



ADVIES VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8699

Aanbevelingen inzake de validatie en bewaking van de omgeving binnen banken en intermediaire instellingen voor menselijk lichaamsmateriaal

Validation and environmental monitoring of controlled environments of tissue establishments

6 juni 2012

1. INLEIDING

Conform het Koninklijk besluit (KB) van 28 september 2009 tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, wegnemen, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van menselijk lichaamsmateriaal (KB, 2009) moeten banken en intermediaire instellingen voor menselijk lichaamsmateriaal (MLM) beschikken over passende voorzieningen – cleanrooms – indien het MLM tijdens bewerking wordt blootgesteld aan zijn omgeving. De bewerkingen dienen plaats te vinden in een omgeving met een gespecificeerde luchtkwaliteit en reinheid om de risico's op besmetting van de weefsels en cellen, inclusief kruisbesmetting te voorkomen. De doeltreffendheid van deze maatregelen moet worden gevalideerd en bewaakt aan de hand van het aantal deeltjes en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) vastgesteld in de omgeving.

De bewaking van de luchtkwaliteit van cleanrooms (lucht- en oppervlakte monsters) is tot op heden echter weinig omschreven binnen instellingen voor MLM. Hiervoor wordt indirect verwezen naar internationale richtlijnen zoals de *European Union's Good Manufacturing Practice* (EU GMP) bijlage 1, NBN EN¹ ISO² 14644-1 en NBN EN ISO 14698-1.

Bij de evaluatie van de luchtkwaliteit in cleanrooms conform de Belgische regelgeving worden volgende problemen vastgesteld:

- Het KB tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen specificeert dat de luchtkwaliteit van de omgeving waarmee het MLM in contact komt wat betreft het aantal deeltjes en KVE overeenkomt met een klasse A zoals omschreven in de EU GMP. De achtergrondomgeving moet wat betreft het aantal deeltjes en KVE ten minste overeenkomen met een klasse D. Een achtergrond klasse D kan echter 10³ meer deeltjes bevatten dan de aseptische omgeving klasse A.
- De technieken voor het bepalen van deeltjes in functie van de validatie van een cleanroom omgeving zijn gespecificeerd in de NBN EN ISO 14644-2. De praktische uitvoering voor het bewaken van de luchtkwaliteit is echter weinig gestandaardiseerd, waardoor het zeer moeilijk is om resultaten te vergelijken. Vragen met betrekking tot het volume van het luchtmonster, het aantal

¹ Europese normen geregistreerd als Belgische normen

² International Organization for Standardization

staallocaties, de frequentie van meten en het continu of discontinu meten blijven onbeantwoord.

- De technieken voor het bepalen van de KVE worden opgesomd in bijlage 1 van de EU GMP. De NBN EN ISO 14698-1 geeft meer duiding bij het inrichten van een formeel systeem voor de bewaking van biocontaminatie. Vragen met betrekking tot het volume luchtmonster of de duur van de blootstelling, het aantal staallocaties, de frequentie van meten, de selectie van de voedingsbodem(s), de incubatieomstandigheden en interpretatie van de resultaten blijven evenwel onderbelicht.

Om op deze vragen 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. Deze subwerkgroep heeft het advies opgesteld. Vervolgens werd het voorgelegd aan de permanente werkgroep "cellen, weefsels en organen van menselijke en dierlijke oorsprong", die het heeft goedgekeurd.

2. CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

Binnen het werkveld van banken en intermediaire instellingen voor MLM is tot op heden weinig literatuur beschikbaar dat een direct verband aantoonde tussen de concentratie van micro-organismen in de lucht, de concentratie van partikels en het optreden van besmetting van het MLM. Het betreft wellicht een onderrapportering omdat het aantal besmettingen relatief beperkt is en omdat de luchtkwaliteit van de omgeving waaraan cellen en weefsels worden blootgesteld tot voor kort niet systematisch werd bewaakt binnen instellingen voor MLM. Andere sectoren zoals de ziekenhuishygiëne en de farmaceutische industrie hebben dit verband wel afdoende bewezen.

In overeenstemming met de reglementering moeten banken en intermediaire instellingen voor MLM beschikken over passende voorzieningen en de werking ervan valideren en bewaken. In dit kader wordt verwezen naar het maximale aantal toegelaten deeltjes en KVE zoals gespecificeerd in de EU GMP bijlage 1. Deze EU GMP richtlijn werd echter opgesteld voor industriële bereiding van geneesmiddelen en houdt geen rekening met de aard van het startmateriaal en de arbeidsintensieve, manuele bewerkingsprocessen binnen instellingen voor MLM, veelal toegepast op een niet-routinematige basis.

In die zin beveelt de Hoge Gezondheidsraad (HGR) aan om een validatie- en bewakingsprogramma op te zetten waarbij een goed evenwicht bestaat tussen het efficiënt inzetten van middelen en het periodiek bewaken van de luchtkwaliteit van de omgeving. De validatie van de luchtkwaliteit dient te gebeuren 'in rust' en 'operationele' toestand. De bewaking van de luchtkwaliteit dient minimaal te gebeuren in rusttoestand. Cleanrooms geclassificeerd als een GMP A of B dienen ook periodiek bewaakt te worden in 'operationele' toestand.

In afwijking van de gangbare industriële normen wordt aanbevolen dat een validatie van de cleanroom wordt uitgevoerd bij:

- de eerste ingebruikname;
- na herinrichting- of uitbreiding van de infrastructuur, indien de aanpassingen een invloed hebben op de luchtkwaliteit;
- na aanpassing van het basisontwerp van de *Heating, ventilation, and air conditioning* (HVAC) installatie;
- bij de vervanging van *High-efficiency particulate air* (HEPA) of *Ultra-low particulate air* (ULPA) filters;
- bij het systematisch overschrijden van waarschuwings- en actielimieten tijdens de bewaking;
- minimaal 1 maal per jaar voor omgevingen gekwalificeerd onder GMP klasse A.

Omwille van de verschillen in achtergrondomgeving en omwille van de zeer diverse bewerkingstechnieken binnen weefselbanken en intermediaire instellingen wordt aanbevolen om de frequentie van bewaken te bepalen aan de hand van een risico-analyse waarbij volgende parameters in beschouwing genomen worden:

- (1) Validatieresultaten;
- (2) Trends van microbiologische besmetting gedurende een representatieve periode;
- (3) Besmettingsrisico's op verschillende momenten tijdens het proces:
 - Het risico op besmetting van de weefsels tijdens prelevatie (o.a. type omgeving, blootstellingduur, onderliggende pathologie bij de donor, etc);
 - Het risico op besmetting van de weefsels tijdens bewerking (o.a. type cleanroom, blootstellingduur, type van bewerking, etc);
 - Het risico op kruisbesmetting (reinigings- en ontsmettingsprocedures, type weefsels of cellen, infectieuze donoren, steriliteit gebruikte materialen, etc);
 - Het risico op besmetting bij toepassing van de weefsels en /of cellen bij de patiënt: immuun status patiënt, toedieningsvorm, plaats van toediening, etc.

