisissures et des levures doit être incubé à température ambiante ou  
137 si nécessaire à 20-25 °C.

138 Pour les méthodes conventionnelles, les milieux liquides sont incubés à 35-37 °C pendant au  
139 moins 10 jours et les milieux solides à 35-37 °C pendant 5 jours.

140

141

142 **OBSERVATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

143 Examinez les milieux, visuellement 1 fois par jour ou à l'aide de systèmes automatisés, et à la  
144 fin de la période d'observation, pour détecter des signes éventuels de croissance microbienne.

145 S'il n'est pas observé de croissance microbienne à la fin de la période d'observation, le produit  
146 est « négatif en culture » à la limite de détection. Si une croissance est observée dans le cadre  
147 d'un essai valide, le produit est « positif en culture ».

148 Il est recommandé d'identifier le contaminant à un niveau taxonomique approprié (genre,  
149 espèce) et un antibiogramme est établi en cas de résultat positif en post-greffe.

150

151 Selon le type d'organisation, la collaboration de la banque de cornée et du laboratoire de  
152 microbiologie en charge du contrôle devra être optimisée car la banque demandera, dès  
153 l'apparition d'un trouble dans le milieu d'organoculture, un isolement du contaminant et une  
154 identification éventuelle du germe responsable de la contamination.

155

156

157 **CONSERVATION DES SOUCHES MICROBIENNES**

158 Il est recommandé de conserver les souches isolées lors des contrôles microbiologiques dans  
159 une souchothèque respectant les conditions opératoires définies par les normes européennes  
160 en vigueur. Cette souchothèque peut permettre de mettre en évidence un dysfonctionnement  
161 (exemple : contamination environnementale ayant impacté plusieurs prélèvements de cornée).

162