



Centrum
Voortplantingsgeneeskunde Brabant
Tilburg | 's-Hertogenbosch | Breda

Een Cleanroom voor IVF is Microbiologische Nonsens

8e KLEM kwaliteitsdag 8 april 2014

Jan Marcelis
Met dank aan Dimitri Consten



EU richtlijn 2006/86/EG Punt 3

- Bijlage 1 bij de European Guide to Good Manufacturing Practice (GMP) en Richtlijn 2003/95/EG, omtrent geschiktheid achtergrondomgeving voor het bewerken van weefsels/cellen:
- Luchtkwaliteit zoals beoordeeld aan de hand van het aantal deeltjes en het aantal kolonievormende eenheden.
 - Ten minste GMP-klasse D.
- Weefsels of cellen die tijdens de bewerking aan de omgeving worden blootgesteld en daarna geen microbiële inactivatie ondergaan:
 - Luchtklasse A
- Een achtergrond in klasse D kan 1033 meer deeltjes bevatten dan de aseptische omgeving klasse A.
- Behoudens punt 4 van de richtlijn.

8 April 2014

Cleanroom bij IVF is
microbiologische nonsens

2



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

8 April 2014 Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens 3



EU richtlijn 2006/86/EG

4. Minder stringente omgevingscondities dan aangegeven in punt 3 kunnen aanvaardbaar zijn indien:

- Aangetoond is dat de wijze waarop en de weg waarlangs de weefsels of cellen aan de ontvanger worden toegediend, van dien aard zijn dat het risico op overdracht van een bacteriële of fungale infectie naar de ontvanger aanzienlijk kleiner is dan bij cel- en weefseltransplantatie, of
- Het technisch niet mogelijk is om het vereiste proces in een omgeving van klasse A uit te voeren (bv. als voor bepaalde apparatuur in de bewerkingsruimte speciale eisen gelden die niet geheel te verenigen zijn met klasse A).

- **c: Risico is aanzienlijk groter:**
 - Wijze van verkrijgen oocyten en sperma niet steriel
 - Wijze van embryotransfer niet steriel:
 - Urethra (man) en vaginawand niet ontsmet
 - Cervix slijm komt mee met katheter

microbiologische nonsens

**Table 1. Vaginal bacterial flora: organisms recovered**

John G. Bartlett, et al **Quantitative Bacteriology of the Vaginal Flora** J. INFECT. DIS. **136**, 1977

Organism	No. of specimens with organisms	No. of strains isolated	Mean concentration*
Aerobes and facultative anaerobes			
Gram-positive cocci	52	145	8.13 ± 0.22
Gram-positive bacilli	48	74	6.67 ± 0.28
Gram-negative bacilli	42	62	7.87 ± 0.25
	9	9	4.92 ± 0.69
Anaerobic bacteria			
Gram-positive cocci	49	200	9.08 ± 0.22
Gram-positive bacilli	39	71	8.70 ± 0.31
Gram-negative bacilli	35	66	8.60 ± 0.28
	32	63	8.22 ± 0.39

*Concentration expressed in $\log_{10}$ cfu/g ± 1 SE.



Microbiële Flora

- Bacteriën (kolonie vormende eenheden)

- Vaginawand: 10^8 - 10^9 /gram

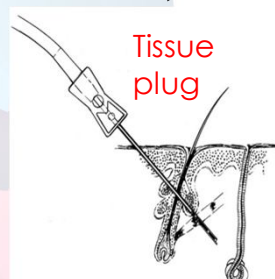
- Cervix: 10^8 - 10^{10} /ml

- Urethra man: 10^4 - 10^5 /ml

- Semen: 10^3 - 10^8 /ml

- Lucht (klasse D)

- $<200/\text{m}^3 = 2 \times 10^{-4}/\text{ml} = 0,0002/\text{ml}$



8 April 2014

Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens

6



Luchtmetingen IVF lab (Klasse D)

KVE metingen: (Ongeveer klasse C)

Datum	Plaats	Aantal KVE / m ³	Species
11-11-2013	Semenbewerking	50	• Bacteriën gekweekt
		3	• Schimmels gekweekt
11-11-2013	Tafel microscoop midden	27	• Bacteriën gekweekt
		3	• Schimmels gekweekt
11-11-2013	Embryo's beoordelen	3	• Bacteriën gekweekt
			• Geen schimmels gekweekt
11-11-2013	Administratie	33	• Bacteriën gekweekt
		7	• Schimmels gekweekt
11-11-2013	ICSI plaats	67	• Bacteriën gekweekt
		7	• Schimmels gekweekt

