

Bacteriologische analyses op teruggewonnen grondstoffen na de recyclage van wegwerpluiers

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Controlestrategie van een effectief sterilisatieproces	3
3	Methode A: controle op pathogenen	5
3.1	<i>Monstername</i>	5
3.1.1	Principe	5
3.1.2	Algemene richtlijnen monstername	5
3.1.3	Materiaal	5
3.1.4	WL1: Monstername van volledige LI-eenheden bij de input- en outputstromen	5
3.1.5	WL2: Monstername van vloeibare outputstroom al dan niet gecombineerd met vaste plastic-fractie	6
3.1.6	Monsterconservering - en bewaring	6
3.2	<i>Monstervoorbereiding</i>	6
3.2.1	Materiaal	6
3.2.2	Werkwijze	6
3.3	<i>Detectie van pathogenen</i>	7
3.3.1	Principe	7
3.3.2	Werkwijze	7
3.3.3	Apparatuur en materiaal	7
3.3.4	Reagentia	7
3.3.5	Suspenderen van pathogenen uit een vast inputmonster in gebufferd peptoon water	7
3.3.6	bevestigingstesten	8
3.3.7	Weergave van de resultaten	8
3.4	<i>Recoverytesten</i>	8
3.4.1	Opzet	8
3.4.2	Voorbereiding en besmetting van de outputstromen	9
3.4.3	Recovery: na inwerktijd suspenderen van pathogenen uit een outputmonster in gebufferd peptoon water en analyse van pathogeen	9
3.4.4	Weergave van de resultaten	9
3.5	<i>Kwaliteitscontrole van de outputstromen uit de recyclage</i>	10
3.5.1	Opzet	10
3.5.2	Analyse van de geselecteerde pathogenen uit een vast outputmonster	10
3.5.3	Analyse van de geselecteerde pathogenen uit een vloeibaar outputmonster	10
3.5.4	Weergave van de resultaten	11
4	Methode B: survival-kill test van sporen <i>Geobacillus stearothermophilus</i> conform de NBN EN ISO 11138-3 norm12	
4.1	<i>Opzet</i>	12
4.2	<i>Apparatuur en materiaal</i>	12
4.3	<i>Ampullenconservering - en bewaring</i>	12
4.4	<i>Procedure survival-kill test via methode B1 en methode B2</i>	12
4.5	<i>Weergave van de resultaten</i>	13
5	Referenties	14

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure betreft de QC (kwaliteitscontrole) van een effectief sterilisatieproces waardoor de afwezigheid van pathogenen in de teruggewonnen grondstoffen van de recyclage van wegwerpluiers ¹ aantoonbaar is. Er zijn twee luiken om dit te kunnen garanderen. Het proces kan:

- via methode A opgevolgd worden door microbiologische analyses waarmee kan worden aangetoond dat er geen relevante pathogenen gedetecteerd worden in de outputstromen van het sterilisatieproces.
- via methode B opgevolgd worden via survival-kill test van *Geobacillus stearothermophilus* sporen, conform de NBN EN ISO 11138-3 norm; een teststrategie moet worden uitgewerkt om een representatieve lokalisatie van de *Geobacillus* suspensie tijdens het doorlopen van een sterilisatieproces te bekomen waarbij het technisch haalbaar moet zijn om het recipiënt met de sporensuspensie onbeschadigd te recupereren na het warmteproces.

2 CONTROLESTRATEGIE VAN EEN EFFECTIEF STERILISATIEPROCES

Bij de opstart van een nieuwe installatie moet het uitvoeren van QC op recuperatiestromen het proces voldoende borgen. De analyses van relevante pathogenen (methode A), of de *Geobacillus* sporentest (indien fysisch realiseerbaar) (methode B), dienen bij de opstartvalidatie getest te worden. De onontbeerlijke monitoring van temperatuur / druk / doorlooptijd dat inherent bij elk sterilisatieproces dient opgevolgd te worden en zorgt voor een blijvende borging.

Bij de opstart van een installatie wordt een beheersplan opgesteld en dient een risicobeoordeling te gebeuren. In de 'sterilisatie'-reactor van een installatie kunnen er nl. plaatsen zijn waar het warmteproces niet optimaal is en waar de technische eisen voor sterilisatie niet volledig bereikt worden. De microbiële testen zijn een hulpmiddel om deze 'cold spots' te detecteren en zo nodig het sterilisatieproces bij te sturen.

Het sterilisatieproces wordt gecontroleerd ten opzichte van de vooropgestelde temperatuur / druk / doorlooptijd en met de test van relevante pathogenen (methode A) of via de *Geobacillus stearothermophilus* sporentest (methode B), indien fysisch realiseerbaar. Het sterilisatieproces is gunstig als het resulteert in de negatieve testresultaat volgens methode A of B.

Indien het beheersplan aantoont dat het sterilisatieproces gunstig is dient een exploitant met zesmaandelijks frequentie het proces te testen. Het resultaat moet driemaal opeenvolgend gunstig zijn om nadien over te gaan naar een jaarlijkse testfrequentie.