Het blijkt echter niet opportuun te zijn om iedere testmethode zowel in rust als in operationele toestand uit te voeren. Het valideren of bewaken van de omgeving mag bovendien op geen enkel ogenblik de veiligheid of de kwaliteit van de weefsels of cellen in gevaar brengen. In dit kader wordt aanbevolen om minstens volgende niet-optionele methodes toe te passen in functie van de activiteitstoestand:

Tabel 1: Aanbevolen testmethodes in het kader van de validatie en bewaking van cleanrooms

Omgeving	Validatie		Bewaking		Reinheid oppervlakken
	In rust	In werking (Simulatie)	In rust	Operationeel	
GMP					
Klasse A	Deeltjstelling Sedimentatieplaten Air sampler*	Deeltjstelling Sedimentatieplaten Air sampler*	Deeltjstelling Sedimentatieplaten Air sampler*	Sedimentatieplaten ^a	Contactplaten Wissers*
Klasse B	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Sedimentatieplaten ^a	Contactplaten Wissers*
Klasse C	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Sedimentatieplaten*	Contactplaten Wissers*
Klasse D	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Air sampler* Deeltjstelling* Sedimentatieplaten*	Deeltjstelling Air sampler Sedimentatieplaten*	Sedimentatieplaten*	Contactplaten Wissers*

* Optioneel – a: Tests uit te voeren met een bepaalde regelmaat aan de hand van de risicobeoordeling

Validatieresultaten worden geïnterpreteerd in functie van de GMP classificatie van de cleanroom in overeenstemming met de EU GMP richtlijnen (tabel 2 en 3). Aan de hand van de validatieresultaten en trends vastgesteld tijdens de bewaking van de cleanrooms moeten 'waarschuwings-' en 'actielimieten' worden opgesteld die dienen voor de interpretatie van de bewakingsresultaten en de te ondernemen acties. Indien de testresultaten buiten de gespecificeerde limieten vallen wordt aanbevolen om ook de optionele testmethodes uit te voeren. De verschillende testmethodes worden verder uitgewerkt in dit advies.

Het minimale aantal monsterlocaties voor de validatie van de luchtkwaliteit in cleanrooms dient te worden bepaald zoals voorgeschreven in de NBN EN ISO 14644-1 (1999).

Het minimale aantal monsterlocaties voor de bewaking van de luchtkwaliteit en de controle van de reinheid van oppervlakken wordt geselecteerd aan de hand van de validatieresultaten en een risicoanalyse.

In de regel wordt voor de bewaking van de luchtkwaliteit het volgende aanbevolen:

- 1) minimaal 1 monsterlocatie per 1 m² per veiligheidswerkbank GMP klasse A
- 2) minimaal 2 monsterlocaties voor achtergrondomgevingen met een oppervlakte < 25 m²
- 3) minimaal 4 monsterlocaties voor achtergrondomgevingen met een oppervlakte ≥ 25 m² te nemen.

Sleutelwoorden

Keywords	Mesh terms*	Sleutelwoorden	Mots clés	Stichworte
Tissue establishments	Tissue banks	weefselbanken	Banques de tissus	Gewebebanken
Controlled environment, Clean room	Environment, controlled	Gecontroleerde omgeving Clean room	Environnement contrôlé Salle blanche	Kontrollierte Umgebung Reinraum
Environmental monitoring	Environmental monitoring	Controle van de omgeving	Contrôle de l'environnement	Überwachung der Umgebung
Air quality	Air quality, Indoor	Luchtkwaliteit	Qualité de l'air	Luftqualität
Environmental microbiology	Environmental microbiology	Omgevingsmicrobiologie	Microbiologie environnementale	Mikrobiologie der Umgebung
Colony forming unit	Colony Count, Microbial	Kolonievormende eenheid	Unité formant colonie	Koloniebildende Einheit
Particle count	Particulate Matter (Count)	Deeltjestelling	Comptage particulaire	Teilchenzählung

* 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

cGTP	<i>Current Good Tissue Practice</i>
EG	Europese Gemeenschap
EN	Europese normen
EU GMP	<i>European Union's good manufacturing practice</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMEA	<i>Failure Mode and Effects Analysis</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
HEPA	<i>High-efficiency particulate air</i>
HGR	Hoge Gezondheidsraad
HVAC	<i>Heating, ventilation, and air conditioning</i>
ICSI	Intra cytoplasmatische sperma injectie
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
KB	Koninklijk besluit
KVE	Kolonievormende eenheden
MLM	Menselijk lichaamsmateriaal
NBN	Nationale Belgische normen
TSA	Tryptic Soy Agar
ULPA	<i>Ultra-low particulate air</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VS	Verenigde Staten
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Definities

Classificatie:	Indeling van de cleanroom volgens een bepaalde luchtzuiverheidsklasse (GMP, ISO) door het bepalen van het aantal deeltjes in de lucht, uitgedrukt in termen van maximaal toegestane concentratie van deeltjes van een bepaalde grootte (deeltjes/m ³) (NBN EN ISO 14644-1, 1999). De classificatie van een cleanroom maakt deel uit van het kwalificatieproces van cleanrooms (EU, 2001).
Kwalificatie ³ :	Aan de hand van documentatie met een hoge mate van zekerheid vastleggen dat een bepaald uitrustingsstuk, een bepaald systeem, een bepaalde omgeving voldoet aan de specificaties van de producent (<i>Installation Qualification</i>), voldoet aan de specificaties van de gebruiker (<i>Operational Qualification</i>) en op constante wijze leidt tot een product dat aan de daarvoor van tevoren vastgelegde specificaties en kwaliteitskenmerken voldoet (<i>Performance Qualification</i>) (EU, 2001; KB, 2009).
Proces-validatie:	Aan de hand van documentatie met een hoge mate van zekerheid vastleggen dat een bepaald proces op constante wijze leidt tot een product dat aan de daarvoor van tevoren vastgelegde specificaties en kwaliteitskenmerken voldoet. Een proces wordt gevalideerd om de doeltreffendheid van een systeem voor het beoogde gebruik te evalueren. De kwalificatie van een bepaald uitrustingsstuk, een bepaald systeem, een bepaalde omgeving kan onderdeel uitmaken van de validatie van een proces (EU, 2001; KB, 2009).
Cleanroom in rust:	Activiteitstoestand van de cleanroom waarbij de luchtzuiveringsinstallatie en de uitrusting in de cleanroom werkzaam zijn in overeenstemming met de specificaties van de gebruiker, zonder dat er personeel aanwezig is (NBN EN ISO 14644-1, 1999).

³ Indien men de doeltreffendheid van een cleanroom voor het beoogde gebruik wenst te evalueren kan men zowel spreken van validatie als van kwalificatie (art.1 §3 KB van 28 september 2009 tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen). In deze richtlijn zal verder de term validatie worden gebruikt.

- Cleanroom in werking: Activiteitstoestand van de cleanroom waarbij de luchtzuiveringsinstallatie, de uitrusting en het personeel operationeel is in overeenstemming met de specificaties van de gebruiker (NBN EN ISO 14644-1, 1999). Andere terminologie met dezelfde betekenis is 'operationeel' of 'in activiteit'.
- Actielimiet: Maximaal aantal KVE of partikels, in te stellen door de gebruiker in het kader van een gecontroleerde omgeving, die, wanneer overschreden, een onmiddellijke interventie vereist, met inbegrip van een oorzakelijke analyse en corrigerende maatregelen.
- Waarschuwinglimiet: Maximaal aantal KVE of partikels, in te stellen door de gebruiker als waarschuwing bij afwijking van de normaalwaarden, die, wanneer overschreden, moeten leiden tot een verscherpt toezicht op het proces.

