

Microbiologische validatie van aseptische handelingen: wat zijn de criteria?

Frits A. Boom ^{a*}, Hans van Doorne ^b en Josee E. Moes-ten Hove ^c

^a Ziekenhuisapotheker, Apotheek Zaans Medisch Centrum, Zaandam.

^b Universitair docent, afdeling Farmaceutische technologie en Biofarmacie, Rijksuniversiteit Groningen.

^c Ziekenhuisapotheker in opleiding, Apotheek Zaans Medisch Centrum, Zaandam / afdeling Klinische Farmacologie en Apotheek, VU Medisch Centrum, Amsterdam.

* Correspondentie: boom.f@zaansmc.nl.

KERNPUNTEN

- Bij de validatie van aseptische handelingen moeten, net als bij aseptische bereidingen, corrigerende maatregelen bij groei afhankelijk zijn van het aantal simulaties zonder groei.
- Een curve die bij een simulatie zonder groei stijgt met 1 punt en bij een simulatie met groei daalt met 100 punten, is een praktisch hulpmiddel om de validatie van aseptische handelingen te beoordelen en corrigerende acties in te zetten in geval van groei.

Inleiding

Aseptische handelingen zijn handelingen om steriele geneesmiddelen voor toediening gereed te maken [1]. Kenmerken zijn: steriele producten als uitgangsmateriaal, verwerking grotendeels in gesloten systemen, korte duur van de bereiding en korte bewaartermijn voor toediening. De charges zijn klein, ze zijn bestemd voor individuele patiënten en ze bestaan uit één of enkele eenheden.

Complexe aseptische handelingen moeten gevalideerd worden [1]. Bij die validatie wordt de bereiding nagebootst met een vloeibaar voedingsmedium, vaak Trypticase Soya Broth Ph. Eur. (TSB). De TSB-simulatie dient alle kritische stappen te omvatten die bij aseptische handelingen voorkomen [2]. Hierbij moet men denken aan een vloeistof opzuigen uit een ampul, infuus of injectieflacon, een vloeistof toevoegen via een bijspuitpunt of via een *spike-luer lock set*, gebruik van een filternaald en/of gebruik van een drielwegkraan, enzovoort. Omdat al deze kritische stappen niet in één TSB-simulatie zijn samen te brengen zijn er meestal meerdere TSB-simulaties in gebruik [2].

In de LNA-procedure *Validatie aseptische werkwijze* staat dat de bereiding met TSB dagelijks moet worden uitgevoerd, aansluitend aan een bereiding of bereidingsperiode, of periodiek door middel van een aantal TSB-simulaties achter elkaar [2]. Het met TSB verkregen product wordt bebroed bij 30°C en na veertien dagen beoordeeld op groei. Als de status van andere variabelen (ruimte, apparatuur, procedures) constant gehouden wordt, mogen de uitslagen van de TSB-simulaties bij elkaar worden opgeteld zodat op den duur informatie wordt verkregen over het gehele proces

ABSTRACT

Microbiological validation of aseptic compounding: what are the criteria?

OBJECTIVE

To introduce a simple method for judging the validation results of aseptic compounding. Aseptic compounding is validated by a simulation with an appropriate broth solution, typically Trypticase Soya Broth. The simulation should comprise all critical steps of aseptic compounding. The frequency is one simulation every day, at the end of an aseptic compounding session. The current acceptance criteria for the validation, as described in the Dutch GMP for Hospital Pharmacy (contamination level $\leq 1\%$, 95% confidence), are misleading because microbial contamination is not a random process.

DESIGN AND METHODS

We developed a validation curve, which rises 1 unit after a simulation without growth and falls 100 units after a simulation with growth. The maximum is fixed at 299 and the minimum at 0. Three levels of performance are distinguished. Just as with the validation of aseptic manufacturing, corrective measures in case of growth are made dependent on the total number of simulations without growth. After every simulation the results are introduced into an Excel file which then gives the adjusted validation curve. This curve shows how well the validation works out and it indicates which corrective measures need to be taken in case of a positive simulation.

RESULTS

With appropriate aseptic techniques less than 1 simulation with growth out of 500 is possible.

CONCLUSION

The validation curve is an easy and practical tool for judging the quality of aseptic compounding and for taking corrective measures in case of growth.