Indien het beheersplan aantoont dat het sterilisatieproces niet gunstig is moet een exploitant overgaan tot een optimalisatie van het proces tot hij aantoont dat Het sterilisatieproces gunstig is.

Volgende controlestrategieën zijn van toepassing:

Bij de **definitieve opstart (eerste ingebruikname) van een vergunde installatie met gedefinieerde inputstromen en gedefinieerde herkomst van deze inputstromen en na 6 maanden na opstart en na 12 maanden na opstart** wordt:

of methode A getest op basis van een preselectie van de pathogenen die worden bepaald door steekproeven op de inputstromen van het proces; er dient eveneens aangetoond worden dat met

¹ Cf. Vlarema Wegwerpluier: luier voor baby of incontinentiemateriaal voor volwassene voor éénmalig gebruik

de aangewende extractietechniek een maximale recovery van de geselecteerde pathogenen wordt bereikt (§ 3.3 en § 3.4 en §3.5)

of methode B (zie § 4.4 B1 en B2) getest via survival-kill test van *Geobacillus stearothermophilus* sporen.

Indien van een vergunde installatie bij opstart, na 6 maanden en na 12 maanden de afwezigheid van pathogenen is aangetoond kan overgegaan worden naar een **jaarlijkse kwaliteitscontrole** via:

of de methode A (§ 3.5) getest met de gescreende pathogenen geselecteerd uit de routine inputstromen

of de methode B2 getest via survival-kill test uitgevoerd, met vijf maal één ampul omwikkeld met drie nieuwe overlappende luier/incontinentie-eenheden via het Matroesjka inpak principe (zie § 3.4).

Wanneer de **inputstromen en/of herkomst van deze inputstromen ingrijpend wijzigt**, bv. overgang van luiers naar incontinentiematerialen of vice versa, of bv. aanvoer uit een kindercentra wijzigt naar een aanvoer vanuit ziekenhuizen, dan moet sterilisatieproces via methode A (§ 3.3 en § 3.4 en § 3.5) of methode B (zie § 4.4 B1 en B2) hertest worden.

Voor de daaropvolgende jaarlijkse kwaliteitscontrole wordt of de methode A (§ 3.5) of de methode B2 (§ 4.4) uitgevoerd.

In het kader van een vergunning is het noodzakelijk dat een exploitant voor de validatie van zijn installatie (piloot of full-scale) de afwezigheid van een aantal pathogenen zoals *E.coli*, *Enterococci* en *Staphylococcus aureus* op de gesteriliseerde outputstromen kan aantonen (§3.5).

3 METHODE A: CONTROLE OP PATHOGENEN

3.1 MONSTERNAME

3.1.1 PRINCIPE

Afhankelijk van het doelpubliek waarvan de luiers of incontinentiematerialen (verder 'LI'-eenheden) afkomstig zijn, wordt het patroon aan prominente pathogenen bepaald. De selectie van de te detecteren pathogenen op de outputstromen wordt afgestemd op relevante fecale en dermale pathogenen in de inputstromen.

3.1.2 ALGEMENE RICHTLIJNEN MONSTERNAME

Er wordt verwezen naar CMA/1/A.14 voor de algemene richtlijnen van de monstername betreffende veiligheid (CMA/1/A.14 § 3), partij en partij-afbakening (CMA/1/A.14 § 4 en § 4.1.1), , verpakking en conservering van laboratorium-monsters (CMA/1/A.14 § 9), transport en monsteroverdracht (CMA/1/A.14 § 10), registratie en rapportering (CMA/1/A.14 § 11).

Richtlijnen betreffende de greepgrootte, aantal grepen en monstergrootte worden hieronder toegelicht in § 3.1.4.

3.1.3 MATERIAAL

3.1.3.1 wegwerphandschoenen

3.1.3.2 grijpstok (facultatief)

3.1.3.3 reine ongebruikte plasticzakken voor het bemonsteren van de volledige LI-eenheden

3.1.3.4 steriele recipiënten voor het bemonsteren van vloeibare outputstromen

3.1.4 WL1: MONSTERNAME VAN VOLLEDIGE LI-EENHEDEN BIJ DE INPUT- EN OUTPUTSTROMEN

Voor de monstername van de inputstromen dient een vooropgesteld aantal grepen nl. volledige LI-eenheden met de hand of met een grijpstok uit de partij genomen te worden. Bij het selecteren van de LI-eenheden wordt aandacht geschonken dat 'indien toepasselijk' bij elke greep visueel te onderscheiden types LI-eenheden worden bemonsterd.

De LI-eenheden dienen niet 'steriel' bemonsterd te worden maar wel op aseptische wijze. De monsternemer draagt hierbij nieuwe wegwerphandschoenen en gebruikt reine ongebruikte plastic zakken.

Indien tijdens het sterilisatieproces de vorm van de LI-eenheden niet wijzigt wordt voor de monstername van de outputstromen op identieke wijze gewerkt zoals voor de inputstromen. Belangrijk is dat de output LI-eenheden onmiddellijk na de warmtebehandeling worden bemonsterd en dus niet verder in het vervolgproces. Vanzelfsprekend speelt de toegankelijkheid hier een belangrijke rol. Van zodra de LI-eenheden kunnen worden bemonsterd worden ze op aseptische wijze genomen, dit om na-contaminatie te vermijden. Hierbij wordt geregistreerd waar in het proces bemonsterd wordt.

