

Integritetstesting av sprøyter ved bruk av metodene beskrevet i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes, NHS 2013»

Mastergradsoppgave i farmasi

Cathrine Aabel Lia



 **SJUKEHUSAPOTEKA VEST**

Senter for farmasi og
Sjukehusapoteka Vest

Universitetet i Bergen
Mai 2020

Forord

Denne masteroppgaven ble utført på produksjonsavdelingen ved Sykehusapoteket i Bergen i perioden august 2019 til mai 2020. Arbeidet med dette prosjektet har vært både spennende og lærerikt. Kunnskapen jeg sitter igjen med er uvurderlig, og jeg kommer til å ta med meg mye av denne verdifulle kunnskapen videre inn i arbeidslivet som farmasøyt.

Først må jeg rette en stor takk til veilederne mine Marianne Heggø Hansen, Ragnhild Haugse og Lone Holst. Dere har gitt meg gode tilbakemeldinger underveis i arbeidet og har alltid vært tilgjengelige. Oppgaven hadde ikke blitt den samme uten de jevnlige møtene jeg har hatt med Marianne og Ragnhild. Jeg setter stor pris på alle deres konstruktive innspill og at dere fant tid til meg i deres travle hverdag.

Jeg vil også takke alle de ansatte på produksjonsavdelingen ved Sykehusapoteket i Bergen. Dere har tatt meg godt imot, og alltid vært klare til å hjelpe uansett hva jeg har trengt underveis dette året. I tillegg må jeg takke de ansatte i 5. etasje på Laboratoriebygget ved Haukeland universitetssykehus. Spesielt takk til Helene Heitmann Sandnes for at jeg fikk tilgang til disse lokalene, og for god hjelp gjennom hele året. Jeg vil også takke Tove Skogmo som har hjulpet meg med autoklivering gjennom hele perioden.

Tusen takk også til kullet mitt. Farmasiststudiet hadde ikke vært det samme uten dere. Jeg har underveis i året fått masse motivasjon av hvor flinke dere alle er, og setter uendelig stor pris på kontakten jeg har med noen av dere.

Til slutt vil jeg takke familien min som har oppmuntret meg underveis, og en stor takk til Per Erling som har vært tålmodig og støttende under hele perioden.

Bergen, 20. mai 2020

Cathrine Abel Lia

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Forkortelser	6
Sammendrag	7
1. Introduksjon	9
1.1 Oppbevaring av legemidler i sprøyter og anbrudd av sterile legemidler	9
1.1.1 Bruk av sprøyter som beholdere for legemidler	9
1.1.2 Gjeldende regler for holdbarhet av legemidler etter anbrudd	10
1.1.3 Vurderinger vedrørende holdbarheten til legemidler som oppbevares i sprøyter	11
1.2 Produksjon av sterile legemidler og mikrobiell vekst i farmasøytiske produkter	13
1.2.1 Generelt om aseptisk produksjon	13
1.2.2 Lokaler	13
1.2.3 Personalet	14
1.2.4 Mikrobiologisk monitorering	15
1.2.5 Mikrobiell vekst i farmasøytiske produkter	15
1.3 Tilvirkning av legemidler i sykehusapotek og på sykehuspost	16
1.3.1 Aldersrelatert våt makuladegenerasjon og tilgjengelige terapivalg	17
1.3.2 Hendelser med endoftalmitt etter intravitreale injeksjoner med VEGF-hemmere	17
1.3.3 Forskjeller mellom tilvirkning av legemidler i sykehusapotek og på sykehuspost	19
1.3.4 Hvordan utføres tilvirkningen av bevacizumab og aflibercept i dag?	20
1.3.5 Andre legemidler som tilvirkes i sprøyter på Sykehusapoteket i Bergen	22
1.4 Integritetstesting	23
1.4.1 Hensikten med integritetstesting	23
1.4.2 Beskrivelser av integritetstesting i veiledende dokumenter	23
1.4.3 Beskrivelser av ulike integritetstester	24
1.4.4 Protocols for the Integrity Testing of Syringes	26
1.5 Formålet med denne studien	28
2. Materialer og metode	29
2.1 Mikrobiologisk integritetstesting ved bruk av E. Coli	29
2.1.1 Oversikt over sprøytene som ble testet ved mikrobiologisk integritetstesting	29
2.1.2 Aseptisk fylling av buljong i sprøytene	31
2.1.3 Tillaging av E. Coli	32
2.1.4 Mikrobiologisk integritetstest (full nedsenking)	34
2.1.5 Tillaging og sterilisering av buljong og ildfast form til bakteriesuspensjon	36
2.1.6 Telling av bakterier i flytende medium ved Total Viable Count	36
2.1.7 Validering av mediet (positiv kontroll)	37
2.2 Fysisk integritetstesting	39
2.2.1 Oversikt over sprøytene som ble testet ved fysisk integritetstesting	39
2.2.2 Tillaging av sprøytene før integritetstesten	39
2.2.3 Tillaging av positiv kontroll	42
2.2.4 Fysisk integritetstesting med metylenblått	42
2.2.5 Visuell deteksjon av fargegjennomtrenging	44
2.2.6 UV-spektroskopi	44
2.2.7 Kalibreringskurve med metylenblått	45
2.2.8 Kvantifisering av innholdet i sprøytene ved UV-spektroskopi	45
2.2.9 Deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret	45

2.2.10	Deteksjonsgrensen ved visuell deteksjon	46
3.	Resultater	47
3.1	<i>Mikrobiologisk integritetstest</i>	47
3.1.1	Resultater 1 ml sprøyter.....	47
3.1.2	Resultater 2, 3 og 5 ml sprøyter.....	49
3.1.3	Observasjoner under testingen.....	51
3.1.4	Total Viable Count	52
3.1.5	Positiv kontroll	53
3.1.6	Andre resultater	54
3.2	<i>Fysisk integritetstest</i>	55
3.2.1	Resultater fysisk integritetstest.....	55
3.2.2	Positiv kontroll	56
3.2.3	Kalibreringskurve med metylenblått	56
3.2.4	Kvantifisering av innholdet i sprøytene ved UV-spektroskopi	57
3.2.5	Deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret	57
3.2.6	Deteksjonsgrensen ved visuell deteksjon	58
4.	Diskusjon.....	59
4.1	<i>Diskusjon: Metode</i>	59
4.1.1	Valg av metode.....	59
4.1.2	Mikrobiologisk integritetstesting.....	59
4.1.3	Fysisk integritetstesting	62
4.2	<i>Diskusjon: Resultat</i>	65
4.2.1	Mikrobiologisk integritetstest (1 ml sprøyter).....	65
4.2.2	Mikrobiologisk integritetstest (2, 3 og 5 ml sprøyter).....	66
4.2.3	Fysisk integritetstest	66
4.2.4	Sammenligning av resultatene fra mikrobiologisk og fysisk integritetstesting.....	67
4.2.5	Er metodene egnet til å teste beholdere for legemidler på et sykehusapotek?	67
4.2.6	Kan holdbarheten til legemidlene som oppbevares i sprøytene utvides?	68
5.	Konklusjon.....	70
6.	Veien videre	71
	Referanseliste	72
	Vedlegg	78
7.1	<i>Arbeidsseddel bevacizumab (Avastin) fra Sykehusapoteket i Bergen</i>	78
7.2	<i>Arbeidsseddel aflibercept (Eylea) fra Sykehusapoteket i Bergen</i>	80
7.3	<i>Produktspesifikasjon Trypton Soya Buljong (Sigma-Aldrich)</i>	82
7.4	<i>Produktspesifikasjon BioBall – Pakning nr. 1 (Biomérieux)</i>	83
7.5	<i>Produktspesifikasjon BioBall – Pakning nr. 2 (Biomérieux)</i>	86
7.6	<i>Produktspesifikasjon Metylenblått (Alfa Aesar)</i>	89
7.7	<i>Vedlegg til resultat</i>	90
7.7.1	Målt absorbans av metylenblått til kalibreringskurve	90
7.7.2	Forsøk for å finne deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret.....	90

Forkortelser

AMD	Aldersrelatert Makuladegenerasjon
B. Diminuta	Brevundimonas Diminuta
CFU	Kolonidannende Enhet
E. Coli	Escherichia Coli
EMA	European Medicines Agency
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GMP	Good Manufacturing Practice
LAF	Laminar Air Flow
NLS	Norske Legemiddelstandarder
NHS	National Health Service (United Kingdom)
Ph. Eur	Den Europeiske Farmakopé
RPM	Roteringer Per Minutt
SLV	Statens Legemiddelverk
SPC	Preparatomtale
TSA	Trypton Soya Agar
TSB	Trypton Soya Buljong
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Sammendrag

Bakgrunn og formål På sykehusapotek tilvirkes ulike legemidler i sprøyter. Holdbarheten til legemidler i sprøyter påvirkes av en rekke faktorer, og det finnes ingen klare regler for hvordan den bør fastsettes. For å sikre den mikrobielle holdbarheten er det essensielt å teste integriteten til sprøytene som skal benyttes som beholdere for legemidler. I denne studien har det blitt utført integritetstesting av sprøyter i henhold til metodene som er beskrevet i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes, NHS 2013». Målet har vært å avdekke om sprøytene klarer å bevare sterilitet under oppbevaring, og å evaluere om integritetstestene er egnet til å teste sprøyter som beholdere for legemidler på et sykehusapotek.

Metode Ulike sprøytetørrelser fra tre forskjellige produsenter ble testet ved mikrobiologisk og fysisk integritetstesting. I den mikrobiologiske integritetstesting ble sprøytene fylt aseptisk med steril trypton soya buljong (TSB), før de under integritetstesting ble utfordret med *E. Coli* i 30 minutter. Sprøytene ble deretter inkubert i 14 dager før de ble inspisert for vekst. I den fysiske integritetstesting ble sprøytene klargjort, fylt med vann og plassert i en beholder med metylenblått. Beholderen ble rotert i to timer før innholdet i sprøytene ble inspisert visuelt.

Resultat De fleste sprøytene bevarte sterilitet etter mikrobiologisk integritetstesting. Sprøytene som bevarte sterilitet etter integritetstesting vil sannsynligvis også bevare sterilitet under oppbevaring, og egner seg derfor som beholdere for legemidler. Resultatene tyder på at bevegelser på stempelet bør unngås, og derfor at sprøytene bør ligge i ro under oppbevaring og transport. Alle sprøytene som ble testet ved fysisk integritetstesting bestod. Underveis i prosessen ble det oppdaget at små lekkasjer var vanskelig å detektere. Resultatene fra disse testene samsvarer imidlertid med resultatene fra de mikrobiologiske integritetstestene. Den mikrobiologiske integritetstesten er tidkrevende og kan være utfordrende å utføre i sin helhet på et sykehusapotek, men den tillater testing av alle ønskelige sprøytetyper. Den fysiske integritetstesten krever lite utstyr og kan utføres på et sykehusapotek, men den tillater ikke testing av alle sprøytetyper.

Konklusjon Begge integritetstestene vurderes som egnet til å teste sprøyter som benyttes som beholdere for legemidler dersom de utføres og valideres korrekt. Det er en fordel å utføre både én mikrobiologisk og én fysisk integritetstest for å sammenligne resultatene. Funnene som er gjort i studien kan være av verdi for å støtte vurderinger vedrørende den mikrobiologiske holdbarheten til legemidler som oppbevares i sprøytene som har bestått integritetstestene som er gjennomført i denne studien.

Abstract

Background and aim Hospital pharmacies prefill various drugs in syringes. There are no clear rules on how to determine the shelf life of drugs that are stored in syringes as the shelf life is affected by different factors. The integrity of the syringe/hub combination has to be examined to ensure the microbiological shelf life. Integrity testing of syringes that are used or potentially could be used as containers for drugs have been performed in this study. This has been done by using the methods described in «Protocols for the Integrity Testing of Syringes, NHS 2013». The aim of the study was to investigate whether the syringes maintain sterility under storage, and to evaluate if the integrity tests completed in this study are suitable for testing syringes as containers for drugs in a hospital pharmacy.

Method Various sizes of syringes from three producers were tested by microbiological and physical integrity testing. In the microbiological integrity test the syringes were filled aseptically with sterile tryptic soy broth (TSB) before the syringes were challenged with *E. Coli* for 30 minutes during the integrity test. The syringes were incubated for 14 days before each syringe was examined for growth showing *E. Coli* access into the syringe. In the physical dye intrusion test the syringes was prepared according to the protocol and placed in a dye bath. The dye bath was rotated for two hours before each syringe was examined visually for the presence of dye.

Results Most of the tested syringes remained sterile after the microbiological integrity testing. The syringes that maintained sterility after testing are likely to maintain sterility under storage and are therefore suitable as containers for drugs. The findings indicate that movement of the plunger after filling should be avoided. All syringes that were tested with the physical integrity test passed. During the process it was discovered that small leakages of dye was hard to detect. The results of the physical integrity testing correspond to the results from the microbiological integrity testing. The microbiological integrity testing is time consuming and hard to complete in its entirety at a hospital pharmacy, but it permits testing of all types of syringes. The physical integrity testing requires little equipment, and it can be performed in its entirety at a hospital pharmacy. However, it does not allow testing of all types of syringes.

Conclusion Both tests performed in this study are suitable for assessing the syringe and hub as a container if they are performed and validated correctly. It is an advantage to perform both a microbiological and a physical integrity test for comparison of these results. The findings of this study may be valuable when assigning the microbiological shelf-life for drugs that are kept in the syringes that passed the integrity tests.

1. Introduksjon

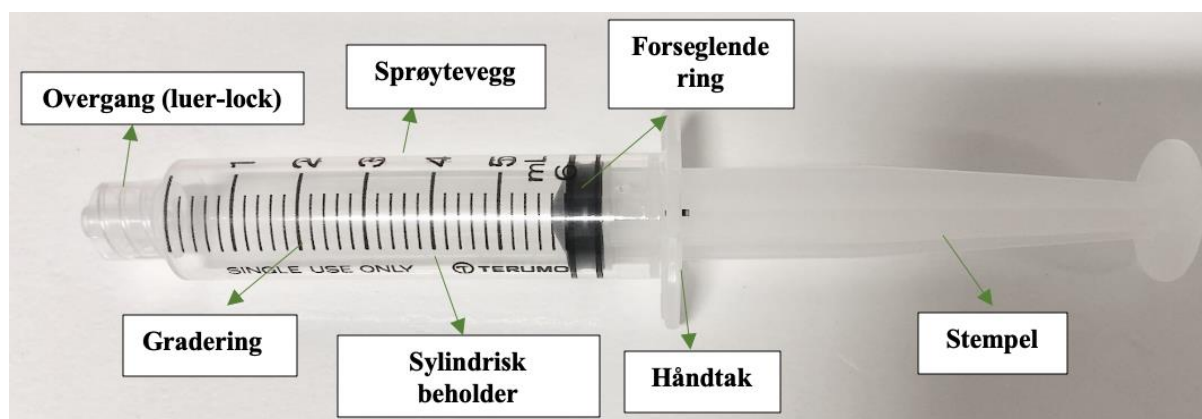
1.1 Oppbevaring av legemidler i sprøyter og anbrudd av sterile legemidler

1.1.1 Bruk av sprøyter som beholdere for legemidler

I kapittel «3.2 *Containers*» definerer den Europeiske Farmakopé (Ph. Eur) en beholder til farmasøytisk bruk som: «en artikkel som inneholder eller er ment til å inneholde et produkt som er, eller kanskje er, i direkte kontakt med beholderen» (1). Lukkemekanismen regnes også som en del av beholderen. Beholderen skal gi en varierende grad av beskyttelse, avhengig av egenskapene til produktet og miljørisikoer (1). Den skal også minimere tap av innholdet i produktet. Beholderen skal ikke interagere fysisk eller kjemisk med innholdet på en måte som påvirker kvaliteten slik at den blir lavere enn grensene som kreves for produktet (1).

Videre, i kapittel «3.3.8. *Sterile single-use plastic syringes*», beskriver farmakopéen sterile engangssprøyter av plast (1). Slike sprøyter beskrives også i ISO standarden 7886-1 «*Sterile hypodermic syringes for single use – Part 1: Syringes for manual use*» (2). Engangssprøyter av plast beskrives her som medisinsk utstyr som er ment til administrering av injeksjonspreparater og som skal brukes umiddelbart etter fylling (1, 2). Sprøytene skal være sterile og frie for bakterielle endotoksiner, og de skal ikke steriliseres eller brukes på nytt (1). Hver sprøyte skal ha individuell emballasje for å opprettholde sterilitet (1, 2). En sprøyte består av en sylindrisk beholder og et stempel som kan ha en forseglende ring (**Figur 1**) (1). Sterile engangssprøyter av plast skal videre være gjennomsiktige slik at det er lett å lese av korrekt dose, og observere eventuelle luftbobler og partikler (1, 2).

Den sylindriske beholderen og stempelet består vanligvis av polypropylen, men andre typer plast og glass kan også benyttes (3). Den forseglende ringen på toppen av stempelet består av syntetisk gummi materiale (3). Når en engangssprøyte skal brukes som emballasje for legemidler, trengs en lukkemekanisme. Lukkemekanismen er ofte en propp eller en kanyle. Overgangen mellom sprøyten og lukkemekanismen er enten luer eller luer-lock (3). Luer-lock gir mulighet til å skru proppen eller kanylen på overgangen så den låses på plass. Dette sørger for en sikker overgang som forhindrer at lukkemekanismen fjernes ved et uhell. Plastsprøyter kan inneholde silikonolje for å sikre en jevn og enkel bevegelse av stempelet i sylindringen (1, 3). Mengden silikonolje er bestemt av krav i Ph. Eur (1).



Figur 1: Bilde av 5 ml sprøyte fra Terumo med tilhørende deler (eget bilde).

Bruken av ferdigfylte sprøyter til parenteral administrering av legemidler har vokst internasjonalt de siste årene (4-7). Dette er fordi det finnes flere fordeler ved å benytte slike sprøyter til administrering av legemidler, både for pasienten og for produsenten av legemidlene (4, 6). For det første reduseres risikoen for kontaminering med mikroorganismer og partikler fordi legemidlene ikke må overføres til en ny beholder før bruk (4, 6). For det andre kan fylling av legemidler i sprøyter være en tidskrevende og komplisert oppgave, og derfor vil bruk av ferdigfylte sprøyter være med på å spare både tid og ressurser (6). Til slutt gjør ferdigfylte sprøyter det enkelt å administrere en nøyaktig dose av et legemiddel (4, 6). På sykehusapotekene i Norge tilvirkes ulike legemidler i sprøyter, slik at de er klare til administrering på sykehuspost og poliklinikker.

1.1.2 Gjeldende regler for holdbarhet av legemidler etter anbrudd

Anbrudd av et legemiddel kan defineres som: «første gang legemiddelbeholderen punkteres, forseglingen brytes eller lukkeanordningen åpnes» (8). Når anbrudd av et legemiddel og opptrekk i sprøyte ikke finner sted umiddelbart før bruk og/eller preparatet er ment til bruk et annet sted enn der det er istandgjort defineres det som ny tilvirkning av legemidlet (9, 10). Når tilvirkning av legemidler finner sted på et apotek med tilvirkertillatelse sier «Forskrift om tilvirkning av legemidler i apotek» at apoteket skal påføre opplysninger om holdbarhet (9). Dette medfører i praksis at holdbarheten må vurderes på nytt når legemidlet er overført til den nye beholderen (9, 11). Holdbarhetstiden skal bestemmes på bakgrunn av hvert legemiddel sine egenskaper, og det er krav om at legemidlet tilfredsstillt krav i farmakopé og andre produktspesifikasjoner i hele holdbarhetsperioden (9). Ved resepturproduksjon, altså tilvirkning av legemidler til den enkelte pasient, kan ikke holdbarheten overskride seks måneder (9).

For istandgjøring av legemidler på sykehuspost kreves det derimot ikke tilvirkertillatelse, og da følger andre regler og retningslinjer (10). Som hovedregel skal man følge oppbevaringstider og brukstider etter anbrudd som er godkjent av Statens legemiddelverk (SLV) på bakgrunn av dokumentasjonen til tilvirkerne av legemidlet (8). Denne informasjonen finnes i det aktuelle legemidlet sin godkjente preparatomtale (SPC). SLV har imidlertid publisert retningslinjer for oppbevaringstider og veiledende brukstider for sterile legemidler etter anbrudd (8). Disse retningslinjene er veiledende brukstider der relevante opplysninger ikke er angitt i tilvirkerens dokumentasjon (8). Retningslinjene finnes i Norske legemiddelstandarder (NLS) som er en del av norsk farmakopé og inneholder oversikt over standarder for legemidler som gjelder for Norge (12).

Retningslinjene angir at åpnede beholdere med sterilt legemiddel som en hovedregel bør benyttes umiddelbart og at eventuelle rester bør kastes (8). Dette er fordi det ved anbrudd av en beholder som inneholder et sterilt legemiddel finnes en risiko for kontaminering med mikroorganismer (8). Kontaminering er avhengig av flere faktorer som blant annet personalets arbeidsteknikk under tilberedning, antall uttak av legemidlet, lokalenes standard og utstyr (8). Brukstidene som oppgis i NLS er basert på generelle vurderinger og gjelder under forutsetning av at holdbarhetstiden til legemidlet ikke overskrides, i tillegg til at aseptisk arbeidsteknikk gjennomføres og at gitte oppbevaringsbetingelser overholdes (8). Kontaminasjonsrisikoen øker dersom tilberedning foregår under andre betingelser enn de som er beskrevet, og i slike tilfeller bør holdbarheten settes kortere (8). NLS oppgir også, på bakgrunn av retningslinjer fra European Medicines Agency (EMA), at det er brukerens ansvar å sørge for at kvaliteten til legemidlet som administreres til pasienten opprettholdes (8, 13). Dette er fordi det er vanskelig å forutse alle måter et preparat vil kunne bli oppbevart, fortynnet eller åpnet (8, 13).

1.1.3 Vurderinger vedrørende holdbarheten til legemidler som oppbevares i sprøyter

Holdbarheten til legemidler i beholdere som ikke er originalemballasjen er et område som ikke er tilstrekkelig studert (11). Dette skiller seg fra legemidler med markedsføringstillatelse fordi det for slike produkter alltid gjennomføres stabilitetstesting av legemidlet i den tiltenkte emballasjen (14-16). Denne stabilitetstesting er videre bakgrunnen for bestemmelse av produktets holdbarhet (14, 16). Ufullstendige og manglende stabilitetsdata til legemidler når de

er overført til en ny emballasje medfører således ofte vanskeligheter når apoteket skal fastsette holdbarheten til legemidlene de tilvirker.

Det overordnede målet med emballasje er å gi produktet tilstrekkelig beskyttelse for å sikre at alle relevante fysikalsk-kjemiske og mikrobiologiske kvaliteter er ivaretatt gjennom hele holdbarhetstiden (17). Ved opptrekk av legemidler i sprøyter byttes emballasjen fra en der disse faktorene er testet til en annen emballasje som potensielt kan påvirke produktet (11). Slik påvirkning kan ha betydning for både effekten av legemidlet og risikoen for bivirkninger (11). Stabiliteten til legemidlet kan påvirkes av både fysiske, kjemiske, mekaniske og mikrobiologiske egenskaper til emballasjen (18). Disse faktorene må følgelig vurderes når legemidlet oppbevares i en annen emballasje enn den legemidlet originalt er testet og oppbevart i (18).

Fysisk degradering omhandler forandringer i legemidlets fysiske egenskaper uten at virkestoffet påvirkes. Eksempler på dette er tilstedeværelse av aggregater og partikler eller krystallisering (14). Kjemisk degradering omhandler kjemiske reaksjoner som forekommer under oppbevaring. Det finnes mange slike reaksjoner, men de vanligste er hydrolyse, oksidasjon, isomerisering og fotolyse (14). Mekaniske egenskaper til emballasjen omhandler bevegelser eller krefter som påføres legemidlet under produksjon og transport. Slike bevegelser kan føre til dårligere stabilitet for noen legemidler (18). I emballasjen kan det også finnes stoff («leachables» og «extractables») som kommer over i produktet ved kontakt med løsemidlet eller formuleringen (18, 19). Stoffe som dette kan føre til kjemiske og fysiske stabilitetsproblemer. Eksempler på slike stoffer er plast og silikonolje (18). I tillegg til dette kan det også ved overføring av legemiddel til sprøyte forekomme adhesjon av virkestoff til platen i sprøyten (11). Den mikrobiologiske kvaliteten til en formulering kan også påvirkes etter tilvirkning (14). For sterile legemidler skjer dette når mikroorganismer kontaminerer produktet under produksjon, oppbevaring eller bruk. Mikrobiologisk holdbarhet avhenger derfor av initial kontaminering, sannsynlighet for kontaminering fra miljøet og hvor godt mikroorganismer vokser i den aktuelle formuleringen (14).

Det finnes ingen klare regler for hvordan holdbarheten til legemidler som er overført til sprøyter bør fastsettes (11). Dette er fordi holdbarheten kan påvirkes av en rekke faktorer som er nevnt ovenfor. Noen av disse faktorene gjelder legemidlenes egenskaper i den aktuelle emballasjen, og er derfor uavhengig av hvordan produktet blir tilvirket eller brukt (11). Andre faktorer

gjelder fyllingen av sprøytene, og er derfor knyttet til personalet, lokalene og forholdene der legemidlene blir tilvirket (11). Aseptisk tilvirkning av legemidler i sprøyter på sykehusapotek skjer under validerte og aseptiske betingelser og skal i prinsippet resultere i sterile produkter, men stabiliteten til legemidlene er likevel ikke testet i den aktuelle emballasjen. Av den grunn må en rekke faktorer undersøkes før en holdbarhet kan fastsettes. Disse faktorene inkluderer både fysisk, kjemisk og mikrobiologisk holdbarhet (9, 14). For å sikre den mikrobielle holdbarheten er det viktig å teste integriteten til sprøytene som brukes som beholder for det aktuelle legemidlet (20).

1.2 Produksjon av sterile legemidler og mikrobiell vekst i farmasøytiske produkter

1.2.1 Generelt om aseptisk produksjon

Aseptisk produksjon av sterile produkter er underlagt strenge krav for å minimere risiko for mikrobiell kontaminering og for kontaminering med partikler og pyrogener (21). Kvaliteten til sluttproduktet avhenger i stor grad av ferdighetene, opplæringen og holdningene til personalet som er involvert i produksjonen. Kvalitetssikring er svært viktig og av den grunn følger produksjonen av aseptisk tilvirkede legemidler etablerte og validerte metoder (21). Retningslinjer for aseptisk tilvirkning av legemidler beskrives i Annex 1: «Manufacture of Sterile Medicinal Products» av Eudralex - Volum 4 – Good Manufacturing Practice (GMP) (21). Aseptisk produksjon gjennomføres i et miljø der lufttilførsel, personalet, utstyr, materialer og lokaler er strengt regulert for å unngå kontaminering av produktet (21). Nedenfor gjennomgås flere av faktorene som er nødvendig for å unngå kontaminering av produktet i aseptisk produksjon.

1.2.2 Lokaler

Det stilles strenge krav til lokalene der det forekommer aseptisk tilvirkning av legemidler. Ulike romklasser og krav til disse er beskrevet i Annex 1 av GMP, henholdsvis romklasse A-D (21). I de ulike romklassene stilles det krav til antall tillatte partikler per kubikkmeter luft når rommet er i aktivitet og hvile (21). Partikkelantallet i rommet monitoreres jevnlig slik at romklassifiseringen kan garanteres. Ulik påkledning kreves i de ulike romklassene. Prinsippet for påkledningen er at klærne skal være glatte og i tettvevd tekstil slik at de ikke avgir fibre og holder tilbake partikler som avgis fra kroppen (21).