3.1 Methodologie

Het advies berust op een overzicht van de wetenschappelijke literatuur, internationale richtlijnen en het oordeel van de experts.

3.2 Uitwerking

3.2.1 Juridisch kader

Om hoge kwaliteits en veiligheid voor menselijke weefsels en cellen binnen de Europese Gemeenschap (EG) te waarborgen implementeerde het Europese Parlement en de Raad in 2004 een richtlijn tot vaststelling van kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van menselijke weefsels en cellen (2004/23/EG). Ter uitvoering van richtlijn 2004/23/EG werden 2 dochterrichtlijnen uitgevaardigd waaronder richtlijn 2006/86/EG wat betreft de traceerbaarheidsvereisten, de melding van ernstige ongewenste voorvallen en bepaalde technische voorschriften voor het coderen, bewerken, conserveren, bewaren en distribueren van menselijke weefsels en cellen. Deze richtlijn schrijft voor dat de luchtkwaliteit tijdens de bewerking van weefsels en cellen van groot belang is voor het risico op besmetting van de weefsel en cellen.

In regel stelt de richtlijn dat, indien weefsels en cellen tijdens bewerking blootgesteld worden aan hun omgeving en daarna geen microbiële inactivatie ondergaan, een luchtkwaliteit vereist is waarbij het aantal deeltjes en het aantal KVE voldoen aan klasse A zoals omschreven in bijlage 1 bij de EU GMP (2008) en richtlijn 2003/94/EG van de commissie. De achtergrond omgeving moet, wat betreft het aantal deeltjes en het aantal KVE, ten minste overeenkomen met een klasse D.

Op 19 december 2008 werd de Europese richtlijn 2004/23/EG omgezet in Belgisch recht met de wet inzake het verkrijgen en het gebruik van MLM met het oog op de geneeskundige toepassing op de mens of het wetenschappelijk onderzoek. De technische voorschriften voor onder andere gebouwen en voorzieningen zoals beschreven in richtlijn 2006/86/EG werden uitgewerkt in bijlage VII van het KB van 28 september 2009 tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, wegnemen, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van MLM, waaraan de banken voor MLM, de intermediaire structuren voor MLM en de productie-instellingen moeten voldoen.

In afwijking tot de Europese richtlijnen stelt de Belgische regelgever voor hartkleppen, vaten, greffen van het locomotorische stelsel en cellen, dat, indien de weefsels en cellen tijdens de bewerking worden blootgesteld aan hun omgeving, de achtergrondomgeving, wat betreft het aantal KVE ten minste overeenkomt met een GMP klasse C in plaats van met een GMP klasse D. In het geval van bewerking in een functioneel gesloten systeem of voor gameten volstaat dat het aantal KVE ten minste overeenkomt met een GMP klasse D.

**Tabel 2: Maximum toegelaten aantal deeltjes
(EU GMP bijlage 1, 2008).**

	Maximaal toegelaten aantal deeltjes per m ³ gelijk of groter dan de gespecificeerde grootte			
	In rust		In werking	
Klasse	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Niet gespecificeerd	Niet gespecificeerd

**Tabel 3: Aanbevolen limieten voor microbiologische besmetting (in werking)
(EU GMP bijlage 1, 2008).**

Klasse	Aanbevolen limieten voor microbiologische besmetting ^a		
	Luchtmonster KVE/m ³	Sedimentatieplaten (diameter 90 mm) KVE/4 uur ^b	Contactplaten (diameter 55 mm) KVE/plaat
A	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

a: dit betreft gemiddelde waarden

b: individuele settle plates kunnen minder lang dan 4u worden blootgesteld

De microbiologische limieten zoals aangeduid in tabel 3 betreffen aanbevolen limieten. De *World Health Organisation* (WHO, 2011) erkent dat sommige omstandigheden, waaronder het gebruik van niet-steriele grondstoffen, het aseptische productieproces van vaccins bemoeilijken. Onder deze omstandigheden is het ook in de industrie regel om in laminaire veiligheidswerkbanken te werken met een achtergrondomgeving GMP klasse C of D.

Ook bij weefsels en cellen kan het aseptische productieproces niet altijd worden verzekerd omdat regelmatig vertrokken wordt van niet-steriele weefsels zoals de huid, sperma of organen, en weefsels gepreleveerd in het mortuarium, etc. In dit kader stelt de HGR dat laminaire veiligheidswerkbanken in een GMP klasse C of D achtergrond wat betreft het aantal deeltjes en KVE in rusttoestand moeten voldoen aan een GMP klasse A zoals gedefinieerd in tabel 2 en 3. In werking kan wat betreft het aantal KVE worden afgeweken van de aanbevolen limieten zoals gespecificeerd in tabel 3. Deze afwijking dient wel gestaafd te worden aan de hand van literatuur, validatieresultaten en/of een risicoanalyse.

3.2.2 Microbiologische besmetting van weefsels en cellen in een gecontroleerde omgeving

Microbiologische besmetting van weefsels en cellen getransplanteerd bij de mens kan aanleiding geven tot de ontwikkeling van ernstige ziekten, verlenging van de ziekenhuisopname of zelf de dood van de patiënt. Tot voor kort werd er van uit gegaan dat het aantal patiënten dat microbiologisch besmette weefsel- en celgreffes toegediend kreeg beperkt bleef tot enkele individuele gevallen. Verschillende recente voorvallen, soms met fatale afloop, hebben de aandacht gevestigd op dit probleem (Eastlund T, 2006; Wang et al., 2007). Naar aanleiding van de invoering van de *current Good Tissue Practice* (cGTP) richtlijnen in de Verenigde Staten (VS) in 2001, richtte de *Food and Drug Administration* (FDA) het MedWatch systeem op voor de melding van ernstige ongewenste voorvallen en reacties naar aanleiding van een weefsel- of celtransplantatie. Wang (2007) onderzocht alle ernstige ongewenste voorvallen en reacties van

microbiologische infecties gerapporteerd binnen het jaar volgend op een transplantatie voor de periode 2001 tot 2004. In deze periode werden 83 meldingen op vrijwillige basis gerapporteerd op 6 miljoen getransplanteerde weefsel- en celgreffes (1,4/100.000). De rapporten lieten echter niet toe om de bron van de besmetting te bepalen.

3.2.2.1 De operator als besmettingsbron

Verscheidende studies binnen weefselbanken en industriële cleanrooms toonden aan dat meer dan de helft van de teruggevonden kiemen op de oppervlakken in gecontroleerde omgevingen behoren tot de normale huidflora van de mens (Cobo & Concha, 2007; Favero et al., 1966; Guns et al., 2012; Herlong et al., 2008). Het menselijke lichaam kan tot 10.000 KVE/minuut afscheiden (Thomas et al., 2005). Vanneaux (2007) rapporteerde dat in de periode van januari 2003 tot februari 2006 negentien van de 257 (7,4 %) beenmergproducten gecontamineerd waren met bacteriën. Hierbij werd vastgesteld dat het aantal gecontamineerde beenmergproducten na verwerking hoger lag dan het aantal contaminaties initieel vastgesteld onmiddellijk na collectie. Deze discrepantie werd toegeschreven aan besmetting van de celproducten tijdens manipulatie (1,5 %). Ook bij Prince (1995) en Schwella (1998) bleek respectievelijk 0,8 % en 8,8 % van de bewerkte beenmergproducten besmet te zijn tijdens de bewerking.