Verder wordt er verwezen naar CMA/1/A.15 (monsterneming van statische partijen of partijen in beweging) voor het aantal grepen en de monsternametechniek in functie van de opslag van de input- of outputstroom.

Het veldmonster (aantal te nemen grepen x LI-eenheid) wordt integraal – zonder reductie van de monstergrootte (CMA/1/A.18) - in een reine plastic zak aan het labo bezorgd.

3.1.5 WL2: MONSTERNAME VAN VLOEIBARE OUTPUTSTROOM AL DAN NIET GECOMBINEERD MET VASTE PLASTIC-FRACTIE

Indien tijdens het proces de hoedanigheid van de LI-eenheden gewijzigd wordt omwille van toepassing van hoge druk en temperatuur bijvoorbeeld een Thermal Pressure Hydrolysis (TPH) dan is de monstername van een vloeibare outputstroom van toepassing en wordt er verwezen naar CMA/1/A.16 Afvalstoffen - grondstoffen Monsternemingstechnieken vloeistoffen, afhankelijk van de te bemonsteren situatie en grootte van de vloeistofopslag. Deze CMA geeft duiding en informatie m.b.t. de monsternamemogelijkheden, specifiek over monstername uit een tank op verschillende monsternemingsniveaus of monstername aan een kraan, na 20%/50%/80% verpompen.

In CMA/1/A.16 § 3 'Vorbereitung monsterneming' wordt benadrukt dat indien de te bemonsteren slurry een hoge temperatuur heeft, dan is het gebruik van een monstername-recipient uit materiaal zoals bv. inox of glas aangewezen.

De slurry uit de TPH wordt steriel bemonsterd en indien toegankelijk vóór de scheiding van de plastic fractie. Hierbij dient zeker geregistreerd welke stap in het proces bemonsterd wordt. Indien vóór scheiding slurry en plastics wordt bemonsterd, dient rekening gehouden te worden met eventuele aanwezigheid van vaste deeltjes bij de monstername. De greepgrootte en/of monsternamemateriaal dient aangepast te worden aan de grootte van de vaste deeltjes.

De genomen grepen worden integraal – zonder reductie van de monstergrootte (CMA/1/A.18)- in een steriele recipient aan het labo bezorgd.

3.1.6 MONSTERCONSERVERING - EN BEWARING

De monsters worden gekoeld (1 – 5°C) geconserveerd gedurende een maximale termijn van 1 dagen, namelijk 24 uur van toepassing vanaf het tijdstip (datum/uur) van de monsterneming tot de aanvang van analyse in het laboratorium.

3.2 MONSTERVOORBEREIDING

3.2.1 MATERIAAL

- 3.2.1.1 materiaal om een LI-eenheid te openen en het nemen van een monster: steriele lepel / schaar / pincet / scalpel
- 3.2.1.2 steriele plastic blenderzakken
- 3.2.1.3 balans voorzien van houder voor blenderzak
- 3.2.1.4 steriele recipienten geschikt voor (automatische) vortex

3.2.2 WERKWIJZE

Vaste inputstroom: Uit elk LI-eenheid wordt telkens een fractie van 1 g feces gecollecteerd, alsook een stukje van de contact-celluloselaag van 2 cm op 2 cm.

Vaste outputstroom: Uit elk LI-eenheid wordt telkens een fractie van 1 g feces gecollecteerd, een stukje van de contact-celluloselaag van 2 cm op 2 cm en 1 g SAP ².

Het homogeniseren in een labblender gebeurt in een steriele plastic blenderzak. De zakken moeten een zodanige capaciteit hebben dat de totaliteit van de deelmonsters met het vereiste negenvoudig volume BPW kan vermengd worden. Na het ontsluiten van elke LI-eenheid wordt elk deelmonster (feces + contact-celluloselaag respectievelijk feces + contact-celluloselaag + SAP) rechtstreeks in één steriele plastic zak aseptisch afgewogen.

² SAP: Super Absorberend Polymeer

Vloeibare outputstroom: Homogeniseer conform CMA/5/A.2 en breng in een steriel recipiënt geschikt voor (automatische) vortex één volume vloeibaar monster dat verdund wordt met 9 x volume BPW.

3.3 DETECTIE VAN PATHOGENEN

3.3.1 PRINCIPE

Op de vaste inputstroom worden pathogenen bepaald. Voor de opvolging van aanwezigheid van pathogenen dienen minstens zeven relevante fecale en dermale pathogenen geselecteerd te worden. Deze pathogenenselectie wordt nadien getest op recovery in de outputstro(o)m(en). Minstens vier pathogenen waarvan een maximale recovery via een gevalideerde extractiemethode is aangetoond worden nadien opgevolgd als parameters voor kwaliteitscontrole (QC) van de outputstro(o)m(en).