Deeltjes metingen (Ongeveer klasse B)

Datum	Plaats	0.3 µm	0.5 µm	5.0 µm
11-11-2013	Semenbewerking	211840	10315	255
11-11-2013	Tafel microscoop midden	103200	5545	130
11-11-2013	Embryo's beoordelen	155635	10335	160
11-11-2013	Administratie	79415	4325	70
11-11-2013	ICSI plaats	116815	6895	85



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

Klasse	Maximaal toegelaten aantal deeltjes per m ³ gelijk of groter dan de gespecificeerde grootte			
	In rust		In werking	
	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



EU richtlijn 2006/86/EG

Punt 4

Minder stringente omgevingscondities dan aangegeven in punt 3 kunnen aanvaardbaar zijn indien,

- er een gevalideerde microbiële inactivatie of gevalideerde eindsterilisatie wordt toegepast, of
- aangetoond is dat blootstelling aan een omgeving van klasse A schadelijk is voor de vereiste eigenschappen van de betrokken weefsels of cellen, of

.....

b: Flowkast, laminair flow; afkoeling, verdamping, lastiger manipuleren?

a: Kweekmedium met antibiotica, zeer sporadisch infectie in kweek en herkomst altijd één v.d. Partners

8 April 2014 Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens 9



M.F. Peeters
In Vitro Fertilisatie EZH
Elisabeth ZKH Tilburg

Dagrapport
 Patiëntennummer : 2030341 A2030341
 BSN :
 Naam : Afd Ivfe Elisabeth-Zhs
 Adres : Dr. Marcellis 2384 GP Plaats Onbekend.
 Geboortedatum : 29-02-1952 Geslacht: V Datum Rapport: 01-04-2014

Materiaal : vocht/weefsel semen FERTILITEITSAKJE
 Klinische gegevens : B-D-NR 6619
 Datum afname : 24-06-2004 Ordernummer : 04E069198
 Datum ontvangst : 24-06-2004 afdeling : IVFE

Macroscopie : geen bijzonderheden

Microscopie
 Gram-preparaat :
 cellen : geen
 Gramneg. staven : sporadisch

Kweek : 1: Escherichia coli: meerdere

Gevoeligheid :
 : amoxicilline 1
 : amoxicilline/clavulaanzuur R
 : piperacilline/tazobactam S
 : cefuroxim S
 : ofloxacin S
 : trimethoprim/sulfamethoxazol S
 : gentamicine S
 : tobramycine S
 (S=Gevoelig I=Intermediair R=Resistent)


M.F. Peeters
In Vitro Fertilisatie EZH
Elisabeth ZKH Tilburg

Dagrapport
 Patiëntennummer : 2030341 A2030341
 BSN :
 Naam : Afd Ivfe Elisabeth-Zhs
 Adres : Dr.Marcelis 2384 GP Plaats Onbekend.
 Geboortedatum : 29-02-1952 Geslacht: V Datum Rapport: 01-04-2014

Materiaal : vocht/veefsel semen V00R BEWERKING
 Klinische gegevens : B-D-6619
 Datum afname : 24-06-2004 Ordernummer : 04E069206
 Datum ontvangst : 24-06-2004 afdeling : IVFE

Macroscopie : geen bijzonderheden
Microscopie
 Gram-preparaat:
 polymorfnucl. leucocyten : sporadisch
 spermatozoa : enkele
 Gramneg. staven : enkele

Kweek : 1: Escherichia coli: meerdere
Gevoeligheid :

: amoxicilline	1
: amoxicilline/clavulaanzuur	R
: piperacilline/tazobactam	S
: cefuroxim	S
: cefloxacin	S
: trimethoprim/sulfamethoxazol	S
: gentamicine	S
: tobramycine	S

 (S=Gevoelig I=Intermediair R=Resistent)

Verrekencodes: 980022,075043,070501,070507,
 070507,070507,070507,070507,


M.F. Peeters
Fertilititeit
Elisabeth ZKH Tilburg

Dagrapport
 Patiëntennummer : 2030341 A2030341
 BSN :
 Naam : Afd Ivfe Elisabeth-Zhs
 Adres : Dr.Marcelis 2384 GP Plaats Onbekend.
 Geboortedatum : 29-02-1952 Geslacht: V Datum Rapport: 01-04-2014