Cobo (2007) toonde aan dat het al dan niet correct toepassen van aseptische technieken een groter besmettingsrisico inhoudt dan de omgeving. Dit risico neemt wel af indien de aseptische technieken worden uitgevoerd in een cleanroom (Stucki et al., 2009). De operator kan dus zowel direct als indirect een bron van microbiële besmetting vormen. De controles in werking zijn belangrijk in het kader van de beoordeling van de voornaamste besmettingsfactor, i.e. de operator.

3.2.2.2 De omgeving (lucht, oppervlakken) als besmettingsbron

Tot op vandaag zijn slechts een beperkt aantal rapporten gepubliceerd waarbij de bron van de besmetting kan toegeschreven worden aan de omgeving waarin de bewerking van de weefsels en cellen plaatsvond:

- Arnow (1991) rapporteerde dat in een periode van 3 maand 2 patiënten besmet werden met *Aspergillus fumigatus* nadat ze *lymphokine-activated killer cells* van autologe oorsprong toegediend kregen. Onderzoek toonde aan dat de besmetting afkomstig was van een besmette laminaire veiligheidswerkbank en incubator.
- Friberg (1999a; 1999b) stelde vast dat de oppervlaktebesmetting van patiënten, wonden en chirurgisch materiaal in een operatiezaal sterk gecorreleerd is met de contaminatiegraad van de directe omgeving.
- Ritter (2003) stelde een significante daling vast van het aantal gecontamineerde perifere bloedstamcelgreffes (3,6 % naar 0,8 %) indien de bewerking plaatsvond in een cleanroom omgeving (GMP klasse A in B) in plaats van in een laminaire veiligheidswerkbank (GMP klasse A) in een niet-gekwalificeerde laboratoriumomgeving ($p < 0,0001$).
- Klykens (*submitted article*) stelde vast dat een achtergrondomgeving GMP klasse B een positieve impact had op de oppervlaktebesmetting van laminaire veiligheidskasten in vergelijking met een achtergrondomgeving klasse D. Het aantal besmette contactplaten in de laminaire veiligheidswerkbanken nam af van 5,6 % met een GMP klasse D achtergrond naar 1,8 % met een GMP klasse B achtergrond.

3.2.3 Validatie en bewaking van een cleanroom

In overeenstemming met het KB (2009) tot vaststelling van de kwaliteits- en veiligheidsnormen moeten banken en intermediaire instellingen voor MLM de omgeving valideren en bewaken aan de hand van het aantal deeltjes en het aantal KVE.

Het valideren van de cleanroom betreft een formeel validatieproces waarbij de instelling aantoont dat de luchtkwaliteit voldoet aan de gevraagde zuiverheidsklasse zoals bepaald in het KB tijdens het bewerken van MLM. De NBN EN ISO 14644-1 (1999) en 2 (2000) specificeren dat de

validatie zowel in werking als in rusttoestand kan gebeuren en de EU GMP bijlage 1 specificeert dat de validatie dient te gebeuren in zowel rust- als operationele toestand.

Er wordt aanbevolen om de luchtkwaliteit te valideren in zowel rust als operationele toestand. De waarden die worden gemeten in 'rust toestand' (geen activiteit of personeel aanwezig in de cleanroom) zijn een maat voor de kwaliteit van de lucht in de desbetreffende omgeving. De validatie gebeurt conform de NBN EN ISO 14644-1 (1999) en leidt tot de kwalificatie van de ruimte.

De waarden die worden gemeten in 'operationele toestand' zijn een resultante van de gegenereerde vervuiling, de achtergrond en de capaciteit van de luchtbehandelinginstallatie om de desbetreffende ruimte adequaat te zuiveren. De validatie gebeurt bij voorkeur voor de ingebruikname van de cleanroom of voor het invoeren van nieuwe processen. Tijdens de validatie in werking worden processen bij voorkeur gesimuleerd. Er dient ook rekening gehouden te worden met de potentiële risicofactoren. De validatie van de omgeving mag op geen enkel ogenblik de kwaliteit en veiligheid van weefsel- of celproducten in gevaar brengen. Aan de hand van het aantal vastgestelde deeltjes en KVE kan de instelling waarschuwings- en actielimieten vooropstellen.

Het bewaken van de omgeving onderscheidt zich van de validatie van de omgeving in die zin dat het routinematig gebeurt met de bedoeling om veranderingen in trends van microbiologische besmetting en microbiologische flora waar te nemen (Sandle, 2006). De bekomen waarden leveren informatie aan over de fysische constructie van de cleanroom, prestatie van het luchtbehandelingsstelsel of HVAC, aseptisch werken van het personeel, goede werking van apparatuur en de reinigings – en ontsmettingsprocedures.

Het aseptische productieproces van weefsels en cellen kan echter niet altijd worden verzekerd:

- Gebruik van niet steriele bronweefsels zoals huid, sperma, organen, weefsels uitgenomen in een mortuarium, ...
- Bepaalde technieken zoals intra cytoplasmatische sperma injectie (ICSI) dienen te gebeuren onder een microscoop. De aanwezigheid van microscopen in een veiligheidswerkbank verstoort het luchtpatroon sterk waardoor een aseptische omgeving niet kan worden verzekerd.
- Het cultuurmedium van cellen moet regelmatig worden verversd. De cultuurschalen of -flessen komen uit een niet steriele omgeving. Het is echter niet altijd mogelijk om deze recipiënten te ontsmetten.

3.2.3.1 Frequentie

De frequentie van validatie zoals gespecificeerd in de NBN EN ISO 14644-2 (2000) gaat uit van een periodieke sluiting van de faciliteiten voor onderhoud en validatie zoals gebruikelijk is binnen de industrie. Er wordt echter geen rekening gehouden met de specifieke situatie waar vele weefselbanken mee worden geconfronteerd, zijnde een continue kweek van cellen of weefsels en de relatieve schaarste van de beschikbare cellen en weefsels. Hierdoor is een periodieke sluiting van de cleanroom faciliteiten voor sommige weefsels en cellen uitgesloten. De NBN EN ISO 14698-1 (2003) specificeert dat de microbiologische validatie van cleanrooms moet worden uitgevoerd:

- Wanneer waarschuwings- en actielimieten systematisch worden overschreden;
- Na een langdurige sluiting van de activiteiten;
- Na detectie van infectieuze agentia in kritische omgevingen;
- Na een significante aanpassing van het basisontwerp van de HVAC installatie;
- Na de aanpassing van een proces dat een invloed heeft op de cleanroom omgeving;
- Na het vaststellen van ongewone bewakingsresultaten;
- Na het wijzigen van de kuis- en ontsmettingsmethode;
- Na ongeplande incidenten die mogelijk aanleiding geven tot biocontaminatie.