3.3.2 WERKWIJZE

Detectie van pathogenen gebeurt aan de hand van:

- labblender voor vaste (onscherpe) matrices
- sonicatie bij aanwezigheid van scherpe vaste fragmenten in de matri(x)(ces)
- (automatische) vortex voor vloeistoffen

3.3.3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 3.3.3.1 steriele plastic blenderzakken
- 3.3.3.2 labblender: peristaltische homogenisator
- 3.3.3.3 (automatische) vortex
- 3.3.3.4 soniceerbak
- 3.3.3.5 automatische en/of gegradueerde pipetten
- 3.3.3.6 waterbad van $45 \pm 1^\circ\text{C}$
- 3.3.3.7 incubator van $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (of andere optimale groeitemperatuur per pathogeen)
- 3.3.3.8 laminaire flowkast
- 3.3.3.9 representatieve inputstroom LI-eenheden
- 3.3.3.10 representatieve steriele³ outputstro(o)m(en) voor recoverytesten (gesteriliseerde LI-eenheid of gesteriliseerde vloeibare outputstroom)

3.3.4 REAGENTIA

- 3.3.4.1 gebufferd peptoon water (BPW)
- 3.3.4.2 verdunningsbuizen met standaardvolume steriel diluent
- 3.3.4.3 selectieve agar voor diverse pathogenen
- 3.3.4.4 biochemische / serologische bevestigingstesten of MALDI-TOF MS voor pathogenen

3.3.5 SUSPENDEREN VAN PATHOGENEN UIT EEN VAST INPUTMONSTER IN GEBUFFERD PEPTOON WATER

- Aan de afgewogen⁴ feces + contact-celluloselaag monsters in een steriele plastic blenderzak wordt een negenvoud volume⁵ gebufferd peptoon water (BPW op kamertemperatuur) aseptisch

³ Bijkomende geautoclaveerd in het analyselaboratorium in een gevalideerde autoclaaf

⁴ Tolerantie: $\pm 5\%$

⁵ Tolerantie $\pm 2\%$

toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien de monsters fragmenten bevatten die de steriele blenderzak kunnen beschadigen, gebruik zakken in dubbel om perforatie en lekkage te voorkomen. Zoniet dient overgeschakeld te worden naar soniceren (in geschikt recipiënt);

- Homogenisatie / sonicatie gedurende 2 minuten;
- Onmiddellijk wordt uit de steriele plastic zak/recipiënt van de gebufferd peptoon suspensie met een pipet een volume van het te analyseren monsterextract overgebracht in verdunningsbuizen om hiervan een verdunningsreeks (10^{-1} tot 10^{-6}) te maken. Een standaard portie (bv. 1 ml) van elke verdunning in lege steriele petrischalen (aantal is functie van de te testen pathogeen) overbrengen of uitplaten van standaard porties (bv. 100 μ l) op selectieve agars per pathogeen. Vermijd hierbij om stukjes monster te pipetteren. De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en uitplaten/of gietplaten op/met (s)electieve (chromogeen) agar moet zo kort mogelijk worden gehouden;
- Voor de gietplaten: petrischalen vullen met ± 18 ml vloeibaar (s)electieve (chromogeen) agar bewaard bij 44-46°C in een waterbad; entmateriaal en medium mengen door het uitvoeren van horizontale mengbewegingen;
- Gietplaat agar laten stollen en gietplaat agars / uitgeplate agars indien gewenst drogen in een laminaire flow en geïnverteerd incuberen bij optimale groeiomstandigheden per pathogeen.

3.3.6 BEVESTIGINGSTESTEN

Voer de nodige biochemische/serologische testen uit volgens de richtlijnen van de producent, telkens voor de geselecteerde presumptieve kolonies of maak gebruik de MALDI-TOF MS ter identificatie van de pathogenen.

3.3.7 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Geef de identificaties aan van zeven (preferentieel fecale en dermale) pathogenen die zullen worden getest op de recoverytesten.

3.4 RECOVERYTESTEN

3.4.1 OPZET

Een steriele outputstroom (vast of vloeibaar) wordt besmet met een gekende hoeveelheid (10^7 - 10^8 kve per matrix) van de 7 geselecteerde en geïsoleerde pathogenen uit § 3.3.7, en er wordt nagegaan of met de gekozen extractiemethode uit § 3.3.5 de totaliteit van de pathogenen worden gerecupereerd. Dit is belangrijk en noodzakelijk omdat bij in situ besmettingen de belading aan pathogenen in hun totaliteit moet kunnen geëxtraheerd worden als bewijs van een al dan niet effectieve sterilisatie.

Indien alle aanwezige pathogenen kunnen worden geëxtraheerd in de EoW-outputstromen dan kan - wanneer de pathogenen niet aantoonbaar zijn - de steriliteit gegarandeerd worden. Bij een inefficiënte extractie kunnen nog pathogenen in de matrix 'achterblijven' zonder ze te detecteren en kan voor de matrix een vals negatieve steriliteit gerapporteerd worden.