Klasse A er romklassen med høyest luftkvalitet, og i et slikt rom er kravet til partikkelantall det samme når rommet er i aktivitet og i hvile (21). Denne romklassen er egnet for operasjoner som er forbundet med høy risiko, for eksempel åpning av hetteglass og ampuller eller opptrekking av legemidler som skal være sterile (21). Romklasse B egner seg for aseptiske forberedelser og som bakgrunn til et rom med klasse A. Romklasse C og D er egnet for mindre kritiske trinn når det kommer til tilvirkningen av sterile legemidler (21). Romklasse D kan være bakgrunn når det tilvirkes sterile legemidler i isolator (21). En isolator er en lukket benk der den som tilvirker kun har tilgang gjennom hanskeporter og varesluser. Isolatoren gir personalet beskyttelse fra produktet, i tillegg til at det beskytter produktet fra miljøet (22).

I renrommene skal alle overflater være glatte, ugjennomtrengelige og bestå av robuste materialer som for eksempel stål eller vinyl. Dette er viktig for å redusere akkumulering av partikler og mikroorganismer og for å tilrettelegge for fullstendig rengjøring (21). Det er derfor også viktig å ha et minimum av hyller og utstyr i renrommene for å unngå områder som er vanskelige å rengjøre. Vasker og avløp bør heller ikke være tilstede i rom av klasse A eller B som brukes til aseptisk produksjon. Alt personell og varer som skal inn i de ulike renrommene må passere gjennom sluser, som går fra mindre ren til renere sone (21).

1.2.3 Personalet

Mennesket er den største kilden til forurensing i et aseptisk miljø (23). Dette er fordi mennesket sprer mikroorganismer til luften og enten direkte eller indirekte til overflater i rommet. Dette kan minimeres ved en rekke tiltak, og derfor stilles det strenge krav til personalet som skal jobbe med aseptisk produksjon (23). Alt personell, inkludert renholdere og vedlikeholdspersonell, skal jevnlig motta opplæring vedrørende aspektene rundt korrekt tilvirkning av sterile produkter. Denne opplæringen skal inkludere hygiene og elementær mikrobiologi (21).

Det settes høye standarder når det kommer til personlig hygiene. Dette inkluderer prosedyrer for vask og desinfeksjon av hender og korrekt påkledning i de ulike romklassene (21). Personalet skal rapportere inn hvis de er syke, noe som kan resultere i karantene avhengig av årsak til sykdommen. Personalet skal ikke bruke klokker, smykker eller sminke i renrommene (21). Det er svært viktig at personalet er klar over at aseptisk produksjon er forbundet med risiko. Derfor må det være en kultur der det er lojalitet mot prosedyrene som er etablert og for

å melde feil og avvik fra dem. Uavhengig av hvor strenge krav som stilles til personalet er fortsatt den som tilvirker legemidlene en kilde til mikrobiell kontaminering, og derfor er aseptisk arbeidsteknikk viktig for å beskytte produktet (23). Dette er en arbeidsmetode som tilstreber at mikroorganismer ikke tilføres et produkt under produksjon. Den aseptiske arbeidsteknikken til produsenten skal valideres jevnlig ved å bruke et mikrobiologisk vekstmedium i produksjonen isteden for produktet (23).

1.2.4 Mikrobiologisk monitorering

Mikrobiologisk monitorering benyttes for å bestemme graden av forurensing fra miljøet (23). Faktorer som utgjør en trussel inkluderer blant annet utstyr, luft, overflater, produsenten og prosessen. Generelt kan man si at jo nærmere trusselen befinner seg produktet, desto større er risikoen for kontaminering. Monitoreringen fokuserer generelt på å bestemme antall mikroorganismer (23). Anbefalte grenser for monitorering i de ulike romklassene beskrives i Annex 1 av GMP (21).

For å monitorere luften brukes nedfallskåler og volumetriske luftmålere (21, 23). Nedfallskåler er en åpen agarskål som eksempelvis kan plasseres i en isolator under en arbeidsøkt. Aktuelle mikroorganismer som finnes i luften vil da under arbeidsøkten falle ned på agarskålen (23). Monitorering av overflater kan foretas ved bruk av kontaktskåler (21, 23). Disse agarskålene kan forsiktig trykkes mot en overflate man er interessert i å monitorere (23). For å monitorere den som produserer og prosessen benyttes det hansketester (21, 23). Hansketester utføres ved at produsenten på slutten av en arbeidsøkt trykker de sterile hanskene mot en agarskål (23). Agarmediet i agarskålene som benyttes til monitoreringen er trypton soya agar (TSA). Dette vekstmediet benyttes fordi det tillater vekst av de fleste mikroorganismene man kan forvente i et aseptisk miljø (23, 24). De ulike skålene inkuberes før man eventuelt vil observere vekst av mikroorganismer (23).

1.2.5 Mikrobiell vekst i farmasøytiske produkter

Alle farmasøytiske produkter kan potensielt bli kontaminert med mikroorganismer, uavhengig av om de tilberedes på sykehus eller tilvirkes i industrien (25). Mikrobiell kvalitetssikring og kvalitetskontroll skal være en del av det farmasøytiske kvalitetssystemet der det produseres legemidler (26). Hovedårsaken til dette er ønsket om å forhindre mikrobiell kontaminering av

sterile produkter og begrense antall mikroorganismer og unngå uønskede mikroorganismer i ikke-sterile produkter (26). Prinsipper for hvordan mikrobiell kontaminering skal unngås inkluderer korrekt design av lokaler og adekvate prosedyrer og kontroller (26). Prinsippene er inkludert i Annex 1 av GMP (21).

Mikrobiell vekst i farmasøytiske produkter kan ha flere konsekvenser (26). Det kan være skadelig for pasienten ved at kontamineringen kan forårsake infeksjon eller en immunologisk reaksjon. Det kan også føre til endring i den terapeutiske effekten til produktet eller føre til lavere kvalitet på andre måter, som for eksempel ved forandring i pH (26). Hvor skadelig mikrobiell vekst i et produkt er avhenger av hvilken type og antall mikroorganismer som har kontaminert produktet, administrasjonsform og hvor motstandsdyktig pasienten er mot en infeksjon (25).

Overlevelse og vekst av mikroorganismer i farmasøytiske produkter er påvirket av ytre faktorer som temperatur og indre faktorer som produktets sammensetning og fysikalsk-kjemiske egenskaper (26). Kombinasjonen av disse faktorene vil bestemme type og antall mikroorganismer som kan utvikle seg i et produkt (26). Mikrobiell kontaminering av et legemiddel kan videre være primær eller sekundær. Primær kontaminering kan forårsakes av personalet, råvarer, vann, luft, utstyr eller emballasjen (26). Sekundær kontaminering kan skje under oppbevaring, transport eller ved administrering av produktet. Hovedårsaken til kontaminering under oppbevaring og transport er vanligvis integriteten til beholderen som brukes til oppbevaring av legemidlet (26). Dette vil si at beholderen som benyttes ikke er tett, og tillater penetrering av mikroorganismer.

1.3 Tilvirkning av legemidler i sykehusapotek og på sykehuspost

Legemidlene bevacizumab (Avastin) og aflibercept (Eylea) brukes til behandling av aldersrelatert våt makuladegenerasjon (27, 28). Fylling av disse legemidlene i sprøyter illustrerer flere gode eksempler på forskjeller vedrørende når legemidler tilvirkes i sykehusapotek og tilberedes på sykehuspost. Fylling av disse legemidlene i sprøyter har de fleste steder i Norge blitt overtatt av sykehusapotekene etter en rekke uheldige hendelser som fant sted da disse sprøytene ble tilberedt på sykehuspost (28-30).

1.3.1 Aldersrelatert våt makuladegenerasjon og tilgjengelige terapivalg

Aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) er den vanligste årsaken til synstap hos eldre i vestlige land (31, 32). Tørr AMD utgjør rundt 90 % av tilfellene, og våt AMD omtrent 10 % (31). Våt AMD kjennetegnes ved innvekst av nye blodkar under netthinnen (33). Den våte og mest alvorlige formen for AMD kan nå, i motsetning til tidligere, behandles. Dette gjøres med intravitreale injeksjoner (injeksjoner i øyet) med legemidler som hemmer dannelsen av nye blodårer, såkalte VEGF-hemmere («Vascular Endothelial Growth Factor») (33).

VEGF-hemmere som er aktuelle til behandling av våt AMD i Norge er aflibercept (Eylea®), ranibizumab (Lucentis®) og bevacizumab (Avastin® – utenfor godkjent indikasjon) (27, 34, 35). Flere studier konkluderer med at alle tre virkestoffene er effektive i å behandle våt AMD og at de viser lignende resultater på sykdommen (36-38). Avastin er ikke testet eller godkjent til bruk ved våt AMD eller til intravitreal injeksjon (28, 34, 39). Legemidlet har imidlertid blitt benyttet «off-label» ved øyesykdommer siden 2005 uten at hverken bruken eller administrasjonsformen er godkjent (28). Produsenten av Avastin (Genentech) har etter denne utstrakte bruken utviklet en VEGF-hemmer godkjent til bruk ved våt AMD, Lucentis (28). Gjentatte intravitreale injeksjoner med legemidlene kreves for å oppnå god effekt, og alle legemidlene krever dosering én gang per måned de første tre månedene eller til maksimal synsskarphet er oppnådd og/eller det ikke er andre tegn på sykdomsaktivitet (27, 35, 38).

Legemidlene som brukes til intravitreal injeksjon er svært kostbare, og da spesielt Lucentis og Eylea som har våt AMD som indikasjon (27, 35). Avastin har en betydelig lavere pris, og vurderes av den grunn som førstevalg ved de fleste øyeavdelingene i Norge (31, 34). De fleste øyeavdelingene i Norge har som praksis å dele innholdet i et hetteglass Avastin på flere pasienter (28). Denne praksisen reduserer legemidlets kostnad til omtrent en førtiendedel (40).

1.3.2 Hendelser med endoftalmitt etter intravitreale injeksjoner med VEGF-hemmere

Det er internasjonalt rapportert mange tilfeller med pasienter som har utviklet endoftalmitt etter intravitreale injeksjoner med VEGF-hemmere (39, 41-45). Endoftalmitt er en alvorlig infeksjon i øyets indre, som i verste fall kan føre til varig blindhet (46, 47). En av de mest alvorlige hendelsene fant sted i Florida i 2011 da tolv pasienter fikk påvist endoftalmitt etter intravitreal injeksjon med Avastin (45). Injeksjonene fant sted på ulike lokasjoner, men sprøytene med

Avastin var istandgjort på det samme apoteket (45). I etterkant av denne hendelsen skrev U.S. Food and Drug Administration (FDA) et varsel til helsepersonell som omhandlet infeksjonsrisiko etter bruk av Avastin som er ompakket i sprøyter (48). FDA understreket i varselet at ompakking av sterile legemidler uten ordentlig aseptisk teknikk kan gå på bekostning av produktets sterilitet og potensielt medføre en infeksjonsrisiko for pasienten (48).

Også i Norge har det blitt rapportert flere tilfeller med endoftalmitt etter intravitreale injeksjoner (28-30). Fra 2012 til mars 2017 mottok meldeordningen for uønskede hendelser i spesialisthelsetjenesten 17 meldinger om endoftalmitt der nesten alle hendelsene omhandlet beskrivelser av mulig kontaminering ved opptrekk av legemidlet (29). Etter disse meldingene publiserte Helsedirektoratet et læringsnotat med noen forebyggende tiltak som kan være med på å redusere risikoen for slike komplikasjoner (29). Tiltakene inkluderer blant annet aseptisk arbeidsteknikk ved istandgjøring av legemidlet og at hetteglass kun er til engangsbruk (29).

Til tross for dette læringsnotatet har det også i etterkant blitt rapportert hendelser med alvorlige øyeinfeksjoner etter intravitreale injeksjoner med Avastin i Norge (28). Den mest alvorlige hendelsen er rapportert fra St. Olavs hospital (28). Den 23. mai 2017 fikk tjuetvåne pasienter intravitreale injeksjoner med legemidlet Avastin ved øyeavdelingens poliklinikk (28). Tolv pasienter mottok legemidlet Avastin fra det samme hetteglasset, og elleve av tolv pasienter kom tilbake etter få dager med symptomer på endoftalmitt. Bakterien *staphylococcus epidermidis* ble funnet i prøver fra øyet til alle elleve pasientene (28). Statens helsetilsyn har etter denne hendelsen skrevet en tilsynsrapport der det kommer frem at øyeavdelingen valgte å bruke et hetteglass med legemidlet Avastin til flere pasienter, og at håndteringen av legemidlet ikke var forsvarlig (28). Det kom også frem gjennom tilsynet at valg av legemiddel og gjenbruk av det samme hetteglasset til flere pasienter ble gjort av økonomiske hensyn (28).

Helsepersonell ved øyeavdelingen hadde trukket opp legemiddelet fra et hetteglass i to 1 ml sprøyter (28). Individuelle behandlingsdoser på omkring 0,06 ml hadde så blitt laget ved at legemidlet ble overført fra 1 ml sprøytene til 0,3 ml sprøyter fra baksiden med fjernet stempel (28). Rommet på poliklinikken der behandlingen ble gitt hadde ingen spesiell tilrettelegging for tilberedning av sterile legemidler med tanke på ventilasjon, avløp og hygieniske forhold (28). Under tillagingen av behandlingsdosene ble det benyttet ordinær bekledning, samt munnbind og hette (28). Sprøytene med istandgjort legemiddel ble liggende gjennom dagen under et sterilt dekke og ble tatt frem i løpet av dagen etterhvert som pasientene kom til behandling. Intern

analyse avdekket i etterkant av tilsynet at personalet mener å ha fått opplæring i gjeldende prosedyre for istandgjøring av Avastin, men at dette kun har blitt gjort én gang og senere ikke blitt fulgt opp (28).

Avdelingens interne analyseteam fant ikke én sikker kilde til kontaminering av legemidlet, men analysen kom frem til at anbrudd og opptrekk av Avastin i sprøyte inneholdt flere usikre oppgaver som medførte risiko for kontaminering (28). Dette inkluderte variasjoner vedrørende hvordan de ansatte utførte prosedyren, ikke tilstrekkelig opplæring i aseptiske teknikker og legemiddelhåndtering, mangelfull håndhygiene og mangelfulle prosedyrer (28). Statens helsetilsyn konkluderer i tilsynsrapporten med noen anbefalinger for å forebygge at slike hendelser forekommer igjen. Disse inkluderer blant annet (28):

- Bruk av legemidler til injeksjon fra én pakning til flere pasienter bør unngås (28).
- Dersom det likevel er ønskelig å fortsette å dele innholdet i ett hetteglass til flere pasienter, bør deling av legemidlet skje i apotek eller tilsvarende fasiliteter (28).
- Istandgjøring og bruk av legemidler som skal injiseres i øyet bør beskrives i prosedyrer og alt helsepersonell som er involvert i slike aktiviteter bør jevnlig gjøres kjent med innholdet i disse (28).

1.3.3 Forskjeller mellom tilvirkning av legemidler i sykehusapotek og på sykehuspost

Etter de gjentatte alvorlige hendelsene som fant sted grunnet mikrobiell kontaminering av legemidler til intravitreal injeksjon ble det tydelig at avdelingene på sykehusene ikke hadde prosedyrer som var gode nok til å tilberede disse legemidlene til pasienter. Som et resultat av dette har tillaging av sprøytene som brukes til behandling av våt AMD blitt overtatt av sykehusapotekene de fleste stedene i Norge (30, 49). Dette er fordi risikoen for kontaminering er større når injeksjonslegemidler klargjøres til bruk i kliniske områder, som for eksempel på en poliklinikk, enn på et sykehusapotek (24). Det er publisert flere studier som omhandler dette temaet, der alle konkluderer med behovet for bedre prosedyrer og tiltak for å redusere risikoen når injeksjonslegemidler tilberedes på sykehuspost og poliklinikker (50, 51).

For produksjon på et sykehusapotek finnes det detaljerte krav for å sikre kvaliteten til produktene som blir tilvirket. Disse kravene beskrives i «Forskrift om tilvirkning av legemidler i apotek», samt relevante deler av GMP (9, 52). For tilvirkning av sterile legemidler finnes det

også krav til blant annet lokaler, personalet, bekledning og monitorering. Disse kravene beskrives i Annex 1 av GMP, og er utdypet i delkapittel 1.2 (21). I Norge er det også krav om å følge gyldig Norsk Farmakopé som består av den nyeste versjonen av NLS og Ph. Eur (53, 54). GMP og Ph. Eur er gjeldende regelverk i hele Europa (1, 52). Det finnes derimot ikke et felles europeisk regelverk for ulisensiert produksjon som finner sted på apotek, og det er følgelig ikke samarbeid eller gjensidig anerkjennelse mellom ulike land på dette området (55, 56).

Ved produksjon av legemidler er det krav om tilvirkertillatelse som utstedes av SLV, dette gjelder også ved tilvirkning av legemidler på sykehusapotek (9, 10). Med en tilvirkertillatelse følger det en rekke kvalitetskrav som skal sørge for god tilvirkningspraksis, og kvaliteten til produktet bygges derfor inn i alle ledd av produksjonen (10). Tilvirkertillatelse fra SLV kreves derimot ikke for enkel istandgjøring eller pakking av preparatet dersom (10):

- a) istandgjøringen eller pakkingen skjer i apotek, sykehus eller andre helseinstitusjoner,
- b) istandgjøringen eller pakkingen skjer umiddelbart før bruk og
- c) preparatet utelukkende er beregnet til bruk på tilberedningsstedet (10).

Med andre ord trenger ikke sykehuset tilvirkertillatelse for enkel istandgjøring av legemidler som på grunn av begrenset holdbarhet må tilberedes rett før anvendelse, og som skal brukes på stedet de ble tillaget (9, 10).

1.3.4 Hvordan utføres tilvirkningen av bevacizumab og aflibercept i dag?

På Sykehusapoteket i Bergen fylles både aflibercept og bevacizumab i sprøyter til øyeavdelingen på Haukeland universitetssykehus. Opptrekk av disse legemidlene i sprøyter utføres i validerte, klassifiserte renrom i produksjonsavdelingen på sykehusapoteket. Personalet som tilvirker aflibercept og bevacizumab har vært gjennom grundig opplæring i alle aspekter vedrørende aseptisk tilvirkning. Den aseptiske arbeidsteknikken til de ansatte valideres også jevnlig. Alle sprøytene som tilvirkes kontrolleres i tillegg av en farmasøyt. Fylling av bevacizumab og aflibercept i sprøyter utføres som beskrevet i en arbeidsseddel som er utarbeidet fra en godkjent hovedforskrift (Vedlegg 7.1 og 7.2) (9). På arbeidsseddelen beskrives produksjonsprosessen i detalj. De ansatte må før tilvirkningen ta på håرنett, hansker og lang overdel, i henhold til krav som er beskrevet i GMP Annex 1 (21).

Hovedtrekkene i tilvirkningen av bevacizumab og aflibercept er at hele innholdet av legemiddel trekkes opp fra hetteglassene i en større sprøyte. Fra denne sprøyten trekkes det så opp én pasientdose til en mindre sprøyte. Det trekkes opp henholdsvis 0,05 ml aflibercept og 0,12 ml bevacizumab. Etter at innholdet er trukket opp i sprøyten sjekkes det for fravær av luftbobler. Deretter legges de ferdigfylte sprøytene i hver sin sterile pose som forsegles før sprøytene fraktes til øyeavdelingen (Vedlegg 7.1 og 7.2).



Figur 2: Sprøyten som ble benyttet i tilvirkning av aflibercept (SOL-care U100 0,5 ml insulinsprøyte) (57).



Figur 3: Sprøyten som ble benyttet i tilvirkning av bevacizumab (Terumo 1 ml Luer sprøyte) (58).



Figur 4: Kanylen som benyttes i tilvirkningen av bevacizumab og aflibercept (BD Microlance 30 G x 13 mm kanyle) (59).



Figur 5: Sprøyten som benyttes i tilvirkningen av bevacizumab og aflibercept (B. Braun Injekt-F 1 ml) (60).

Sprøyten som tidligere har blitt benyttet til tilvirkningen av aflibercept er en 0,5 ml insulinsprøyte med tilhørende kanyle (**Figur 2**), mens sprøyten som ble benyttet til bevacizumab var en 1 ml Terumo luer sprøyte (**Figur 3**) med kanyle fra BD Microlance (**Figur 4**). Nå har det imidlertid blitt besluttet å benytte 1 ml B. Braun Injekt-F sprøyter (**Figur 5**) med BD Microlance kanyle (**Figur 4**) til tilvirkningen av både aflibercept og bevacizumab.

Årsaken til at det nylig har blitt besluttet å bruke en annen sprøytetype til tilvirkningen av disse legemidlene er observasjoner som viser at silikonoljen de fleste sprøyter inneholder kan være problematisk med tanke på injisering av disse legemidlene i øyet (40, 61-63). Dette omhandler at silikonoljen som finnes i sprøytene kan følge legemidlet inn i øyet, noe som kan føre til symptomatisk ansamling av dråper med silikonolje og uheldige effekter for pasienten (40). Av den grunn har Sykehusapoteket i Bergen, i tillegg til flere andre sykehusapotek i Norge, besluttet å bruke sprøyter uten silikonolje (slik som B. Braun Injekt-F) som beholdere for legemidlene til intravitreal injeksjon (40).

Ettersom det ikke finnes nok dokumentasjon på holdbarheten til aflibercept og bevacizumab i andre beholdere enn originalbeholderen har Sykehusapoteket i Bergen valgt å sette en holdbarhetstid på henholdsvis 24 og 72 timer for de to legemidlene når de er overført til sprøyter. Det ville imidlertid ofte vært gunstig å kunne utvide holdbarheten til sprøytene. For det første vil det være gunstig med tanke på logistikken vedrørende tilvirkningen av preparatene. En annen åpenbar fordel ved å utvide holdbarheten er det økonomiske aspektet, fordi man ved å tilvirke sprøytene sjeldnere vil kunne frigjøre både tid og ressurser. Før holdbarheten kan utvides må imidlertid en rekke faktorer undersøkes, blant annet integriteten til sprøytene som brukes som emballasje for legemidlene.

1.3.5 Andre legemidler som tilvirkes i sprøyter på Sykehusapoteket i Bergen

I tillegg til sprøytene som benyttes til intravitreal injeksjon fylles også andre legemidler i sprøyter på Sykehusapoteket i Bergen. Fylling og levering av legemidler i sprøyter er særlig aktuelt for cytostatika der det er krav om at håndteringen skal foregå i eget rom som er utstyrt med arbeidsbenker med avtrekksskap (64). De tre legemidlene som oftest tilvirkes og leveres i sprøyter på Sykehusapoteket i Bergen er bortezomib (Velcade®), azacitidin (Vidaza®) og metotreksat (65-67). Bortezomib gis som intravenøs eller subkutan injeksjon og fylles i 1, 4 eller 5 ml sprøyter, avhengig av dosen som skal gis (65). Azacitidin gis som subkutan injeksjon og fylles i 3 ml og 5 ml sprøyter (66). Metotreksat gis som intratekal eller intraventrikulær injeksjon og fylles i 1, 3 eller 5 ml sprøyter (67). Alle sprøytene tilvirkes med propp som lukkemekanisme og leveres til avdelingene i en forseglet pose.

1.4 Integritetstesting

1.4.1 Hensikten med integritetstesting

Dersom sprøyter skal benyttes som beholdere for aseptisk tilvirkede legemidler er det særdeles viktig at sprøyten og dens lukkemekanisme beskytter produktets sterilitet og stabilitet gjennom hele holdbarheten (17, 68, 69). For å kunne oppnå dette er det essensielt at integriteten til beholderen er intakt frem til den skal brukes (68). Integritetstesting er en metode som kan benyttes for å evaluere en beholders evne til å beskytte produktet og opprettholde en barriere mot ulike forurensinger (68). Forurensinger som potensielt kan krysse en slik barriere inkluderer mikroorganismer, gasser og andre stoffer (17, 68). Ved utilstrekkelig integritet, og derav beskyttelse av produktet, risiker man tap av produktet og at produktet ikke bevarer sterilitet eller opprettholder relevante fysikalsk-kjemiske egenskaper (17). Nåværende regulatoriske retningslinjer gir begrenset informasjon om hvordan en beholders integritet skal vurderes og denne informasjonen varierer også mellom ulike land og regioner (70).

1.4.2 Beskrivelser av integritetstesting i veiledende dokumenter

Et kapittel som omhandler evaluering av beholderes integritet har nylig publisert av United States Pharmacopeial Convention (USP) (71). Dette kapitlet, <1207> «Packaging Integrity Evaluation – Sterile Products», gir utstrakt informasjon og veiledning når det gjelder testmetoder som kan benyttes for å sikre at en beholder er tett og derav trygg å bruke til oppbevaring av sterile legemidler (17, 71). Det er imidlertid fortsatt mange spørsmål vedrørende integritetstesting som må diskuteres av den farmasøytiske industrien og produsentene av sterile legemidler (70). Dette inkluderer blant annet hvilken metode som er best egnet, hvilke resultater som kan aksepteres og hvilke prøvestørrelser som er egnet ved integritetstesting (70). Det er forventet, i lys av den nylige reviderte USP <1207>, at det vil forekomme nøyere granskning når det kommer til evaluering av beholderes integritet i fremtiden (70). Dette vil sannsynligvis føre til nye regulatoriske krav som må møtes av selskaper som er involvert i produksjonen av sterile legemidler (70).

Flere andre veiledende dokumenter beskriver viktigheten av å teste integriteten til beholdere som skal brukes til oppbevaring av sterile legemidler (15, 21, 72, 73). I Annex 1 av GMP står det følgende: «Beholdere skal lukkes i henhold til validerte metoder. Beholdere som lukkes med fusjon, for eksempel glass eller plastampuller bør være underlagt 100 % integritetstesting.

For andre beholdere bør integriteten bekreftes i henhold til passende prosedyrer» (21). I GMP retningslinjene «Part II – Basic Requirements for Medicinal Products» står det: «Beholdere skal gi adekvat beskyttelse mot forverring eller kontaminering av virkestoffet som kan skje under transport og oppbevaring» (73). I «Guidance for Industry, Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice» skriver FDA: «En beholder som tillater penetrering av mikroorganismer er uegnet for et sterilt produkt» (72).

«Quality Assurance of Aseptic Preparation Services: Standards» inneholder standarder som benyttes for ulisensiert aseptisk produksjon på apotek i Storbritannia (24). Her oppgis det at integriteten til en beholder burde være undersøkt og validert før man fastsetter holdbarheten til et produkt. For beholdere som består av flere komponenter, som sprøyter, må det da utføres en integritetstest (24). Utførelse av integritetstester beskrives som nødvendig for å bekrefte den mikrobiologiske holdbarheten til produktet som lagres i sprøyten. «Quality Assurance of Aseptic Preparation Services: Standards» beskriver videre at det ideelt må utføres integritetstester som samsvarer med «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» (24). Da det ikke finnes tilsvarende retningslinjer for ulisensiert produksjon i apotek i Norge, vurderes de britiske standardene som et godt utgangspunkt for tilsvarende testing i Norge.

1.4.3 Beskrivelser av ulike integritetstester

Det finnes i dag ingen universell akseptert testmetode eller gullstandard når det kommer til å evaluere en beholders integritet (70, 71). Lokale og globale regulatoriske krav sier heller ingenting om hva som kreves når det kommer til integritetstesting, annet enn at produktet skal forbli sterilt og beskyttes i hele holdbarhetstiden (17, 70). Det finnes flere måter å utføre integritetstesting på, og ulike integritetstester deles i USP <1207> inn i deterministiske og probabilistiske metoder (17, 68, 70, 71, 74). Definisjonene under kommer fra den reviderte USP <1207> (17):

Deterministiske metoder: «En metode der lekkasjen som detekteres, eller måles, er basert på et fenomen som følger en rekke forutsigbare hendelser. I tillegg er målingen av lekkasjen basert på fysikalsk-kjemiske teknikker som er enkle å kontrollere og monitorere. Resultatet gir objektive, kvantitative data» (17). Noen eksempler på denne metoden er masseekstraksjon og vakuum forfall (68, 70).