In Europa bestaan er weinig of geen richtlijnen met betrekking tot de frequentie van bewaken van cleanroomomgevingen. De richtlijnen beperken zich meestal tot omschrijvingen zoals het 'routinematig' of 'frequent' bewaken van de omgeving (EU, 2008; NBN EN ISO 14698-1, 2003; NBN EN ISO 14644-1, 1999). Binnen de farmaceutische industrie is het gangbaar om de frequentie van bewaken te bepalen aan de hand van een risicoanalyse. De methodes die het meest worden gebruikt zijn de *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) methode en de *Failure Mode and Effects Analysis* (FMEA) methode (Whyte & Eaton, 2004).

3.2.3.2 Keuze van de testmethode

Door te verwijzen naar het maximale aantal deeltjes en KVE zoals omschreven in EU GMP bijlage 1 en richtlijn 2003/94/EG van de commissie bepaalt de regelgever indirect de testmethodes voor de validatie van cleanrooms:

- Meting van het aantal deeltjes (NBN EN ISO 14644-1, 1999);
- Meting van het aantal KVE in luchtmonsters (NBN EN ISO 14698-1, 2003);
- Meting van de sedimentatiegraad van KVE (NBN EN ISO 14698-1, 2003);
- Meting van het aantal KVE op oppervlakken (NBN EN ISO 14698-1, 2003).

Het is evenwel niet duidelijk welke testmethode of methodes de voorkeur dragen. Evenmin is duidelijk of de verschillende testmethodes bij iedere activiteitstoestand moeten worden uitgevoerd en bij zowel validatie als bewaking.

De EU GMP bijlage 1 schrijft voor dat de omgeving dient te worden gevalideerd conform NBN EN ISO 14644-1 (1999). De NBN EN ISO 14644-1 (1999) schrijft de meting van het aantal deeltjes met een deeltjesteller voor als de referentiemethode voor het classificeren van cleanrooms. Daarenboven moet het aantal deeltjes in een omgeving GMP klasse A continu worden bewaakt. De meetprobe moet in een straal van 30 cm rond het aan de omgeving blootgestelde product worden gepositioneerd om te komen tot een relevante meting (FDA, 2004; WHO, 2011).

Deze richtlijnen werden echter opgesteld in het kader van statische afvuelsystemen in de geneesmiddelenindustrie en houden geen rekening met de technische beperkingen van weefselbank specifieke processen zoals het versnijden van weefsels, laminaire veiligheidswerkbanken met microscopen, incubatoren, schudders of arbeidsintensieve cultuurmethodes. Het vast en correct positioneren van de meetprobe voor continue bewaking is haast onmogelijk daar de meeste weefselbanken gebruik maken van wisselende processen en opstellingen. Een mogelijk alternatief is het plaatsen van een meetprobe in een hoek achteraan de veiligheidswerkbank. Het nut van deze meetpositie kan evenwel in vraag worden gesteld. Daar het haast onmogelijk is om de meetprobe correct te positioneren in het kader van weefselbank specifieke processen wordt de continue bewaking van deeltjes in een omgeving GMP klasse A tijdens werking afgeraden. Er dient evenwel op regelmatige tijdstippen te worden aangetoond dat de omgeving GMP klasse A in rusttoestand voldoet aan de specificaties.

Het bepalen van het aantal KVE door collectie van een luchtmonster met een 'air sampler' wordt door zowel de Amerikaanse farmacopee (USP), de EU GMP als de cGTP (FDA, 2001) naar voor geschoven als de referentiemethode voor het bewaken en valideren van de microbiologische verontreiniging in cleanrooms. Er worden echter grote verschillen in collectie efficiëntie vastgesteld tussen de verschillende commercieel beschikbare air samplers (Bonadonna & Marconi, 1994; Gangneux et al., 2006; Lee K, 2004; Ljungqvist & Reinmuller 2000; Pasquarella et al., 2000; Shintani et al., 2004; Whyte et al., 2007; Yao & Mainelis, 2006). Deze verschillen zijn te wijten aan de gebruikte technologie in het toestel. Het beschermen van het groeipotentieel en de biologische integriteit van de micro-organismen na de impact op de voedingsbodem is cruciaal. Vooral het aantal enkelvoudige bacteriën met een diameter van 0,5 tot 1,0 µm wordt onderschat (Yao & Mainelis, 2006). Rekening houdend met het gegeven dat 1/3 van de levensvatbare deeltjes afgescheiden door de operators kleiner is dan 2,1 µm (Ljungqvist & Reinmuller, 2007)

moet de voorkeur uitgaan naar air samplers met een zo laag mogelijke 'cut-off' diameter (d_{50}). Deze cut-off waarden kunnen worden aangeleverd door de leverancier van het toestel.

Friberg (1999a; 1999b) stelde met sedimentatieplaten een relatie vast tussen wondinfecties en microbiologische verontreiniging van de directe omgeving in operatiezalen met een laminaire luchtstroming. Deze relatie werd niet vastgesteld indien er gebruik werd gemaakt van een air sampler (Friberg et al., 1999a). In operatiezalen met een turbulente luchtstroming werd wel een relatie vastgesteld tussen wondinfecties en microbiologische verontreiniging waargenomen met een air sampler (Friberg et al., 1999b). Whyte (1996) kwam tot een gelijkaardig besluit in een farmaceutische productieomgeving. Hij stelde vast dat het gebruik van sedimentatieplaten de beste methode was voor het kwantificeren van een mogelijke microbiologische besmetting in afvuelsystemen.

Het gebruik van een deeltjesteller en een microbiologische 'air sampler' heeft bovendien een directe impact op de omgeving van de meting door hun fysieke aanwezigheid en het opzuigen van luchtmonsters aan een debiet van 28 tot 100L/minuut (Pasquarella et al., 2000). Het is bijzonder moeilijk om de steriliteit van een air sampler te verzekeren. Daar het gebruik van een air sampler een besmettingsrisico inhoudt wordt de methode afgeraden voor de bewaking en validatie van omgevingen die in contact komen met weefsels of cellen.

3.2.3.3 Aantal monsterlocaties

Het minimale aantal monsterlocaties voor de validatie van de luchtkwaliteit in cleanrooms wordt bepaald zoals voorgeschreven in de NBN EN ISO 14644-1 (1999) door het toepassen van onderstaande formule, waarbij de oppervlakte van de te testen ruimte wordt uitgedrukt in m^2 . De minimale locaties moeten evenwichtig verspreid worden over de te testen omgeving.

$$N = \sqrt{\text{oppervlakte}}$$

Bijkomende monsterlocaties kunnen worden geselecteerd aan de hand van een risicoanalyse. Voor het meten van het aantal KVE in luchtmonsters, na sedimentatie, en op oppervlakken zijn geen strikte richtlijnen van toepassing. Hoewel tot op heden geen verband werd vastgesteld tussen het aantal waargenomen deeltjes en KVE (Ljungqvist et al., 2007) wordt vanuit praktische overwegingen aangeraden om de monsterlocaties van de deeltjestellingen over te nemen in het microbiologische validatieplan.

Het minimale aantal monsterlocaties voor de bewaking van cleanrooms wordt bepaald aan de hand van de microbiologische validatie van de cleanroom en een risicoanalyse (NBN EN ISO 14698-1, 2003; WHO, 2011).