Boom FA, van Doorne H, Moes-ten Hove JE. Microbiologische validatie van aseptische handelingen: wat zijn de criteria? PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:a1219.

van aseptische handelingen. Men spreekt in dat geval van een systeem van continue monsternamen [3].

De microbiologische validatie van de aseptische handelingen is afgeleid van de validatie van industriële aseptische bereidingen, zoals onder andere beschreven in *Technical report 22* van de Parenteral Drug Association [4]. Richtsnoer 69 van Annex 1 van de Europese richtlijnen voor *good manufacturing practice* (EU-GMP) noemt eisen waaraan deze validatie moet voldoen [5]. Ook worden de te

nemen maatregelen genoemd in geval van één of meer monsters met groei (zie kader). Het gaat bij de validatie van aseptische bereidingen om relatief grote charges. Treedt er bij een charge-grootte van minder dan 5000 uitgevulde eenheden groei op in minimaal één eenheid, dan moet de productie worden stopgezet en is hervalidatie nodig. Voor aseptische handelingen, waar bij één TSB-simulatie per werkdag in totaal dus circa 250 TSB-simulaties per jaar worden uitgevoerd, duurt het twintig jaar voordat er 5000 eenheden zijn uitgevuld. Gedurende die twintig jaar moet er, als de criteria van richtsnoer 69 worden toegepast, worden gestopt met aseptische handelingen bij groei en mag er pas weer worden gestart als het resultaat van de hervalidatie in orde is. Uit het oogpunt van zorgcontinuïteit is dit ongewenst, vandaar dat in het hoofdstuk *Aseptische handelingen* van de GMP-Ziekenhuisfarmacie criteria worden genoemd die beter passen bij de omvang van de aseptisch handelingen, namelijk kans op contaminatie < 1% met 95% betrouwbaarheid [1].

De huidige criteria voor de microbiologische validatie van aseptische bereidingen (zie kader) hebben de oorspronkelijke criteria (kans op contaminatie < 0,1% met 95% betrouwbaarheid) vervangen. De achtergrond voor deze wijziging is het feit dat het optreden van een contaminatie een proces is dat geen statistische wetmatigheden volgt. Een besmetting kan immers het gevolg zijn van een groot aantal factoren, waaronder een onjuiste handeling van een medewerker of een verstoring van de achtergrondruimte. Deze incidenten treden niet op met een vaste frequentie. Het gebruikte statistische model (Poisson-verdeling) is dus niet juist. Aangezien bij de criteria die worden gehanteerd in het hoofdstuk *Aseptische handelingen* van de GMP-Ziekenhuisfarmacie, uitgegaan is van hetzelfde statistische model, is er ook voor deze criteria geen wetenschappelijke onderbouwing.

Wij stellen daarom in dit artikel nieuwe criteria voor waarbij, net als in richtsnoer 69 van de GMP, de corrigerende maatregelen afhankelijk worden gemaakt van het aantal TSB-simulaties zonder groei. We zetten daarbij de resultaten in een curve, die we de naam 'validatiecurve' geven. De criteria worden aan de hand van resultaten uit vier ziekenhuisapotheken getoetst op praktische toepasbaarheid. Ten slotte bespreken wij in hoeverre met deze nieuwe criteria de veiligheid van aseptische handelingen is geborgd.

Validatiecurve en corrigerende acties bij groei

Figuur 1 is een voorbeeld van een fictieve validatiecurve. De x-as geeft het aantal TSB-simulaties. De waarde op de y-as (score) stijgt met 1 punt bij een TSB-simulatie zonder groei en daalt met 100 punten bij een TSB-simulatie met groei. Wij geven de validatiecurve drie niveaus: niveau 1 van 0 t/m 100, niveau 2 van 101 t/m 200 en niveau 3 van 201 t/m 299 (zie figuur 1). Het niveau waar de curve na een TSB-simulatie met groei uitkomt, bepaalt de corrigerende maatregelen die moeten worden ingezet. Voor de verschillende niveaus stellen wij het volgende voor.

Niveau 3: geen maatregelen nodig; het bereidingsproces is onder controle.

Niveau 2: onderzoek gericht op de bron van de besmetting, zoals identificeren van het (de) aangetroffen micro-organisme(n) en nagaan of de resultaten van microbiologische monitoring en persoonsgebonden kwalificatie afwijken van het normale patroon.