Probabilistiske metoder: «En metode som er motsatt av en deterministisk metode. Metoden er stokastisk, og avhenger av en rekke sekvensielle og/eller samtidig inntreffende hendelser. Hver hendelse er assosiert med tilfeldige utfall som beskrives ved sannsynlighetsfordelinger. Derfor er funnene assosiert med usikkerhet som krever store nok prøvestørrelser og rigide testforhold for å gi meningsfulle resultater» (17). Noen eksempler på denne metoden er fargetest og mikrobiologisk integritetstesting (70, 74).

Både deterministiske og probabilistiske metoder blir brukt for å evaluere integritet, og begge metodene er akseptable om de er tilstrekkelig kvalifisert (70). Kvalifiseringen inkluderer blant annet etablering av en «maksimalt tillatt grense for lekkasje», deteksjonsgrense og vurdering av metodens utfall (17). Hver metode har ulik sensitivitet og ulike kriterier for vurdering av godkjent og ikke-godkjent resultat (70). De ulike integritetstestene har både fordeler og ulemper, og det finnes av den grunn ikke én metode som regnes som den «beste». Hvilken test som skal benyttes må vurderes for hver enkelt beholder og i hvert enkelt tilfelle (70).

Tradisjonelt har integritetstesting blitt gjennomført ved å bruke en variant av fysisk integritetstesting som baserer seg på fargegjennomtrenging og mikrobiologisk integritetstesting (74). Disse integritetstestene er hovedfokuset i denne oppgaven, fordi det er disse som beskrives i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» (20). De andre metodene for integritetstesting vil derfor ikke bli diskutert ytterligere. De to tradisjonelle metodene kan beskrives som probabilistiske metoder, og har derav lignende fordeler og ulemper (68, 70).

Fordeler med de fysiske testene som baserer seg på fargegjennomtrenging er blant annet at det er tester som har vært utstrakt i bruk i flere tiår, og av den grunn er metoden kjent for både industrien og regulatoriske myndigheter (69, 70). Metoden er enkel og effektiv, i tillegg til at den er fleksibel ved at flere beholdere kan testes på likt (70). Ulemper med metoden er at den er destruktiv, noe som vil si at beholderen ikke kan brukes eller testes på nytt etter en gjennomført test (69, 70, 74). I tillegg må beholderne som testes være transparente for visuell deteksjon. En annen ulempe er at når det testes beholdere med større volumer så kan en liten gjennomtrenging av væske være vanskelig å detektere (70). En siste ulempe er at gjennomtrenging av farge ved små defekter i beholderen er basert på sannsynlighet for en rekke hendelser som må finne sted (69, 70).

Fordeler med den mikrobiologiske integritetstesten er at dette også er en test som har vært utstrakt i bruk i flere tiår. Derfor er metoden godt kjent av industrien og regulatoriske myndigheter (69, 70). Metoden gir også en direkte evaluering av en relevant egenskap, altså integriteten til en beholder med tanke på mikrobiell kontaminering (70). Ulemper med metoden inkluderer at den kun vil gi et resultat som kan vurderes som godkjent/ikke godkjent. Det er med andre ord ingen kvantitative resultater (70). Metoden er også destruktiv, i tillegg til at den tar lang tid og krever relativt mye arbeid (70). En annen ulempe er at beholderen som skal testes kun kan fylles med et medium som støtter vekst av den aktuelle mikroorganismen som brukes under testingen (69, 70, 74). Det er også en mulighet for falske negative og falske positive resultater fordi deteksjon delvis er avhengig teknikken til den som gjennomfører testingen (70). Til slutt er kontaminering med mikroorganismer ved små defekter i beholderen også basert på sannsynlighet for denne testen (69, 70).

1.4.4 Protocols for the Integrity Testing of Syringes

Integritetstestene som skal foretas i denne oppgaven skal utføres i henhold til «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» (20). Protokollen er skrevet og revidert av en rekke forfattere på vegne av «National Health Service (NHS) United Kingdom, Pharmaceutical Quality Assurance Committee». Målet med protokollen er å beskrive standardiserte og validerte metoder for å vurdere integriteten til ulike sprøyter og overgangen fra sprøyten til lukkemekanismen. I protokollen beskrives to ulike mikrobiologiske tester og en fysisk test som baserer seg på gjennomtrenging av farge inn i sprøytene (videre kalt fysisk integritetstest) (20). De to testene deler det samme prinsippet fordi det som detekteres er overføring av henholdsvis bakterier eller fargeløsning inn i beholderen. Dersom det har skjedd en overføring vil det bli avslørt gjennom mikrobiologisk vekst i innholdet eller farging av innholdet i beholderen som testes (74).

Protokollen beskriver ulike forhold som bør tas i betraktning når engangssprøyter blir brukt som beholdere for legemidler (20):

- Luer-lock overgang mellom sprøyten og proppen/kanylen sørger for en mer sikker og integrert lukkemekanisme enn luer overgang. Derfor foretrekkes luer-lock overgang der det er mulig. Om luer overgang benyttes anbefales det å ha foretatt en risikovurdering for å rettferdiggjøre bruken (20).

- Bøying av stempelet etter at sprøyten er fylt anbefales ikke. En slik uheldig bøying kan forekomme for eksempel under lagring eller transport. Dette kan føre til problemer med integriteten til sprøyten (20).
- Sprøytene som skal benyttes som beholdere for legemiddel bør ikke fylles til maksimal kapasitet. Dette er fordi fulle sprøyter øker risikoen for potensiell lekkasje som kan forekomme grunnet forhøyet trykk som påføres stempelet under lagring eller transport. Som en tommelfingerregel anbefales det derfor at sprøytene ikke fylles til mer enn 85 % av deres kapasitet (20).
- Under tillaging av sprøytene bør det for hver sprøyte bekreftes at kanylen eller proppen sitter ordentlig fast (20).

Prinsippet for de mikrobiologiske testene som beskrives i protokollen er å fylle sprøytene med et sterilt næringsrikt medium (20). Det er essensielt at sprøytene som skal brukes i testen har sterilt innhold før de gjennomgår integritetstesting, fordi man da vet at en eventuell bakterievekst skyldes hendelser som har forekommet etter at sprøytene har blitt utfordret med mikroorganismer (20). For begge de mikrobiologiske testene beskrives to alternativer for testing: «whole immersion» og «partial immersion» (full og delvis nedsenking) (20). Om det er ønskelig å teste hele systemet, altså både lukkemekanismen, sprøyten og stempelet er full nedsenking anbefalt. Da blir hele sprøyten utsatt for den aktuelle mikroorganismen på likt. Testen som baserer seg på delvis nedsenking kan være nyttig om den andre testen har feilet, og det er ønskelig å finne ut hvor det foreligger problem med integriteten.

Under den mikrobiologiske integritetstesten blir utsiden av sprøytene utfordret med en bakteriesuspensjon som inneholder bevegelige bakterier i vekst (20). De to mikrobiologiske testene er forholdsvis like, men tar i bruk ulike bakterier, henholdsvis *Brevundimonas diminuta* (*B. Diminuta*) og *Escherichia coli* (*E. Coli*) (20). *B. Diminuta* egner seg godt for testen fordi den er liten, mobil og stavformet. *E. Coli* er godt egnet fordi den søker områder med næring, er veldig mobil og stavformet (20). *E. Coli* skiller seg fra *B. Diminuta* ved at den også kan vokse uten tilgang på oksygen (25, 75). Derfor er medier som kun har én karbonkilde nok for at *E. Coli* kan vokse (25). *E. Coli* kan vokse ved lave temperaturer, men også ved temperaturer så høye som 40 °C, optimal vekst skjer ved 37 °C (25). Optimal vekst av *B. Diminuta* skjer mellom 30 og 37 °C (75).

Den fysiske testen som beskrives i protokollen er en enklere og raskere test (20). Testen er ikke avhengig av en inkuberingsperiode, og kan derfor brukes til å evaluere hver batch som tilvirkes. Denne metoden går ut på at sprøytene som skal testes fylles med enten legemiddel eller vann. Deretter skal man feste propp på sprøytene, og lage et indre vakuum i sprøyten ved å lage et hull til en skrue som holder stempelet tilbake. Så plasseres sprøytene i en tett beholder som fylles med en fargeløsning. Deretter blir beholderen med sprøytene og fargeløsningen rotert i to timer før innholdet i sprøytene blir inspisert visuelt eller ved bruk av et spektrofotometer (20). Den mest fullstendige vurderingen av integriteten til en sprøytetype oppnås dersom det gjennomføres både én mikrobiologisk og én fysisk integritetstest, og det er det som skal gjennomføres i denne studien (20).

1.5 Formålet med denne studien

Formålet med studien er å utføre integritetstesting av sprøyter som benyttes, eller potensielt vil kunne benyttes, som emballasje for legemidler på Sykehusapoteket i Bergen. Integritetstesting skal utføres ved å bruke metodene som er beskrevet i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» (20). Disse resultatene vil kunne brukes til å si noe om sprøytene klarer å bevare sterilitet under oppbevaring, og videre om sprøytene er egnet som beholdere for legemidler. Resultatene fra studien kan være verdifulle for å gi en produksjonspraksis som er økonomisk og samtidig ivaretar pasientsikkerheten.

Basert på dette skal oppgaven ta for seg følgende problemstillinger:

- Klarer sprøytene å bevare sterilitet under oppbevaring?
- Er sprøytene egnet som beholdere for legemidler?
- Er metodene som benyttes i denne oppgaven egnet til å teste integriteten til beholdere for legemidler på et sykehusapotek?
- Kan holdbarheten til legemidlene som oppbevares i sprøytene utvides?

2. Materialer og metode

2.1 Mikrobiologisk integritetstesting ved bruk av *E. Coli*

2.1.1 Oversikt over sprøytene som ble testet ved mikrobiologisk integritetstesting

Tabell 1 presenterer en oversikt over sprøytene som ble testet ved mikrobiologisk integritetstesting. Noen sprøyter ble testet flere ganger og er derfor tilvirket ved forskjellige anledninger, dette er representert ved forskjellige rader i **Tabell 1**.

Ingen av sprøytene ble fylt mer enn 85 % av maksimal kapasitet, basert på «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» (20). Sprøyter fra tre forskjellige produsenter, henholdsvis Terumo, B. Braun og BD, ble inkludert i studien. 20 sprøyter av hver sprøytetype ble testet på likt, som beskrevet i protokollen (20). Ved én anledning ble 40 sprøyter av samme sprøytetype testet fordi disse allerede var tilvirket som en del av en prosedyrekontroll av ansatte på Sykehusapoteket i Bergen.

Tabell 1: *Oversikt over sprøytene som ble testet ved mikrobiologisk integritetstesting.*

STØRRELSE	PRODUSENT	LUKKE- MEKANISME	ANTALL TILVIRKET	BATCH NUMMER	FYLLINGS- GRAD
1 ml	Terumo	Luer m. kanyle	20 stk	1909265	40 %
1 ml	Terumo	Luer m. kanyle	20 stk	1903235	40 %
1 ml	Terumo	Luer m. kanyle	40 stk	*	40 %
1 ml	Terumo	Luer m. propp	20 stk	1907055	40 %
1 ml	Terumo	Luer m. propp	20 stk	1907055	85 %
1 ml	B. Braun Injekt-F	Luer m. propp	20 stk	19K30C8	40 %
1 ml	B. Braun Injekt-F	Luer m. kanyle	20 stk	19K30C8	40 %
1 ml	B. Braun Injekt-F	Luer m. propp	20 stk	19F10C8	85 %
1 ml	B. Braun Injekt-F	Luer m. kanyle	20 stk	19F10C8	40 %
1 ml	B. Braun Omnifix	Luer m. propp	20 stk	19M11C8	40 %
1 ml	B. Braun Omnifix	Luer m. propp	20 stk	19M11C8	85 %

1 ml	BD Plastipak	Luer-lock m. Propp	20 stk	9210923	40 %
1 ml	BD Plastipak	Luer-lock m. Propp	20 stk	9210923	85 %
1 ml	BD Plastipak	Luer m. Propp	20 stk	1910001	40 %
1 ml	BD Plastipak	Luer m. Propp	20 stk	1910001	85 %
2 ml	B. Braun Omnifix	Luer-Lock m. Propp	20 stk	19K30C8	50 %
2 ml	B. Braun Omnifix	Luer-Lock m. Propp	20 stk	19K30C8	85 %
3 ml	Terumo	Luer-Lock m. propp	20 stk	180715K	50 %
3 ml	Terumo	Luer-Lock m. propp	20 stk	180715K	85 %
3 ml	Terumo	Luer-Lock m. Propp	20 stk	180715K	85 %
3 ml	Terumo	Luer-Lock m. Propp	20 stk	180715K**	85 %
3 ml	BD Plastipak	Luer-Lock m. propp	20 stk	9318756**	50 %
3 ml	BD Plastipak	Luer-Lock m. propp	20 stk	9318756**	85 %
5 ml	Terumo	Luer-Lock m. propp	20 stk	180422M	50 %
5 ml	Terumo	Luer-Lock m. propp	20 stk	180422M	85 %
5 ml	Terumo	Luer-Lock m. propp	20 stk	180422M	85 %
5 ml	Terumo	Luer-Lock m. propp	20 stk	190126M**	85 %
5 ml	B. Braun Omnifix	Luer-Lock m. propp	20 stk	19M18C8	50 %
5 ml	B. Braun Omnifix	Luer-Lock m. propp	20 stk	19M18C8	85 %
5 ml	BD Plastipak	Luer-Lock m. propp	20 stk	9346325	50 %
5 ml	BD Plastipak	Luer-Lock m. propp	20 stk	9346325	85 %

* Batchnummer mangler fordi disse sprøytene ble tilvirket av ansatte på produksjonsavdelingen.

** Sprøytene ble fylt med 3x fortynnet trypton soya buljong (TSB).

Den samme proppen ble benyttet for alle sprøytetypene (Combi-Stopper, B. Braun). 1 ml sprøyten fra Terumo ble testet med kanylen som blir benyttet til tilvirkningen av bevacizumab (BD Microlance 3, 30 G ½ kanyle). Denne kanylen ble også testet på 1 ml B. Braun Injekt-F.

I tillegg ble 1 ml B. Braun Injekt-F testet med kanyle fra TSK (TSK 33G x 3/8 Steriject hypodermic kanyle). Kun én 1 ml sprøyte hadde luer-lock overgang mellom sprøyten og lukkemekanismen (fra produsenten BD), mens resten hadde luer overgang. Alle 2, 3 og 5 ml sprøytene som ble testet hadde propp som lukkemekanisme og luer lock overgang mellom sprøyten og proppen.

Der det oppgis at fylt volum i 1 ml sprøytene er 40 % tilsvarer dette 0,3 ml buljong og 0,1 ml luft. Dette volumet ble valgt i den første testen fordi det tilsvarer volumet buljong som normalt fylles i disse sprøytene under prosedyrekontroll på Sykehusapoteket i Bergen. I de etterfølgende testene ble det besluttet å bruke det samme volumet for å teste sprøytene under samme forhold. Der det oppgis at fylt volum i 1 ml sprøytene er 85 % tilsvarer dette 0,75 ml buljong og 0,1 ml luft.

2, 3 og 5 ml sprøytene ble fylt med buljong og luft tilsvarende 50 % og 85 %. Det ble gjort avrundninger da disse volumene ble regnet ut for å gjøre det praktisk når sprøytene skulle fylles. Under følger en oversikt over hvor mye buljong og luft de ulike volumene tilsvarer for de forskjellige sprøytetypene:

- **2 ml sprøyter:** 50 % tilsvarer 1 ml buljong og 0,2 ml luft.
85 % tilsvarer 1,9 ml buljong og 0,2 ml luft.
- **3 ml sprøyter:** 50 % tilsvarer 1,25 ml buljong og 0,25 ml luft.
85 % tilsvarer 2,3 ml buljong og 0,25 ml luft.
- **5 ml sprøyter:** 50 % tilsvarer 2,2 ml buljong og 0,3 ml luft.
85 % tilsvarer 3,7 ml buljong og 0,3 ml luft.

2.1.2 Aseptisk fylling av buljong i sprøytene

For å sikre sterilitet ble sprøytene tilvirket på produksjonsavdelingen ved Sykehusapoteket i Bergen. Et antall av 20 sprøyter for hver sprøytetype som skulle testes ble tilvirket samtidig. Tilvirkningen foregikk enten i isolator med romklasse D som bakgrunn, eller i åpen LAF-benk («Laminar Air Flow»). Aseptisk arbeidsteknikk ble benyttet, i tillegg til bruk av hårnett, armovertrekk og sterile hansker. Sprøytene ble fylt med steril trypton soya buljong (TSB) (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrike). Mediet er mikrobiologisk testet, noe som betyr at det er påvist at relevante mikroorganismer kan vokse i mediet. Det er dette mediet produksjonsavdelingen vanligvis benytter til valideringen av de ansattes aseptiske tilvirkning.

TSB (Biomérieux) ble trukket opp fra et hetteglass eller en infusjonspose. I et tilfelle ble det også brukt TSB som hadde trippel styrke (markert i **Tabell 1**). Denne buljongen ble fortynnet i LAF-benken før bruk ved å tilsette to deler sterilt vann (Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Tyskland) til en del TSB i et sterilt hetteglass (Biomérieux).

Sprøytene ble tilvirket på følgende måte:

1. Membranen til TSB-hetteglasset/TSB-infusjonsposen ble desinfisert i ett minutt. Membranen ble gnidd godt idet kompressen ble fjernet.
2. TSB ble trukket opp ved bruk av minispике (B. Braun) og en 10 ml (B. Braun) eller 50 ml (Terumo) overføringssprøyte.
3. Baxa-overgang (Baxter) ble satt på overføringssprøyten.
4. Ønsket volum TSB ble trukket opp i sprøyten.
5. Ønsket volum luft ble trukket opp i sprøyten, i tillegg til innholdet av TSB.
6. Kanyle eller propp ble satt på sprøyten, kanylen ble ikke fylt og hetten ble værende på.
7. 20 sprøyter ble fylt.
8. Sprøytene ble lagt i hver sin sterile pose eller i en felles lynlåspose. Det ble sett til at det var så lite luft som mulig i posen før den ble lukket.
9. Sprøytene ble fraktet ut av LAF-benken/isolatoren.

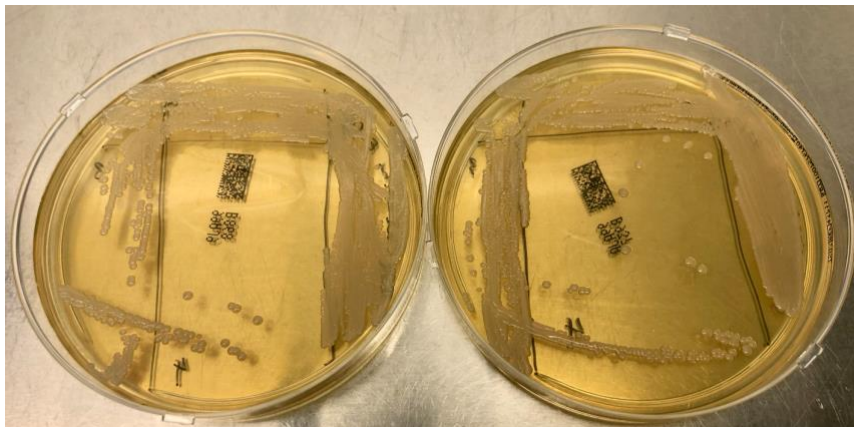
Etter tilvirkningen ble sprøytene først pre-inkubert ved 20-25 °C i syv dager, og deretter inkubert ved omtrent 33 °C i et inkubatorskap (Binder, WTC, Tuttlingen, Tyskland) i syv dager (20). Inkuberingen fant sted i produksjonsavdelingen der mikrobiologiske prøver normalt håndteres. Denne prosessen ble utført for å sikre at den aseptiske dispenseringen hadde blitt foretatt korrekt og at innholdet i sprøytene var sterilt. Sprøytene som inneholdt tegn til vekst av mikroorganismer etter disse 14 dagene ble tatt ut av testen (20).

2.1.3 Tillaging av *E. Coli*

Alt arbeid som involverte mikroorganismer ble utført i et mikrobiologisk laboratorium utenfor sykehusapoteket. *E. Coli* ble valgt som mikroorganisme fordi den er beskrevet som egnet i protokollen (20). For å lage renkultur av *E. Coli* ble det brukt en steril bakteriologisk øse (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) til å så ut bakteriene på agarskåler. Det ble benyttet *E. Coli* som hadde vært konserveret i glyserol og lagret ved -74 °C. Agarskålene som ble benyttet var TSA (Biomérieux). TSA støtter veksten av flere bakterier, deriblant *E. Coli*.

Bakteriene ble sådd ut på agarskålen ved bruk av kvadrantmetoden (**Figur 6**) (76). I denne metoden spres bakteriene utover agarskålen ved bruk av et bestemt mønster. Agarskålen ble delt i fire deler, og merket en til fire. For den første kvadranten ble den sterile øsen dyppet i det fryste bakteriemediet, før øsen ble spredd utover kvadranten med jevne, lette bevegelser. Agarskålen ble deretter snudd 90 grader, og en ny øse ble benyttet til å spre bakteriene videre fra kvadrant én til kvadrant to. På samme måte ble bakteriene fordelt fra kvadrant to til kvadrant tre, og deretter fra kvadrant tre til kvadrant fire (76).

Målet med denne metoden er å dyrke frem individuelle kolonier av *E. Coli* til videre bruk. En koloni, i motsetning til en enkelt bakterie, kan ses uten mikroskop. I teorien stammer alle bakteriene i en koloni fra én enkelt bakterie som initialt ble sådd ut på platen (76). Agarskålene ble inkubert i et inkubatorskap (Termaks, Bergen, Norge) i omtrent 24 timer ved 35 °C, før skålen ble tatt ut av inkubatoren og deretter plassert i et kjøleskap. Agarskålene ble inkubert opp ned slik at kondensering som akkumuleres i lokket ikke skulle dryppe på koloniene (76).



Figur 6: Utsåing av *E. Coli* ved bruk av kvadrantmetoden (eget bilde).

Etter inkubering ble materialet fra en enkeltkoloni overført fra agarskålen med en bakteriologisk øse til en erlenmeyerkolbe (VWR) som var tilsatt 100 ml mikrobiologisk testet TSB (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) (Vedlegg 7.3) (20). Buljongen og reagensglasset hadde på forhånd blitt autoklavert. Bakteriesuspensjonen ble deretter inkubert på en ristende inkubator (311DS, Labnet, Edison, USA) i omtrent 24 timer ved 35 °C og 250 rpm (roteringer per minutt) (20).

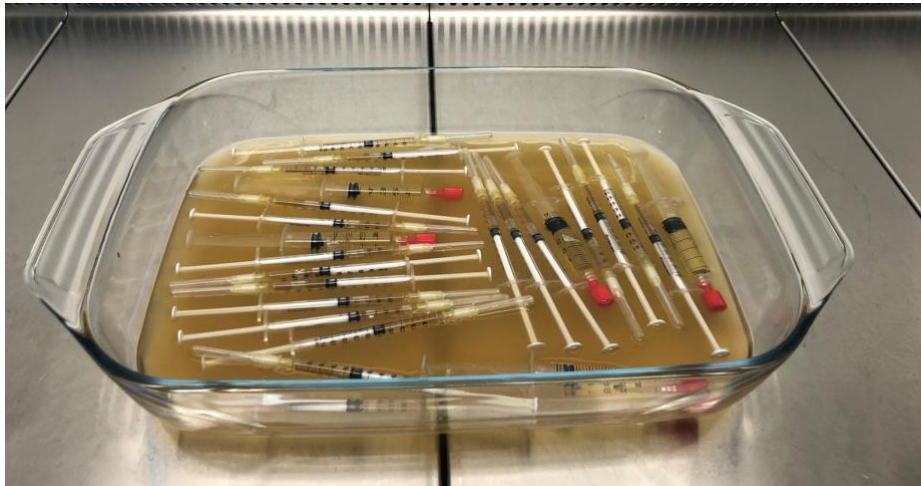
2.1.4 Mikrobiologisk integritetstest (full nedsenking)

Sprøytene ble flyttet fra produksjonsavdelingen til det mikrobiologiske laboratoriet samme dag som integritetstesten ble utført. Sprøytene ble nøye undersøkt for mikrobiell kontaminering før testen ble utført. Integritetstesten ble utført i en rektangulær ildfast form fra Pyrex. Denne beholderen ble brukt fordi den hadde passelig størrelse og tåler temperatur opp til 300 °C. Beholderen ble i forkant av hver integritetstest sterilisert med tørr varme.

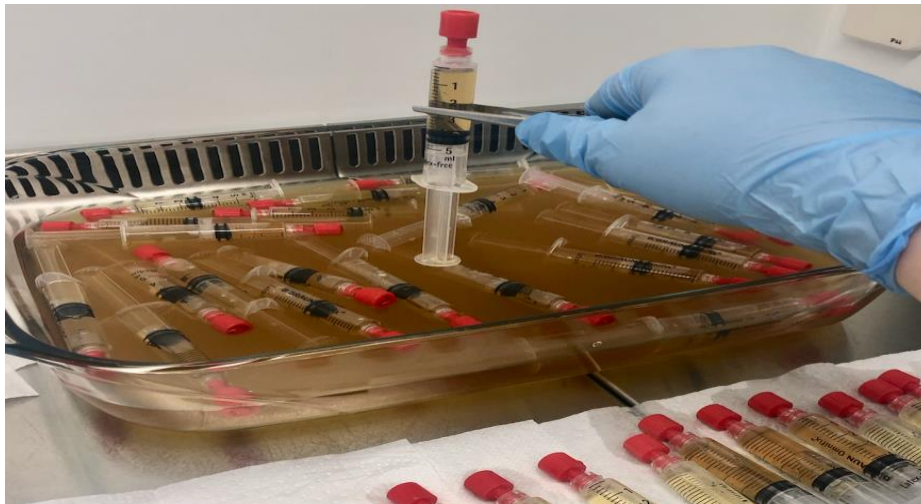
Integritetstesten ble utført i en LAF-benk. Først ble det sikret at kanylen eller proppen satt godt fast til sprøyten, før den ytre overflaten til sprøytene ble tørket med kompresser (OneMed, Stockholm, Sverige) som var fuktet med 70 % etylalkohol (Solveco, Rosersberg, Sverige). Deretter lufttørket sprøytene før de ble plassert i den ildfaste formen. Da sprøytene var plassert i formen ble de dekket med tilstrekkelig autoklavert TSB (Merck) til at sprøytene forble dekket av buljong (20). Det ble brukt ulik mengde buljong avhengig av hvor mange sprøyter som var plassert i beholderen samtidig. Det ble også sikret at ulike sprøytetyper var jevnt fordelt i formen da flere sprøytetyper ble testet samtidig. Deretter ble den tillagde bakteriesuspensjonen tilsatt formen. Etter at bakteriesuspensjonen var tilsatt ble formen stående i omtrent 30 minutter (**Figur 7**). I løpet av denne tiden ble en prøve av suspensjonen tatt ut, og det ble utført Total Viable Count (forklart videre i delkapittel 2.1.6) (20).