Materiaal : vocht/veefsel Fertilititeitshakje.
 Klinische gegevens :
 Datum afname : 07-06-2010 Ordernummer : 10E067505
 Datum ontvangst : 07-06-2010 afdeling : FERE

Kweek : 1: Stenotrophomonas maltophilia: meerdere
Gevoeligheid :

: amoxicilline	1
: amoxicilline/clavulaanzuur	R
: cefazoline	R
: cefuroxim	R
: ceftazidim	R
: ciprofloxacin	S
: trimethoprim/sulfamethoxazol	S
: tobramycine	R

 (S=Gevoelig I=Intermediair R=Resistent)

Verrekencodes: 980022,075043,070507,070507,
 070507,070507,070507,070507,
 070507,070507,075045



M.F. Peeters
Fertilititeit
Elisabeth ZKH Tilburg

Dagrapport
 Patiëntnummer : 2030341 A2030341
 BSN :
 Naam : Afd Ivfe Elisabeth-Zhs
 Adres : Dr.Marcelis 2384 GP Plaats Onbekend.
 Geboortedatum : 29-02-1952 Geslacht: V Datum Rapport: 01-04-2014

Materiaal : vocht/weefsel semen voor
 Klinische gegevens :
 Datum afname : 07-06-2010 Ordernummer : 10E067503
 Datum ontvangst : 07-06-2010 afdeling : FERE

Microscopie
 Gram-preparaat :
 celdetritus : gezien
 Gramneg. staven : enkele
 Gramneg. diplococ : enkele

Kweek : 1: Stenotrophomonas maltophilia: veel

Gevoeligheid :
 : amoxicilline I
 : amoxicilline/clavulaanzuur R
 : cefazoline R
 : cefuroxim R
 : ceftazidim R
 : ciprofloxacin S
 : trimethoprim/sulfamethoxazol S
 : gentamicine I
 : tobramycine R
 : amikacine S
 (S=Gevoelig I=Intermediair R=Resistent)



J.H. Marcelis
Fertilititeit
Elisabeth ZKH Tilburg

Dagrapport
 Patiëntnummer : 2030341 A2030341
 BSN :
 Naam : Afd Ivfe Elisabeth-Zhs
 Adres : Dr.Marcelis 2384 GP Plaats Onbekend.
 Geboortedatum : 29-02-1952 Geslacht: V Datum Rapport: 01-04-2014

Materiaal : vocht/weefsel
 Klinische gegevens : sot-kweeschaaltje
 Datum afname : 16-05-2012 Ordernummer : 12E055641
 Datum ontvangst : 16-05-2012 afdeling : FERE

Kweek : 1: Candida albicans: meerdere

Gevoeligheid :
 : flucytosine I
 : amfotericine B S
 : fluconazol S
 : voriconazole S
 (S=Gevoelig I=Intermediair R=Resistent)

Verrekenecodes: 980022,075043,070501,070507,
 070507,070507,070507,075043

J.H. Marcelis
Fertilititeit
Elisabeth ZKH Tilburg

Dagrapport
 Patientnummer : 2030341 A2030341
 BSN :
 Naam : Afd Ivfe Elisabeth-Zhs
 Adres : Dr.Marcelis 2384 GP Plaats Onbekend.
 Geboortedatum : 29-02-1952 Geslacht: V Datum Rapport: 01-04-2014

Materiaal : vocht/weefsel semen
 Klinische gegevens : semenkweek sot
 Datum afname : 16-05-2012
 Datum ontvangst : 16-05-2012

Ordernummer : 12E055642
 afdeling : FERE

Kweek :
 1: Escherichia coli: meerdere
 2: Candida albicans: enkele
 3: Streptococcus agalactiae (groep B): na ophoping

Gevoeligheid :

penicilline	1	2	3
amoxicilline	S		S
amoxicilline/clavulaanzuur	S		S
piperacilline/tazobactam	S		S
cefazoline			S
cefuroxim	S		S
ciprofloxacin	S		R
trimethoprim/sulfamethoxazol	S		S
toframycine	S		
clindamycine			S
erytromycine			S
claritromycine			S
azitromycine			S
doxycyclin			R
flucytosine		S	
amfotericine B		S	
fluconazol		S	
voriconazole		S	
tigecycline			S