3.2.4 Deeltjestellingen

3.2.4.1 Toestel

Deeltjestellers bepalen het aantal en de concentratie van de deeltjes in de lucht. Ze detecteren zowel levensvatbare als niet-levensvatbare deeltjes zonder onderscheid te maken. De keuze van een deeltjesteller kan gebeuren in functie van de gewenste toepassing (validatie versus bewaking), rekening houdend met het luchtdebiet van het toestel in functie van de collectietijd van het luchtmonster. Er kan een keuze gemaakt worden tussen 'handheld', 'portable' en 'continue' meettoestellen. Deeltjestellers moeten jaarlijks worden gekalibreerd (ISO 21501-4, 2007).

3.2.4.2 Meting

Het minimale volume van een luchtmonster voor de bepaling van het aantal deeltjes is afhankelijk van de zuiverheid van de omgeving en de activiteitstoestand. De NBN EN ISO 14644-1 (1999) bepaalt dat voor de validatie van de omgeving een volume lucht moet worden gemeten waarin minimaal 20 deeltjes worden gedetecteerd. Daarnaast specificeert de norm dat minimaal 2 L

lucht moet worden gemeten en minimaal gedurende 1 minuut moet worden gemeten. Het te meten luchtvolume kan worden berekend aan de hand van onderstaande formule waarbij C het maximaal toegelaten aantal deeltjes betreft gespecificeerd voor de grootste deeltjesgrootte van de betrokken klasse (NBN EN ISO 14644-1, 1999).

$$V = \frac{20}{C} \times 1.000$$

De mond van de meetprobe moet worden gepositioneerd in de richting van de laminaire luchtstroom. In het geval van een turbulente luchtstroom wordt de mond van de meetprobe verticaal naar boven gepositioneerd.

3.2.4.3 Interpretatie

- In het kader van de validatie dienen alle individuele waarden van elke monsterlocatie te vallen binnen de limieten van de GMP klasse waarbinnen de betrokken ruimte wordt geclassificeerd.
- In het kader van de bewaking moet iedere weefselbank waarschuwings- en actielimieten bepalen per gekwalificeerde ruimte. Deze limieten kunnen bepaald en aangepast worden op basis van trends waargenomen tijdens de validatie en bewaking van de ruimten en na overleg met een multidisciplinair team.

3.2.5 Sedimentatieplaten

3.2.5.1 Meting

Voor de bepaling van het aantal KVE door sedimentatie wordt gebruik gemaakt van steriele kweekbodems (Ø 90 mm). De kweekbodems worden gedurende een bepaalde periode blootgesteld aan de omgeving. De besmettingsgraad wordt uitgedrukt als KVE/4 uur/kweekbodem (Ø 90 mm) (EU GMP, 2008; FDA, 2004; USP, 2010).

Het is niet steeds mogelijk om kweekbodems gedurende 4 uur bloot te stellen aan laminaire en turbulente luchtstromen daar dit leidt tot meer dan 10 % gewichtsverlies van de agar (Guns et al., 2012) en viabiliteitsverlies van micro-organismen met 8 % (Deschenes, 2008). De kweekbodems gedurende minimaal 2 uur blootstellen aan de omgeving en het aantal opgespoorde KVE vermenigvuldigen met een factor 2 is een aanvaardbare methode. Indien korte processen plaatsvinden, kan de duur van blootstelling beperkt worden tot de duur van het proces (WHO, 2011).

3.2.5.2 Kweekbodem

De NBN EN ISO 14698-1 (2003) adviseert het gebruik van een niet selectieve kweekbodem voor het opsporen van biocontaminatie in cleanrooms. Het eventuele gebruik van selectieve kweekbodems voor gisten en schimmels is al jaren onderwerp van debat onder farmaceutische microbiologen (Clontz, 2009). Recent heeft de USP *Tryptic Soy Agar* (TSA) aanvaard als kweekbodem voor het opsporen en kwantificeren van de meeste omgevingskiemen in cleanrooms en dit voor zowel bacteriën als gisten en schimmels. Alternatieve kweekbodems zijn eveneens toegelaten indien kan aangetoond worden dat zij voldoen aan het vooropgestelde doel.

3.2.5.3 Kweek

De ideale kweekcondities zijn afhankelijk van het type van micro-organismen (NBN EN ISO 14698-1, 2003; FDA, 2001; FDA, 2004; Clontz, 2009). Er wordt aanbevolen om 2/3 van de kweekbodems gedurende 5 dagen te incuberen bij 30 tot 35 °C voor het opsporen van bacteriën. 1/3 van de kweekbodems moet gedurende 5-7 dagen bij 20 tot 25 °C worden geïncubeerd voor het opsporen van gisten en schimmels. Een gefaseerde kweek gedurende 5-7 dagen waarbij de kweekbodems gedurende een aantal dagen bij 30 tot 35 °C worden geïncubeerd gevolgd door een aantal dagen bij 20 tot 25 °C is een aanvaarde methode (Guns et al., 2012; Herlong et al., 2008; Moldenhauer, 2005; WHO, 2011).

3.2.5.4 *Interpretatie*

- De limieten zoals gespecificeerd in de EU GMP bijlage 1 betreffen aanbevolen limieten in operationele toestand.
- In het kader van de validatie en bewaking dienen de resultaten te worden geëvalueerd zoals beschreven in de NBN EN ISO 14698-2 (2003):
 - in functie van het type kiem;
 - in functie van de vooropgestelde waarschuwings- en actielimieten;
 - in functie van het aantal monsters en de monsterlocatie;
 - in functie van de detectiemethodes;
 - rekening houdend met het schoonmaakproces;
 - met opvolging van trends en afwijkingen.
- In het kader van de bewaking in operationele toestand moet iedere weefselbank 'waarschuwinglimieten' en 'actielimieten' bepalen per gekwalificeerde ruimte. Deze limieten kunnen bepaald en aangepast worden op basis van trends waargenomen tijdens de validatie en bewaking van de ruimten en na overleg.

3.2.6 *Contactplaten*

3.2.6.1 *Meting*

Voor het opsporen van het aantal KVE op oppervlakken wordt standaard gebruik gemaakt van steriele contactplaten (\varnothing 55 mm) met kweekbodem. De contactplaten worden gedurende een tiental seconden licht aangedrukt op het oppervlak. De besmettingsgraad wordt uitgedrukt als KVE/contactplaat (\varnothing 55 mm) (EU, 2008; FDA, 2001; FDA, 2004; USP, 2010).

In het geval van oneffen oppervlakken kan er overwogen worden om over te schakelen op de wissermethode waarbij een oppervlakte van 24 tot 30 cm² wordt afgestreeken. De wisser wordt vervolgens in een steriele buffer gebracht met gekend volume waarvan 0,1 ml wordt uitgeënt op een kweekbodem (USP, 2010).

3.2.6.2 *Kweekbodem*

Er kan worden gekozen voor dezelfde bodem als besproken onder [3.2.5.2 Kweekbodem](#) aangevuld met inhiberende agentia tegen de residuen van de ontsmettingsmiddelen gebruikt in de betrokken cleanroom. Tot op heden is geen enkel commercieel beschikbare neutraliserend agens in staat om alle types van ontsmettingsmiddel te neutraliseren. Leveranciers maken veelal gebruik van een mix van neutraliserende agentia met wisselende samenstelling en concentratie wat een vergelijking vrijwel onmogelijk maakt. Sutton (2002) bracht 6 kweekmedia met verschillende mengelingen van neutraliserende agentia in contact met 13 commercieel beschikbare biocides. Geen enkel kweekmedium bleek vervolgens adequaat in opgroeien van alle voorgeschreven index micro-organismen. De keuze van neutraliserende agentia moet gebeuren in functie van het gebruikte ontsmettingsmiddel.

