

Validatie van kiemgetalbepaling m.b.v. membraanfiltratie

Claudia Paalvast
Laboratorium Apotheek Haagse Ziekenhuizen

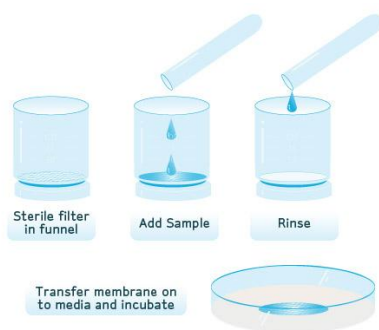
Inleiding

Kiemgetalbepaling houdt in dat de in een materiaal aanwezige levende micro-organismen worden opgekweekt tot zichtbare kolonies, die vervolgens geteld kunnen worden. Hierbij wordt ervan uitgegaan dat een kolonie gevormd wordt uit één KVE of kolonievormende eenheid (Engels: CFU of Colony forming unit). Dit levert een kiemgetal op dat uitgedrukt wordt in KVE per volume-eenheid of KVE per massa-eenheid.

De belangrijkste reden voor het bepalen van het kiemgetal is risico-inventarisatie; men kan op basis van het kiemgetal een inschatting maken van eventueel aanwezige microbiële verontreiniging en daarmee van zowel het risico voor de patiënt die het eindproduct toegediend krijgt, als van de houdbaarheid van het product.

Kiemgetalbepaling met behulp van membraanfiltratie volgens Ph.Eur. 7.0 §2.6.12

De techniek van membraanfiltratie is gebaseerd op het principe van aseptische (vacuüm)filtratie van het gehomogeniseerde monster na eventuele voorbereiding over een microporeus membraan (figuur 1) met een maximale nominale poriëgrootte van 0,45 µm. Na filtratie wordt het membraan gespoeld met een geschikt spoelmiddel. Het aantal spoelstappen en het te gebruiken spoelmiddel is afhankelijk



Figuur 1: Membraanfiltratie (Bron: www.millipore.com)

van de samenstelling van het product en dient per product gevalideerd te worden. Na de spoelstappen wordt het membraan aseptisch overgebracht op vaste media. Belangrijk hierbij is dat er geen luchtballen aanwezig mogen zijn tussen het membraan en het medium. In elke serie monsters worden tevens een of meerdere negatieve controle monsters meegenomen ter controle op de uitvoering, met name op besmetting tijdens de uitvoering van de test. Uitvoering van een negatieve controle houdt in dat op dezelfde manier als de testmonsters een gesteriliseerde vloeistof, bijvoorbeeld het gebruikte oplosmiddel, wordt gefiltreerd en geïncubeerd. In negatieve controle monsters mag dan ook geen groei optreden.

Membraanfiltratie is bij uitstek geschikt voor de bepaling van het kiemgetal van waterige en wateroplosbare materialen. Het is de eerste keuze indien het materiaal groeiremmende eigenschappen bevat, zoals conserveermiddelen of antibiotica. Het is ongeschikt voor niet-oplosbare materialen, deze verstopen het membraan. Als alternatief dient dan de uitplaatmethode, dat wil zeggen: het monster direct op een vast medium brengen en verdelen over het gehele oppervlak.

Validatie

Waarom valideren? Om te bewijzen dat de gebruikte methode geschikt is om mogelijke



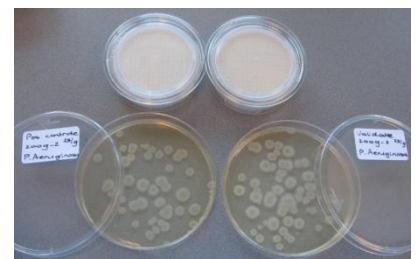
Figuur 2: Beënten van monster bij validatie

microbiologische besmetting aan te tonen.

Het is van belang eerst de methode te ontwikkelen, dus eerst te bepalen welk membraan er gebruikt gaat worden, of er een monstervoorbereiding plaatsvindt of dat gekozen wordt voor één of meerdere spoelstappen.

Voor de validatie wordt vervolgens het monster, na evt. voorbereiding, beënt met micro-

organismen. Deze micro-organismen staan beschreven in de Europese farmacopee. Ze worden toegevoegd aan het opgewerkte monster en aan een positieve controle. Dit is 'blanco' oplosmiddel of spoelmiddel, opgewerkt op dezelfde manier als het monster, maar zonder product. Het aantal micro-organismen dat wordt toegevoegd, het inoculum, mag niet groter zijn dan 100 KVE. Dit wordt meestal door middel van de uitplaatmethode bevestigd. Vervolgens wordt zowel van het te valideren product als van de positieve controles het kiemgetal bepaald volgens de van te voren ontwikkelde methode. Dit wordt herhaald voor alle voorgeschreven micro-organismen en evt. micro-organismen die geïsoleerd zijn uit de omgevingsmonitoring.



Figuur 3: Monsters van een validatie

Een praktijkvoorbeeld van een validatie

Het te valideren product is een drank, geconserveerd met methylparabeen.