Voor de terugvinding (lees verder als 'recovery') worden bij elke uitgevoerde test de pathogene organismen uitgeplaat op electieve/selectieve agars en dit na een 24 uur inwerktijd. Tijdens een dergelijke inwerktijd kan de hechting van de micro-organismen op of binnen de matrix evolueren. Voor de interpretatie van de resultaten geldt volgend criterium voor een volwaardige recovery: de tellingen van de bacteriën na log transformatie zijn in absolute waarden niet significant verschillend wanneer het verschil ⁶ in log-waarden $\leq 0,3$.

⁶ ISO 19036:2019

3.4.2 VOORBEREIDING EN BESMETTING VAN DE OUTPUTSTROMEN

- Een vaste steriel outputstroom (LI-eenheid) wordt ontmanteld en er wordt een oppervlak van ongeveer 3 cm op 3 cm feces + contact-celluloselaag + SAP met een steriele pincet / schaar / scalpel geïsoleerd in een steriele plastic blenderzak. De inhoud wordt gewogen.
- Een vloeibare steriele outputstroom wordt als dusdanig gebruikt: breng op steriele wijze 5 ml ervan in een steriel recipiënt;
- Elke matrix wordt besmet telkens met een gekende hoeveelheid (10^7 - 10^8 kve per g matrix) van telkens één van de zeven geselecteerde en geïsoleerde pathogenen uit § 3.3.7. Een inwerktijd van 24 uur bij omgevingstemperatuur wordt aangehouden. De leefbare telling van de geënte pathogenen gebeurt via een verdunningsreeks, en verdunning 10^{-6} , 10^{-7} tot 10^{-8} wordt uitgeplaat op electieve/selectieve agar.

3.4.3 RECOVERY: NA INWERKTIJD SUSPENDEREN VAN PATHOGENEN UIT EEN OUTPUTMONSTER IN GEBUFFERD PEPTOON WATER EN ANALYSE VAN PATHOGEEN

- Aan het besmette vast monster in een steriele plastic blenderzak wordt een negenvoud volume⁷ gebufferd pepton water (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toegevoegd (finaal 1/10 massa/volume verhouding)
- Aan een afgewogen⁸ vloeibaar monster in een steriele tube wordt een negenvoud volume⁹ gebufferd pepton water (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toegevoegd (finaal 1/10 massa/volume verhouding);
- Homogenisatie met labblender respectievelijk vortex gedurende 2 minuten;
- Onmiddellijk wordt uit de steriele plastic zak/recipiënt van de gebufferd pepton suspensie met een pipet een volume van het te analyseren monsterextract overgebracht in verdunningsbuizen om hiervan een verdunningsreeks (10^{-1} tot 10^{-6}) te maken. Een standaard portie (bv. 1 ml) van elke verdunning in lege steriele petrischalen (aantal is functie van de te testen pathogeen) overbrengen of uitplaten van standaard porties (bv. 100 µl) op selectieve agars per pathogeen. Vermijd hierbij om stukjes monster te pipetteren. De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het uitplaten/of gietplaten op/met (s)electieve (chromogeen) agar moet zo kort mogelijk worden gehouden;
- Voor de gietplaten: petrischalen vullen met ±18 ml vloeibaar (s)electieve (chromogeen) agar bewaard bij 44-46°C in een waterbad en entmateriaal en medium mengen door het uitvoeren van horizontale meng bewegingen;
- Gietplaat agar laten stollen en gietplaat agars / uitgeplate agars indien nodig drogen in laminaire flow en geïnverteerd incuberen bij optimale groeiomstandigheden per pathogeen.

3.4.4 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

De resultaten van de recoverytesten worden berekend en geïnterpreteerd met het criterium voor een volwaardige recovery: de tellingen van de geënte bacteriën en van de recovery bacteriën na log transformatie zijn in absolute waarden niet significant verschillend wanneer het verschil in log-waarden $\leq 0,3$.

Van de zeven geteste pathogenen worden er vier geselecteerd die de hoogste recovery aangeven.

⁷ Tolerantie ± 2 %

⁸ Tolerantie: ± 5 %

⁹ Tolerantie ± 2 %

3.5 KWALITEITSCONTROLE VAN DE OUTPUTSTROMEN UIT DE RECYCLAGE

3.5.1 OPZET

De outputstromen (vast en/of vloeibaar) worden getest op de geselecteerde pathogenen uit § 3.4.4. Hiervoor worden onderstaande werkwijzen gevolgd om de afwezigheid van pathogenen (< detectielimiet) aan te tonen na een sterilisatiecyclus. Voor de frequentie van deze test wordt verwezen naar § 2.

