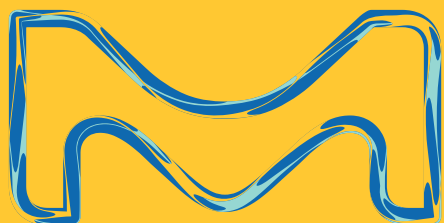


ИСПЫТАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ И АПИРОГЕННОСТЬ



Алексей Ельфимов, к.б.н.,
Merck Life Sciences, BioMonitoring
30 ноября 2020г.



The life science business of Merck operates
as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Millipore®

Preparation, Separation,
Filtration & Testing Products

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ НОРМАТИВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ

➤ cGMP

- “Для каждой партии продукта, который должен быть **стерильным** и/или **апирогенным**, следует проводить **соответствующие лабораторные испытания для установления соответствия продукта данным требованиям**”
21CFR211.167 (a)

➤ European Pharmacopoeia

- „ Тест применяется к субстанциям, препаратам или веществам, которые, согласно Фармакопее, должны быть стерильными.“

➤ ГФ РФ XII

- „ Лекарственные средства для инъекций и инфузий, глазные капли, мази, пленки и другие препараты и субстанции, в отношении которых имеются соответствующие указания в документации, должны быть стерильными, **то есть не содержать микроорганизмов**“

➤ ГФ РФ XIV

„ ...испытания на стерильность различных лекарственных средств (ЛС)..., которые в соответствии с нормативной документацией или фармакопейными статьями должны быть стерильными“

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ОСОБЕННОСТИ

- Тест на наличие/отсутствие
- Вирусы и микоплазма не обнаруживаются
- Длительный период инкубации: 14 суток
- Основан на способности микроорганизмов к росту
- Предлагаются только 2 среды для обнаружения всех бактерий, дрожжей и плесеней
- Разрушающий тест
- Вероятностный характер теста:
 - Статистически несостоятельный, не репрезентативный, особенно при небольшом объеме упаковки
 - Проблема однородности лота: лот продукта считается однородным, если он приготовлен таким образом, что риск контаминации для всех его составляющих одинаковый.
 - Вероятность обнаружения микроорганизмов повышается с увеличением их числа в образце и варьирует в зависимости от способности к росту у разных видов микроорганизмов.

**ВАЛИДИРОВАТЬ И ПРОВОДИТЬ ТЕСТ НА
СТЕРИЛЬНОСТЬ В УСЛОВИЯХ, ПОЗВОЛЯЮЩИХ
ПОЛУЧАТЬ НАИБОЛЕЕ ДОСТОВЕРНЫЕ
ДААННЫЕ.**

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ НЕМНОГО ИСТОРИИ...

➤ 1932: первое описание испытания на стерильность: прямой посев – 2 среды, 5 суток инкубирования (BPh)



➤ 1957: метод мембранной фильтрации (МФ) одобрен для препаратов с антимикробным действием (FDA)



➤ 1966: метод МФ усовершенствован использованием гребенки (FDA). Использование промывных растворов

➤ 1974: Замкнутая система Steritest (Millipore)



➤ Начало 80х: первые изоляторы для контроля стерильности (La Calhène)

➤ 1983: специальная мембрана (Durapore, Millipore) для антибиотиков



➤ 1997: Время инкубации увеличено с 7 до 14 суток

Merck Millipore и испытание на стерильность



1973

- 45 лет опыта и превосходства
- 4 -е поколение канистр
- 15 разновидностей канистр
- 5 -е поколение насоса Стеритест



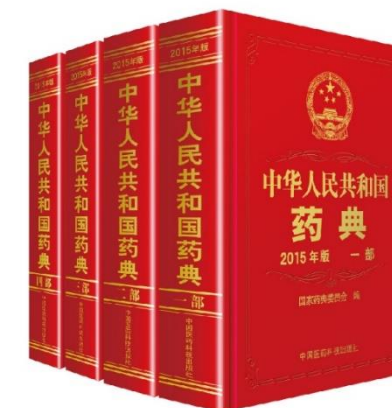
2020

Цель:

Упростить процедуру тестирования и добиться максимальной достоверности и воспроизводимости результата

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ НОРМАТИВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ

- Условия проведения
- Питательные среды
- Метод испытаний
- Минимальное количество образца для посева на каждую среду/ Минимальное число образцов для тестирования
- Стерильные растворы (промывные жидкости, растворители и др.)
- Проверка пригодности методики («валидационный тест»): бактериостатическое и фунгистатическое действие препарата
- Наблюдение и интерпретация



ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ УСЛОВИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Асептические условия

- Ламинар класса А в помещении класса В
- Изолятор (Iso5)

➤ Рабочие условия, в которых проводится испытание, регулярно контролируют соответствующим отбором проб и проведением необходимых анализов

➤ Меры предосторожности, принимаемые против контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в ходе испытания.

**Риск
ложного
положи-
тельного
результата!**

**Риск
ложного
отрица-
тельного
результата!**



Испытание на стерильность следует проводить в рабочей зоне с достаточным пространством (PIC/S, 2007)

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ – ГФ РФ

➤ Жидкая Тиогликолевая Среда

- Для выявления аэробных и анаэробных бактерий.
- Раствор резазурина натрия как индикатор окисления: если при хранении верхний слой (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, то среду можно регенерировать нагреванием (только один раз)
- Инкубация при 32.5°C +/- 2.5°C

➤ Жидкая Соево-Казеиновая Среда

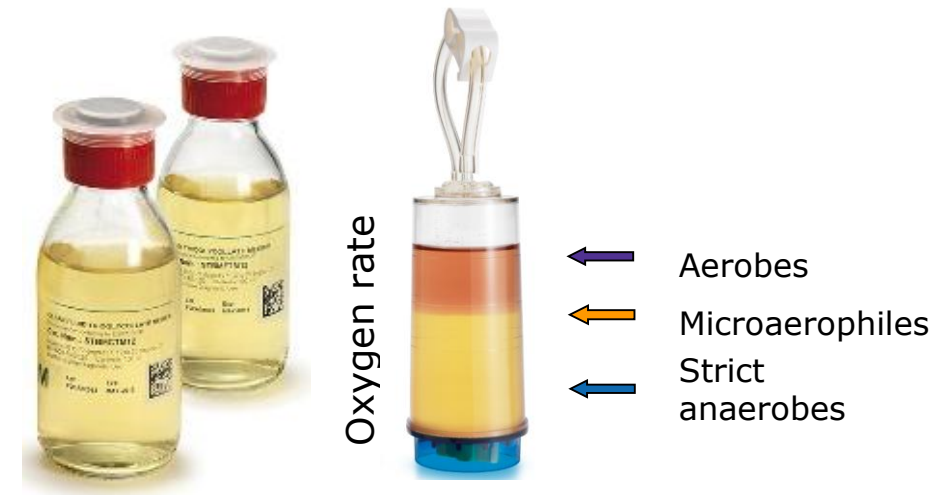
- Для выявления грибов и аэробных бактерий
- Инкубация при 22.5°C +/- 2.5°C

ИЛИ

➤ Жидкая Среда Сабуро

- Для выявления грибов
- Инкубация при 22.5°C +/- 2.5°C

При испытаниях на стерильность ИЛП не рекомендуется использование жидкой среды Сабуро, а только тиогликолевой среды в качестве универсальной с инкубацией при двух температурах.



ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Стерильные жидкости - USP

| Type | Characteristics | Application |
|--|--|---|
| Fluid A (USP) / neutral solution of meat or casein peptone (EP) | 0.1% Peptone: source of Carbon & Nitrogen pH $7.1 \pm 0.2^*$ maintained osmotic equilibrium (pH prior to sterilization) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Suitable as a general rinse buffer ▪ Works well with most samples ▪ Excellent to dissolve or dilute samples ▪ Excellent to reconstitute commercial microorganisms ▪ Excellent transport medium for microorganisms |
| Fluid D (USP) | 1 l Fluid A + 1 ml polysorbate 80 (0,1%) Polysorbate 80: will neutralize some preservatives Peptone: source of Carbon & Nitrogen pH $7.1 \pm 0.2^*$ maintained osmotic equilibrium (* prior to sterilization) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Suitable for testing specimens that contain lecithin or oil ▪ Excellent for rinsing sterile pathways of devices ▪ Works well with most antibiotics ▪ Needed for rinse method testing of Medical Devices |
| Fluid K (USP) (neutral solution with emulsifying agent (EP)) | Beef extract and peptone: provide nutrients for recovery of injured and fastidious microorganisms Polysorbate 80 at a concentration of 10 g/l (1 %) Polysorbate 80: will neutralize some preservatives pH 6.9 ± 0.2 maintained osmotic equilibrium (* prior to sterilization) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Suitable for testing specimens that contain petrolatum ▪ Suitable for oils and oily solutions ▪ Excellent for rinsing pathways of Medical Devices ▪ Good for "difficult" sample to filter or to dissolve samples |

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

МЕТОДЫ: ЕР, ЦСР, ГФ РФ...

- Прямой посев (более 100 лет)
- Мембранная фильтрация (более 50 лет)
 - Открытая система («открытая воронка»)
 - Замкнутая система



- Метод МФ предписывают для всех случаев, когда позволяет природа продукта
- Проведение негативного контроля

Преимущества

- Удобен для медицинских устройств
- Единственно возможный для нефилтруемых продуктов
- Меньше манипуляций, чем при методе «открытой воронки»

Ограничения

- Антимикробное действие продукта может подавлять рост
- Естественная мутность продукта
 - Необходим пересев
- Повышенные требования к асептике и валидации
- Непригоден для объемов более 100 мл
- Высокий риск ложных положительного и отрицательного результатов

Методы испытания

Мембранная фильтрация

- Мембранная фильтрация - предпочтительный метод для испытания на стерильность
- Необходимые условия и спецификация мембранного фильтра для контроля стерильности:
 - **Размер пор** (номинал)- не более 0.45 мкм
 - **Диаметр фильтра** - около 50 мм (ГФ – 47мм)
 - **Материал мембраны** : Нитрат целлюлозы / ацетат целлюлозы. **Специальные фильтры могут быть необходимы для некоторых продуктов, например антибиотиков**
 - **Скорость потока** воды в минуту, при давлении 13,5 psi (70 см рт.ст): 55 – 75 мл (USP 23, ГФ XI)