RICHTSNOER 69 VAN ANNEX 1 VAN DE EU-GMP

The number of containers used for media fills should be sufficient to enable a valid evaluation. For small batches, the number of containers for media fills should at least equal the size of the product batch. The target should be zero growth and the following should apply:

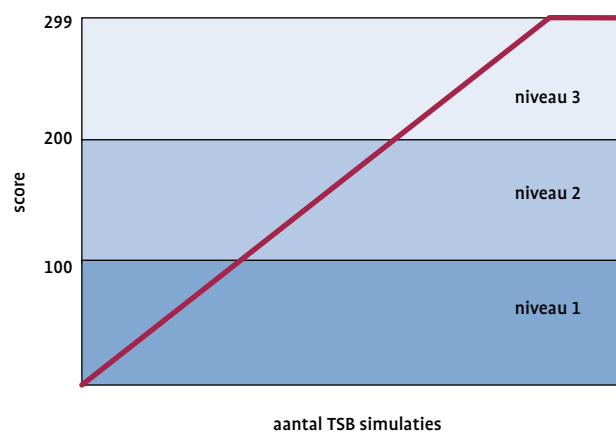
- When filling fewer than 5,000 units, no contaminated units should be detected.
- When filling 5,000 to 10,000 units:
 - a) One (1) contaminated unit should result in an investigation, including consideration of a repeat media fill;
 - b) Two (2) contaminated units are considered cause for revalidation, following investigation.
- When filling more than 10,000 units:
 - a) One (1) contaminated unit should result in an investigation;
 - b) Two (2) contaminated units are considered cause for revalidation, following investigation.

Niveau 1: onderzoek (als bij niveau 2), beoordelen van de werkwijze via bijvoorbeeld een interne audit en binnen een maand de betreffende TSB-simulatie door 5 verschillende medewerkers die aseptische handelingen doen, 5 maal laten uitvoeren. Als één van deze 25 TSB-simulaties positief wordt, daalt de validatiecurve nogmaals met 100 en zijn de maatregelen nodig die bij niveau < 1 worden genoemd.

Niveau < 1 (de curve eindigt op 0): de werkwijze onderzoeken en beoordelen (als bij niveau 1) en binnen een maand de bewuste TSB-simulatie door iedere medewerker die aseptische handelingen doet, 10 maal laten uitvoeren. Degene die hierin een positieve TSB-simulatie heeft, moet tijdelijk stoppen met aseptische handelingen.

FIGUUR 1

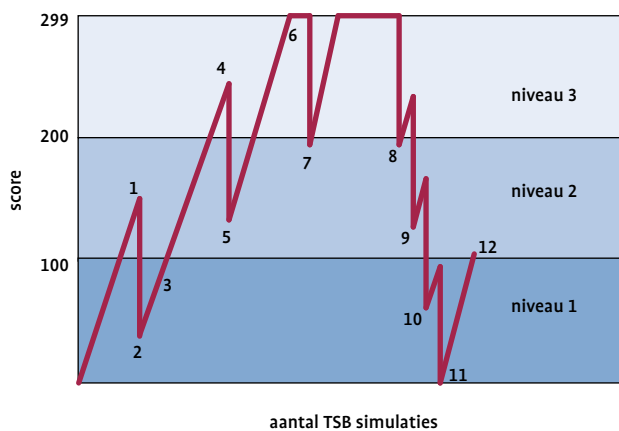
Validatiecurve voor aseptische handelingen
De doorlopende lijn is het resultaat van simulaties waarin geen groei is opgetreden.



Zie de tekst voor de beschrijving van de niveaus.

FIGUUR 2

Voorbeeld van een validatiecurve met een aantal positieve simulaties



Zie de tekst voor de beschrijving van de niveaus.

lingen. Hij/zij moet extra worden geschoold en vervolgens laten zien dat hij/zij adequaat aseptische handelingen kan uitvoeren (persoonsgebonden kwalificatie en tienvoudige herhaling van iedere TSB-simulatie).

De validatiecurve is bewust op een maximum van 299 gezet. Bij groei komt de curve dan altijd in niveau 2 met de daarbij behorende controlerende en corrigerende acties.