3.5.2 ANALYSE VAN DE GESELECTEERDE PATHOGENEN UIT EEN VAST OUTPUTMONSTER

- Aan de afgewogen¹⁰ feces + contact-celluloselaag + SAP monsters in een steriele plastic zak wordt een negenvoud volume¹¹ gebufferd pepton water (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toevoegen (finaal 1/10 massa/volume verhouding). Indien de monsters fragmenten bevatten die de steriele plastic zak kunnen beschadigen, gebruik zakken in dubbel om perforatie en lekkage te voorkomen. Zoniet dient overgeschakeld te worden naar soniceren;
- Homogenisatie / sonicatie gedurende 2 minuten;
- Een veelvoud van bv. 1 ml porties van het de analyseren suspensie dient geanalyseerd te worden dat representatief voor 1 gram monster. Onmiddellijk uit de steriele plastic zak van de gebufferd pepton suspensie met pipet standaard porties in lege steriele petrischalen (aantal is functie van de te testen pathogeen) overbrengen of uitplaten van standaard porties op selectieve agar per pathogeen. Vermijd hierbij om stukjes monster te pipetteren. De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het uitplaten/of gietplaten op/met (s)electieve (chromogeen) agar moet zo kort mogelijk worden gehouden;
- Voor de gietplaten: petrischalen vullen met ± 18 ml vloeibaar (s)electieve (chromogeen) agar bewaard bij 44-46°C in een waterbad en entmateriaal en medium mengen door het uitvoeren van horizontale bewegingen;
- Gietplaat agar laten stollen en gietplaat agars / uitgeplate agars indien gewenst drogen in een laminaire flow en geïnverteerd incuberen bij optimale groeiomstandigheden per pathogeen.

3.5.3 ANALYSE VAN DE GESELECTEERDE PATHOGENEN UIT EEN VLOEIBAAR OUTPUTMONSTER

- Aan een afgewogen¹² vloeibaar monster in een steriele tube wordt een negenvoud volume¹³ gebufferd pepton water (BPW op kamertemperatuur) aseptisch toegevoegd (finaal 1/10 massa/volume verhouding);
- Homogenisatie met vortex gedurende 2 minuten;
- Een veelvoud van bv. 1 ml porties van het de analyseren suspensie dient geanalyseerd te worden dat representatief voor 1 gram monster. Onmiddellijk uit de tube van de gebufferd pepton suspensie met pipet standaard porties in lege steriele petrischalen (aantal is functie van de te testen pathogeen) overbrengen of uitplaten van standaard porties op selectieve agar per pathogeen. De tijd tussen inoculatie van de petrischalen en het uitplaten/of gietplaten op/met (s)electieve (chromogeen) agar moet zo kort mogelijk worden gehouden;
- Voor de gietplaten: petrischalen vullen met ± 18 ml vloeibaar (s)electieve (chromogeen) agar bewaard bij 44-46°C in een waterbad en entmateriaal en medium mengen door het uitvoeren van horizontale bewegingen;
- Gietplaat agar laten stollen en gietplaat agars / uitgeplate agars indien gewenst drogen in een laminaire flow en geïnverteerd incuberen bij optimale groeiomstandigheden per pathogeen.