Etter 30 minutter ble sprøytene fjernet fra formen med en pinsett og lagt på et papir (**Figur 8**). Da de ble fjernet ble de ristet forsiktig over formen for å fjerne mest mulig væske. De ble deretter tørket med kompresser for å fjerne rester av *E. Coli* og buljong. I noen av sprøytene samlet det seg bakteriesuspensjon som var vanskelig å fjerne (**Figur 9**). I de første forsøkene ble det beveget forsiktig på stempelet til noen av sprøytene for å fjerne denne væsken. Etter inkuberingen var det vekst i en stor andel av disse sprøytene, og det ble mistenkt at bevegelse på stempelet hadde bidratt til kontaminering (**Tabell 3 og 4**). I de videre forsøkene ble det derfor forsøkt å håndtere sprøytene med forsiktighet under denne prosessen.

Sprøytene ble så lagt i en lynlåspose og plassert i et inkubatorskap (Termaks) ved omtrent 35 °C i 14 dager. Etter inkuberingen ble hver enkelt sprøyte inspisert for å se etter vekst som tydet på at *E. Coli* hadde fått tilgang til innholdet i sprøyten. Integriteten til sprøyten og lukkemekanismen var bekreftet om innholdet i alle sprøytene var fri for vekst. Dersom det var vekst i noen av sprøytene, ble ikke resultatet regnet som godkjent (20).



Figur 7: Bildet viser sprøytene og formen under den mikrobiologiske integritetstesten (eget bilde).



Figur 8: Bildet viser prosessen der sprøytene blir fjernet fra formen etter den mikrobiologiske integritetstesten (eget bilde).



Figur 9: Bildet viser sprøyter med rester av bakteriesuspensjon i toppen av stempelet som var vanskelig å fjerne etter mikrobiologisk integritetstesting. Fargen på buljongen i sprøytene er ulik grunnet forskjellig farge på TSB i hetteglass og infusjonspose (eget bilde).

2.1.5 Tillaging og sterilisering av buljong og ildfast form til bakteriesuspensjon

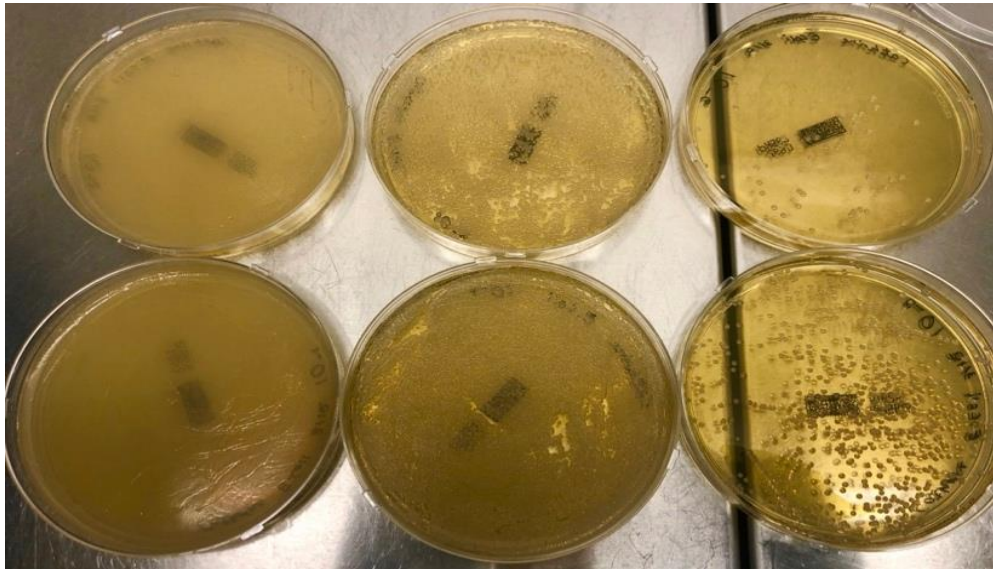
TSB ble laget ved å tilsette 1 liter sterilt vann (Fresenius Kabi) til 30 g TSB pulver (Biomérieux) i en 1000 ml flaske (VWR, Radnor, USA). Denne blandingen ble rørt på en magnetrører (IKA-Combimag RCT, Staufen im Breisgau, Tyskland) til alt pulveret hadde løst seg i vannet. Buljongen ble så overført til 500 ml flasker (VWR), før flaskene med innhold ble autoklavert i en autoklav (Cisa, Lucca, Italia) med fuktig varme i 15 minutter ved 121 °C. Den ildfaste formen ble før hver integritetstest vasket i en oppvaskmaskin og sterilisert i en tørrsterilisator (Termaks) i to timer ved 180 °C.

2.1.6 Telling av bakterier i flytende medium ved Total Viable Count

I henhold til protokollen ble det utført Total Viable Count under hver integritetstest for å bekrefte utfordringsmediet (20). Total Viable Count baserer seg på at bakteriesuspensjonen blir seriefortynnet og sådd ut på et medium som tillater vekst (77). Teknikken som brukes til å så ut bakteriene på agarskålene kalles for «spread plate procedure». Denne teknikken brukes for å spre mikroorganismer som finnes i et lite volum jevnt utover overflaten til agarskålene (76). Den fortyningen som har resultert i en agarskål med mellom 30 og 300 kolonier velges ut og telles (**Figur 10**). Siden fortynningsfaktoren er kjent kan det totale antall kolonidannende enheter (cfu) som finnes på en plate brukes til å regne ut konsentrasjonen av levende bakterier i løsningen der prøven ble tatt (77).

For å lage seriefortynningene ble 9 ml sterilt vann (Fresenius Kabi) fylt i seks sterile 15 ml rør med skrukork (Sarstedt). Rørene ble merket med fortynningsfaktoren (fra 10^{-1} til 10^{-6}). Seks agarskåler (Biomérieux) ble så merket med tilsvarende fortynningsfaktorer. Deretter ble 1 ml bakteriesuspensjon pipettert med automatpipette (ThermoFisher, Waltham, USA) og pipettespiss (Finntip Flex Filter 1000 μ L) over i rør nummer en (fortynning 10^{-1}). Suspensjonen ble blandet ved å snu den opp ned omtrent 10 ganger, før 1 ml fra rør nummer en ble pipettert over i rør nummer to (fortynning 10^{-2}). Det samme ble gjort med alle rørene frem til alle hadde blitt tilsatt 1 ml suspensjon fra det foregående røret (77). Deretter ble 0,1 ml pipettert fra rørene til tilhørende merket agarskål. En steril bakteriologisk spreder (VWR) ble benyttet til å spre suspensjonen jevnt utover hele agarskålen. Skålen ble rotert flere ganger mens sprederen ble ført over hele skålen for å sikre jevn distribusjon av bakteriesuspensjonen. Etter at suspensjonen var spredd utover skålene ble det ventet minst fem minutter for å sikre god absorpsjon av suspensjonen. Deretter ble agarskålene invertert og inkubert i et inkubatorskap (Termaks) i

omtrent 24 timer ved 35 °C. Skålen som inneholdt mellom 30 og 300 kolonier ble valgt for å utføre utregningene. Skålene som inneholder flere enn 300 kolonier defineres som «Too Numerous To Count», og skålene som inneholder mindre enn 30 kolonier er en for liten prøve til å representere et nøyaktig utvalg av utfordringsmediet (77, 78).



Figur 10: Bildet viser seks agarskåler etter 24 timer inkubering. Skålene med fortynning 10^{-1} til 10^{-5} har for høyt bakterieantall til å kunne telles. Skålen med fortynning 10^{-6} har 57 bakteriekolonier. Dette tilsvarer 5.7×10^8 cfu/ml i originalprøven (eget bilde).

2.1.7 Validering av mediet (positiv kontroll)

Validering av mediet som var fylt i sprøytene ble utført dersom sprøytene bestod integritetstesten (se 2.1.4). Dette ble utført gjennom en positiv kontroll, ved at to av sprøytene ble inokulert med mindre enn 100 cfu *E. Coli* (20). For å tilsette mindre enn 100 cfu *E. Coli* ble det benyttet SingelShot BioBalls™ fra Biomérieux (Vedlegg 7.4 og 7.5). En BioBall inneholder et kjent antall mikroorganismer (omtrent 30 cfu) i en vannløselig kule (**Figur 11**) (79).

En BioBall ble løst opp ved å pipettere 100 µL sterilt vann (Fresenius Kabi) direkte på kulen i et lite rør. Det ble deretter ventet i omtrent 30 sekunder til kulen var oppløst (Vedlegg 7.4 og 7.5). Innholdet ble overført til toppen av sprøytene med en 5 µL pipettespiss (Finntip Flex Filter 5 µL). De to sprøytene ble inkubert i tre dager ved 35 °C. Integriteten til sprøytene var bekreftet om begge sprøytene viste tegn til vekst. Dersom vekst ikke ble observert måtte mediets evne til å understøtte vekst undersøkes, og testen måtte gjentas (20).



Figur 11: Bildet viser en BioBall før tilsetning av sterilt vann (eget bilde).

Der samme sprøytetype med ulikt fyllingsvolum av buljong ble tilvirket og videre testet på samme dag ble det inkludert én sprøyte med hvert fyllingsvolum til positiv kontroll. Dette ble gjort da sprøytene ble fylt med samme buljong under like betingelser. Der ulike sprøytetyper ble tilvirket på samme dag med lik buljong ble det inkludert to positive kontroller av de ulike sprøytetypene.

2.2 Fysisk integritetstesting

2.2.1 Oversikt over sprøytene som ble testet ved fysisk integritetstesting

Det var ønskelig å teste de samme sprøytene fra de ulike produsentene både ved fysisk og mikrobiologisk integritetstesting. Det var imidlertid ikke mulig å teste 1 ml sprøyter (se 2.2.2) eller ulike fyllvolum (20). **Tabell 2** viser sprøytene som ble testet ved fysisk integritetstesting. Noen sprøytetyper ble testet flere ganger, disse er representert ved to rader i tabellen.

Tabell 2: Oversikt over sprøytene som ble testet ved fysisk integritetstesting.

STØRRELSE	PRODUSENT/TYPE	SPRØYTE-TYPE	ANTALL TILVIRKET	BATCH-NUMMER
1 ml	Terumo	Luer	4 stk	190705S
2,5 ml	Terumo	Luer	20 stk	171123L
3 ml	Terumo	Luer Lock	20 stk	180715K
5 ml	Terumo	Luer Lock	20 stk	181207M
5 ml	Terumo	Luer Lock	20 stk	180422M
2 ml	B. Braun Omnifix	Luer Lock	20 stk	19K30C8
5 ml	B. Braun Omnifix	Luer Lock	20 stk	19M18C8
3 ml	BD Plastipak	Luer Lock	20 stk	9318576
3 ml	BD Plastipak	Luer Lock	20 stk	9318576
5 ml	BD Plastipak	Luer Lock	20 stk	9346325

Kun to av sprøytetyperne hadde luer overgang mellom sprøyten og lukkemekanismen (fra produsenten Terumo), mens resten hadde luer-lock overgang. Alle sprøytene som ble testet hadde propp som lukkemekanisme, bortsett fra Terumo 1 ml sprøytene som hadde kanyle.

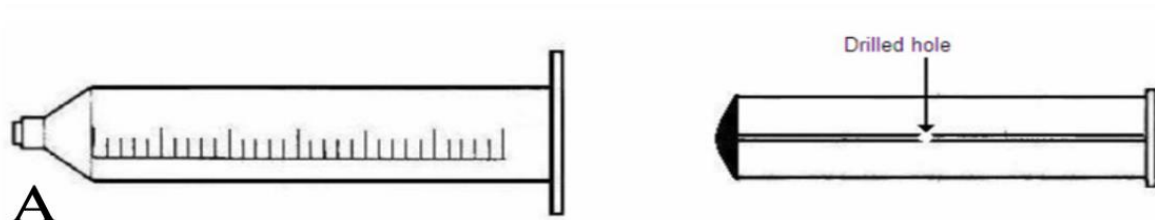
2.2.2 Tillaging av sprøytene før integritetstesten

20 sprøyter fra samme batch ble testet for hver sprøytetype (20). I forkant av testingen ble sprøytene klargjort ved å lage et hull med plass til en skrue i hver enkelt sprøyte. Dette ble gjort for å kunne lage et indre vakuum i sprøytene under testen. Tillaging av sprøytene ble utført på følgende måte (20):

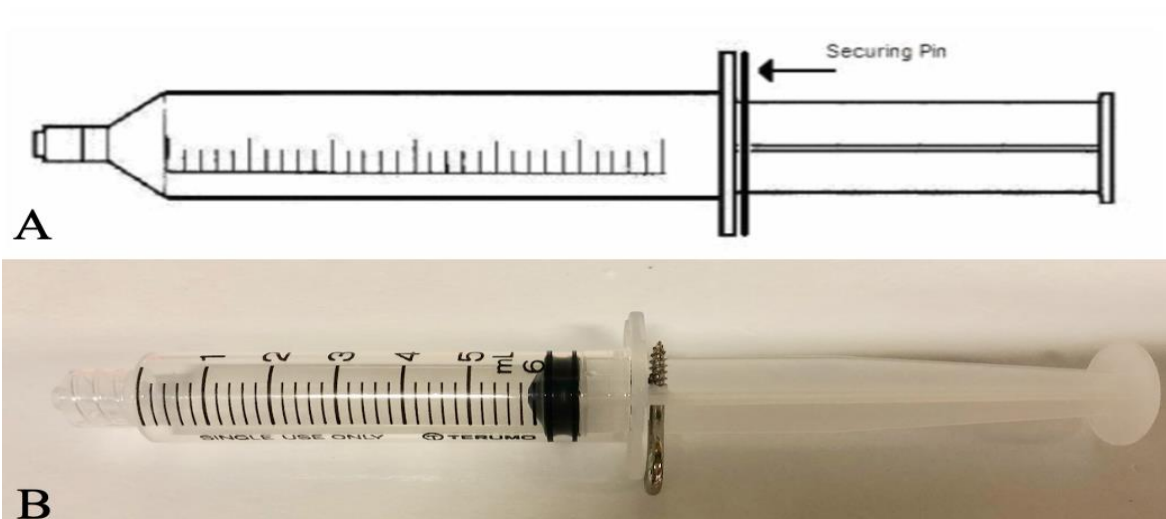
- Avstanden som tilsvarer at sprøyten er 100 % full ble markert på stempelet til sprøyten med en tusj (**Figur 12**) (20).
- Det ble deretter laget et hull i stempelet ved dette tusjmerket. Hullet ble laget med en syl (Clas Ohlson, Dalarna, Sverige) (**Figur 13**) (20).
- Det ble sikret at det var plass til en skrue (Clas Ohlson) i hullet som klarte å holde stempelet tilbake (**Figur 14**) (20).
- Hver sprøyte ble så fylt med vann til et volum som representerte 75 % full sprøyte (20).
- Deretter ble proppen festet på sprøyten, før stempelet ble dratt bakover til hullet slik at skruen kunne plasseres (**Figur 15**) (20).



Figur 12: Figur som viser markering av 100 % volum med tusj. (A) Figur fra protokoll (20). (B) Eget bilde.



Figur 13: Figur som viser tillaging av hull i stempelet til sprøyten. (A) Figur fra protokoll (20). (B) Eget bilde.

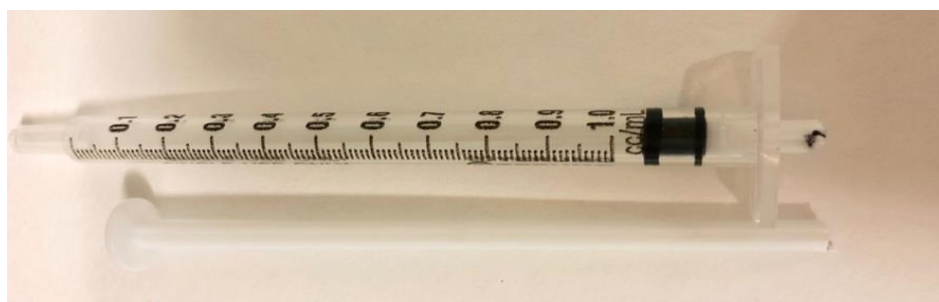


Figur 14: Figur som viser plassering av en skrue som holder stempelet tilbake i rett posisjon. (A) Figur fra protokoll (20). (B) Eget bilde.



Figur 15: Eksempel på sprøyte som er fylt med vann og klargjort til integritetstesting (eget bilde).

Tillagingen av et hull med plass til en skrue som holder stempelet på plass og laget et vakuum i sprøyten viste seg å være vanskelig å gjennomføre på 1 ml sprøytene. Det ble forsøkt ulike metoder for å lage et hull, blant annet tynnere syl og skrue. Selv om den tynneste sylen ble benyttet resulterte det fortsatt i at stempelet knakk da sylen ble forsøkt presset gjennom (**Figur 16**). På bakgrunn av dette ble det besluttet at det ble vanskelig å gjennomføre fysisk integritetstesting på 1 ml sprøytene.

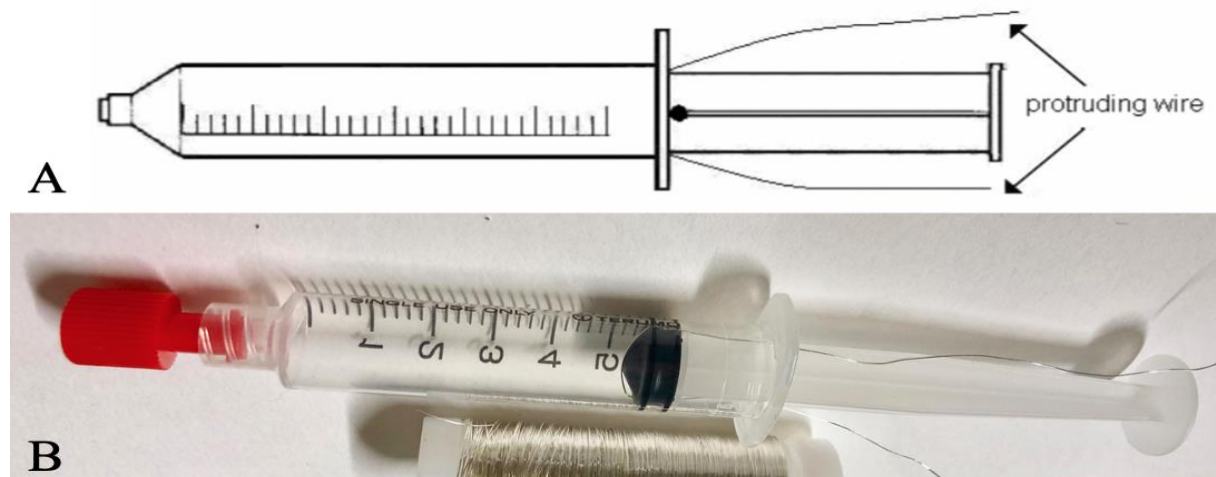


Figur 16: Bildet viser forsøket med å lage hull i 1 ml sprøyte fra Terumo (eget bilde).

2.2.3 Tillaging av positiv kontroll

En sprøyte med samme batchnummer som de andre sprøytene fungerte som positiv kontroll under testen (20). For å klargjøre positiv kontroll ble stempelet tatt ut av sprøyten før en tynn tråd av rustfritt stål ble plassert mellom sprøyten og stempelet (**Figur 17**). Protokollen beskriver at det skal benyttes en tråd som er 0,12 mm tykk (20). Det ble imidlertid benyttet en tråd med 0,18 mm tykkelse fordi dette var den tynneste tråden som kunne skaffes. Denne tråden lager en liten åpning i veggen mellom stempelet og sylindere til sprøyten som tillater gjennomtrenging av farge.

Protokollen beskriver ikke om positiv kontroll skal ha vakuum under testene, slik som de andre sprøytene har (20). Dette ble undersøkt under den første integritetstesten (Terumo 3 ml). Det ble følgelig laget en positiv kontroll med og uten vakuum. Etter testen hadde positiv kontroll uten vakuum ingen gjennomtrenging av farge, mens positiv kontroll med vakuum hadde gjennomtrenging. Det ble derfor besluttet å ha vakuum i positiv kontroll i de resterende integritetstestene.



Figur 17: Figur som viser tillaging av positiv kontroll. (A) Figur fra protokoll (20). (B) Eget bilde.

2.2.4 Fysisk integritetstesting med metylenblått

En vandig løsning med 1 % w/v metylenblått (Alfa Aesar, Haverhill, USA) ble fortynnet med rensert vann til 0,4 % w/v i henhold til «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» (Vedlegg 7.6) (20). En sylindrisk vanntett beholder (Flaskebeholder Safepak, VWR) ble fylt omtrent halvfull med 0,4 % metylenblått. Beholderen som ble benyttet hadde et volum på omtrent 1200 ml. De klargjorte sprøytene ble tilsatt beholderen i en stående posisjon. Sprøyten som fungerte som positiv kontroll ble plassert i midten av de andre sprøytene. Lokket ble skrudd ordentlig

på plass før beholderen ble rotert 90 grader. Det ble sikret at alle sprøytene forble nedsenket i metylenblått og at lokket satt på plass (20).

Beholderen ble plassert på en roteringsmaskin (SRT 9D, Stuart, Staffordshire, UK), der den ble rotert 45 ganger per minutt i to timer (**Figur 18**). Etter dette ble sprøytene fjernet fra beholderen med pinsett, én sprøyte av gangen (20). Sprøytene som ble tatt ut av beholderen ble plassert i et lite kar (**Figur 19**). Deretter ble alle skruene fjernet fra sprøytene, før de ble vasket grundig ved å skylle gjentatte ganger med vann. Dette arbeidet ble gjort over en vask.

Hver sprøyte ble så inspisert for å vurdere om det hadde forekommet gjennomtrenging av farge til innholdet i sprøytene (20). Integriteten til sprøytene var bekreftet dersom det ikke var tegn til gjennomtrenging av farge i noen av sprøytene, i tillegg til at innholdet i positiv kontroll var farget med metylenblått (20).



Figur 18: Bildet viser flasken med sprøytene og metylenblått på roteringsmaskinen under en integritetstest (eget bilde).



Figur 19: Bildet viser fjerning av sprøytene fra beholderen etter en integritetstest (eget bilde).

2.2.5 Visuell deteksjon av fargegjennomtrenging

«Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver at sprøytene skal eksamineres visuelt etter testen for tilstedeværelse av fargestoff (20). Dette skal gjøres ved å sammenligne innholdet i de testede sprøytene med en kontrollsprøyte som referanse (20). Sprøytene som ble testet var fylt med vann, og derfor ble innholdet i sprøytene sammenlignet med like sprøyter som var fylt med vann etter testen. Sprøytene ble også sammenlignet med sprøyter med kjent lav konsentrasjon av metylenblått (omtrent 0,25 mg/L). Da sprøytene ble sammenlignet med kontrollsprøytene ble de holdt opp mot lyset og mot en hvit bakgrunn. Dersom det ikke var mulig å se forskjell på innholdet i den testede sprøyten og vann, og det var mulig å se forskjell på innholdet i den testede sprøyten og sprøyten med lav konsentrasjon metylenblått, ble det vurdert at det ikke hadde forekommet fargegjennomtrenging.

2.2.6 UV-spektroskopi

Protokollen oppgir også at en validert spektrofotometrisk metode kan benyttes til å kvantifisere innholdet i sprøytene etter integritetstesten (20). UV-spektroskopi er en offisiell analysemetode i Ph. Eur, og benyttes både til kvantitative bestemmelser og identifikasjon i forbindelse med

farmasøytiske preparater og råvarer (80). Prinsippet for UV-spektroskopi er at monokromatisk elektromagnetisk stråling (stråling med kun én bølgelengde) sendes gjennom en løsning av prøven, før absorbansen til prøven måles ved en gitt bølgelengde. Basert på Beers lov kan så den målte absorbansen omregnes til konsentrasjon (80). For å vurdere om UV-spektroskopi var en egnet metode for å se om det hadde forekommet gjennomtrenging av farge inn i sprøytene under integritetstesting ble det laget en kalibreringskurve med ulike konsentrasjoner av metylenblått.

2.2.7 Kalibreringskurve med metylenblått

Ved kalibrering måles absorbansen til standardløsninger med kjente konsentrasjoner av analytten (80). En kalibreringskurve viser således responsen til en analytisk metode når kjente konsentrasjoner av analytten analyseres (81). For å vurdere rekkevidde og lineært område for metoden ble det laget en kalibreringskurve med fortyninger av metylenblått med følgende konsentrasjoner: 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L og 0.3125 mg/L.

I alle analysene ble løsningene ble tilsatt en kyvette (10 mm High Precision Cell, Hellma Analytics, Müllheim, Tyskland), før absorbansen ble målt med et UV-spektrofotometer (UV Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Det ble målt tre paralleller av hver prøve. Gjennomsnittet av de målte absorbansene ved bølgelengde 663 nm ble plottet mot de ulike konsentrasjonene i Excel for å lage en kalibreringskurve. Denne bølgelengden ble valgt fordi spektrumet viste at det er ved denne bølgelengden metylenblått har maksimal absorbans.

2.2.8 Kvantifisering av innholdet i sprøytene ved UV-spektroskopi

Innholdet i sprøytene fra den første testrunden (Terumo 3 ml sprøyter) ble kvantifisert med UV-spektroskopi. Innholdet i alle sprøytene ble overført til en kyvette (Hellma Analytics) før absorbansen til tre paralleller av hver prøve ble målt med et UV-spektrofotometer ved bølgelengde 663 nm (Shimadzu).

2.2.9 Deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret

Deteksjonsgrensen angir den laveste konsentrasjonen av et stoff som med sikkerhet kan detekteres i prøven med den aktuelle analysemetoden (80, 82). For å finne deteksjonsgrensen må det utføres en grensetest som viser at en analytt kan påvises dersom konsentrasjonen i

aktuell prøve er større eller lik deteksjonsgrensen (80). Ulike metoder kan benyttes for å finne deteksjonsgrensen (82-84).

For å estimere deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret ble det benyttet en metode som baserer seg på bestemmelse av signalet til blanke prøver (vann) (83, 84). Metoden kan uttrykkes ved formelen: $LOD = X_{bl} + 3S_{bl}$. Der LOD er deteksjonsgrensen, X_{bl} er gjennomsnittskonsentrasjonen til blankmålingene, og S_{bl} er standardavviket til blankmålingene (84). Basert på dette ble tre paralleller av seks blanke prøver målt ved 663 nm. Gjennomsnittet og standardavviket til målingene ble deretter beregnet før korresponderende konsentrasjon ble funnet ved hjelp av formelen for kalibreringskurven til metylenblått.

2.2.10 Deteksjonsgrensen ved visuell deteksjon

Videre ble det gjort undersøkelser for å finne deteksjonsgrensen til metylenblått ved visuell deteksjon. Det ble da laget en fortynningsrekke med konsentrasjonene 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L og 0,13 mg/L. Disse løsningene ble fylt i sprøyter, og sammenlignet både med sprøyter som hadde gjennomgått integritetstesting og sprøyter som var fylt med vann.

3. Resultater

3.1 Mikrobiologisk integritetstest

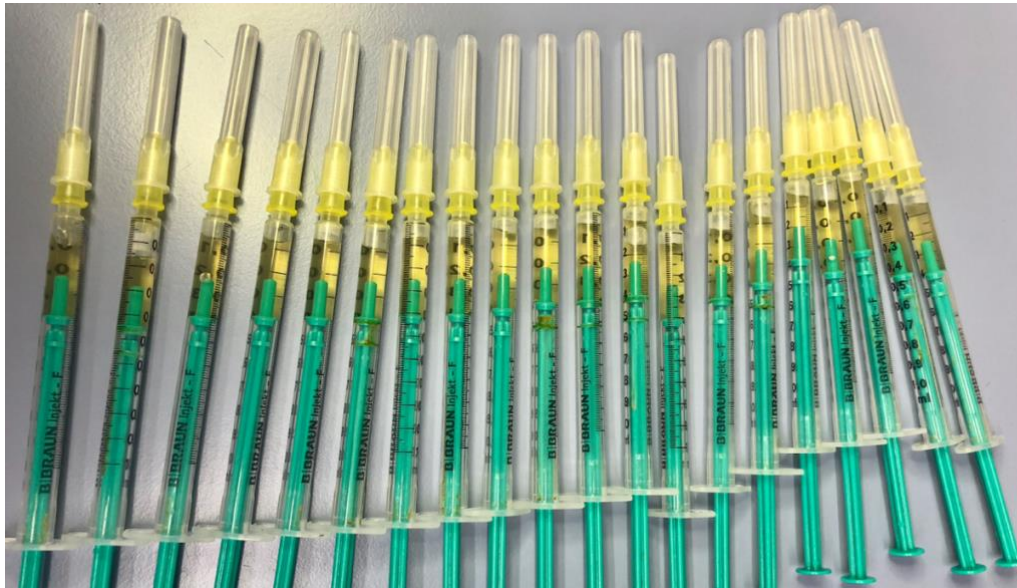
3.1.1 Resultater 1 ml sprøyter

Tabell 3: Resultatene fra 1 ml sprøytene som ble testet ved mikrobiologisk integritetstesting.