(S=Gevoelig I=Intermediair R=Resistent)



EU richtlijn 2006/86/EG

5. Een in punt 4, onder a) tot en met d), bedoelde omgeving wordt gespecificeerd.

1. Er wordt aangetoond en gedocumenteerd dat de gekozen omgeving het vereiste kwaliteits- en veiligheidsniveau heeft, waarbij in ieder geval wordt gelet op het beoogde doel, de wijze van toepassing en de immuunstatus van de ontvanger.

Kweekmedium met antibiotica, zeer sporadisch infectie in kweek en altijd terug te voeren op semen / punctaat. (Tilburg)

Geen problemen bekend van infectie, nl. gezonde "patiënten"

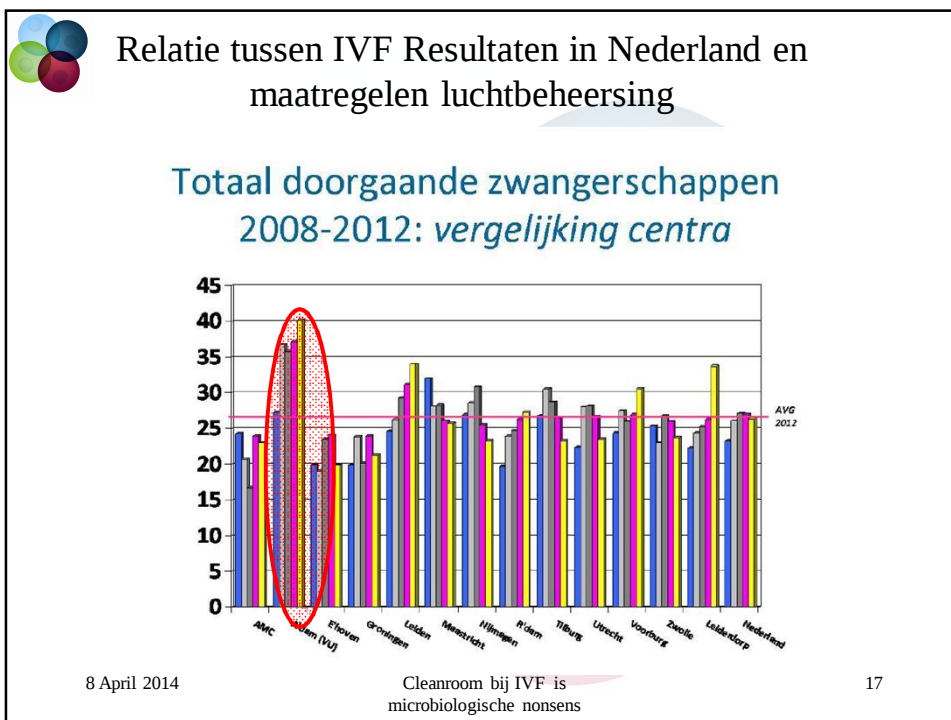
Zelfs op OK infectiepreventie effect van cleanroom niet aangetoond (NTVG 2010:154;A1598)

Luchtbehandeling en zwangerschappen in Nederland

8 April 2014

Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens

16



Er zijn meerdere onderzoeken die het effect van luchtkwaliteit ter discussie stellen.

STAND VAN ZAKEN

Brengt ultraschone lucht op de OK meer veiligheid?
NED TIJDSCHR GENEESKD. 2010;154:A1598

Frank H. van Tiel, Anton G. Buiting, Nico E.L. Meessen, Andreas Voss en Margreet C. Vos

- De Britse studie die ten grondslag ligt aan de voorgestelde norm voor luchtkwaliteit van operatieafdelingen type 1 is van 1982, en onvoldoende gecorrigeerd voor [redacted] ofylaxe leidt op zich namelijk ook al tot minder postoperatieve wondinfecties.
- Recentere studies naar ultraschone lucht op de operatieafdeling laten geen infectiepreventief effect zien.