Методы испытания Мембранная фильтрация: открытая система

Открытая система



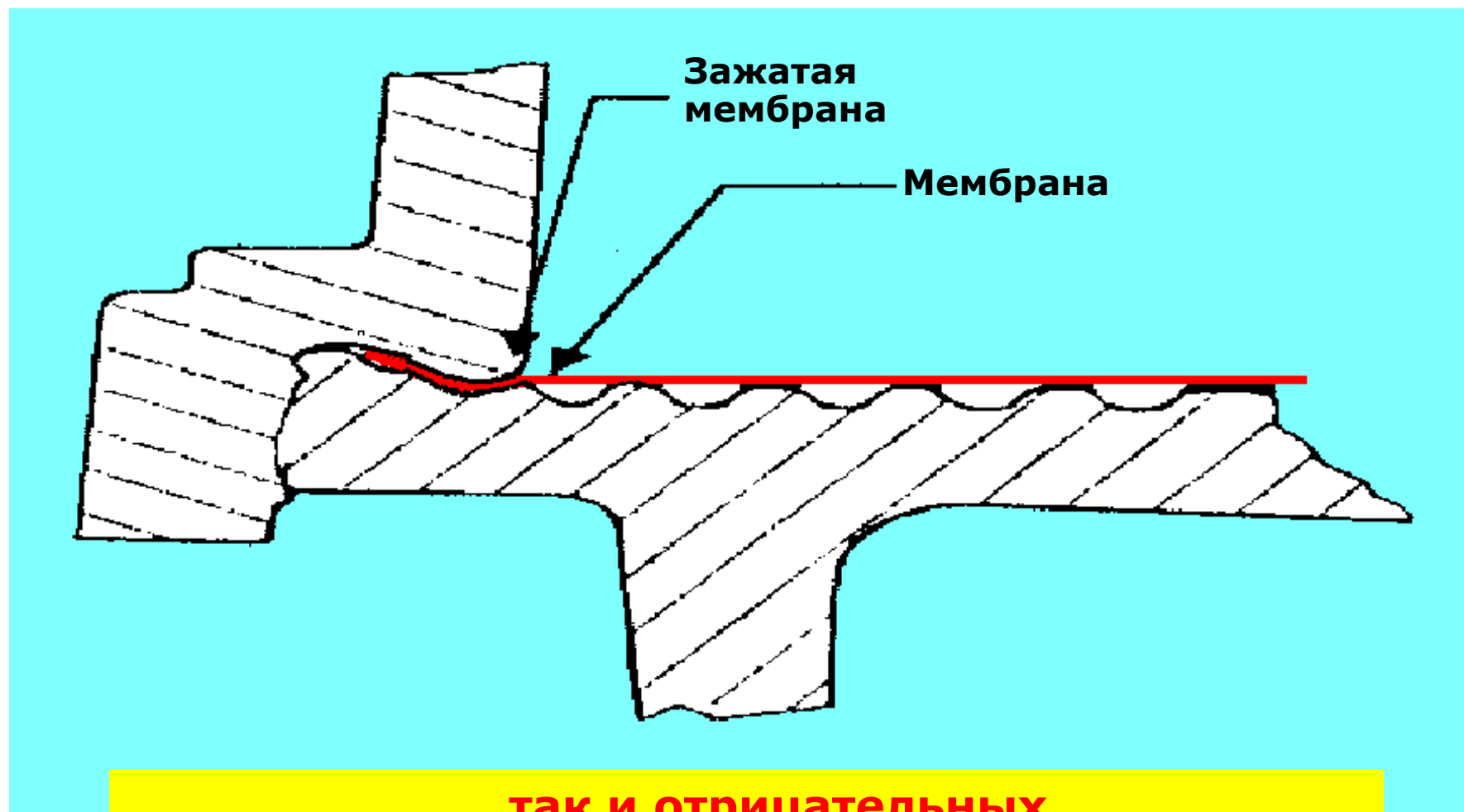
Риски

Открытая система связана с рисками ложных результатов:
как положительных...