SPRØYTE- TYPE TESTET	ANTALL TESTET	LUKKE- MEKANISME	FYLT VOLUM I SPRØYTE	ANTALL MED VEKST	ANTALL UTEN VEKST	% MED VEKST
1 ml Terumo Luer	20	Kanyle	40 %	1	19	5 %*
1 ml Terumo Luer	20	Kanyle	40 %	3	17	15 %*
1 ml Terumo Luer	40	Kanyle	40 %	4	36	10 %*
1 ml Terumo Luer	20	Propp	40 %	0	20	0 %
1 ml Terumo Luer	20	Propp	85 %	2	18	10 %*
1 ml B. Braun Injekt-F Luer	20	Propp	40 %	0	20	0 %
1 ml B. Braun Injekt-F Luer	20	Kanyle	40 %	0	20	0 %**
1 ml B. Braun Injekt-F Luer	20	Propp	85 %	0	20	0 %
1 ml B. Braun Injekt-F Luer	20	Kanyle	40 %	0	20	0 %
1 ml B. Braun Omnifix Luer	20	Propp	40 %	0	20	0 %
1 ml B. Braun Omnifix Luer	20	Propp	85 %	0	20	0 %
1 ml BD Luer- Lock	20	Propp	40 %	0	20	0 %**
1 ml BD Luer-Lock	20	Propp	85 %	0	20	0 %**
1 ml BD Plastipak Luer	20	Propp	40 %	0	20	0 %**
1 ml BD Plastipak Luer	20	Propp	85 %	0	20	0 %**

* Fjerning av væske etter integritetstesting kan ha ført til kontaminerte sprøyter.

** Sprøytene ble inspisert for mikrobiell vekst etter 10 eller 11 dager inkubering grunnet stenging av UiB (se 3.1.6).



Figur 20: Eksempel på sprøyter etter integritetstesting. Bildet viser 20 B. Braun Injekt-F 1 ml sprøyter med kanyle fra BD Microlance. Ingen av sprøytene viste tegn til vekst av *E. Coli* (eget bilde).

Resultatene som er vist i **Tabell 3** kan beskrives på følgende måte:

- 1 ml sprøytene fra Terumo med kanyle fra BD Microlance bestod ikke testen. Disse sprøytene hadde henholdsvis 5, 15 og 10 % vekst i tre ulike testrunder. Fjerning av væske etter integritetstesting kan ha ført til kontaminerte sprøyter (se 4.1.2.1).
- 1 ml sprøytene fra Terumo med propp bestod testen med 40 % volum, men ikke med 85 % volum. Fjerning av væske etter integritetstesting kan ha ført til kontaminerte sprøyter (se 4.1.2.1).
- 1 ml B. Braun Injekt-F bestod testen både med 40 % og 85 % volum med propp, kanyle fra BD Microlance og kanyle fra TSK (**Figur 20**).
- 1 ml B. Braun Omnifix bestod testen både med 40 % og 85 % volum og propp.
- 1 ml BD Luer-Lock bestod testen både med 40 % og 85 % volum og propp.
- 1 ml BD Plastipak bestod testen både med 40 % og 85 % volum og propp.

1 ml sprøytene fra Terumo som ble testet i første og andre testrunde inneholdt buljong som gikk ut på dato i løpet av testperioden. Det ble likevel besluttet å ta med disse resultatene da buljongen viste seg å støtte vekst av *E. Coli* fordi noen av sprøytene var kontaminert etter integritetstesting (de to øverste radene i **Tabell 3**).

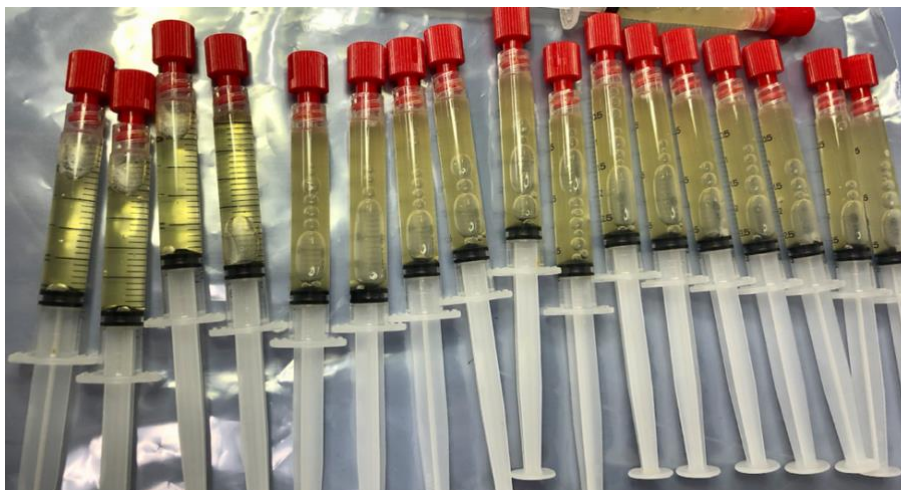
3.1.2 Resultater 2, 3 og 5 ml sprøyter

Tabell 4: Resultatene fra 2, 3 og 5 ml sprøytene som ble testet ved mikrobiologisk integritetstesting.

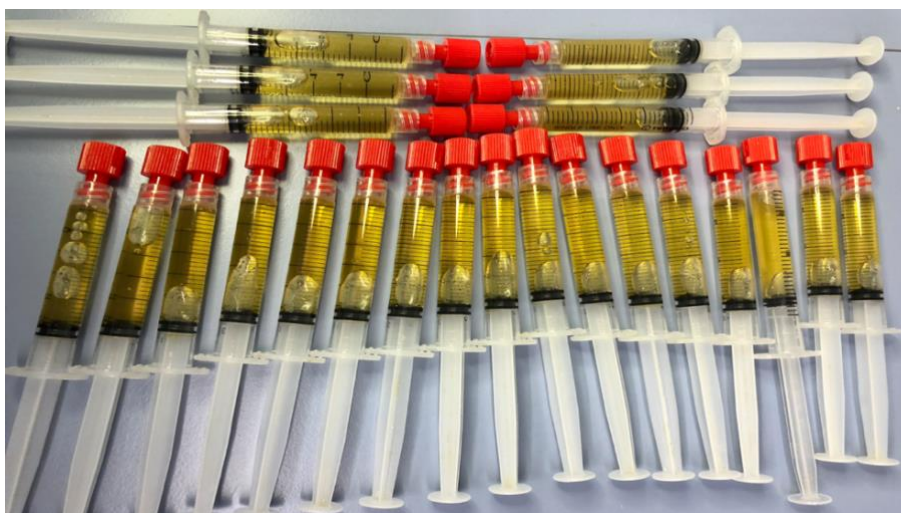
SPRØYTE- TYPE TESTET	ANTALL TESTET	LUKKE- MEKANISME	FYLT VOLUM I SPRØYTE	ANTALL MED VEKST	ANTALL UTEN VEKST	% MED VEKST
3 ml Terumo	20	Propp	50 %	13	7	65 %*
3 ml Terumo	20	Propp	85 %	16	4	80 %*
3 ml Terumo	20	Propp	85 %	0	20	0 %
3 ml Terumo	20	Propp	85 %	0	20	0 %**
5 ml Terumo	20	Propp	50 %	5	15	25 %*
5 ml Terumo	20	Propp	85 %	13	7	65 %*
5 ml Terumo	20	Propp	85 %	0	20	0 %
5 ml Terumo	20	Propp	85 %	0	20	0 %**
2 ml B. Braun Omnifix	20	Propp	50 %	0	20	0 %
2 ml B. Braun Omnifix	20	Propp	85 %	0	20	0 %
5 ml B. Braun Omnifix	20	Propp	50 %	0	20	0 %
5 ml B. Braun Omnifix	20	Propp	85 %	0	20	0 %
3 ml BD Plastipak	20	Propp	50 %	0	20	0 %**
3 ml BD Plastipak	20	Propp	85 %	0	20	0 %**
5 ml BD Plastipak	20	Propp	50 %	0	20	0 %**
5 ml BD Plastipak	20	Propp	85 %	0	20	0 %**

* Bevegelse på stempelet under integritetstesting førte til høyt antall kontaminerte sprøyter.

** Sprøytene ble inspisert for mikrobiell vekst etter 9, 10 eller 11 dager inkubering grunnet stenging av UiB (se 3.1.6).



Figur 21: Eksempel på sprøyter etter integritetstesting. Bildet viser 17 Terumo 3 ml sprøyter med propp. 13 av 17 sprøyter på bildet har vekst av *E. Coli* (eget bilde).



Figur 22: Eksempel på sprøyter etter integritetstesting. Bildet viser 20 Terumo 3 ml sprøyter med propp. Ingen av sprøytene viste tegn til vekst av *E. Coli* (eget bilde).

Resultatene som er vist i **Tabell 4** kan videre beskrives på følgende måte:

- I første testrunde med 3 ml og 5 ml sprøytene fra Terumo var det høy prosentandel sprøyter med vekst (**Figur 21**). Etter endring av metode viste de neste testrundene med 3 og 5 ml sprøytene fra Terumo med 85 % volum ingen tegn til vekst (se 2.1.4 og 4.1.2.1).
- 3 og 5 ml sprøytene som var fylt med 3x fortynnet TSB bestod også integritetstestene (se **Tabell 1** og avsnitt 2.1.2).
- Sprøytene fra alle produsentene bestod integritetstestingen uavhengig av fyllingsgrad (**Figur 22**).

3.1.3 Observasjoner under testingen

Under integritetstestingen av 2, 3 og 5 ml sprøytene ble det observert forskjeller på sprøytene fra Terumo og sprøytene fra BD Plastipak og B. Braun Omnifix. Denne forskjellen omhandlet at sprøytene fra BD Plastipak og B. Braun Omnifix hadde en ekstra «ring» på toppen av stempelet (**Figur 23**).



Figur 23: Bildet illustrerer forskjellen på sprøytene fra BD Plastipak (til venstre), B. Braun Omnifix (i midten) og Terumo (til høyre) (eget bilde).

Under de mikrobiologiske integritetstestene førte dette til at det samlet seg bakteriesuspensjon mellom de to «ringene» på toppen av stempelet i noen av sprøytene (**Figur 24**).



Figur 24: Bildet viser eksempel på sprøyter fra B. Braun Omnifix der det har samlet seg bakteriesuspensjon i toppen av stempelet etter en integritetstest (eget bilde).

3.1.4 Total Viable Count

Total Viable Count ble utført under hver integritetstest for å bekrefte utfordringsmediet. I alle testene som ble utført hadde agarskålen med fortynningsfaktor 10^{-6} et antall bakteriekolonier som kunne telles. Resultatene av disse forsøkene følger i **Tabell 5**.

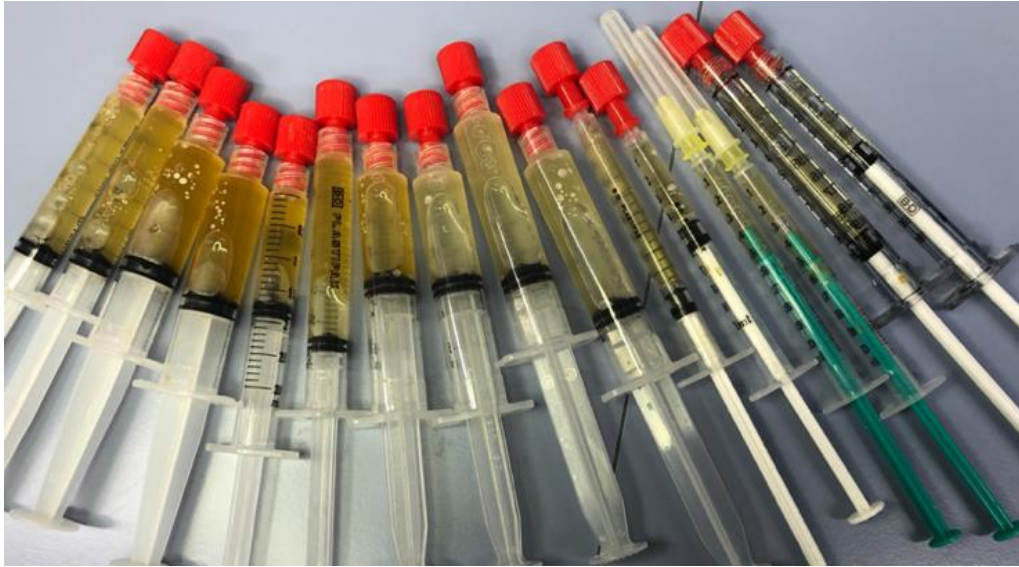
Tabell 5: Resultat fra Total Viable Count av utfordringsmediet under integritetstesting.

SPRØYTER TESTET	RESULTAT [cfu/ml]
1 ml Terumo luer med kanyle (20 stk)	$5,7 \times 10^8$
1 ml Terumo luer med kanyle (20 stk)	$1,9 \times 10^8$
1 ml Terumo luer med kanyle (40 stk)	$6,3 \times 10^8$
1 ml Terumo luer med propp (40 stk)	$6,4 \times 10^8$
3 ml Terumo luer-lock med propp (40 stk)	$3,1 \times 10^8$
5 ml Terumo luer-lock med propp (40 stk)	$3,5 \times 10^8$
1 ml B. Braun Injekt-F luer med kanyle/propp (40 stk)	$3,6 \times 10^8$
1 ml B. Braun Injekt-F luer med propp (20 stk)	$9,0 \times 10^8$
3 ml Terumo (20 stk)	
5 ml Terumo (20 stk)	
1 ml B. Braun Omnifix (40 stk)	$8,5 \times 10^8$
2 ml B. Braun Omnifix (40 stk)	
5 ml B. Braun Omnifix (40 stk)	$2,1 \times 10^8$
1 ml B. Braun Injekt-F luer med kanyle (20 stk)	$4,6 \times 10^8$
1 ml BD Luer-Lock (40 stk)	
5 ml BD Plastipak (20 stk)	
1 ml BD Plastipak (40 stk)	$7,5 \times 10^8$
5 ml BD Plastipak (20 stk)	
3 ml BD Plastipak (40 stk)	$9,8 \times 10^8$
3 ml Terumo (20 stk)	
5 ml Terumo (20 stk)	

Hver rad i **Tabell 5** viser sprøytene som ble testet under samme integritetstest. Det vil si at sprøytene som står i samme rad ble testet samtidig og ble utsatt for det samme bakterieantallet gjennom testingen. Der antallet er 40 stk ble to volum av samme sprøytetype testet på likt.

3.1.5 Positiv kontroll

Positiv kontroll ble utført for alle sprøytetyperne som ikke inneholdt tegn til vekst av mikroorganismer etter integritetstestene. Samtlige av sprøytene som fungerte som positiv kontroll hadde tegn til vekst av *E. Coli* etter tre dager inkubering (**Figur 25 og 26**). Dette bekrefter at mediet som ble brukt til å fylle sprøytene tillater vekst av mikroorganismer.



Figur 25: Bilde av ulike sprøyter som fungerte som positiv kontroll. Samtlige sprøyter hadde vekst av *E. Coli* etter tre dager inkubering (eget bilde).



Figur 26: Bildet sammenligner positiv kontroll med sprøyter som ikke har vekst av *E. Coli* (BD Plastipak 3 ml) (eget bilde).

3.1.6 Andre resultater

De siste sprøytene som lå til inkubering måtte inspiseres for mikrobiell vekst etter 9, 10 og 11 dager i stedet for 14 dager som angitt i protokollen (20). Dette ble nødvendig grunnet stenging av UiB som følge av utbrudd av COVID-19.

Dette gjaldt følgende sprøyter (markert i **Tabell 3 og 4**):

- **Inspisert etter 11 dager inkubering:** 1 ml B. Braun Injekt-F med kanyle, 1 ml BD luer-lock 40 % og 85 % volum med propp, 5 ml BD Plastipak 50 % volum med propp.
- **Inspisert etter 10 dager inkubering:** 1 ml BD Plastipak 40 % og 85 % volum med propp, 5 ml BD Plastipak 85 % volum med propp.
- **Inspisert etter 9 dager inkubering:** 3 ml BD Plastipak 50 % og 85 % volum med propp, 3 ml Terumo 85 % med propp og 5 ml Terumo 85 % med propp.

3.2 Fysisk integritetstest

3.2.1 Resultater fysisk integritetstest

Tabell 6: Resultater etter fysisk integritetstesting.

STØRRELSE	PRODUSENT/TYPE	ANTALL SPRØYTER TESTET	ANTALL SYNLIG FARGET	POSITIV KONTROLL FARGET?
3 ml	Terumo	20	0	Ja
5 ml	Terumo	20	0	Nei*
5 ml	Terumo	20	0	Ja
2 ml	B. Braun Omnifix	20	0	Ja
5 ml	B. Braun Omnifix	20	0	Ja
3 ml	BD Plastipak	20	0	Nei*
3 ml	BD Plastipak	20	0	Ja
5 ml	BD Plastipak	20	0	Ja
2.5 ml	Terumo Luer	20	0	Ja
1 ml	Terumo Luer med kanyle	4	0	Ingen positiv kontroll**

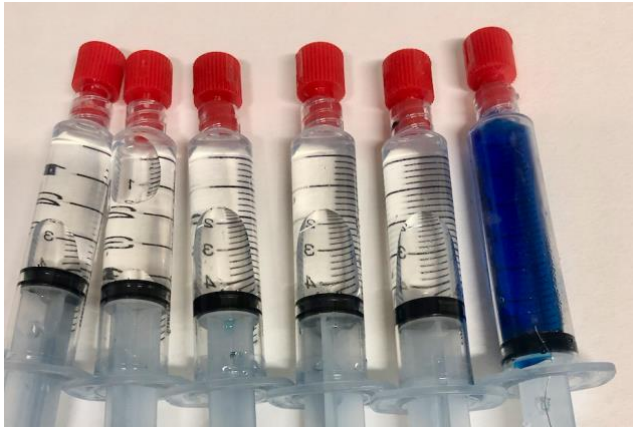
* Integritetstesten ble gjentatt fordi positiv kontroll ikke var farget av metylenblått.

** Forsøket ble ikke utført i henhold til protokollen, og vurderes derfor ikke som gyldig.

Hver rad i **Tabell 6** viser én gjennomført integritetstest. Unntaket er sprøytene på siste rad i tabellen, Terumo 1 ml med kanyle, da disse fire sprøytene ble testet samtidig som 2,5 ml sprøytene fra Terumo. Resultatet fra forsøket med 1 ml sprøytene fra Terumo kan imidlertid ikke vurderes som gyldig fordi forsøket ikke ble utført i henhold til protokollen (se 4.1.3.1). Ingen av de øvrige sprøytene som ble testet viste tegn til gjennomtrenging av farge, og alle sprøytetyperne bestod derfor integritetstesting. Terumo 2,5 ml sprøytene som hadde luer overgang mellom sprøyten og lukkemekanismen bestod også integritetstesten.

3.2.2 Positiv kontroll

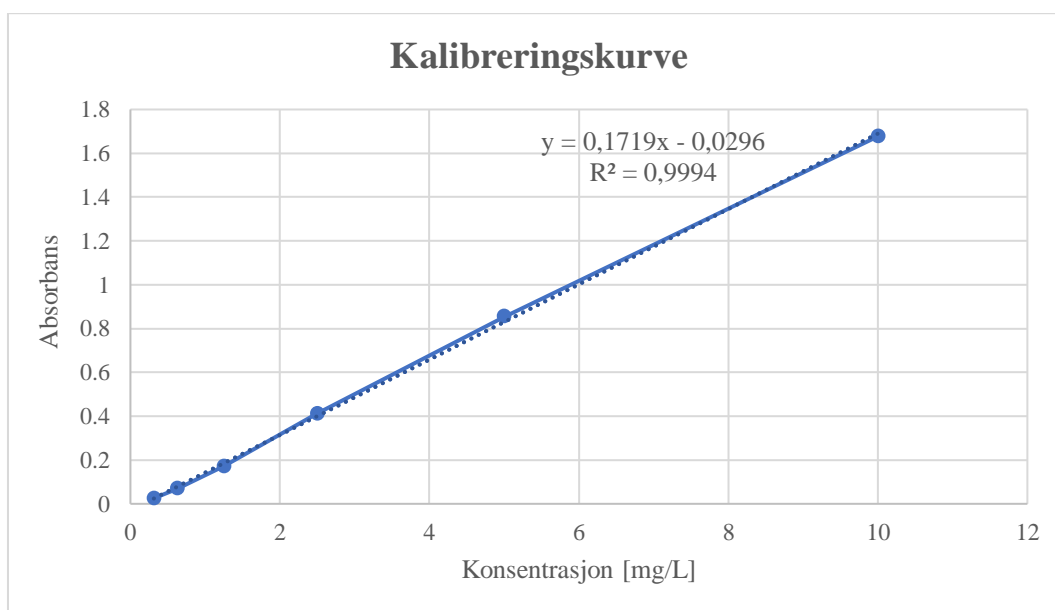
To av testene måtte gjentas fordi positiv kontroll ikke ble farget under første testrunde (Tabell 6). I begge disse tilfellene (Terumo 5 ml og BD Plastipak 3 ml) ble positiv kontroll farget av metylenblått under andre testrunde (Figur 27). Alle sprøytetypene hadde derfor en testrunde der positiv kontroll ble farget blå.



Figur 27: Bildet viser fem testsprøyter og positiv kontroll i andre testrunde med 5 ml sprøytene fra Terumo (eget bilde).

3.2.3 Kalibreringskurve med metylenblått

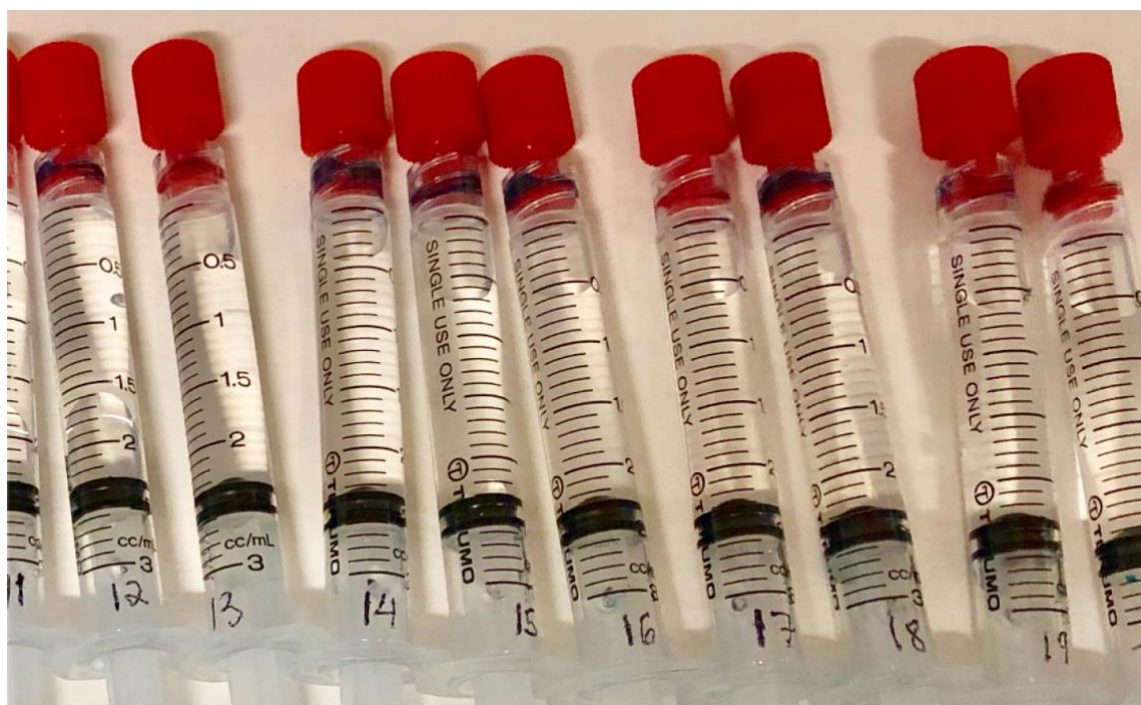
Kalibreringskurven som ble laget viste en graf med tilhørende formel $y = 0,1719x - 0,0296$ (Figur 28). Tabell 7 (Vedlegg 7.7.1) viser målt absorbans ved de ulike konsentrasjonene av metylenblått.



Figur 28: Kalibreringskurve laget i Excel for de ulike konsentrasjonene av metylenblått.

3.2.4 Kvantifisering av innholdet i sprøytene ved UV-spektroskopi

Innholdet i sprøytene fra den første integritetstesten ble forsøkt kvantifisert ved UV-spektroskopi (se 2.2.8). Da innholdet skulle analyseres oppstod det imidlertid en utfordring som omhandlet at noen sprøyter hadde rester av metylenblått i korken (**Figur 29**). Da innholdet i disse sprøytene skulle overføres til kyvetten var det uunngåelig at løsningen i kyvetten ble farget av metylenblått. Dette førte til at innholdet som i utgangspunktet så ut til å være ufarget, ble farget av metylenblått. Det ga videre usikkerhet vedrørende hvordan resultatene skulle tolkes, og mulig falske positive målinger for noen av prøvene som ble analysert. Resultatene fra dette forsøket vurderes derfor til å ha liten verdi.



Figur 29: Bildet viser tilfeller der farge har trengt ned i korken til sprøytene, men ikke ned i selve innholdet i sprøyten (eget bilde).

3.2.5 Deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret

Deteksjonsgrensen ble funnet ved hjelp av metoden som er beskrevet i delkapittel 2.2.9 (83, 84). Resultatene fra målingene av de seks blanke prøvene, og tilhørende gjennomsnitt og standardavvik er presentert i **Tabell 8** og **Tabell 9** (Vedlegg 7.7.2). Deteksjonsgrensen ble beregnet til å være 0,217 mg metylenblått/L.

3.2.6 Deteksjonsgrensen ved visuell deteksjon

For å estimere deteksjonsgrensen ved visuell deteksjon ble det laget en fortynningsrekke med ulike konsentrasjoner av metylenblått som ble fylt i sprøyter (se 2.2.10). Sprøyten lengst til venstre i **Figur 30** inneholder 1 mg/L metylenblått. I både denne sprøyten og sprøyten som inneholdt 0,5 mg/L metylenblått var det enkelt å observere den blå fargen. For sprøyten som inneholdt 0,25 mg/L kunne det observeres en svak blå farge som ble mest tydelig da sprøyten var plassert med graderingen ned mot en hvit bakgrunn (**Figur 30 og 31**). For sprøyten som inneholdt 0,13 mg/L metylenblått var det vanskeligere å være helt sikker på observasjonen av blå farge (**Figur 30 og 31**). Basert på dette ble deteksjonsgrensen for visuell deteksjon estimert til å være omtrent 0,25 mg metylenblått/L.