Materiaal

- Vacuümfiltratie-opstelling Milliflex Plus® (Millipore)
- Disposable trechters 100 ml met cellulosemembranen, poriegrootte 0,45 µm (Millipore)
- Voorgevulde mediacassettes, Tryptone Soya Agar (=TSA) en Sabouraud Dextrose Agar met chlooramfenicol(=SDA) (Millipore)
- Oplosmiddel, steriel natriumchloride 0,9%, 100 ml (Braun®)
- Spoelmiddel, pepton 0,1% - tween 80 1%, 100 ml (Biotrading)
- Micro-organismen in suspensievorm (Microbiologics, via Biotrading)
- Petrischalen met media TSA en SDA
- Pipet met steriele pipetpunten, steriele L-vormige spreaders, spuit 10 ml

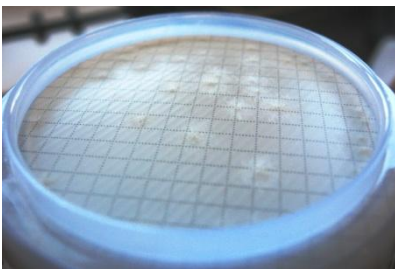
Methode

Dranken zijn vaak wat visceus, daarom wordt gekozen om 10 ml monster 1:10 te verdunnen met steriel natriumchloride 0,9%. Deze verdunning is voldoende om filtratie te vergemakkelijken maar niet voldoende om de groeiremmende werking van methylparabeen op te heffen. Daarom wordt gekozen voor een spoelstap met een geschikte spoelvloeistof. In dit geval pepton 0,1% - tween 80 1%.

Van het product worden aseptisch 5 identieke verdunningen gemaakt. Hieraan worden de inoculi toegevoegd. Parallel daaraan worden de inoculi toegevoegd aan 5 verschillende porties steriel 0,9% natriumchloride als positieve controle. De gevonden aantallen KVE in de positieve controle monsters gelden als referentiewaarden ten opzichte waarvan de recovery in de testmonsters wordt bepaald. De reden dat gekozen wordt voor verdunnen met 0,9% natriumchloride in plaats van water is dat water sterk hypotoon is. Dit zou kunnen leiden tot afsterving van de geënte micro-organismen door osmose, nog voordat de kiemgetalbepaling is uitgevoerd.

De opgewerkte monsters en de positieve controles worden parallel gefiltreerd, d.w.z. beënt monster en direct daar achteraan de bijbehorende positieve controle.

Vervolgens worden de membranen op de cassettes gebracht volgens tabel 1 en worden alle monsters geïncubeerd. De TSA-platen worden geïncubeerd bij 30-35°C en de SDA-platen bij 20-25°C.



Figuur 4: Cassette met A. brasiliensis

De gefiltreerde monsters worden dagelijks beoordeeld gedurende

Micro-organisme	TSA	SDA
S. aureus	✓	-
P. aeruginosa	✓	-
C. albicans	-	✓
B. subtilis	✓	-
A. brasiliensis	-	✓

Tabel 1: Micro-organismen bij validatie

maximaal 3 dagen voor TSA en 5 incubatieduur leidt tot overgroei van micro-organismen. Hierdoor wordt een lager kiemgetal gevonden doordat meerdere kolonies 'fuseren' tot één grote kolonie. De gevonden aantallen KVE worden vergeleken met de gevonden aantallen KVE in de positieve controles.

$$\text{Recovery} = \frac{\text{KVE monster}}{\text{KVE positieve controle}} * 100 \%$$

Resultaten

Na 48-72 uur werden de media beoordeeld. De resultaten staan weergegeven in tabel 2.

Micro-organisme	Monster (KVE/plaat)	Positieve controle (KVE/plaat)	Recovery in monster (%)	Inoculum (KVE/plaat)	% pos. controle t.o.v. inoculum
S. aureus	65	68	95	67	101
P. aeruginosa	26	19	137	21	90
C. albicans	28	29	97	29	100
B. subtilis	15	46	33	43	107
A. brasiliensis	37	56	66	48	117

Tabel 2: Resultaten validatie drank

Eisen:

1. Inoculum ≤ 100 KVE
2. Recovery monster t.o.v. positieve controle 50-200%. Indien niet aan deze eis wordt voldaan dient de methode te worden aangepast, bijv. verdunning van het monster, twee spoelstappen i.p.v. een enkele of toevoeging van een neutraliserend middel aan het spoelmiddel. Dit wordt herhaald totdat aan de eis wordt voldaan.

De inoculi blijken akkoord, allen <100 KVE.

Alle positieve controles worden teruggevonden binnen 50-200% van het inoculum, dus de gebruikte werkwijze werkt niet remmend op de groei.

De recovery (= % monster t.o.v. positieve controle) van B. subtilis blijkt in dit geval te laag. Blijkbaar is de groeiremmende werking van het product niet volledig uitgeschakeld. Daarom wordt de test voor B. subtilis herhaald met twee spoelstappen van 100 ml pepton 0,1% - tween 80 1%. Hierna blijkt de recovery van B. subtilis 84% te zijn.

De kiemgetalbepaling van dit product wordt dan uiteindelijk als volgt:

Monsteropwerking: Verdunning 10 ml tot 100 ml met NaCl 0,9%, in duplo

Media: TSA en SDA

Membraan: cellulose-acetaat, is geschikt voor waterige oplossingen.
Spoelmiddel: 2 x 100 ml pepton 0,1% - tween 80 1% per membraan.

Conclusie

De kiemgetalbepaling van deze drank is gevalideerd conform Ph.Eur.7.0.

Literatuur

Ph.Eur. 7.0 §2.6.12