3.2.6.3 *Kweek*

Zie [3.2.5.3. Kweek](#)

3.2.6.4 *Interpretatie*

- De limieten zoals gespecificeerd in de EU GMP bijlage 1 betreffen aanbevolen limieten.
- In het kader van de validatie en bewaking dienen de resultaten te worden geëvalueerd zoals beschreven in de NBN EN ISO 14698-2 (2003):
 - in functie van het type kiem;
 - in functie van de vooropgestelde waarschuwings- en actielimieten;
 - in functie van het aantal monsters en de monsterlocatie;
 - in functie van de detectiemethodes;
 - rekening houdend met het schoonmaakproces;
 - met opvolging van trends en afwijkingen.
- Iedere weefselbank moet 'waarschuwinglimieten' en 'actielimieten' bepalen per gekwalificeerde ruimte of per type oppervlak (materiaal, kledij, handschoenen, ...). Deze

limieten kunnen bepaald en aangepast worden op basis van trends waargenomen tijdens de validatie en bewaking van de ruimten en na overleg.

3.2.7 Air sampler

3.2.7.1 Toestel

Zoals reeds aangegeven onder [Keuze van de testmethode](#) is het tot op vandaag onduidelijk welke air sampler de voorkeur geniet. Nationale en internationale richtlijnen spreken zich niet uit of kiezen voor een verschillend type van air sampler (Pasquarella et al., 2000). Binnen de wereld van de ziekenhuishygiëne wordt aanbevolen een hoogvolume air sampler te kiezen met een debiet van minimaal 100 L/minuut en een impactsnelheid van < 20 m/sec (HGR nr. 8364, 2010). Het luchtdebiet van de airsampler moet jaarlijks worden gekalibreerd.

3.2.7.2 Meting

Het minimale volume van een luchtmonster voor de bepaling van het aantal KVE in de lucht is afhankelijk van de zuiverheid van de omgeving en de activiteitstoestand. Er wordt bij voorkeur een zo groot mogelijk volume gemeten om een representatie luchtmonster te garanderen met een minimum van 250 L.

3.2.7.3 Kweekbodem en kweek

Zie [3.2.5.2 Kweekbodem](#) en [3.2.5.3. Kweek](#)

3.2.7.4 Interpretatie

- De limieten zoals gespecificeerd in de EU GMP bijlage 1 betreffen aanbevolen limieten in operationele toestand.
- In het kader van de validatie en bewaking dienen de resultaten te worden geëvalueerd zoals beschreven in de NBN EN ISO 14698-2 (2003).
 - in functie van het type kiem;
 - in functie van de vooropgestelde waarschuwings- en actielimieten;
 - in functie van het aantal monsters en de monsterlocatie;
 - in functie van de detectiemethodes;
 - rekeninghoudend met het schoonmaakproces;
 - met opvolging van trends en afwijkingen.
- In het kader van de bewaking in operationele toestand moet iedere weefselbank 'waarschuwinglimieten' en 'actielimieten' bepalen per gekwalificeerde ruimte. Deze limieten kunnen bepaald en aangepast worden op basis van trends waargenomen tijdens de validatie en bewaking van de ruimten en na overleg met een multidisciplinair team.

4. REFERENTIES

- Arnow PM, Houchins SG, Richards JM, Chudy R. Aspergillus fumigatus contamination of lymphokine-activated killer cells infused into cancer patients. *J Clin Microbiol* 1991;29(5):1038-41.
- 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, blz. 69409.
- Belgisch Koninkrijk. Wet inzake het verkrijgen en het gebruik van menselijk lichaamsmateriaal met het oog op de geneeskundige toepassing op de mens of het wetenschappelijke onderzoek. BS van 19 december 2008, blz. 68774.
- Bonadonna L, Marconi A. A comparison of two air samplers for recovery of indoor bioaerosols. *Aerobiologia* 1994;10.2:153-6.
- Clontz L. Microbial limit and bioburden tests. Validation approaches and global requirements. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2009.
- Cobo F, Concha A. Environmental microbial contamination in a stem cell bank. *Lett Appl Microbiol* 2007;44(4):379-86.
- Deschenes PD. Viable environmental microbiological monitoring. In: Agalloco J, Carleton FJ, eds. Validation of pharmaceutical processes. New York: Informa Healthcare; 2008;357-369.
- Eastlund T. Bacterial infection transmitted by human tissue allograft transplantation. *Cell Tissue Bank* 2006;7(3):147-66.
- EU – Europese Unie. Richtlijn 2003/94/EG van de Commissie van 8 oktober 2003 tot vaststelling van de beginselen en richtsnoeren inzake goede praktijken bij het vervaardigen van geneesmiddelen voor menselijk gebruik en geneesmiddelen voor onderzoek voor menselijk gebruik.
- EU - Europese Unie. Richtlijn 2004/23/EG van het Europees Parlement en de Raad van 31 maart 2004 tot vaststelling van kwaliteits- en veiligheidsnormen voor het doneren, verkrijgen, testen, bewerken, bewaren en distribueren van menselijke weefsels en cellen.
- EU - Europese Unie. Richtlijn 2006/86/EG van de commissie van 24 oktober 2006 ter uitvoering van Richtlijn 2004/23/EG van het Europees Parlement en de Raad wat betreft de traceerbaarheidsvereisten, de melding van ernstige bijwerkingen en ernstige ongewenste voorvallen en bepaalde technische voorschriften voor het coderen, bewerken, conserveren, bewaren en distribueren van menselijke weefsels en cellen.
- EU - European Union. EU Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version). 91/356/EEC, EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines 2008.
- EU - European Union. EU Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 15 Qualification and validation, EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines 2001.
- Favero MS, Puleo JR, Marshall JH, Oxborrow GS. Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. *Appl Microbiol* 1966;14(4):539-51.
- FDA - Food and Drug Administration. Current Good Tissue Practice for human cell, tissue, and cellular and tissue-based product establishments. 21CFR1271, Subpart C-subpart D; 2001.
- FDA - Food and Drug Administration. Guidance for industry. Sterile Drug Products. Produced by aseptic processing - Current good manufacturing practice; 2004.