Figur 30: Konsentrasjonen til løsningen i sprøytene fra venstre til høyre er 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L og 0,13 mg/L. Sprøyten lengst til høyre er en tilfeldig sprøyte som har gjennomgått integritetstesting (eget bilde).



Figur 31: Bildet viser sammenligning av fargen i en sprøyte etter integritetstesting (sprøyten i midten) med en sprøyte med konsentrasjon av metylenblått på 0,25 mg/L (sprøyten til venstre) og en sprøyte med konsentrasjon av metylenblått på 0,13 mg/L (sprøyten til høyre) (eget bilde).

4. Diskusjon

4.1 Diskusjon: Metode

4.1.1 Valg av metode

Hensikten med oppgaven var å etablere metodene som er beskrevet i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes». Videre var målet å teste integriteten til sprøyter som benyttes, eller som potensielt vil kunne benyttes, som emballasje for legemidler på Sykehusapoteket i Bergen.

«Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver validerte og standardiserte integritetstester for å vurdere integriteten til ulike sprøyter og lukkemekanismer (20). Integritetstestene som beskrives er relativt enkle å gjennomføre, i tillegg til at de krever både lite og rimelig utstyr (20). Det finnes imidlertid mange måter å utføre integritetstesting på (68-71). Som beskrevet i innledningen finnes det dog ingen metode som kan regnes som en «gullstandard» (70). Hvilken test som benyttes må derfor vurderes i hvert enkelt tilfelle, og må ta i betraktning den tiltenkte bruken (for eksempel kvalifisering eller kvalitetskontroll) og produktets design (for eksempel flytende eller tørt produkt) (70).

«Quality Assurance of Aseptic Preparation Services: Standards» beskriver at det ideelt må utføres tester som samsvarer med «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» for å bekrefte den mikrobiologiske holdbarheten til et produkt som lagres i sprøyter (24). Det finnes som nevnt ikke tilsvarende retningslinjer for ulisensiert produksjon på apotek i Norge, og det finnes således ingen nasjonale anbefalinger vedrørende integritetstesting på apotek. Både fysisk integritetstesting som baserer seg på gjennomtrenging av farge og mikrobiologisk integritetstesting er imidlertid metoder som er mye brukt i flere tiår, og som er godt kjent hos industrien og myndigheter (69, 70). Av disse grunnene kan det argumenteres for at testene som beskrives i protokollen er egnet til formålet i denne studien.

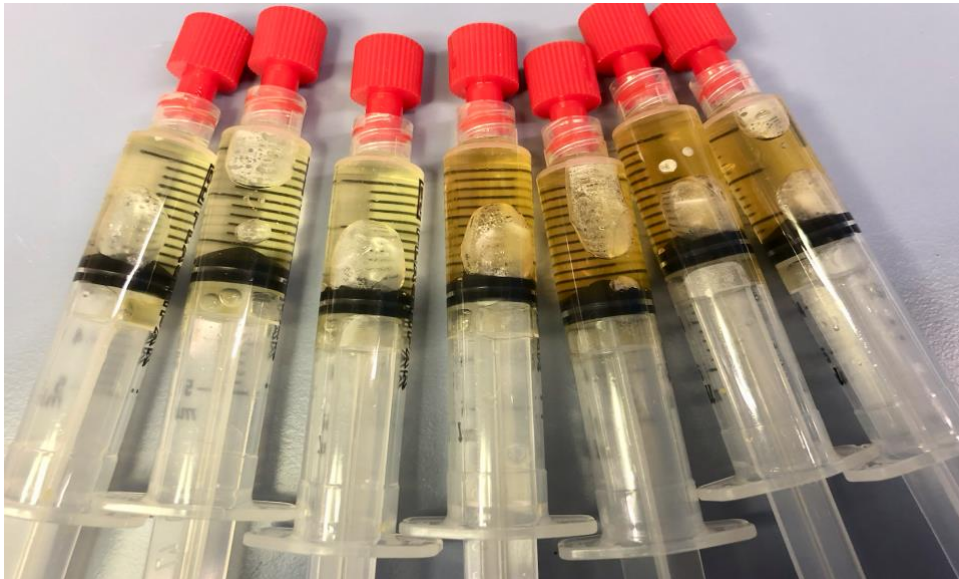
4.1.2 Mikrobiologisk integritetstesting

4.1.2.1 Etablering og utvikling av metoden

I første testrunde med 3 og 5 ml sprøytene fra Terumo var det en høy prosentandel sprøyter med vekst (**Tabell 4**). Disse resultatene samsvarte ikke med resultatene fra den fysiske integritetstesting (**Tabell 6**). Metodene måtte derfor evalueres for å avdekke om svakheter ved metodene kunne være årsaken til dette.

Under den første mikrobiologiske integritetstesten av disse to sprøytetyperne ble stempelet beveget forsiktig for å fjerne bakteriesuspensjon som samlet seg mellom stempelet og sprøyteveggen. «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver ikke tydelig hvordan denne prosessen skal gjennomføres (20). Det ble derfor raskt mistenkt at det var denne bevegelsen av stempelet som hadde ført til vekst i mange av de testede sprøytene. Det ble også mistenkt at forsøk på å fjerne bakteriesuspensjon mellom stempel og sprøytevegg under testene med 1 ml sprøytene fra Terumo kan ha ført til kontaminering i noen av disse sprøytene, fordi dette var de første integritetstestene som ble gjennomført (**Tabell 3**).

I de etterfølgende testrundene ble sprøytene derfor håndtert med stor forsiktighet. Det ble også besluttet at dersom det var bakteriesuspensjon som var vanskelig å fjerne, så skulle dette bli værende under inkuberingsperioden fremfor å bevege på stempelet. I noen tilfeller tørket dette inn under inkuberingen, mens i andre tilfeller var det fortsatt flytende bakteriesuspensjon i sprøytene da inkuberingsperioden var over (**Figur 32**). Selv om bakteriesuspensjonen var veldig nær innholdet i sprøytene under hele inkuberingsperioden førte det fortsatt ikke til vekst av *E. Coli* i noen av sprøytene der dette var tilfellet. Etter at disse tiltakene ble innført viste de neste rundene med tester at det ikke hadde forekommet vekst i noen av sprøytetyperne (**Tabell 3 og 4**).



Figur 32: Bildet viser sprøyter fra BD Plastipak der det fortsatt er flytende bakteriesuspensjon i toppen av stempelet etter inkuberingsperioden (eget bilde).

«Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver ikke i detalj hvordan renkulturen av *E. Coli* skal inkuberes (20). Det blir kun beskrevet at renkulturen skal inokuleres i 100 ml TSB og deretter inkuberes i 18-24 timer ved 30-35 °C (20). På bakgrunn av flere andre protokoller ble det besluttet å inkubere bakteriesuspensjonen på ristende inkubator (85, 86).

Det ble brukt stoppeklokke med nedtelling fra 30 minutter etter at bakteriesuspensjonen var tilsatt buljongen i formen. Det tok imidlertid litt tid å fjerne sprøytene fra formen etter testingen. Dette medførte at noen sprøyter ble eksponert for utfordringsmediet litt lengre enn sprøytene som ble fjernet fra formen først. Det ble likevel besluttet at dette var den enkleste måten å utføre testingen på for å sikre at alle sprøytene ble eksponert for bakteriesuspensjonen i minst 30 minutter. Resultatene fra de mikrobiologiske integritetstestene tyder ikke på at denne praksisen har hatt noen innvirkning på utfallet av testene.

4.1.2.2 Total Viable Count

Det er viktig at den mikrobielle utfordringen sprøytene blir utsatt for under testingen er høy nok til å fullstendig teste integriteten til beholderen (87). I følge «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» forventes antall bakterier i utfordringsmediet under integritetstesten å være mellom 10^5 og 10^6 cfu/ml (20). Resultatene som er funnet etter utførelse av Total Viable Count er imidlertid høyere enn dette (**Tabell 5**). I annen litteratur er det beskrevet som ønskelig med høyere konsentrasjoner enn de som er nevnt i protokollen (88, 89). Et hovedpoeng er imidlertid at konsentrasjonen av bakterier som sprøytene blir utsatt for er høyere enn konsentrasjonen av mikroorganismer som sprøytene kan møte i naturlige miljøer (87). To studier har brukt konsentrasjoner av *E. Coli* som er omkring 10^8 cfu/ml, altså lignende konsentrasjonene som er funnet i denne oppgaven (88, 89). En annen studie beskriver at bakteriekonsentrasjoner mellom 10^5 og 10^6 cfu/ml kan være for lavt til å bli akseptert av noen regulerende myndigheter, som U.S. FDA (87). Resultatene etter Total Viable Count varierte i denne studien mellom 1,9 til $9,0 \times 10^8$ cfu/ml. I forhold til annen litteratur vurderes dette som et passende antall mikroorganismer til å utfordre sprøytene under integritetstesting (87-89).

4.1.2.3 Positiv kontroll

Protokollen beskriver at det skal tilsettes mindre enn 100 cfu *E. Coli* til sprøytene som skal fungere som positiv kontroll (20). For å sikre repeterbarhet mellom de ulike testene ble

standardiserte BioBalls fra Biomérieux benyttet. Det ble kjøpt inn to pakker med BioBalls der det følger med analysesertifikat som oppgir at innholdet av *E. Coli* i hver BioBall er mellom 23,2 og 34,9 cfu (Vedlegg 7.4 og 7.5). På denne måten ble det sikret at mengden *E. Coli* som ble tilsatt positiv kontroll var omtrent den samme hver gang og i henhold til beskrivelsene i protokollen (20).

4.1.2.4 Inkubasjonstid

Noen av sprøytene ble inkubert kortere enn 14 dager etter integritetstesten grunnet stengte laboratorier som en følge av COVID-19. Beslutningen om å inspisere disse sprøytene noen dager før de opprinnelig var ferdig ble tatt på bakgrunn av informasjon om inkubasjonstiden etter integritetstesting. Flere artikler beskriver at det ikke finnes noen standard inkubasjonstid etter mikrobiologisk integritetstesting, 7 eller 14 dager settes derfor vanligvis som standard (74, 87). Det beskrives også at dersom mikrobiologisk vekst kan detekteres på kortere tid så kan en kortere inkuberingsperiode velges (74). En studie som har gjennomført et lignende forsøk har til sammenligning valgt en inkubasjonstid på 7 dager (88).

Etter at *E. Coli* hadde blitt tilsatt sprøytene gjennom positiv kontroll ble det observert mikrobiell vekst etter maksimalt tre døgn. På bakgrunn av dette er det rimelig å anta at dersom det har kommet mikroorganismer inn i sprøytene på et tidspunkt under testingen, så vil det forekomme vekst før det har gått 14 dager. Det er også rimelig å anta at om det ikke har vokst mikroorganismer på henholdsvis 9, 10 og 11 dager så vil det heller ikke gjøre det de påfølgende dagene. Grunnet de nevnte argumentene vurderes derfor resultatene fra de aktuelle forsøkene som gyldige.

4.1.3 Fysisk integritetstesting

4.1.3.1 Etablering og utvikling av metoden

Utfordringen vedrørende 1 ml sprøytene er diskutert i delkapittel 2.2.2. Som beskrevet var det vanskelig å lage et hull til en skrue i disse sprøytene. Hensikten med å lage hull i stempelet er å lage vakuum i sprøyten, noe som videre øker sjansen for at fargeløsningen trekker inn. Uten et slikt vakuum blir ikke sprøytene tilstrekkelig utfordret under integritetstesten (20). Det var likevel ønskelig å se hvordan 1 ml sprøytene oppførte seg under integritetstesting. Det ble derfor testet fire slike sprøyter som alle bestod integritetstesten. Resultatet kan likevel ikke

vurderes som gyldig da testen ikke ble utført i henhold til protokollen, og uten positiv kontroll (20). Grunnet stengte laboratorier som en følge av COVID-19 ble det ikke gjennomført videre forsøk med 1 ml sprøytene.

4.1.3.2 Metode for evaluering av fargegjennomtrenging

Forsøkene viste at deteksjonsgrensen for visuell deteksjon var i nærheten av deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret. Deteksjonsgrensen for visuell deteksjon ble estimert til å være omtrent 0,25 mg/L, mens deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret ble beregnet til å være 0,217 mg/L. Dette tilsier at metodene kan betraktes som tilnærmet likeverdige når det gjelder deteksjon av fargegjennomtrenging. Deteksjonsgrensene begrenser imidlertid hvor lave konsentrasjoner det er mulig å måle med de to metodene.

Hver av de to metodene for deteksjon av fargegjennomtrenging har både fordeler og ulemper. Fordeler med UV-spektroskopi inkluderer objektive, kvantitative data. Den største ulempen viste seg å være knyttet til vanskeligheter med å analysere innholdet i sprøytene etter integritetstesting (se 3.2.4). Fordeler med visuell deteksjon er at metoden krever mindre utstyr og er mindre tidkrevende enn UV-spektroskopi. Visuell deteksjon er på den andre siden mer subjektiv enn UV-spektroskopi, og resultatene kan derfor variere avhengig av hvem som gjennomfører inspeksjonen. Dette har blitt undersøkt i en studie, der resultatet viste at visuell deteksjon ved lave konsentrasjoner av farge avhenger av personen som inspiserer (88).

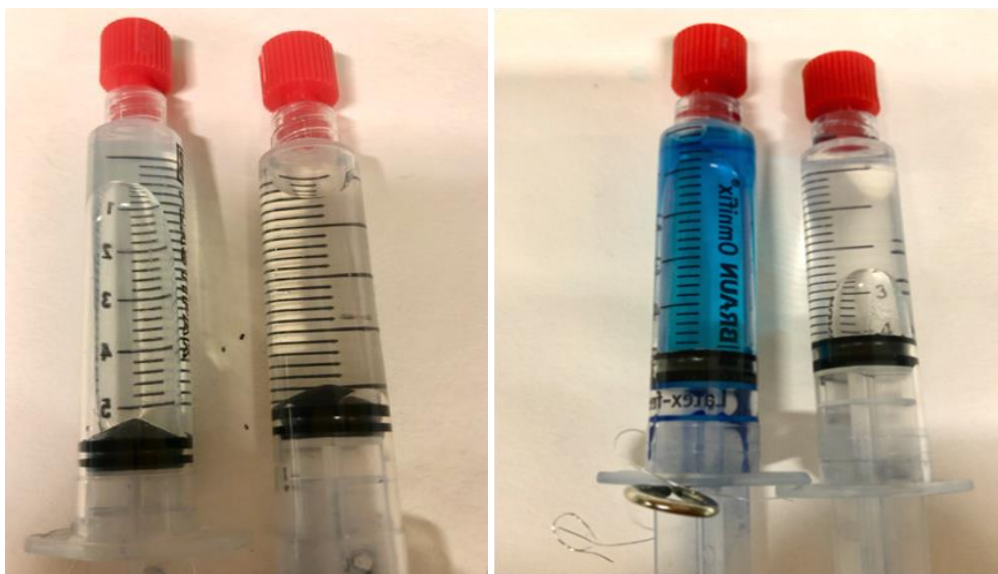
En studie som har gjennomført tilsvarende forsøk konkluderer med at både visuell deteksjon og UV-spektroskopi kan benyttes til deteksjon i denne metoden (88). Visuell deteksjon ble imidlertid vurdert til å være den best egnede metoden for deteksjon av fargegjennomtrenging i denne oppgaven. Dette er basert på utfordringen som oppstod da innholdet i sprøytene skulle analyseres, deteksjonsgrensen som var relativt lik for de to metodene og det faktum at «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver visuell deteksjon som egnet til å evaluere fargegjennomtrenging (19).

Metoden som ble benyttet til å finne deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret er en enkel og rask metode, men den har begrensninger (se 2.2.9) (84). Metoden baserer seg på antagelsen om at en lav konsentrasjon av analytt vil gi et høyere signal enn en blank prøve (83). Det finnes imidlertid ingen objektive bevis på at signalet fra en blank prøve vil skille seg fra signalet til en

lav konsentrasjon av analytt (83, 84). Av den grunn er det ikke sikkert at deteksjonsgrensen som er beregnet er annerledes enn signalet som vil kunne måles fra en blank prøve. Deteksjonsgrensen blir da heller ikke et mål på den laveste konsentrasjonen av metylenblått som med sikkerhet kan detekteres med metoden, slik det følger av definisjonen (80, 82). En artikkel beskriver også at det vanligvis utføres 20 blankmålinger i denne metoden (83). Det ble derimot kun utført seks målinger i denne studien. Det ble ikke arbeidet videre med deteksjonsgrensen for UV-spektrofotometeret fordi visuell deteksjon ble vurdert som best egnet til deteksjon av fargegjennomtrenging. Rutinebruk av metoden krever derfor ytterligere validering enn det som er gjennomført i denne studien. Validering av metoden bør utføres i henhold til retningslinjen «ICH Q2: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» (82).

4.1.3.3 *Positiv kontroll*

Positiv kontroll ble ikke farget av metylenblått i to av de gjennomførte integritetstestene (Terumo 5 ml og BD Plastipak 3 ml) (se 3.2.2). De respektive testene ble gjentatt, og positiv kontroll ble farget i begge de nye testrundene. Testene ble gjennomført så likt som mulig, og det er derfor usikkert hvorfor positiv kontroll ikke ble farget under den første testen av disse to sprøytetyperne. Det var også stor variasjon i hvor mye farge innholdet i positiv kontroll fikk under de ulike integritetstestene. Nedenfor illustreres to eksempler på positiv kontroll ved siden av innholdet i en ufarget sprøyte (**Figur 33**).



Figur 33: Bildene viser variasjonen i hvor mye farge positiv kontroll har fått etter integritetstesting. Bildene viser positiv kontroll til venstre og ufarget sprøyte til høyre (egne bilder).

Som beskrevet i delkapittel 1.4.3 er fysisk integritetstesting som baserer seg på fargegjennomtrenging eksempel på en probabilistisk metode (68, 70). En ulempe med slike metoder er at sjansen for at det skal forekomme lekkasje gjennom små defekter (som en tynn tråd mellom stempel og sprøytevegg slik det er i positiv kontroll) er basert på sannsynlighet for en rekke hendelser som må forekomme (70). Dette kan være med på å forklare hvorfor positiv kontroll noen ganger ble farget av metylenblått, mens andre ganger ikke. Samme artikkel beskriver også at resultatene fortsatt kan vurderes som gyldige selv om noen av de positive kontrollene ikke viser tegn til gjennomtrenging for testene som er probabilistiske (70). Av den grunn vurderes resultatene fra de fysiske integritetstestene som gyldige, fordi positiv kontroll ble farget i begge tilfellene der testen måtte gjentas.

4.2 Diskusjon: Resultat

4.2.1 Mikrobiologisk integritetstest (1 ml sprøyter)

Under forsøkene ble det inkludert en rekke faktorer som ble antatt å være av betydning for integriteten til sprøytene. Faktorene inkluderer hvorvidt overgangen mellom sprøyten og lukkemekanismen er luer eller luer-lock, om lukkemekanismen er kanyle eller propp og om fyllingsgraden er halvfull eller nærmere full.

Hoveddelen av 1 ml sprøytene som ble testet bestod integritetstesting. Unntaket var 1 ml sprøytene fra Terumo som ble testet med kanyle fra BD Microlance, og ved 85 % fyllingsgrad med propp. Disse sprøytene bestod imidlertid integritetstesten med 40 % fyllingsgrad med propp. Det er mulig at fjerning av væske etter integritetstesting kan ha ført til kontaminerte sprøyter for denne sprøytetypen, da disse var første sprøytetype som ble testet med denne metoden.

Funnene etter integritetstestene av 1 ml sprøytene tyder derfor på at alle vil klare å bevare sterilitet under oppbevaring, med unntak av 1 ml sprøytene fra Terumo som beskrevet over. Dette er basert på at forholdene sprøytene ble utsatt for under testingen er mer ekstreme enn forholdene sprøytene vil kunne møte i naturlige miljøer. Sprøytetypene som bestod integritetstesting egner seg derfor som beholdere for legemidler.

4.2.2 Mikrobiologisk integritetstest (2, 3 og 5 ml sprøyter)

Alle 2, 3 og 5 ml sprøytene bestod integritetstesting uavhengig av fyllingsgrad, med unntak av de første testene med 3 og 5 ml sprøytene fra Terumo. Disse resultatene tyder på at sprøyter med luer-lock overgang og propp som lukkemekanisme generelt gir god beskyttelse mot mikrobiell kontaminering.

Sannsynligvis skyldes den høye andelen kontaminerte sprøyter i de første testrundene bevegelse på stempelet da sprøytene ble fjernet fra beholderen før inkubering. Denne antagelsen er basert på at dette var det eneste som ble gjort ulikt mellom de forskjellige testrundene. Justeringene som ble gjort under de etterfølgende integritetstestene førte til ingen vekst for begge sprøytetyperne, og derav samsvar mellom resultatene fra mikrobiologisk og fysisk integritetstesting. Det var heller ikke vekst i sprøytene etter inkubering til tross for at det i noen sprøyter var bakteriesuspensjon tilstede under hele inkuberingsperioden (se 4.1.2.1). Dette tyder på at sprøytene er tette, og at den justerte fremgangsmåten er best.

Det kan likevel være av verdi å vite at integriteten til sprøytene ikke er bevist når stempelet har blitt beveget på. Protokollen beskriver også at bevegelse på stempelet etter at sprøytene er fylt bør unngås fordi det er kjent for å forårsake problemer med integriteten (20). Funnene fra disse forsøkene kan derfor tyde på at det er viktig at sprøytene får ligge i ro uten å bli beveget på under både lagring og transport. I sykehusapotek er det også vanlig at sprøyter legges i sterile poser under produksjon i klasse A (Vedlegg 7.1 og 7.2). Funnene som er gjort kan være med på å understreke viktigheten av å pakke hver sprøyte som blir tilvirket i en individuell steril pose.

Resultatene fra de mikrobiologiske integritetstestene av 2, 3 og 5 ml sprøytene tyder på at alle vil klare å bevare sterilitet under oppbevaring. Samtlige sprøytetyper egner seg derfor som beholdere for legemidler. I tillegg viser funnene fra integritetstesting av 2, 3 og 5 ml sprøytene at disse er sensitive for kontaminering ved bevegelse av stempelet.

4.2.3 Fysisk integritetstest

Alle 2, 3 og 5 ml sprøytene bestod den fysiske integritetstesting. Alle sprøytene bortsett fra én (Terumo 2,5 ml) hadde luer-lock overgang mellom sprøyten og lukkemekanismen. Innholdet i sprøytene ble inspisert ved visuell deteksjon etter integritetstestene. Der det ikke var mulig å

observere forskjell på innholdet i en testet sprøyte og vann, og det var mulig å se forskjell på innholdet i en testet sprøyte og lav konsentrasjon metylenblått, ble det vurdert at sprøyten hadde bestått integritetstesten. Under utvikling av metoden ble det oppdaget at veldig små lekkasjer ville vært vanskelig å detektere både visuelt og ved UV-spektroskopi (se 4.1.3.2). Resultatene fra fargetesten samsvarer imidlertid med resultatene fra de mikrobiologiske integritetstestene. Dette styrker antagelsen om at sprøytene ikke tillater lekkasje.

Det var usikkert om tilfeller der farge hadde trengt ned i korken, men ikke ned i selve innholdet i sprøyten, skulle vurderes som positivt eller negativt resultat (se **Figur 29**). I henhold til protokollen er farging av innholdet i sprøyten den eneste faktoren som er av betydning for om resultatet skal regnes som positivt eller negativt (20). Det ble derfor besluttet at en slik gjennomtrenging av farge ned i korken skulle tolkes som et negativt resultat. Dette kan også sammenlignes med tolkningen av resultatene etter den mikrobiologiske integritetstesten. Dersom det hadde kommet bakteriesuspensjon ned i korken på samme måte ville det ikke ha ført til vekst av mikroorganismer i mediet i sprøyten, og resultatet ville også da ha blitt tolket som negativt i henhold til protokollen (20).

4.2.4 Sammenligning av resultatene fra mikrobiologisk og fysisk integritetstesting

«Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver at den mest komplette vurderingen av en sprøyte og dens lukkemekanisme som en beholder gjøres ved å teste den både med én mikrobiologisk og én fysisk integritetstest (20). Resultatene fra den fysiske integritetstesten samsvarer med resultatene fra den mikrobiologiske integritetstesten. Dette er nødvendigvis kun tilfellet for 2, 3 og 5 ml sprøytene da 1 ml sprøytene ikke kunne testes med fysisk integritetstesting. Ingen av de testede 2, 3 og 5 ml sprøytene viste tegn til gjennomtrenging av hverken farge eller mikroorganismer. Dette er med på å styrke antagelsen om at sprøytene klarer å bevare sterilitet under oppbevaring og egner seg som beholdere for legemidler.

4.2.5 Er metodene egnet til å teste beholdere for legemidler på et sykehusapotek?

Den mikrobiologiske integritetstesten krever et laboratorium der det er trygt å arbeide med mikroorganismer. I GMP Annex 1 står det følgende: «Preparater av mikrobiologisk opprinnelse skal ikke lages eller fylles i områder som brukes til prosessering av andre legemidler» (21). Det beskrives også at ansatte som er involvert i arbeid med kulturer av mikroorganismer som er

forskjellige fra de som er inkludert i tilvirkningsprosessen ikke burde ha tilgang til sterile områder med mindre rigide og klart definerte tilgangsprosedyrer er fulgt (21). Av den grunn vurderes det som utfordrende å gjennomføre den mikrobiologiske integritetstesten i sin helhet i en produksjonsavdeling på et sykehusapotek. Den mikrobiologiske integritetstesten er også mye mer tidkrevende enn den fysiske integritetstesten fordi den krever to perioder med 14 dagers inkubasjonstid (20). Metoden tillater derimot testing av alle ønskelige sprøytetyper, fyllvolumer, ulike lukkemekanismer og resultatene vurderes som pålitelige dersom testen utføres korrekt.

Den fysiske integritetstesten er i motsetning til den mikrobiologiske integritetstesten mulig å gjennomføre i sin helhet på et sykehusapotek. Testen krever lite utstyr, og den er rask og enkel å utføre. En ulempe med denne testen er at den ikke kan benyttes til å vurdere integriteten til 1 ml sprøyter eller sprøyter med ulike fyllvolum. Det er også mulig at det er vanskelig å utføre denne testen på andre sprøytetyper der stempelet består av hard plast som gjør det vanskelig å lage et hull uten at stempelet knekker. Utfordringene vedrørende at positiv kontroll noen ganger ikke ble farget under integritetstesting, og at små lekkasjer av metylenblått i sprøytene er vanskelig å detektere, må også tas i betraktning.

Begge integritetstestene som beskrives i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» er relativt enkle å gjennomføre når man har det nødvendige utstyret (20). Om de utføres og valideres korrekt, vurderes også begge testene som egnet til å teste sprøyter som brukes som beholdere for legemidler. Dersom det er mulig er det en fordel å utføre både mikrobiologisk og fysisk integritetstesting for å sammenligne disse resultatene.

4.2.6 Kan holdbarheten til legemidlene som oppbevares i sprøytene utvides?

Om holdbarheten til legemidlene som oppbevares i sprøytene kan utvides er et komplisert spørsmål som må ta i betraktning flere faktorer enn kun beholderens evne til å opprettholde en barriere mot potensielle forurensinger (18). Som nevnt i innledningen fastsettes holdbarhetstiden til et legemiddel på grunnlag av det enkelte produkt sin kjemiske, fysiske og mikrobiologiske holdbarhet (9, 18). Metodene som ble benyttet i denne oppgaven har undersøkt integriteten til beholderne som benyttes til å oppbevare legemidlene, og derav kun den mikrobiologiske holdbarheten (20). Dette alene er ikke nok til å kunne si noe sikkert om holdbarheten til legemidlene som oppbevares i sprøytene kan utvides (9, 18). Resultatene fra

integritetstestene vil imidlertid kunne være av verdi for å støtte vurderinger av den mikrobielle holdbarheten til legemidler som oppbevares i sprøytene som har bestått testene som er gjennomført i denne oppgaven.