¹⁰ Tolerantie: ± 5 %

¹¹ Tolerantie ± 2 %

¹² Tolerantie: ± 5 %

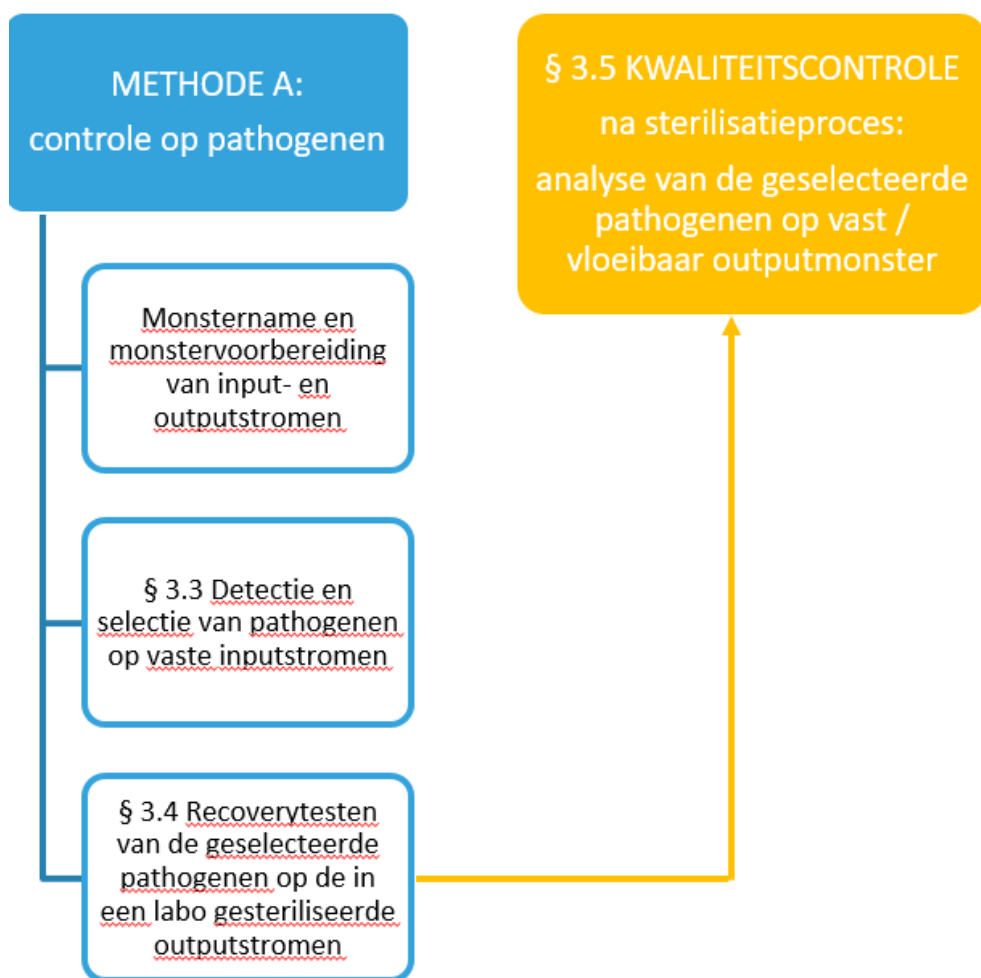
¹³ Tolerantie ± 2 %

3.5.4 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

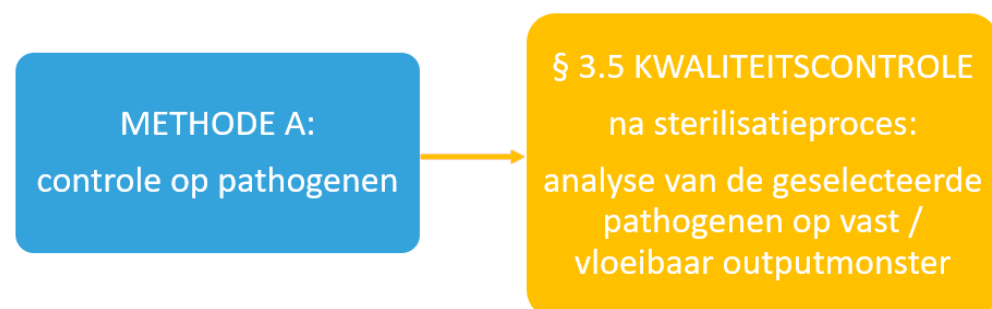
Rapporteer het aantal kve/g outputstroom van de vier geselecteerde pathogenen.
De afwezigheid van de pathogenen wordt uitgedrukt als < 1 kve/g.

Flowchart van de methode A voor een QC

- bij de definitieve opstart (eerste ingebruikname) van een vergunde installatie met gedefinieerde grondstoffen en gedefinieerde herkomst van de inputstromen
- wanneer de grondstof en/of herkomst van de inputstromen ingrijpend wijzigt



Flowchart van de methode A een routine (half)jaarlijkse kwaliteitscontrole QC op de pathogenen geselecteerd uit bij de definitieve opstart of na ingrijpende wijziging van de grondstof en/of herkomst van de inputstromen



4 METHODE B: SURVIVAL-KILL TEST VAN SPOREN *GEOBACILLUS STAEOTHERMOPHILUS* CONFORM DE NBN EN ISO 11138-3 NORM

4.1 OPZET

De steriliteit van de outputstromen van een recyclage-installatie worden getest aan de hand van survival-kill test op de biologische indicator: nl. sporen *Geobacillus staerothermophilus*.

Een aantal vaste plaatsen dienen geïdentificeerd te worden binnen de sterilisatie-unit, nl. plaatsen waar het warmteproces (vermoedelijk) niet optimaal is. Daarnaast worden een aantal biologische indicator ampullen mee in de doorstroom van de installatie getest.

Voor de frequentie van survival-kill test wordt verwezen naar §2.

4.2 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 4.2.1 commerciële *Geobacillus staerothermophilus* sporen ampullen
- 4.2.2 materiaal en/of kabelbinders om ampullen binnen in de reactor vast te maken
- 4.2.3 stift om de ampullen te identificeren met datum en lokalisatie
- 4.2.4 15 nieuwe 'ongebruikte' LI-eenheden
- 4.2.5 opvallende gekleurde tape
- 4.2.6 incubator bij aangegeven temperatuur voor groei van de *Geobacillus*

4.3 AMPULLENCONSERVERING - EN BEWARING

Na een survival-kill test worden de ampullen verzameld en geconserveerd bij omgevingstemperatuur en getransporteerd binnen een maximale termijn van 6 uur van toepassing vanaf het tijdstip beëindiging sterilisatieproces (tijdstip registreren) tot de aanvang van incubatie in het laboratorium.

4.4 PROCEDURE SURVIVAL-KILL TEST VIA METHODE B1 EN METHODE B2

Elke ampule wordt geïdentificeerd met lokalisatie binnen het sterilisatieproces en datum van uitvoering van de survival-kill test.

Methode B1: er worden op minstens 5 vaste plaatsen binnen de sterilisatiereactor sporen-ampullen vastgemaakt. Deze locaties worden strategisch bepaald en de wijze om de ampullen te hechten dient gevalideerd te zijn.