Brandt (C.) et al, Operating room ventilation with laminar airflow shows no protective effect on the surgical site infection rate in orthopedic and abdominal surgery, Annals of surgery, 2008;248:695-700

8 April 2014

Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens

18



EU richtlijn 2006/86/EG

- Afwijken van de Europese wetgeving?
- De screening van IVF patiënten is niet conform de 2006/17/EG. Want, niet bij elke donatie op het tijdstip van doneren, maar zelfs 2 jaar geldig.
- Er worden geen handschoenen gedragen, ook niet in de flowkast waardoor “verontreiniging” nog steeds mogelijk is. Haar-netje?
- De MCKW setting? (handschoenenkast)
Beheersbare luchtkwaliteit, echter niet met als doel infectiepreventie, maar constante temperatuur, CO₂ en O₂.

8 April 2014

Cleanroom bij IVF is
microbiologische nonsens

19



WIP 2011

Omstandigheden (kleine) chirurgische en invasieve ingrepen

Tabel 2: Overzicht van eisen per locatie voor het verrichten van (kleine) chirurgische en invasieve ingrepen

	Operatieafdeling klasse 1	Operatieafdeling klasse 2	Zelfstandige behandelkamer
Zone-indeling	3 zones	2 zones	geen zones
St...	Punctie/ET kamer in het EZ: Zelfstandige behandelkamer		
Sl...			
V...			
Ventilatiesysteem	niet-mengend systeem	geen bijzondere luchtbe-handeling	geen bijzondere luchtbe-handeling
Ventilatievoud	20 x	6 x	6 x
Filtering lucht	Hepa-filter	Hepa-filter	geen Hepa-filter
Drukhiërarchie	overdruk zone A vs B vs C	overdruk zone A vs B	geen drukverschil



Samenvattend: Clean Room?

- Werken als bij: botweefsel, stamcellen.
- “SISO”: “Sterile in, sterile out.”
- Fertiliteitswerk: Aseptisch verkrijgen van het materiaal,
 - zowel eicellen als semen.
- Eicellen: punctie op OK via buikwand direct in utero.
- Spermatozoa verkrijgen via punctie (TESA).
 - Dus altijd ICSI.
- Transfer van embryo's.
 - ET op OK via buikwand direct in utero (als dat al kan).
- Kwaliteit? Patiënt vriendelijk?