- Friberg B, Friberg S, Burman LG. Inconsistent correlation between aerobic bacterial surface and air counts in operating rooms with ultra clean laminar air flows: proposal of a new bacteriological standard for surface contamination. *J Hosp Infect* 1999a;42(4):287-93.
- Friberg B, Friberg S, Burman LG. Correlation between surface and air counts of particles carrying aerobic bacteria in operating rooms with turbulent ventilation: an experimental study. *J Hosp Infect* 1999b;42(1):61-8.
- HGR – Hoge Gezondheidsraad. Aanbevelingen inzake bacteriologische controles van de omgeving binnen de verzorgingsinstellingen. Brussel HGR 2010. Advies n° 8364.
- Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Gicquel G, Tanquerel JJ, Chevrier S, Poisson M, et al. Bacterial and fungal counts in hospital air: comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27(12):1405-8.
- Guns J, Janssens R, Vercammen M. Air quality management. In: Nagy ZP, Varghese AC, Ashok A, editors. *A Practical manual of in vitro fertilization: Advanced methods and novel devices* Type: Generic; 2012.
- Herlong JL, Reubish K, Higdon HL, Boone WR. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in an assisted reproductive technology facility. *Fertility and Sterility* 2008;89:847-853.
- ISO – International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated environments - Part 1: Classification of air clearness. ISO14644-1:1999; 1999.
- ISO - International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control - Part 1: General principles and methods. ISO14698-1:2003; 2003.
- ISO - International Organization for Standardization. Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control - Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination data. ISO14698-2:2003; 2003.
- ISO - International Standard Organisation. Cleanrooms and associated environments - Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO14644-1. ISO14644-2:2000; 2000.
- ISO - International Standard Organisation. Determination of particle size distribution - single particle light interaction methods - Part 4: Light scattering airborne particle counter for clean spaces. ISO 21501-4:2007. 2007.
- Klykens J, Pirnay JP, Verbeken G. Clean rooms and tissue banking how happy I could be with either GMP or GTP. Submitted 2011.
- Lee KS, Bartlett KH, Brauer M, Stephens GM, Black WA, Teschke K. A field comparison of four samplers for enumerating fungal aerosols I. Sampling characteristics. *Indoor Air* 2004;14:360-366.
- Ljungqvist B, Reinmuller B. Airborne viable particles and total number of airborne particles: comparative studies of active air sampling. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000;54:112-116.
- Ljungqvist B, Reinmuller, B. Monitoring of Airborne Viable Particles. In: Dixon M, editor. *Environmental monitoring for cleanrooms and controlled environments. Drugs and Pharmaceutical Sciences. J. Swarbrick. New York: Informa Healthcare, 2007. 61-71.*
- Moldenhauer J. Practical issues in designing and implementing an environmental control program. In: Moldenhauer J, ed. *Environmental monitoring. A comprehensive Handbook. Volume 1. PDA books; 2005;7-26.*
- Pasquarella C, Pitzurra O, Savino A. The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection* 2000;46:241-256.
- Prince HM, Page SR, Keating A, Saragosa RF, Vukovic NM, Imrie KR, et al. Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 1995;15(1):87-91.
- Ritter M, Schwedler J, Beyer J, Movassaghi K, Mutters R, Neubauer A, Schwella N. Bacterial contamination of ex vivo processed PBPC products under clean room conditions. *Transfusion* 2003;43:1587-1595.

- Sandle, T. Environmental monitoring risk assessment. *Journal of GXP Compliance* 10[2]. 2006.
- Schwella N, Rick O, Heuft HG, Miksits K, Zimmermann R, Zingsem J, et al. Bacterial contamination of autologous bone marrow: reinfusion of culture-positive grafts does not result in clinical sequelae during the posttransplantation course. *Vox Sang* 1998;74(2):88-94.
- Shintani H, Taniai E, Miki A, Kurosu S, Hayashi F. Comparison of the collecting efficiency of microbiological air samplers. *Journal of Hospital Infection* 2004;56:42-48.
- Stucki C, Sautter AM, Favet J, Bonnabry P. Microbial contamination of syringes during preparation: the direct influence of environmental cleanliness and risk manipulations on end-product quality. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66(22):2032-6.
- Sutton SVW, Proud DW, Rachui S, Brannan DK. Validation of microbial recovery from disinfectants. *Pda Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 2002;56:255-266.
- Thomas M, Sanborn MD, Couldry R. I.V. admixture contamination rates: traditional practice site versus a class 1000 cleanroom. *Am J Health Syst Pharm* 2005;62(22):2386-92.
- USP – U.S. Pharmacopeia. USP29-NF24. Chapter 1116. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments. United States Pharmacopeia. Baltimore; 2010.
- Vanneaux V, Fois E, Robin M, Rea D, de Latour RP, Biscay N, et al. Microbial contamination of BM products before and after processing: a report of incidence and immediate adverse events in 257 grafts. *Cytotherapy* 2007;9(5):508-13.
- Wang S, Zinderman C, Wise R, Braun M. Infections and human tissue transplants: review of FDA Med Watch reports 2001-2004. *Cell Tissue Bank* 2007;8(3):211-9.
- WHO – World Health Organization. Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities. Eighth draft, 27 February 2011.
- Whyte W, Green G, Albisu A. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *Journal of Aerosol Science* 2007;38:97-110.
- Whyte W, Eaton T. Microbiological risk assessment in pharmaceutical cleanrooms. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences* 2004;9(1):16-23.
- Whyte W, Green G, Albisu A. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *Journal of Aerosol Science* 2007;38(1):97-110.
- Yao, MS, Mainelis G. Investigation of cut-off sizes and collection efficiencies of portable microbial samplers. *Aerosol Science and Technology* 2006;40(8):595-606.

5. SAMENSTELLING VAN DE WERKGROEP

Al de deskundigen hebben **op persoonlijke titel** aan de werkgroep deelgenomen. De namen van de deskundigen van de HGR worden met een asterisk * aangeduid.

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

DE VOS Daniel	Cell technologie	lab MCT HCB-KA
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
IEVEN Greet	Microbiologie	UZA
MARICAU Daniel	Klinische biologie, inspecteur MLM	FAGG
MUYLLE Ludo*	Geneeskunde, klinische biologie	FAGG – UZA, UA
SAEGEMAN Veroniek	Geneeskunde, klinische biologie, ziekenhuishygiëne	UZ Leuven
THONON Fabienne*	Voortplantingsgeneeskunde, embryologie	CHR de la Citadelle de Liège
VAN GEYT Caroline*	Medisch-sociale wetenschappen	UZ Gent
VANSTEENBRUGGE Anne*	Voortplantingsgeneeskunde, embryologie	CHR Namen
VERBEKEN Gilbert	Biologie, QA/QC/RA	lab MCT HCB-KA

Het voorzitterschap werd verzekerd door Johan GUNS en het wetenschappelijk secretariaat door Muriel BALTES.

De volgende deskundigen hebben het advies goedgekeurd:

BEELE Hilde*	Geneeskunde, dermatologie	UZ Gent
CORNU Olivier*	Geneeskunde, orthopedisch chirurgie	UCL
DE SUTTER Petra*	Voortplantingsgeneeskunde	UZ Gent
DELLOYE Christian*	Geneeskunde, orthopedisch chirurgie	UCL
DELFORGE Alain*	Geneeskunde, celtherapie	ULB
HEINEN Ernst	Humane histologie	Ulg
TIMMERMANS Jean-Pierre*	Geneeskunde, histologie, cytologie, cellulaire biologie	UA
PIRNAY Jean-Paul*	Medische wetenschappen	LabMCT HCB-KA
VAN DEN ABBEEL Etienne	Voortplantingsgeneeskunde, embryologie	UZ Gent
VANDERKELEN Alain*	Geneeskunde, algemene chirurgie	HMRA

De administratie werd vertegenwoordigd door:

BONTEZ Walter	Coördinatie Bloed, Cellen, Weefsels en Organen	FAGG
VANTHUYNE Kimberly	Coördinatie Bloed, Cellen, Weefsels en Organen	FAGG

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

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), waarvan er 200 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 (eindbeslissingorgaan). 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), behalve wat betreft vertrouwelijke adviezen. 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 .