Som beskrevet i avsnitt 1.3.4 er problemstillingen vedrørende holdbarheten til legemidlene bevacizumab (Avastin) og aflibercept (Eylea) i sprøyter særlig aktuell. Det er publisert mange studier som har sett på stabiliteten til disse virkestoffene i sprøyter. Flere studier konkluderer med at bevacizumab kan ompakkes i sprøyter og lagres i inntil tre måneder ved 4 °C uten at stabiliteten påvirkes (90, 91). Studier viser også at aflibercept kan lagres ved 4 °C i inntil fire uker uten at det påvirker legemidlets stabilitet (92, 93). En nylig publisert studie fra Oslo universitetssykehus har sett på stabiliteten til disse legemidlene i sprøyter uten tilsatt silikonolje (40). Sprøytetypen som ble benyttet i denne studien er den samme som er testet i denne oppgaven, 1 ml B. Braun Injekt-F (40). Konklusjonen var at både bevacizumab og aflibercept kan lagres i denne sprøytetypen i inntil syv dager uten at det påvirker legemidlenes stabilitet, molekylære integritet eller funksjonelle egenskaper (40).

Det har nå blitt besluttet å bruke 1 ml B. Braun Injekt-F til aseptisk dispensering av bevacizumab og aflibercept i sprøyter på Sykehusapoteket i Bergen (se 1.3.4). 1 ml B. Braun Injekt-F sprøytene bestod de mikrobiologiske integritetstestene både med kanyle fra TSK, BD Microlance og propp (**Tabell 3**). Disse funnene, kombinert med studien som er utført av Oslo universitetssykehus vedrørende stabiliteten til legemidlene i denne sprøytetypen, tilsier at det er gode holdepunkter for å kunne utvide holdbarheten til disse legemidler når de oppbevares i denne sprøytetypen (40). Resultatene fra denne studien tilsier også at det er viktig å sikre at stempelet til sprøyten ikke blir beveget på under oppbevaring og transport.

5. Konklusjon

Ulike sprøytetørrelser fra tre forskjellige produsenter har blitt testet i henhold til metodene som er beskrevet i «Protocols for the Integrity Testing of Syringes, NHS 2013» (20). Begge integritetstestene som er gjennomført i denne studien er metoder som er brukt i flere tiår, og som er godt kjent hos myndigheter og industrien (69, 70). Den mikrobiologiske integritetstesten tillater testing av alle sprøytetyper. Metoden er imidlertid tidkrevende og vanskelig å utføre i sin helhet på et sykehusapotek. Den fysiske integritetstesten krever lite utstyr og kan utføres raskt og i sin helhet på et sykehusapotek. Den tillater derimot ikke testing av 1 ml sprøyter. Dersom de utføres og valideres korrekt vurderes begge testene som egnet til å teste sprøyter som benyttes til beholdere for legemidler (20, 82). Det er en fordel å utføre både én mikrobiologisk og én fysisk integritetstest for å sammenligne resultatene.

Resultatene fra de mikrobiologiske integritetstestene viste at de fleste sprøytene bevarte sterilitet etter integritetstesting. Sprøytene som bevarte sterilitet etter integritetstesting vil sannsynligvis også bevare sterilitet under oppbevaring. Det kan følgelig argumenteres for at sprøytene som bestod den mikrobiologiske integritetstestingene egner seg som beholdere for legemidler. Funnene i oppgaven tyder på at bevegelser på stempelet etter fylling av legemidler i sprøytene bør unngås, og derfor at sprøytene bør ligge i ro under oppbevaring og transport.

Alle 2, 3 og 5 ml sprøytene som ble testet ved fysisk integritetstesting bestod. Innholdet i sprøytene ble etter testene inspisert ved visuell deteksjon. Underveis i prosessen ble det oppdaget at små lekkasjer var vanskelig å detektere visuelt og ved UV-spektroskopi grunnet deteksjonsgrensen som var relativt lik for de to metodene. Resultatene fra de fysiske integritetstestene samsvarer imidlertid med resultatene fra de mikrobiologiske integritetstestene. Dette styrker antagelsen om at sprøytene er tette, og at de egner seg som beholdere for legemidler.

Funnene som er gjort i oppgaven kan være med på å begrunne utvidelse av holdbarheten til bevacizumab (Avastin) og aflibercept (Eylea) når disse legemidlene tilvirkes i 1 ml B. Braun Injekt-F sprøyter. Resultatene vil også kunne være nyttige for å støtte vurderinger av den mikrobielle holdbarheten til legemidler som oppbevares i sprøytene som har bestått integritetstestene i denne oppgaven.

6. Veien videre

Da denne studien var begrenset i tid og omfang, var det ikke rom for å undersøke alt som kunne være av interesse. Flere forsøk var også planlagt, men disse måtte utgå grunnet stenging av UiB som en følge av utbrudd av COVID-19. Det ble eksempelvis ikke gjennomført videre forsøk på 1 ml sprøytene ved fysisk integritetstesting. For å få ytterligere informasjon om hvordan disse oppfører seg under integritetstesting kunne man utført én testrunde med 20 sprøyter og positiv kontroll. Det er likevel usikkert om disse resultatene ville ha tilført noe av verdi, fordi det ikke var mulig å utføre forsøkene med 1 ml sprøytene i henhold til protokollen (20). Det ble også kun testet én sprøytetype med luer overgang mellom sprøyten og lukkemekanismen ved fysisk integritetstesting. Denne bestod testen, men det kunne likevel vært interessant å teste flere slike sprøytetyper for å få mer informasjon om integriteten til sprøyter med luer overgang mellom sprøyten og lukkemekanismen.

Hvilke sprøytetyper og størrelser som ble testet måtte prioriteres etter hva som var mest aktuelt for produksjonsavdelingen på Sykehusapoteket i Bergen. Valget falt derfor på 1, 2, 3 og 5 ml sprøyter. Det ble inkludert sprøyter fra tre ulike produsenter for å ha et bredere sammenligningsgrunnlag. 1 ml sprøytene blir brukt av produksjonsavdelingen til aseptisk dispensering av legemidlene bevacizumab og aflibercept. 1, 3 og 5 ml sprøytene blir også brukt av produksjonsavdelingen til fylling av blant annet bortezomib, azacitidin og metotreksat i sprøyter. I fremtidige studier kunne det derimot vært interessant å teste flere størrelser av sprøyter, som eksempelvis 10, 20 og 50 ml sprøyter. I tillegg hadde det vært interessant å teste sprøyter som er fylt til 100 % kapasitet ved mikrobiologisk integritetstesting for å se om dette hadde utgjort noen forskjell på resultatene.

Basert på forsøkene som er gjennomført på 1 ml sprøytene med kanyler i denne studien er det fortsatt usikkert om kanyler egner seg som lukkemekanisme på alle sprøytetyper. Det kunne vært interessant å utføre videre forsøk på sprøyter med kanyler for å undersøke dette. «Protocols for the Integrity Testing of Syringes» beskriver *partial immersion* (delvis nedsenking) som et alternativ for å undersøke hvor det foreligger problem med integriteten (20). Utførelse av slike forsøk vil muligens kunne undersøke dette, og eventuelt finne ut hvor det foreligger problemer med integriteten til sprøytene.

Referanseliste

1. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2019.
2. International Organization for Standardization (ISO). ISO 7886-1. International Standard. Sterile hypodermic syringes for single use. Part 1: Syringes for manual use 2017. p. 28.
3. Bouwman-Boer Y, Fenton-May VI, Le Brun P. Containers. In: Dillingh J, Smith J, editors. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products 1st ed: KNMP and Springer International Publishing; 2015. p. 501-36.
4. Sacha G, Rogers JA, Miller RL. Pre-filled syringes: a review of the history, manufacturing and challenges. New York, NY :2015. p. 1-11.
5. Peláez SS, Mahler H-C, Matter A, Koulov A, Singh SK, Germershaus O, et al. Container Closure Integrity Testing of Prefilled Syringes. Hoboken, N.J.2018. p. 2091-7.
6. Makwana S, Basu B, Makasana Y, Dharamsi A. Prefilled syringes: An innovation in parenteral packaging. Mumbai :2011. p. 200-6.
7. Zadbuke N, Shahi S, Gulecha B, Padalkar A, Thube M. Recent trends and future of pharmaceutical packaging technology. [Mumbai, India] :2013. p. 98-110.
8. Statens Legemiddelverk. Oppbevaringstider og veiledende brukstid for sterile legemidler etter anbrudd. Oslo [updated 2019 07-01; cited 2019 08-29]. Available from: <https://legemiddelverket.no/godkjenning/nls/oppbevaring/oppbevaringstider-og-veiledende-brukstid-for-sterile-legemidler-etter-anbrudd>.
9. Forskrift om tilvirkning av legemidler i apotek. 2001. Forskrift om tilvirkning av legemidler i apotek av 2001-06-26 nr 738.
10. Forskrift om tilvirkning og import av legemidler. 2004. Forskrift om tilvirkning og import av legemidler av 2004-11-02 nr 1441.
11. Westergren T, Stenberg-Nilsen, H. Oppbevaring av legemidler i sprøyte - viktige faktorer ved vurdering. . Nor Farmaceut Tidsskr. 2019;127(4):20-1.
12. Statens Legemiddelverk. Norske legemiddelstandarder - NLS 2020.1. Oslo [cited 2020 05-08]. Available from: <https://legemiddelverket.no/godkjenning/nls>.
13. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products *Human Medicines Evaluation Unit*. Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Note for guidance on maximum shelf-life for sterile products for human use after first opening or following reconstitution. EMA; 1998.
14. Bouwman-Boer Y, Fenton-May VI, Le Brun P. Stability. In: Touw D, Vigneron J, editors. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products. 1st ed: KNMP and Springer International Publishing; 2015. p. 435-61.
15. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Container and Closure System Integrity Testing *in Lieu* of Sterility Testing as a Component of the Stability Protocol for Sterile Products. 2008 [cited 2020 04-26]. Available from: <https://www.fda.gov/media/76338/download>.
16. European Medicines Agency. ICH Topic Q 1 A (R2). Stability Testing of new Drug Substances and Products. 2003 [updated 2008 08; cited 2020 04-23]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf.

17. U.S. Pharmacopeia. First Supplement to USP 39–NF 34 General Information / <1207> Package Integrity Evaluation—Sterile Products [cited 2020 04-01]. Available from: <http://pmo90dc87.pic37.websiteonline.cn/upload/c12071SUSP39.pdf>.
18. Nema S, Ludwig JD. Pharmaceutical Dosage Forms- Parenteral Medications 3rd ed. ed: Informa Healthcare; 2010.
19. Jenke DR. Extractables and leachables considerations for prefilled syringes. London :2014. p. 1591-600.
20. NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. Protocols for the Integrity Testing of Syringes. 2.nd ed: NHS; April 2013
21. European Commission. EU GMP Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products Brussels 2008 [updated 2008 11-25; cited 2020 04-26]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf.
22. Bouwman-Boer Y, Fenton-May VI, Le Brun P. Equipment. In: Prins M, Boeke W, editors. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products. 1st ed: KNMP and Springer International Publishing; 2015. p. 609-49.
23. Bouwman-Boer Y, Fenton-May VI, Le Brun P. Aseptic Handling. In: Boom F, Beaney A, editors. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products 1st ed: KNMP and Springer International Publishing; 2015. p. 695-706.
24. Quality Assurance of Aseptic Preparation Services: Standards. Royal Pharmaceutical Society. 5. ed. Alison M Beaney DP, MSc, FRPharmS, editor 2016. 125 p.
25. Denyer. SP, Baird. RM. Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices. 2nd ed: CRC Press; 2007. 462 p.
26. Bouwman-Boer Y, Fenton-May VI, Le Brun P. Microbiology In: Doorne Hv, Roesti D, Staerk A, editors. Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products. 1st ed: KNMP and Springer International Publishing; 2015. p. 383-403.
27. Statens Legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Eylea [cited 2019 08-27]. Available from: <https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=2d52dc38-4057-423a-887d-fab21e874f29&searchquery=eylea&f=Han;Mtl;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>.
28. Helsetilsynet. Alvorlige øyefeksjoner etter injeksjonsbehandling med Avastin ved St. Olavs hospital HF. Oslo. [updated 2017 08-31; cited 2020 08-29]. Available from: https://www.helsetilsynet.no/globalassets/opplastinger/tilsyn/varsel_enhet/st_olav_hf_avastin_2017.pdf.
29. Helsedirektoratet. Infeksjon etter injeksjon i øyet. Oslo. 2017 [updated 2017 04; cited 2020 04-20]. Available from: https://www.helsedirektoratet.no/laeringsnotat/infeksjon-etter-injeksjon-i-oyet/Infeksjon%20etter%20injeksjon%20i%20%C3%B8yet.pdf/_attachment/inline/e573d708-4ef2-4134-8943-bb39f55c3209:1c204fe2b8c5d78da22ea03d41e81a0fb7c9e1cf/Infeksjon%20etter%20injeksjon%20i%20%C3%B8yet.pdf.
30. Topdahl RC. Seks personer kunne mistet synet. NRK Rogaland 2017 [updated 2017 04-19; cited 2020 05-14]. Available from: <https://www.nrk.no/rogaland/seks-personer-fikk-alvorlig-oyefeksjon-etter-rutinebehandling-1.13463611>.

31. Berg K, Kalsnes Jørstad Ø. Aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) Nasjonal kvalitetshåndbok for oftalmologi 2016 [cited 2019 08-28]. Available from: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/oftalmologi/retina/aldersrelatert-makuladegenerasjon-amd>.
32. Chopdar A, Chakravarthy U, Verma D. Age related macular degeneration. [London]2003. p. 485-8.
33. Sandvig K. Makuladegenerasjon Store Medisinske Leksikon [updated 2018 04-16 cited 2019 08-28]. Available from: <https://sml.snl.no/makuladegenerasjon>.
34. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Avastin [cited 2019 08-27]. Available from: <https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=e371d9bb-46c9-4596-b0ba-04ed09dc22e1&searchquery=avastin&f=Han;Mtl;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>.
35. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Lucentis [cited 2019 08-27]. Available from: <https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=796bc68c-1be9-49d0-8df8-cd33c2854143&searchquery=lucentis&f=Han;Mtl;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>.
36. Park DH, Sun HJ, Lee SJ. A comparison of responses to intravitreal bevacizumab, ranibizumab, or aflibercept injections for neovascular age-related macular degeneration. Dordrecht ;2017. p. 1205-14.
37. Ba J, Peng R-S, Xu D, Li Y-H, Shi H, Wang Q, et al. Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. [Auckland, N.Z.] :2015. p. 5397-405.
38. Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes S, Lotery AJ, Dakin HA, et al. A randomised controlled trial to assess the clinical effectiveness and cost-effectiveness of alternative treatments to Inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation (IVAN). Southampton :2015. p. 1-298.
39. Lee SH, Woo SJ, Park KH, Kim JH, Song JH, Park KU, et al. Serratia marcescens endophthalmitis associated with intravitreal injections of bevacizumab. London :2010. p. 226-32.
40. Lode HE, Gjøllberg TT, Foss S, Sivertsen MS, Brustugun J, Andersson Y, et al. A new method for pharmaceutical compounding and storage of anti-VEGF biologics for intravitreal use in silicone oil-free prefilled plastic syringes. London :2019. p. 18021.
41. Rohowetz LJ, Yannuzzi NA, Gupta S, Patel NA, Miller D, Flynn HW. Endophthalmitis Caused by Agrobacterium radiobacter following Intravitreal Aflibercept for Diabetic Retinopathy. Basel :. p. 22-7.
42. Sheyman AT, Cohen BZ, Friedman AH, Ackert JM. An outbreak of fungal endophthalmitis after intravitreal injection of compounded combined bevacizumab and triamcinolone. Chicago, IL :2013. p. 864-9.
43. Entezari M, Ramezani A, Ahmadi H, Ghasemi H. Batch-related sterile endophthalmitis following intravitreal injection of bevacizumab. Mumbai2014. p. 468-71.
44. Yamashiro K, Tsujikawa A, Miyamoto K, Oh H, Otani A, Tamura H, et al. Sterile endophthalmitis after intravitreal injection of bevacizumab obtained from a single batch. Philadelphia :2010. p. 485-90.
45. Goldberg RA, Flynn HW, Isom RF, Miller D, Gonzalez S. An outbreak of streptococcus endophthalmitis after intravitreal injection of bevacizumab. New York. 2012. p. 204-8.e1.

46. Sandvig K. Endoftalmitt Store Medisinske Leksikon [updated 2018 02-20; cited 2019 08-28]. Available from: <https://sml.snl.no/endoftalmitt>.
47. Sheu SJ. Endophthalmitis. Seoul, Korea :2017. p. 283-9.
48. United States Food and Drug Administration. FDA Alerts Health Care Professionals of Infection Risk from Repackaged Avastin Intravitreal Injections. 2011 [updated 2011 08-30; cited 2020 05-13]. Available from: <http://web.archive.org/web/20140824115447/http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm270296.htm>.
49. Olsen CY. Endrer praksis etter at pasienter fikk infeksjon av behandling. St. Olavs hospital. Universitetssykehuset i Trondheim. 2017 [updated 2017 06-15; cited 2020 05-14]. Available from: <https://stolav.no/nyheter/2017/enderer-praksis-etter-at-pasienter-fikk-infeksjon-av-behandling>.
50. Soldal Lillemoen LM. Kvalitet i tilberedning av parenterale legemiddel på sengepost [masteroppgave]. Bergen: Universitetet i Bergen; 2015.
51. Cousins DH, Sabatier B, Begue D, Schmitt C, Hoppe-Tichy T. Medication errors in intravenous drug preparation and administration: a multicentre audit in the UK, Germany and France. London :2005. p. 190-5.
52. European Commission. EudraLex - Volume 4. Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines. [cited 2020 03-30]. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en.
53. Forskrift om norsk farmekopé. 2019. Forskrift om norsk farmakopé av 2019-12-13 nr 1734.
54. Forskrift om legemidlers kvalitet. 1995. Forskrift om legemidlers kvalitet, standarder m.m. av 1995-07-20 nr 698.
55. Committee of Ministers - Council of Europe. Resolution CM/Res(2016)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients. 2016. [cited 2020 04-08]. Available from: https://www.edqm.eu/sites/default/files/resolution_cm_res_2016_1_quality_and_safety_assurance_requirements_for_medicinal_products_prepared_in_pharmacies.pdf.
56. Scheepers HPA, Neerup Handlos V, Walser S, Schutjens MDB, Neef C. Impact of the Council of Europe Resolution on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients. London :2017. p. 218-23.
57. SOL-care U100 0,5 ml sprøyte [cited 2020 04-19]. Available from: <https://www.pamark.fi/sol-mtm-insuliiniruisku-29gx12-5mm-0-5ml-u100-100kpl>.
58. Terumo 1 ml Luer Slip sprøyte [cited 2020 04-19]. Available from: <https://www.careshop.co.uk/medical-consumables/iv-injection/syringes/terumo-3-part-1ml-luer-slip-concentric-tip-syringe-1x100.html>.
59. BD Microlance 3, 30G 1/2 kanyle [cited 2020 04-19]. Available from: https://www.tonerweb.no/p/kanyle-1-30gx1-2-gul-100-stk-160932?c=5534&utm_source=kelkoono&utm_medium=cpc&utm_campaign=kelkoclick&utm_term=Microlance+Kanyle+1+30Gx1%2F2%22+Gul+%28100+st.
60. 1 ml B. Braun Injekt-F sprøyte. [cited 2020 03-19]. Available from: <https://www.bbBraun.no/nb/products/b/injekt-f-solo.html>.
61. Khurana RN, Chang LK, Porco TC. Incidence of Presumed Silicone Oil Droplets in the Vitreous Cavity After Intravitreal Bevacizumab Injection With Insulin Syringes. Chicago, IL :2017. p. 800-3.
62. Yu JH, Gallemore E, Kim JK, Patel R, Calderon J, Gallemore RP. Silicone oil droplets following intravitreal bevacizumab injections. [Atlanta] :2018. p. 142-4.

63. Avery RL, Castellarin AA, Dhoot DS, Pieramici DJ, Nasir MA, Steinle NC, et al. Large silicone droplets after intravitreal bevacizumab (Avastin). Philadelphia, Pa. :. p. 130-4.
64. Forskrift om vern mot eksponering for kjemikalier på arbeidsplassen. 2001. Kjemikalieforskriften av 2001-04-30 nr. 443.
65. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Velcade [cited 2020 04-26]. Available from: <https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=f8fe7c53-3fbf-4f9a-8979-5228616a7e6e&searchquery=VELCADE&f=Han;MtI;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>.
66. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Vidaza [cited 2020 04-26]. Available from: <https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=a3a583a5-af76-4aac-a711-4765b02c6927&searchquery=vidaza&f=Han;MtI;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>.
67. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC). Methotrexat Accord [cited 2020 04-26]. Available from: <https://www.legemiddelsok.no/sider/Legemiddelvisning.aspx?pakningId=b303ff08-de39-465c-b6c4-b24b1a63ae66&searchquery=metotreksat&f=Han;MtI;Vir;ATC;Var;Mar;Mid;Avr;gen;par;&pane=0>.
68. Booth C. Understanding Container Closure Integrity Testing American Pharmaceutical Review. 2016 [updated 2016 09-30; cited 2019 09-27]. Available from: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/239498-Understanding-Container-Closure-Integrity-Testing/>.
69. Li L. Container closure integrity testing method development and validation for prefilled syringes. American Pharm Review. 2013;16.
70. Brown H, Mahler H-C, Mellman J, Nieto A, Wagner D, Schaar M, et al. Container Closure Integrity Testing-Practical Aspects and Approaches in the Pharmaceutical Industry. Bethesda. p. 147-62.
71. Degrazio FL. Holistic Considerations in Optimizing a Sterile Product Package to Ensure Container Closure Integrity. Bethesda. p. 15-34.
72. FDA. Guidance for Industry, Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice. 2004 [cited 2019 09-27]. Available from: <https://www.fda.gov/media/71026/download>.
73. European Commission. EudraLex- The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Manufacture of Sterile Medicinal Products Volume 4- Part II: Basic Requirements for Active Substances used as Starting Materials 2014 [updated 2014 08-13]; cited 2020 05-04]. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2014-08_gmp_part1.pdf.
74. Karcher L. Container Closure integrity Tests (CCIT) for Single-Use Systems Confarma; 2017 [cited 2019 09-30]. Available from: https://www.solvias.com/docs/download/en/004_Publications/Container_Closure_Integrity_Tests_CCIT.pdf.
75. Ryan MP, Pembroke JT. Brevundimonas spp: Emerging global opportunistic pathogens. Austin, Tex. :2018. p. 480-93.
76. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: plating methods. Boston, Mass.2012. p. e3064.
77. Collins, Lyne. Microbiological Methods. 8 ed. United Kingdom Arnold 2004.

78. The University of Vermont. Serial Dilution Problem Help. The University of Vermont. [cited 2020 02-20]. Available from: <http://www.uvm.edu/~btessman/calc/serhelp.html>.
79. BioMérieux Industry. BioBall SingleShot. 2018 [cited 2020 04-20]. Available from: <http://bioball.com/wp-content/uploads/2019/02/BIOBALL-SingleShot-IFU-2018-09-english.pdf>.
80. Rasmussen. KE, Pedersen-Bjergaard. S. Legemiddelanalyse. 2. ed: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS 2004. 505 p.
81. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis 8 th. ed. United States of America: W.H. Freeman and Company 2010.
82. European Medicines Agency. ICH Topic Q2: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 1995 [updated 1995 06; cited 2020 04-26]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.
83. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Chippendale, NSW :2008. p. S49-S52.
84. Shrivastava A. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chronicles of Young Scientists 2011;DOI: 10.4103/2229-5186.79345.
85. Merck. Microbial Growth Protocols. Culture of E. Coli. Sigmaaldrich.com Merck [cited 2020 03-18]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/microbial-growth.html>.
86. Addgene. Protocols. Inoculating a Liquid Bacterial Culture. Addgene. [cited 2020 03-18]. Available from: <https://www.addgene.org/protocols/inoculate-bacterial-culture/>.
87. Sandle T. Liquid Immersion Microbial Challenge Tests: Microbial Testing for Container Closure Integrity. Journal of Validation Technology. 2017;23:1-10.
88. Burrell LS, Carver MW, DeMuth GE, Lambert WJ. Development of a dye ingress method to assess container-closure integrity: correlation to microbial ingress. Bethesda. p. 449-55.
89. Integrity testing of vial closure systems used for parenteral products. Bethesda, MD1982. p. 112.
90. Paul M, Vieillard V, Roumi E, Cauvin A, Despiau MC, Laurent M, et al. Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1mL polypropylene syringes for intravitreal administration. Paris :2012. p. 139-54.
91. Khalili H, Sharma G, Froome A, Khaw PT, Brocchini S. Storage stability of bevacizumab in polycarbonate and polypropylene syringes. London :2015. p. 820-7.
92. Sivertsen MS, Jørstad ØK, Grevys A, Foss S, Moe MC, Andersen JT. Pharmaceutical compounding of aflibercept in prefilled syringes does not affect structural integrity, stability or VEGF and Fc binding properties. London :2018. p. 2101.
93. Cao S, Cui J, Matsubara J, Forooghian F. Long-term in vitro functional stability of compounded ranibizumab and aflibercept. Montreal :2017. p. 273-6.

Vedlegg

7.1 Arbeidsseddel bevacizumab (Avastin) fra Sykehusapoteket i Bergen

ARBEIDSSEDDEL – TILSETNINGSSERVICE

K.nr:

Preparat:	Bevacizumab (Avastin®) 25 mg/ml i sprøyte	Volum:	0,12 ml
Antall:	_____ sprøyter	Adm.Vei:	Til intravitreal bruk (injeksjon i øyet)
Utskrevet av (dato/sign):	25.01.19 <i>vannet</i>	Godkjent av (dato/sign):	<i>Meghl 25/1-19</i>

Produseres, dato: _____ kl: _____

Det skal alltid deles på to batcher med mindre det er spesifisert noe annet i bestillingen.

Antall sprøyter som produseres på denne arbeidsseddelen: Antall sprøyter bestilt: _____ + 2 = _____

Etiketter skrevet ut og kontrollert:

Skrevet ut _____ primæretiketter til sprøyte (antall sprøyter som skal produseres + 2 til dokumentasjon). Sign: _____ / _____

Skrevet ut 2 sekundæretiketter til eske (1 til esken og 1 til dokumentasjon). Sign: _____ / _____

Produksjonssted (kryss av):	Isolator på pumperom	Sikkerhetsbenk på Lille Steril	LAFbenk på Store Steril	Tilsetningsrom
Produksjonssone klargjort:	LAFenhet er på og ryddet/rengjort.	Dato/ kl.slett:		
	Førrige produksjon er fjernet.	Sign (T):		

INNHALDSSTOFF	Mengde	Batchnr.	Sign (T):	Sign (F):	Anm.
I Avastin 25 mg/ml, 4 ml Varenummer: 019445	0,12 ml				100 mg/hetteglass

UTSTYR	Type utstyr, produsent, størrelse etc.	Antall	Batchnr.	Sign (T):	Anm.
Opptrekkskanyle	Mini-spike Braun Ref:4550242	1			
5 ml-sprøyte	Terumo luer lock. Ref: SS*05LE1	1			
Overgang	Baxa connector. Ref: H93813901	1			
1 ml-sprøyte	Terumo 1 ml Luer. Ref: SS+01T1				
Kanyle	BD Microlance 3, 30G ½. Ref: 304000				
Ytteremballasje	Intervoid steril pose (sluses inn med ytterposen på)				

Fremgangsmåte: Produseres og pakkes med aseptisk arbeidsteknikk

- Desinfiser gummimembranen til Avastin hetteglasset i 1 minutt. Gni membranen godt med kompress idet kompressen fjernes.
- Trekk langsomt opp hele innholdet i hetteglasset med minispike og 5ml-sprøyten.
- Sett Baxa-overgang på 5ml-sprøyten.
- Trekk opp 0,12 ml i en 1 ml-sprøyte.
- Sjekk for fravær av luftbobler.
- Sett en kanyle på sprøyten. Ikke fyll kanylen. La hetten være på.
- Fyll omtrent halvparten av sprøyten som skal produseres.
- Sett en ny 1ml-sprøyte på overgangen til 5ml-sprøyten og legg dette til side på en kompress.
- Legg de fylte sprøyten i hver sin sterile pose. Se til at det er så lite luft som mulig i posen før den lukkes.
- Sprøyten sluses ut av benken.
- Gjenta punkt 4-10 for resten av sprøyten.
- Etiketter posene umiddelbart. Signer på prosedyrekontrollen, og for etikettregnskapet.
- Farmasøyt kontrollerer sprøyten, og pakker sprøyten i en eske og etiketter esken. Esken forsegles. Signer på prosedyrekontrollen for farmasøyt.