8 April 2014

Cleanroom bij IVF is
microbiologische nonsens

21



Kortom: laten we niet roomser dan de paus zijn



8 April 2014

Cleanroom bij IVF is
microbiologische nonsens

22

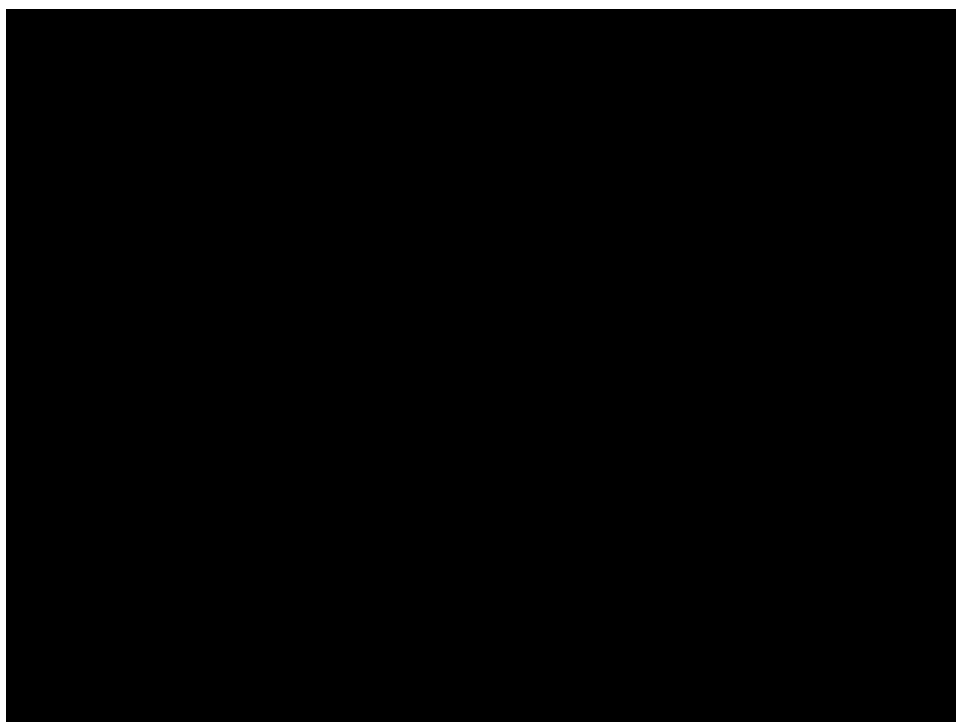



Table 3 Embryogenesis parameters and IVF outcomes measures

Item	TT1	TT2	TT3	Pvalue
OPU cycle	446	573	384	
ET number	396	473	317	
Retrieved oocytes	6186	8210	5953	
ET embryos	910	1053	721	
Fertilization rate ^a (%)	70.1 % (4336/6186)	82.3 % (6759/8210)	83.7 % (4984/5953)	<0.001 ^{c,d}
Normal fertilisation ^a (2PN)(%)	61.3 % (3791/6186)	64.6 % (5303/8210)	66.3 % (3931/5953)	<0.001 ^c
Cleavage rate ^b	90.8 % (3441/3791)	94.15 % (4993/5303)	97.35 % (3827/3931)	<0.001 ^c
Blastocyst culture	568	1084	977	
Blastocyst formation rate	41.7 % (237/568)	38.1 % (413/1084)	51.07 % (499/977)	<0.001 ^{c,d}
Pregnancy rate (PR)	40.6 % (161/396)	46.7 % (222/475)	54.6 % (173/317)	0.001 ^{c, d, e}
Implantation rate (IR)	26.4 % (240/910)	28.6 % (301/1053)	34.4 % (248/721)	0.001 ^{c, d, e}
Abortion rate	4.9 % (8/161)	6.7 % (15/222)	4.1 % (13/317)	0.38 ^f

^a Percentages, expressed per inseminated oocyte.
^b Percentage, expressed per 2PN fertilized oocyte
^c significantly different $P < 0.001$ compared with d and e
^d No significant difference was found between: TT2 and TT3 on fertilization rate, PR and IR
^e No significant difference was found between: TT1 and TT2 on blastocyst formation rate, PR and IR ($P > 0.016$)
^f No significant difference $P > 0.05$

8 April 2014

Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens

24



Table 1 level of some VOC in different areas, on different sampling time

VOC $\mu\text{g}/\text{m}^3$	First sampling			Second sampling			Third sampling		
	hallway	lab	Incubator	hallway	lab	Incubator	hallway	lab	Incubator
Acetylene	1.92	2.56	3.25	4.34	4.68	5.72	2.16	1.31	1.98
SO ₂	0.96	1.11	1.42	1.42	1.07	0.79	0.71	0.29	0.46
Pentane	2.87	3.56	3.8	6.91	5.86	5.5	0.9	1.48	1.6
NOx	17.29	12.72	12.98	11.96	6.8	7.4	10.6	6.28	7.0
Benzene	6.36	5.12	7.17	2.8	2.3	2.1	0.87	1.35	1.76
Halon-1211	303	24609	9390	26	2317	1986	23	51	113
CFC11	2.13	2.75	2.26	1.47	1.45	1.4	0.5	0.6	0.8
CFC12	3.27	5.36	4.09	4.46	3.86	3.7	1.32	1.43	1.23
CFC13	0.97	1.16	1.1	0.73	1.3	0.65	0.26	0.28	0.36
Alcohol	59.63	5792	140	3.97	141.8	119.86	8.79	73.57	79.22
Formaldehyde	13.05	13.47	8.58	13.68	10.7	9.68	6.35	8.78	9.54
Ethylene	0.07	0.56	1.15	0.75	0.83	6.46	0.24	1.1	4.62
Acetylene	1.92	2.56	3.25	4.34	4.86	5.72	2.16	1.31	1.98
Ethane	0.39	0.96	2.96	1.09	0.82	0.15	0.31	0.15	1.14
Propylene	0.53	1.42	7.78	1.45	1.37	7.93	0.34	0.6	18.74
Isobutene	6.32	8.96	9.99	10.19	6.58	6.4	1.22	1.58	3.01
Cis-butene	0.13	0.27	0.85	0.6	0.5	0.56	0.19	0.14	0.12
Cyclopentane	0.37	1.52	1.56	0.22	0.73	0.40	0.3	0.25	0.36
8 April 2014			Cleanroom bij IVF is microbiologische nonsens				25		