Methode B2: om de sterilisatie-efficiëntie van een sterilisatiecyclus met de karakteristieke lading te verifiëren wordt eveneens een survival-kill test van 5 pakketjes verdeeld over de partij LI-eenheden uitgevoerd. Hiervoor wordt vijf maal één ampul omwikkeld met drie nieuwe 'ongebruikte' overlappende LI-eenheden (Matroesjka inpak principe) om de meest kritische sterilisatie-efficiëntie voor de penetratie van het sterilisatieproces te verifiëren. Elk van de drie in elkaar gewikkelde LI-eenheden worden vóór het inpakken nat gemaakt met water (100ml) om de doeltreffendheid van het sterilisatieproces te controleren.

Alle LI-pakketten met een sporenampul worden zichtbaar gemaakt met opvallende tape voor hun latere identificatie en recuperatie en worden via de input homogeen verdeeld binnen de te steriliseren lading.

Na de sterilisatiecyclus worden de ampullen die in de sterilisatiereactor werden vastgemaakt verzameld (B1). Na de sterilisatiecyclus worden de Matroesjka-pakjes gerecupereerd en alle sporenampullen uit de pakking gehaald (B2). De ampullen worden zorgvuldig verpakt voor veilig vervoer en gekoeld getransporteerd naar het laboratorium. Na levering aan het laboratorium worden de sporenampullen geïncubeerd volgens de instructies van de fabrikant (bv. 48 uur bij 55°C).

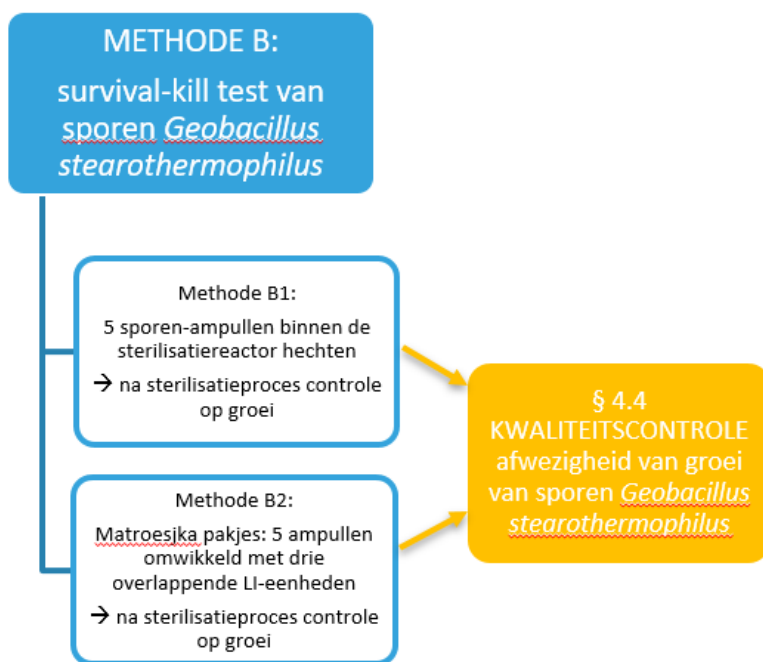
Voor elke geverifieerde cyclus wordt naast alle gecollecteerde ampullen in het laboratorium steeds een positieve controle mee geïncubeerd: deze controle ampul wordt samen met de gesteriliseerde ampullen gecheckt op groei van de sporen of geen groei van sporen wegens effectief afdoden door het sterilisatieproces.

4.5 WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

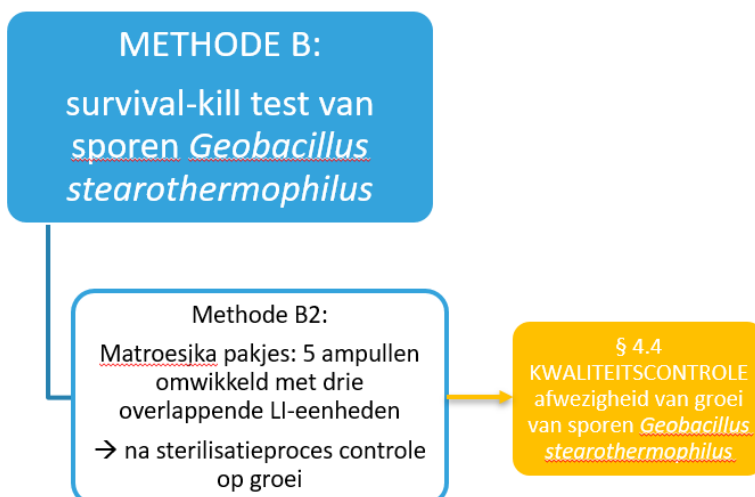
Rapporteer de bevindingen van de survival-kill test van elk sporenampul (met identificatie en lokalisatie) ten opzichte van de positieve controle.

Flowchart van de methode B (B1 en B2) voor een QC:

- bij de definitieve opstart (eerste ingebruikname) van een vergunde installatie met gedefinieerde grondstoffen en gedefinieerde herkomst van de inputstromen
- wanneer de grondstof en/of herkomst van de inputstromen ingrijpend wijzigt



Flowchart van de methode B2 voor een routine (half)jaarlijkse kwaliteitscontrole QC:



5 REFERENTIES

- ISO 11138-3:2017 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 3: Biological indicators for moist heat sterilization processes
- ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain - estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.