Als illustratie kan het voorbeeld van figuur 2 dienen. Na 150 TSB-simulaties wordt een uitslag positief (punt 1, figuur 2). De validatiecurve daalt naar 50 (punt 2) en de acties die horen bij niveau 1 worden uitgevoerd. Door de 5 TSB-simulaties door 5 verschillende medewerkers stijgt de validatiecurve met 25 punten naar 75 (punt 3). Na 175 TSB-simulaties zit de validatiecurve in niveau 3 (punt 4) en zakt hij bij een positieve TSB-simulatie terug naar niveau 2 (punt 5). Als er gedurende een langere tijd geen positieve TSB-simulatie komt, loopt de validatiecurve op tot het maximum van 299 (punt 6). Ook dan zakt hij bij een positieve TSB-simulatie terug naar niveau 2 (punt 7). Zijn er meerdere positieven kort achter elkaar (punten 8 t/m 11) dan kan de validatiecurve dalen tot onder niveau 1 (punt 11). Als er 10 medewerkers zijn die aseptische handelingen doen, moeten die in dat geval allemaal 10 maal een TSB-simulatie uitvoeren. Op die manier zit men weer snel in niveau 2 (punt 12).

Verwerking van de resultaten

De resultaten van de TSB-simulaties worden in een Excel-bestand gezet waaruit een validatiecurve volgt. Elke keer als er nieuwe resultaten worden toegevoegd, wordt de validatiecurve bijgewerkt. Het Excel-bestand kan ook een tabel genereren waarin het totaal aantal TSB-simulaties en het totaal aantal TSB-simulaties met groei worden bijgehouden.

Figuur 3 toont de validatiecurves van werkelijke aseptische handelingen uit vier Nederlandse ziekenhuisapotheken. Ziekenhuizen A, B en C gebruiken voor de validatie twee verschillende TSB-simula-

ties (in figuur 3 aangeduid als soort 1 en soort 2) en ziekenhuis D gebruikt één TSB-simulatie (in figuur 3 aangeduid als soort 1). Tabel 1 geeft het totale aantal TSB-simulaties per soort en het aantal positieven. Ziekenhuizen A en C scoren het beste. Beide hebben in het begin bij één van de TSB-simulaties een positief monster en zakken daardoor naar niveau 1 respectievelijk niveau < 1. Ziekenhuizen B en D hebben regelmatig een positieve TSB-simulatie. Bij ziekenhuis B zijn bij soort 2 kort na elkaar twee TSB-simulaties positief (nummers 863 en 865). Na de eerste zakt de validatiecurve naar 199 (niveau 2). Twee TSB-simulaties later is er weer een positieve uitkomst; de validatiecurve zakt dan naar precies 100 (niveau 1).