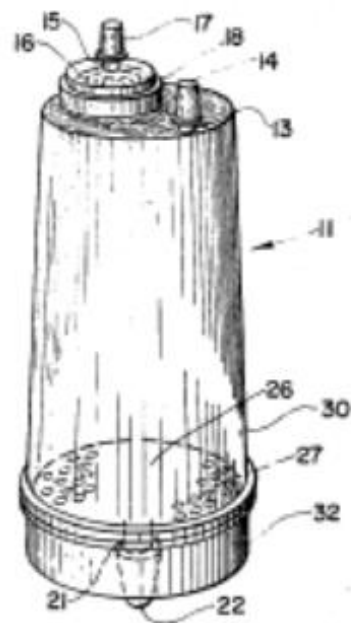
Методы Испытания

Мембранная Фильтрация: открытая система



... так и отрицательных

Методы испытания закрытый метод: система стеритест



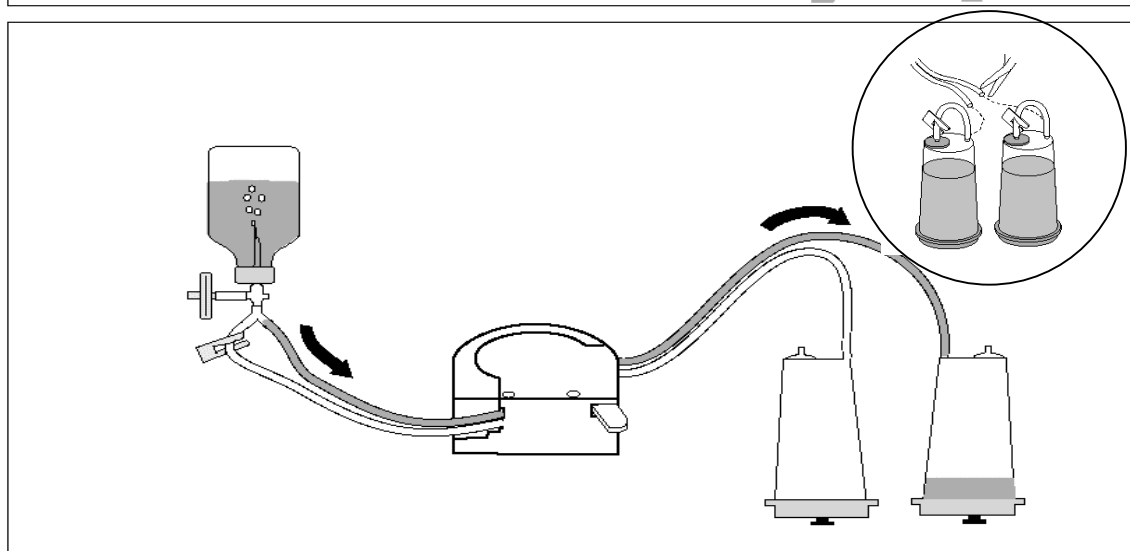
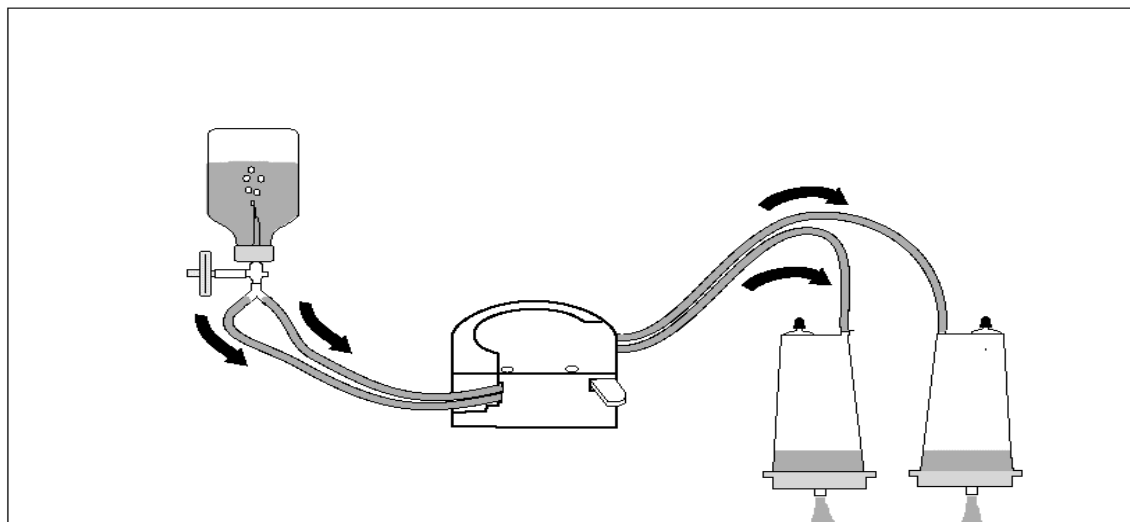
Принцип: образец должен быть изолирован от внешней среды во время фильтрации и инкубации

US Patent filed Nov. 6, 1974

« METHOD AND APPARATUS FOR
MEMBRANE FILTER STERILITY
TESTING »