HOLDBARHET: 3 døgner i kjøleskap og beskyttet mot lys.

PROSEDYREKONTROLL					
	KRAV	Antall godkjente	Antall kasserte (feilproduksjon)	Sign (T):	Sign (F):
Visuell kontroll	Klar løsning Fri for synlige luftbobler og partikler Emballasje er tett og aseptisk pakket				
Volumkontroll	Hver sprøyte skal inneholde mellom 0,10 og 0,12 ml slik at legen kan justere sprøyten til 0,05 ml (søms er behandlingsdosen) og se en liten dråpe.				

\Hovedforskrifer\A_GODKJENTE HOVEDFORSKRIFTER TILSETNINGEN\Andre blandinger\Bevacizumab (avastin) sprøyter til øyeinjeksjon 25.01.19

Side 1/2

Utskrevet av (dato/sign):	25.01.19. vauvat	Godkjent av (dato/sign):	moght 25/1-19
---------------------------	------------------	--------------------------	---------------

ETIKETTER	
Primæretikett til sprøyte: Bevacizumab (Avastin) 25 mg/ml 0,12 ml SPRØYTER 21.12.18 bevacizumab - AVASTIN® TIL INTRAVITREALT BRUK AVDELING: Øyeavdelingen 1 x 0,12 ml sprøyte Sprøytene inneholder: Bevacizumab (Avastin®) 25 mg/ml 0,12 ml Oppbevares i kjøleskap og beskyttet mot lys Anvendes før dato: dd.mm.åå Kl.: tt:mm * SJUKEHUSAPOTEKA VEST HF Sjukehusapoteket i Bergen K.nr: TXXXXXXX	Sekundæretikett til eske: Bevacizumab (Avastin) 25 mg/ml 0,12 ml ESKER 21.12.18 bevacizumab - AVASTIN® TIL INTRAVITREALT BRUK AVDELING: Øyeavdelingen ___ x 0,12 ml sprøyter Sprøytene inneholder: Bevacizumab (Avastin®) 25 mg/ml 0,12 ml Håndteres forsiktig! Oppbevares i kjøleskap og beskyttet mot lys Anvendes før dato: dd.mm.åå Kl.: tt:mm * SJUKEHUSAPOTEKA VEST HF Sjukehusapoteket i Bergen K.nr: TXXXXXXX
ETIKETTREGNSKAP SPRØYTER - TEKNIKER	
Primæretikett til sprøyte Antall etiketter skrevet ut og kontrollert: _____ sign: _____ Brukt til sprøyte: _____ sign: _____ Brukt til dokumentasjon: _____ sign: _____ Kassert: _____ sign: _____ Differanse (skal være 0): _____ sign: _____	

Etiketter til dokumentasjon:

Første etikett til sprøytepose (etiketteres av produsent)

Siste etikett til sprøytepose (etiketteres av produsent)

Etikett til eske (etiketteres av farmasøyt som kontrollerer)

Tilberedt av/produksjon avsluttet (kl.lett dato/sign (T)):	Produksjonen godkjent (dato/sign (F)):
Ordrenr./Reseptnr.:	Fakturert:Dato/sign:

7.2 Arbeidsseddel aflibercept (Eylea) fra Sykehusapoteket i Bergen

ARBEIDSSEDDEL – TILSETNINGSSERVICE

K.nr:

Preparat:	Aflibercept (Eylea®) 40 mg/ml Injeksjonsvæske i sprøyte	Volum:	0,05 ml
Antall:	9 sprøyter	Adm.Vei:	Til intravitreal bruk (injeksjon i øyet)
Utskrevet av (dato/sign):	03.04.19. <i>vanuat</i>	Godkjent av (dato/sign):	5/4-19 <i>SUNNA</i>

For dato: _____ kl: _____

Etiketter skrevet ut og kontrollert:

Skrevet ut 11 primæretiketter til sprøyte (antall sprøyter som skal produseres + 2 til dokumentasjon). Sign: _____ / _____

Skrevet ut 2 sekundæretiketter til eske (1 til esken og 1 til dokumentasjon). Sign: _____ / _____

Produksjonssted (kryss av):	Isolator på pumperom	Sikkerhetsbenk på Lille Steril	LAFbenk på Store Steril	Tilsetningsrom
Produksjonssone klargjort:	LAFenhet er på og ryddet/rengjort.	Dato/ kl.slett:		
	Forrige produksjon er fjernet.	Sign (T):		

INNHALDSSTOFF	Mengde	Antall hetteglass, OBS: ta tre hgl med samme batchnummer!	Batchnr.	Sign (T):	Sign (F):	Anm.
Eylea 40 mg/ml inj. væske	0,05 ml	3				100 µl hgl (0,1 ml)

UTSTYR	Type utstyr, produsent, størrelse etc.	Antall	Batchnr.	Sign (T):	Anm.
Kanyler	Filterkanyler, 18G, 5 µm (i Eylea pakning). Refnr 305211	1			
1 ml-sprøyte	B Braun Injekt-F Tuberkulin. Refnr: 1000002IM	1			
0,5 ml sprøyte	SOL-care U100 - 0,5 ml. Refnr 100002IM	9			
Ytter-emballasje	Intervoid steril pose (sluses inn med ytterposen på)	9			

Fremgangsmåte: Produseres med aseptisk arbeidsteknikk

- Desinfiser gummimembranen til Eylea hetteglasset i 1 minutt. Gni membranen godt med kompress idet kompressen fjernes.
- Sett filterkanylen på 1 ml-sprøyten
- Trekk forsiktig opp hele innholdet med Eylea (3 hgl) opp i sprøyten ved å holde hetteglasset i opprett posisjon og litt på skrå. Få med innhold fra filterkanylen over i sprøyten.
- Legg fra deg sprøyten på en kompress uten at tuppen berører kompressen, eller sett på en steril kork.
- Inspiser en 0,5 ml sprøyte. Den skal ikke inneholde partikler/tråder.
- Ta av hetten til 0,5 ml-sprøyten og legg den på en kompress.
- Trekk opp 0,05 ml Eylea i 0,5 ml-sprøyten ved å føre kanylen inn i 1 ml-sprøyten uten å berøre kantene.
- Sjekk for fravær av luftbobler og at kanylen er rett. Sett på kanylehetten til 0,5 ml-sprøyten.
- Gjenta punkt 5.-8. til ønsket antall sprøyter.
- Legg 0,5 ml-sprøytene i hver sin sterile Intervoidpose og forsegl posen.
- Sprøytene sluses ut av benken.
- Påfør holdbarhet på etikettene og etiketter posene.
- Farmasøyt pakker posene i en eske og merker med samleetikett.

HOLDBARHET: 24 timer i kjøleskap (12 timer i romtemperatur) og beskyttet mot lys.

PROSEDYREKONTROLL			
	KRAV	Sign (T):	Sign (F):
Visuell kontroll	Klar løsning Fri for synlige luftbobler og partikler Emballasje er tett og aseptisk pakket Nålen er ikke skadet		
Volumkontroll	Hver sprøyte skal inneholde 0,05 ml.		

Side 1/2

Utskrevet av (dato/sign):	03.04.19. vankat	Godkjent av (dato/sign):	S/4-19 SNWA
---------------------------	------------------	--------------------------	-------------

ETIKETTER	
Primæretikett til sprøyte: Aflibercept (Eylea) 40 mg/ml 0,05 ml SPRØYTE 15.11.18 AFLIBERCEPT - EYLEA® TIL INTRAVITREALT BRUK FOR DATO: dd.mm.åå AVDELING: Øyeavdelingen 1 x 0,05 ml sprøyte Sprøyten inneholder: Aflibercept (Eylea®) 40 mg/ml inj.væske 0,05 ml Oppbevares i kjøleskap og beskyttet mot lys Anvendes før dato: dd.mm.åå kl. <small>* - SJUXXHUSAPOTTEKA VEST HF Sjukehusapoteket i Bergen</small> K.nr: Txxxxxxx	Sekundæretikett til eske: Aflibercept (Eylea) 40 mg/ml 0,05 ml ESKE 15.11.18 AFLIBERCEPT - EYLEA® TIL INTRAVITREALT BRUK FOR DATO: dd.mm.åå AVDELING: Øyeavdelingen ___ x 0,05 ml sprøyter Sprøytene inneholder: Aflibercept (Eylea®) 40 mg/ml inj.væske 0,05 ml Oppbevares i kjøleskap og beskyttet mot lys Anvendes før dato: dd.mm.åå kl. <small>* - SJUXXHUSAPOTTEKA VEST HF Sjukehusapoteket i Bergen</small> K.nr: Txxxxxxx

ETIKETTREGNSKAP SPRØYTER - TEKNIKER	
Primæretikett til sprøyte: Antall etiketter skrevet ut og kontrollert: _____ sign : _____ Brukt til sprøyte: _____ sign : _____ Brukt til dokumentasjon: _____ sign : _____ Kassert: _____ sign : _____ Differanse (skal være 0): _____ sign : _____	

Etiketter til dokumentasjon:

Første etikett til sprøytepose (etiketteres av produsent)

Siste etikett til sprøytepose (etiketteres av produsent)

Etikett til eske (etiketteres av farmasøyt som kontrollerer)

Tilberedt av/produksjonen avsluttet (kl.slett dato/sign (T)):		Produksjonen godkjent (dato/sign (F)):	
Ordrenr./Reseptnr.:		Fakturert Dato/sign:	

7.3 Produktspesifikasjon Trypton Soya Buljong (Sigma-Aldrich)

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Tryptic Soy Broth – Microbiologically tested.

Product Number: T8907

TEST	Specification
pH	7.1 - 7.5
At room temperature	
Microbiological Test	Pass
Growth of the following microorganisms was observed:	
Bacteroides vulgatus	
Escherichia coli	
Neisseria meningitidis	
Staphylococcus aureus	
Staphylococcus epidermidis	
Streptococcus pneumoniae	
Streptococcus pyogenes	
USP growth of the following microorganisms was observed:	
Aspergillus niger	
Bacillus subtilis	
Candida albicans	
Micrococcus luteus	
Expiration Dated Product	-----

Specification: PRD.3.ZQ5.10000009321

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

7.4 Produktspesifikasjon BioBall – Pakning nr. 1 (Biomérieux)



BIOBALL™
Certificate of Analysis

Certified Reference Material Data

This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31:2015

Organism*: *Escherichia coli*
Designation: NCTC 12923
Cell Type: Cell
Reference: 56034 ^{20 Vials}
Date of Manufacture: 6 May 2019
Expiry Date: 5 May 2021

The Organism and Designation of the Certified Reference Material is traceable to NCTC (National Collection of Type Cultures)

Culture Information

No. of Passages: 4
QC Media: Nutrient agar
Plate Incubation Time (hrs): 14 - 24
Plate Incubation Temp °C: 37 Aerobic

Note: Number of passages are indicated from the original strain assuming original strain is zero.

Lot Number: **B5261**

Quantification Data <i>(Method Ref: BB-030)</i>	
cfu Count per BIOBALL™	
Mean CFU (i)	SD (ii)
28.7	2.7
Expanded Uncertainty (iii)	
8.3	
95% Prediction Interval (iv)	
Lower Limit	Upper Limit
23.2	34.1

The Mean CFU quantification (i) and associated SD (ii) are traceable to natural number counts of visible colonies on agar media.

Characterisation, Certified Values and Uncertainties

Characterisation

Method	Identity
16s Sequencing	<i>Escherichia coli</i>

Bacteria strains are confirmed by 16s Microbial Screen genetic typing at AGRF (Australian Genome Research Facility) using E value resulting. The Expect value (E) is a parameter that describes the number of hits one can 'expect' to see by chance when searching a database of particular size. It decreases exponentially as the score of the match increases. The lower the E value, or the closer to zero, the more 'significant' the match is.

Enumeration Method

A) BB-010 Quality Control Testing BIOBALL™

The test values were obtained by rehydrating Bioball product using RHF (Rehydrating Fluid) and plating aliquots onto QC media (as stated in "Culture Information") for incubation, counting and reporting in accordance to statistical sampling based on batch size.

B) BB-004 BIOBALL™ Stability

Accelerated stability testing is performed by subjecting product at 1 week for 22°C and enumerating results in accordance to method BB-010. Routine long term stability testing is performed by testing product at 13 and 25 month intervals and enumerating results in accordance to method BB-010.



Accredited for compliance with ISO 17034
Accredited Reference Material Producer
Accreditation Number: 14993
Site Number: 15276

* NATA accreditation does not cover the performance of this service.

Issue: 2
Date: 10/05/2019
Page 1 of 3

BIOBALL™ with an assigned property value in terms of CFU is used as a calibrant or measurement trueness control material. This CRM has been produced in a way where metrological traceability to volume and mass has been evaluated along with associated parameters such as temperature to support the entire traceability chain.

I) The certified value represents the unweighted mean cfu counts from a statistically relevant number of samples covering the entire product batch. The characterization uncertainty μ (characterization) represents the dispersion of measurement values, calculated as standard deviation.

II) The Standard Deviation is a measure of variability within the batch.

III) Expanded combined standard uncertainty, $\mu(CRM)$, is calculated as the square root of the sum of squares of the individual contributions (characterization, homogeneity, stability), according to:

$$\mu(CRM) = \sqrt{\mu_{char}^2 + \mu_{homogeneity}^2 + \mu_{stability}^2}$$

The Expanded Uncertainty, $U(CRM)$ is reported at the 95% Confidence Level with a coverage factor $k=2$: $U(CRM) = \mu(CRM) * k$.

IV) The Prediction Interval is a statistical analysis of the quality data stating that 95% of expected results will fall within this range.

Description:

BIOBALL™ is a freeze dried water soluble ball containing a precise number of micro-organisms. The ball is a white sphere approximately 3mm in diameter.

Intended Use:

BIOBALL™ is a microbiological reference material containing a precise number of viable bacterial cells. It is designed for use as a quantitative quality control sample.

Storage and Handling:

Store BIOBALL™ at -18°C to -33°C.

Instructions for Use:

To Open BIOBALL™ Aseptically remove stopper.

Agar Plate

1. Tip BIOBALL™ into the centre of the plate.
2. Rehydrate by pipetting 100 μ L of sterile water or 0.9% saline solution directly onto BIOBALL™.
3. Wait 30 seconds for BIOBALL™ to dissolve.
4. Use a sterile plastic spreader to evenly spread the dissolved BIOBALL™ over the plate surface.
5. Ensure plate is dry before inverting and incubating.

Membrane Filtration

1. Tip BIOBALL™ into liquid sample.
2. Mix by repeatedly inverting sample
3. Filter the sample using standard test method.
4. Follow standard test method for incubation

Pour Plate

1. Pipette 1ml of sterile water or 0.9% saline solution into pour plate.
2. Tip BIOBALL™ into the sterile water/saline solution.
3. Wait 30 seconds for BIOBALL™ to dissolve.
4. Add molten agar and mix according to standard test method.
5. Incubate as required.

Petrifilm®

1. Tip BIOBALL™ onto the centre of Petrifilm®.
2. Rehydrate by pipetting 100 μ L of sterile water or 0.9% saline solution directly onto BIOBALL™.
3. Follow standard test method.
4. Incubate as required.
5. Petrifilm® is a registered trademark belonging to 3M™ Corporation.

Adding to Samples/Broths

1. Tip BIOBALL™ into sample/broth
2. Mix
3. Incubate as required

Stability:

Long term stability of BIOBALL™ is determined and analysed by testing a reduced number of batches over the entire shelf life of all products.

Short term stability of BIOBALL™ is determined and analysed by simulation of product shipment and transport at elevated temperatures and subsequent testing of the product.

Homogeneity:

Homogeneity is tested and confirmed by analysis of a statistically relevant number of samples covering the entire production batch by means of statistical models (ANOVA). The uncertainty related to homogeneity of the product, μ (homogeneity) is a component of the expanded uncertainty value noted in the Certified Values section.

Hazardous information:

BIOBALL™ contains viable and potentially pathogenic bacteria and should only be handled by experienced laboratory personnel trained in the safe handling of these micro-organisms. Refer to your national safety guidelines.

Please refer to the Safety Data Sheet (available online <http://bioball.com/bioball/msds/>).

References:

- [1] ISO Guide 30 Reference materials - Selected terms and definitions
- [2] ISO Guide 31 Reference materials - Contents of certificates labels and accompanying documentation
- [3] ISO17034 General requirements for the Competence of Reference material Producers
- [4] ISO Guide 35 Reference materials - Guidance for characterisation and assessment of homogeneity and stability
- [5] AS ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [6] Guide 98-3 Uncertainty of Measurement - Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement

Approved Quality Signatory:

Rebecca Xu

5 June 2019

Manufactured by:

BTF Pty Ltd - A bioMérieux Company
Unit 1, 35-41 Waterloo Road, North Ryde, 2113, Australia
Tel. 61 (0) 2 8877 9150
Fax. 61 (0) 2 8221 9589
www.bioball.com

Sales and General enquiries:

bioMérieux S.A
69280 Marcy l'Étoile - France
Tel. 33 (0) 4 78 87 20 00
Fax. 33 (0) 4 78 87 20 90
www.biomerieux-industry.com

Issue: 2
Date: 10/05/2019
Page 3 of 3

7.5 Produktspesifikasjon BioBall – Pakning nr. 2 (Biomérieux)



BIOBALL™
Certificate of Analysis

Certified Reference Material Data

This certificate is designed in accordance with ISO Guide 31:2015

Organism*: *Escherichia coli*
Designation: NCTC 12923
Cell Type: Cell
Reference: 56034 20 Vials
Date of Manufacture: 25 July 2019
Expiry Date: 24 July 2021

The Organism and Designation of the Certified Reference Material is traceable to NCTC (National Collection of Type Cultures)

Culture Information

No. of Passages: 4
QC Media: Nutrient agar
Plate Incubation Time (hrs): 14 - 24
Plate Incubation Temp °C: 37 Aerobic

Note: Number of passages are indicated from the original strain assuming original strain is zero.

Lot Number: B5450

Quantification Data	
<small>(Method Ref: BB-030)</small>	
cfu Count per BIOBALL™	
Mean CFU (i)	SD (ii)
30.5	2.2
Expanded Uncertainty (iii)	
6.4	
95% Prediction Interval (iv)	
Lower Limit	Upper Limit
26.0	34.9

The Mean CFU quantification (i) and associated SD (ii) are traceable to natural number counts of visible colonies on agar media.

Characterisation, Certified Values and Uncertainties

Characterisation

Method	Identity
16s Sequencing	<i>Escherichia coli</i>
Bacteria strains are confirmed by 16s Microbial Screen genetic typing at AGRF (Australian Genome Research Facility) using E value resulting. The Expect value (E) is a parameter that describes the number of hits one can 'expect' to see by chance when searching a database of particular size. It decreases exponentially as the score of the match increases. The lower the E value, or the closer to zero, the more 'significant' the match is.	

Enumeration Method

A) BB-010 Quality Control Testing BIOBALL™

The test values were obtained by rehydrating Bioball product using RHF (Rehydrating Fluid) and plating aliquots onto QC media (as stated in "Culture Information") for incubation, counting and reporting in accordance to statistical sampling based on batch size.

B) BB-004 BIOBALL™ Stability

Accelerated stability testing is performed by subjecting product at 1 week for 22°C and enumerating results in accordance to method BB-010. Routine long term stability testing is performed by testing product at 13 and 25 month intervals and enumerating results in accordance to method BB-010.



Accredited for compliance with ISO 17034
Accredited Reference Material Producer
Accreditation Number: 14993
Site Number: 15276

* NATA accreditation does not cover the performance of this service.

Issue: 2
Date: 10/05/2019
Page 1 of 3

BIOBALL™ with an assigned property value in terms of CFU is used as a calibrant or measurement trueness control material. This CRM has been produced in a way where metrological traceability to volume and mass has been evaluated along with associated parameters such as temperature to support the entire traceability chain.

I) The certified value represents the unweighted mean cfu counts from a statistically relevant number of samples covering the entire product batch. The characterization uncertainty μ (characterization) represents the dispersion of measurement values, calculated as standard deviation.

II) The Standard Deviation is a measure of variability within the batch.

III) Expanded combined standard uncertainty, $\mu(\text{CRM})$, is calculated as the square root of the sum of squares of the individual contributions (characterization, homogeneity, stability), according to:

$$\mu(\text{CRM}) = \sqrt{\mu_{\text{char}}^2 + \mu_{\text{homogeneity}}^2 + \mu_{\text{stability}}^2}$$

The Expanded Uncertainty, $U(\text{CRM})$ is reported at the 95% Confidence Level with a coverage factor $k=2$: $U(\text{CRM}) = u(\text{CRM}) * k$.

IV) The Prediction Interval is a statistical analysis of the quality data stating that 95% of expected results will fall within this range.

Description:

BIOBALL™ is a freeze dried water soluble ball containing a precise number of micro-organisms. The ball is a white sphere approximately 3mm in diameter.

Intended Use:

BIOBALL™ is a microbiological reference material containing a precise number of viable bacterial cells. It is designed for use as a quantitative quality control sample.

Storage and Handling:

Store BIOBALL™ at -18°C to -33°C.

Instructions for Use:

To Open BIOBALL™ Aseptically remove stopper.

Agar Plate

1. Tip BIOBALL™ into the centre of the plate.
2. Rehydrate by pipetting 100 μL of sterile water or 0.9% saline solution directly onto BIOBALL™.
3. Wait 30 seconds for BIOBALL™ to dissolve.
4. Use a sterile plastic spreader to evenly spread the dissolved BIOBALL™ over the plate surface.
5. Ensure plate is dry before inverting and incubating.

Membrane Filtration

1. Tip BIOBALL™ into liquid sample.
2. Mix by repeatedly inverting sample.
3. Filter the sample using standard test method.
4. Follow standard test method for incubation.

Pour Plate

1. Pipette 1ml of sterile water or 0.9% saline solution into pour plate.
2. Tip BIOBALL™ into the sterile water/saline solution.
3. Wait 30 seconds for BIOBALL™ to dissolve.
4. Add molten agar and mix according to standard test method.
5. Incubate as required.

Petrifilm®

1. Tip BIOBALL™ onto the centre of Petrifilm®.
2. Rehydrate by pipetting 100 μL of sterile water or 0.9% saline solution directly onto BIOBALL™.
3. Follow standard test method.
4. Incubate as required.
5. Petrifilm® is a registered trademark belonging to 3M™ Corporation.

Adding to Samples/Broths

1. Tip BIOBALL™ into sample/broth
2. Mix
3. Incubate as required

Stability:

Long term stability of BIOBALL™ is determined and analysed by testing a reduced number of batches over the entire shelf life of all products.

Short term stability of BIOBALL™ is determined and analysed by simulation of product shipment and transport at elevated temperatures and subsequent testing of the product.

Homogeneity:

Homogeneity is tested and confirmed by analysis of a statistically relevant number of samples covering the entire production batch by means of statistical models (ANOVA). The uncertainty related to homogeneity of the product, μ (homogeneity) is a component of the expanded uncertainty value noted in the Certified Values section.

Hazardous information:

BIOBALL™ contains viable and potentially pathogenic bacteria and should only be handled by experienced laboratory personnel trained in the safe handling of these micro-organisms. Refer to your national safety guidelines.

Please refer to the Safety Data Sheet (available online <http://bioball.com/bioball/msds/>).

References:

- [1] ISO Guide 30 Reference materials - Selected terms and definitions
- [2] ISO Guide 31 Reference materials - Contents of certificates labels and accompanying documentation
- [3] ISO17034 General requirements for the Competence of Reference material Producers
- [4] ISO Guide 35 Reference materials - Guidance for characterisation and assessment of homogeneity and stability
- [5] AS ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [6] Guide 98-3 Uncertainty of Measurement - Part 3: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement

Approved Quality Signatory:

Rebecca Xu

6 September 2019

Manufactured by:

BTF Pty Ltd - A bioMérieux Company
Unit 1, 35-41 Waterloo Road, North Ryde, 2113, Australia
Tel. 61 (0) 2 8877 9150
Fax. 61 (0) 2 8221 9589
www.bioball.com

Sales and General enquiries:

bioMérieux S.A.
69280 Marcy l'Etoile - France
Tel. 33 (0) 4 78 87 20 00
Fax. 33 (0) 4 78 87 20 90
www.biomerieux-industry.com

Issue: 2
Date: 10/05/2019
Page 3 of 3

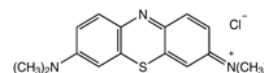
7.6 Produktspesifikasjon Metylenblått (Alfa Aesar)

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Product Specification

42771 Methylene Blue, 1% w/v aq. soln.

Product Number: 42771
MDL number: MFCD00012111
Molecular formula: C₁₆H₁₈ClN₃S
Molecular weight: 319.86



Product Specification

Concentration (w/v): Methylene Blue, 1% w/v aq. soln

Date of Print: January 14, 2020

Version: 1

Product Specifications are subject to amendment and may change over time.

Order our products online at alfa.com

7.7 Vedlegg til resultat

7.7.1 Målt absorbans av metylenblått til kalibreringskurve

Tabell 7: Resultat fra målingene av de ulike konsentrasjonene metylenblått til kalibreringskurven.

Konsentrasjon av metylenblått i løsnings [mg/L]	Gjennomsnittlig målt absorbans ved 663 nm
10	1,677
5	0,8547
2,5	0,411
1,25	0,1703
0,625	0,069
0,313	0,025

7.7.2 Forsøk for å finne deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret

Tabell 8: Resultat fra målingene av de seks blanke prøvene som ble brukt til beregning av deteksjonsgrensen for UV-spektrofotometeret.

Blank prøve	Gjennomsnittlig absorbans	Parallell	Målt absorbans ved 663 nm
1	0,0077	1	0,007
		2	0,008
		3	0,008
2	0,007	1	0,007
		2	0,007
		3	0,007
3	0,007	1	0,007
		2	0,007
		3	0,007
4	0,007	1	0,007
		2	0,007
		3	0,007
5	0,008	1	0,008
		2	0,008
		3	0,008
6	0,008	1	0,008
		2	0,008
		3	0,008

Tabell 9: Beregnet gjennomsnitt og standardavvik fra målingene av de seks blanke prøvene. Verdiene i tabellen ble brukt til å beregne deteksjonsgrensen til UV-spektrofotometeret.

Parameter	Verdi
<i>Gjennomsnitt</i>	0,0074
<i>Gjennomsnitt omgjort til konsentrasjon vha. kalibreringskurven (Figur 28)</i>	0,2155 mg/L
<i>Standardavvik</i>	0,0005