Beschouwing

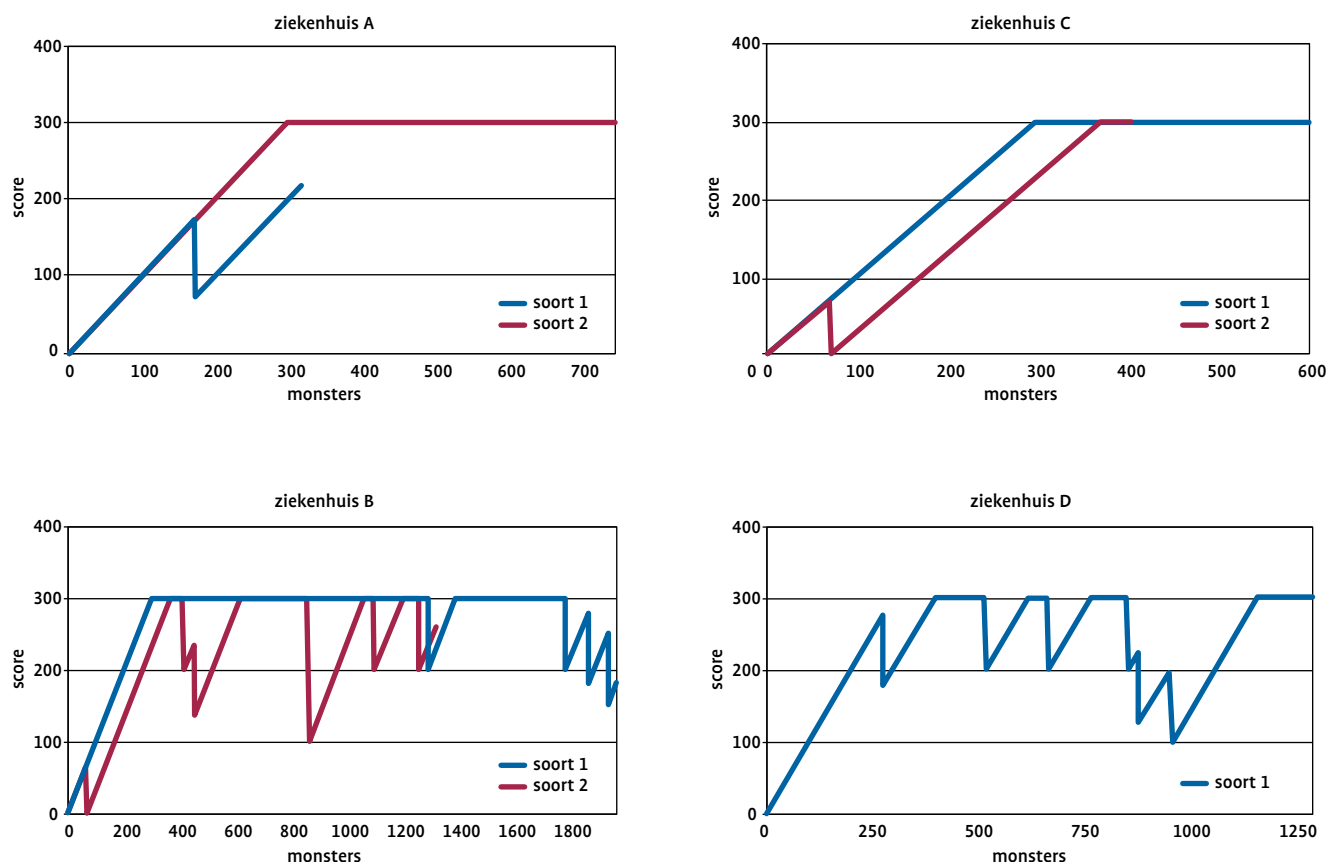
In de EU-richtlijnen voor GMP staat dat een monster met groei altijd moet leiden tot actie [5]. Net als in de EU-GMP hebben wij die actie afhankelijk gemaakt van het aantal TSB-simulaties zonder groei. Samengevat bestaan deze uit onderzoek naar de bron, beoordeling van de werkwijze en bij terugval naar niveau 1 of niveau < 1 uitvoering van een aantal TSB-simulaties in korte tijd. Het in korte tijd uitvoeren is van belang om snel in het veiliger niveau 2 te komen. Consequent doorredenerend zou men ook bij de start van de validatie van de aseptische werkwijze en bij een herziening van een bestaande TSB-simulatie snel in het veiliger niveau 2 moeten komen. Daarvoor is een initiële validatie nodig met bijvoorbeeld de aantallen TSB-simulaties die genoemd worden bij niveau < 1: iedere medewerker die aseptische handelingen doet, 10 maal de TSB-simulatie laten uitvoeren. Wij pleiten ervoor dit op te nemen in de LNA-procedure *Validatie aseptische werkwijze* [2]. Bij de keuze van de hoogte van de niveaus hebben vooral praktische overwegingen een rol gespeeld. Inclusief initiële validatie zal men bij één TSB-simulatie per werkdag en geen groei, binnen een jaar op niveau 3 zitten. Het proces is dan onder controle (zie hierboven) en de risico's voor de patiënt zijn dan gering (zie hieronder).

In de literatuur wordt geadviseerd de containers met de TSB-simulaties slechts ten dele te vullen, zodat er voldoende zuurstof aanwezig is om groei mogelijk te maken [6]. De TSB-oplossing op zich bevat echter meer dan voldoende zuurstof voor het laten groeien van aerobe micro-organismen; slechts gedeeltelijk vullen van de containers is niet nodig. Wel is het belangrijk dat het eindproduct onderzocht wordt op groeibevorderende eigenschappen met behulp van ATCC-stammen van *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* en *Aspergillus niger*. Geadviseerd wordt dit onderzoek te laten uitvoeren door een laboratorium dat daar de nodige ervaring mee heeft [2].

