

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

Cet essai est publié à titre de recommandation.

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

Avant la distribution du greffon, il est recommandé de réaliser 2 contrôles dont les résultats doivent être disponibles :

- Un contrôle bactériologique et fongique du milieu dans lequel la cornée a été conditionnée lors du prélèvement avec résultat définitif (germe identifié) ;
- Un contrôle bactériologique du milieu de conservation au moment de la mise en déturgescence avec résultat intermédiaire en privilégiant une technique suffisamment sensible 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.

### **PRÉCAUTIONS GÉNÉRALES**

Le contrôle bactériologique et fongique 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. Le contrôle bactériologique et fongique est réalisé dans des conditions régulièrement vérifiées par des prélèvements adéquats effectués dans la zone de travail et par des contrôles appropriés.

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

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

#### **Contrôle de stérilité des milieux**

Vérifiez la stérilité de chaque lot de milieu, par incubation de 2 récipients d'essai de chaque milieu de culture représentatifs à 35-37 °C pendant au moins 4 jours en milieu solide et 7 jours en milieu liquide plus un milieu à 20-25 °C destiné à la détection des moisissures ne cultivant pas à 37 °C.

#### **Essai de fertilité**

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

---

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

Résultat : L'essai de fertilité est satisfaisant si une croissance est observée pendant la durée d'incubation dans les milieux ensemencés.

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

---

### Milieu aérobie

---

<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

---

### Milieu anaérobie

---

<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

---

### Milieu pour Recherche de Moisissures

---

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	par exemple ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
---------------------------------	--

---

## 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 différentes concentrations, avec des microorganismes choisis pour leur probabilité d'être contaminants des prélèvements cornéens et leurs exigences de croissance par exemple :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, CIP 82.118, NCIMB 8626
- *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 29837
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Candida albicans* ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
- *Penicillium expansum* UMIP 1668.86
- *Propionibacterium acnes* ATCC 11628
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, CIP 104340, NCTC 12977
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007

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

---

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

## ESSAI DES ÉCHANTILLONS À EXAMINER

### Milieu de culture pour microorganismes

Les milieux choisis et validés comme précédemment décrits comporteront *a minima* un milieu de culture pour germes aérobies et un milieu de culture pour germes anaérobies. Ces milieux permettront également la culture des levures. Un milieu de culture permettant la recherche spécifique des moisissures incubé à 20-25 °C est recommandé (par exemple, un milieu Sabouraud).

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

### Échantillon

Un échantillon représentatif du milieu d'organoculture est examiné.

Une fois prélevé, l'échantillon est ajouté dès que possible aux milieux de culture précédemment validés. Le volume d'échantillon ensemencé dans chacun des milieux doit être représentatif de la quantité de milieu à contrôler et doit respecter les indications données par les fabricants de milieux d'hémoculture et autres milieux. Sont recommandés un volume minimal de 5 mL à 10 mL pour les flacons d'hémoculture, de 1 mL à 5 mL pour les autres milieux liquides (tenez compte du volume final du récipient) et d'au minimum 100 µL pour les milieux solides (ex boîte de Pétri).

Un contrôle visuel du milieu d'organoculture et de la cornée est réalisé à chaque étape du procédé de conservation des cornées. Ce contrôle visuel est effectué dans le but de détecter tout changement de couleur et de transparence/turbidité du milieu d'organoculture ainsi que la mise en évidence d'éventuels éléments mycéliens et/ou levures.

### Analyse

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

Le milieu spécifique des moisissures et des levures est incubé à 20-25 °C pendant au moins 10 jours.

Pour les méthodes conventionnelles, les milieux liquides sont incubés à 35-37 °C pendant au moins 10 jours et les milieux solides à 35-37 °C pendant au moins 3 jours.

## OBSERVATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Examinez les milieux, visuellement 1 fois par jour ou à l'aide de systèmes automatisés, et à la fin de la période d'observation, pour détecter des signes éventuels de croissance microbienne. S'il n'est pas observé de croissance microbienne à la fin de la période d'observation, le produit est « négatif en culture » à la limite de détection. Si une croissance est observée dans le cadre d'un essai valide, le produit est « positif en culture ».

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

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

---

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

### **CONSERVATION DES SOUCHES MICROBIENNES**

Il est recommandé de conserver les souches isolées lors des contrôles microbiologiques pour les cornées greffées dans une souchothèque respectant les conditions opératoires définies par les normes européennes en vigueur pendant un minimum de 2 ou 3 mois. Cette souchothèque peut permettre de mettre en évidence un dysfonctionnement (exemple : contamination environnementale ayant impacté plusieurs prélèvements de cornée).

---

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