Agalloco en anderen plaatsen vraagtekens bij de kwaliteit van aseptische processen die grotendeels handmatig worden uitgevoerd en pleiten voor alternatieven ("Manual filling could no longer be considered good manufacturing practice") [7]. Vanuit het perspectief van de farmaceutische industrie is dat een logische gedachte. Bij het invullen van grote series van één en hetzelfde product kan afvulapparatuur op maat worden gemaakt en kan door toepassing van isolatortechnologie de factor mens als potentiële contaminatiebron volledig worden uitgeschakeld. Aseptische

FIGUUR 3

Validatiecurves van aseptische handelingen uit vier ziekenhuisapotheken



handelingen automatiseren kan met robots [8]. Deze zijn echter nog maar op beperkte schaal beschikbaar en onvoldoende ontwikkeld om alle aseptische handelingen op termijn te kunnen overnemen [9]. Voorlopig zullen we ons dus nog moeten 'behelpen' met het handmatige proces. Toepassing van isolatoren kan dit proces verder optimaliseren [10, 11]. In tegenstelling tot de ons omringende landen slaat deze technologie in Nederlandse ziekenhuisapotheken echter nog niet aan.

Ziekenhuizen A en C laten zien dat het mogelijk is de validatiecurve min of meer continu op 299 te houden en een contaminatieniveau te realiseren van minder dan 1 op 500 TSB-simulaties. De vraag is of dit contaminatieniveau en de in te zetten acties bij een positieve TSB-simulatie, voldoende veiligheid geven voor de patiënt. Deze vraag is in absolute zin niet te beantwoorden. Voor toediening gereedmaken van parenteralia houdt een zeker risico in. Daar staat tegenover dat het therapeutisch effect van de op deze manier bereide producten vaststaat en soms levensreddend is.

Verder dient men te beseffen dat validatie met een TSB-simulatie een worstcasebenadering is. Micro-organismen groeien in de meeste parenterale geneesmiddelen slecht en in de parenteralia waarin ze wel groeien, beperkt de groei zich tot gramnegatieve micro-organismen [12]. Dat is op zich gunstig, omdat de kans op

een besmetting tijdens aseptische handelingen met een gram-negatief micro-organisme veel kleiner is dan de kans op een besmetting met een grampositief micro-organisme [13]. In parenteralia in emulsievorm, zoals totale parenterale voeding en propofol-injecties, groeien echter ook grampositieve micro-organismen [14, 15].

Ook moet men zich in het kader van risico-evaluatie realiseren dat voor toediening gereedgemaakte parenterale geneesmiddelen

TABEL 1

Resultaten van simulaties uit vier ziekenhuisapotheken

Ziekenhuis	Simulatie soort	aantal	positief
A	1	317	1
	2	745	0
B	1	1971	4
	2	1322	7
C	1	600	0
	2	400	1
D	1	1287	6

direct worden toegediend of maximaal vier weken worden bewaard in de koelkast [1]. Mocht er dus tijdens het voor toediening gereedmaken een besmetting optreden, dan is de kans heel laag dat deze besmetting uitgroeit tot aantallen micro-organismen die voor de patiënt schadelijk zijn.

Concluderend kunnen we stellen dat de validatiecurve een eenvoudig en praktisch hulpmiddel is om de validatie van aseptische handelingen te beoordelen en corrigerende acties in te zetten in geval van groei.

LITERATUUR

- 1 GMP-Ziekenhuisfarmacie. Z3 Aseptische handelingen. Den Haag: Nederlandse Vereniging van Ziekenhuisapothekers; 2005. www.znvza.nl/uploaddb/download_object.asp?atoom=11151&VolgNr=34. Geraadpleegd 2012 januari 12.
- 2 Validatie aseptische werkwijze. LNA-procedure F11-10. versie 4.0. Den Haag: Laboratorium der Nederlandse Apothekers; 2010. <http://kennisbank.knmp.nl/index.asp>. Geraadpleegd 2012 januari 12.
- 3 Kraus JJAM, Vermeij P. Verantwoorde monsternamen bij de controle van aseptische werkomstandigheden in (ziekenhuis)apotheken. Pharm Weekbl. 1986;121:370-6.
- 4 Process simulation for aseptically filled products. Technical report no. 22 (revised 2011). Bethesda: Parenteral Drug Association; 2011.
- 5 EU Guidelines to good manufacturing practice – medicinal products for human and veterinary use. Annex 1. Manufacture of sterile medicinal products. Brussel: Europese Commissie; 2008. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf. Geraadpleegd 2012 januari 12.
- 6 Lowery SA, Mueller M. Designing and validating a contamination control program. In: Moldenhauer J, red. Environmental Monitoring – a comprehensive handbook. Volume 4. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2010. p. 1-54.
- 7 Agalloco J, Akers J, Baseman H, et al. Risk management, cGMP, and the evolution of aseptic processing technology. PDA J Pharm Sci Technol. 2009;63(1):8-10.
- 8 I.V.Station®. The automated solution for compounding non-hazardous IV preparations. Bolzano: Health Robotics. www.health-robotics.com/en/solutions/i-v-station/. Geraadpleegd 2011 augustus 19.
- 9 Tribble DA. Minimizing human intervention in intravenous admixture practice. Am J Health Syst Pharm. 2010;67(5):389-90.
- 10 Agalloco J. Barriers, isolators and microbial control. PDA J Pharm Sci Technol. 1999;53(1):48-53.
- 11 van Essenberg M, Franssen EJJ, van Doorne H, et al. Hoe je microben er het beste buiten houdt. Microbiologische contaminatie tijdens cytostaticabereiding in veiligheidswerkbank en isolator. Pharm Weekbl. 2003;138:434-6.
- 12 Whyte W, Niven L, Bell ND. Microbial growth in small-volume pharmaceuticals. J Parenter Sci Technol. 1989;43(5):208-12.
- 13 Whyte W, Bailey PV, Tinkler J, et al. An evaluation of the routes of bacterial contamination occurring during aseptic pharmaceutical manufacturing. J Parenter Sci Technol. 1982;36(3):102-7.
- 14 Scott EM, Gorman SP, Wyatt TD, Magill EA. Growth of microorganisms in total parenteral nutrition mixtures and related clinical observations. J Clin Hosp Pharm. 1985;10(1):79-88.
- 15 Lorenz IH, Kolbitsch C, Lass-Flörl C, et al. Routine handling of propofol prevents contamination as effectively as does strict adherence to the manufacturer's recommendations. Can J Anaesth. 2002;49(4):347-52.

Impact van obesitas op metabolisme en klaring

Bart van den Bemt

Wereldwijd neemt de prevalentie van obesitas sterk toe, bij zowel ouderen als kinderen. In Europa wordt die prevalentie geschat op 9-29% van de bevolking. Door verschillende (patho)fysiologische veranderingen heeft obesitas ook effect op farmacokinetiek en op (bij)effecten van geneesmiddelen. Zo zijn bij obese patiënten de hoeveelheid lichaamsvet en het bloedvolume toegenomen. Daarnaast komt *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) bij obese patiënten frequent voor, met geschatte prevalenties van 20% bij obese patiënten en 50% bij morbide obese patiënten. NASH beïnvloedt de leverenzymactiviteit, waardoor sommige CYP-enzymen geüpreguleerd en andere gedownreguleerd worden. In een indrukwekkend overzichtsartikel hebben Brill e.a. de beschikbare gegevens over de invloed van obesitas op metabolisme en klaring van geneesmiddelen systematisch verzameld, om zo meer inzicht te krijgen in de impact van obesitas op geneesmiddelmetabolisme en eliminatie. Uit dit overzicht blijkt dat de invloed van obesitas sterk afhankelijk is van de specifieke metabole en eliminerende route.

Zo blijkt bij patiënten met obesitas de eliminatie door CYP3A4 doorgaans verminderd te zijn in vergelijking tot patiënten met een

normaal gewicht. Aan de andere kant lijkt bij obese patiënten de klaring van geneesmiddelen via CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 en CYP2D6 versneld te zijn, ofschoon studies met geneesmiddelen die relatief snel geklaard worden (en derhalve een hoge extractieratio hebben) tegenstrijdig zijn. Bij obese patiënten lijkt de eliminatie van geneesmiddelen die geklaard worden via uridinedifosfaatglucuronosyltransferase (UGT), xanthineoxidase, N-acetyltransferase, glomerulaire filtratie of tubulaire secretie sneller te verlopen. De invloed van obesitas op tubulaire reabsorptie is nog onduidelijk. Helaas zijn er op dit moment nog onvoldoende studies die kijken naar de kinetiek bij obese kinderen.

Brill MJ, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker JN, Knibbe CA. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. Clin Pharmacokinet. 2012 mei 1;51(5):277-304.

van den Bemt B. Impact van obesitas op metabolisme en klaring. PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:e1215.