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ

Закр́тый метод: система Стеритест



Методы испытания

Закрытый метод: Система Стеритест

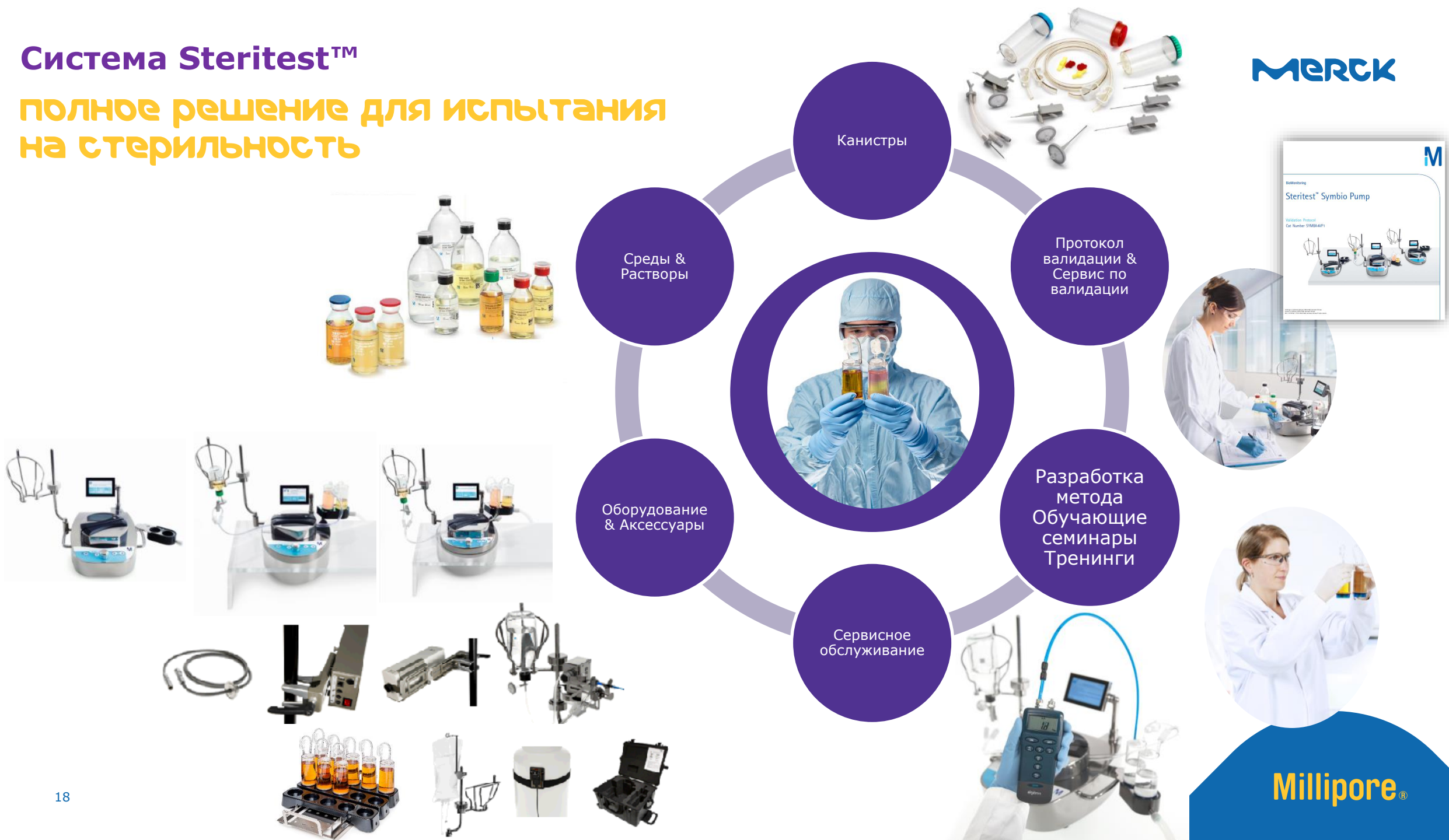


- Рекомендован Фармакопеями
- Уменьшает риск ложных результатов
- Фильтрация под давлением более эффективна, чем вакуумная
- Стерильная и готовая к использованию
- Позволяет отбирать продукт тем же образом, что и в реальных условиях применения.

Система Steritest™

полное решение для испытания на стерильность

MERCK





насосы steritest

Семейство Steritest™ Symbio

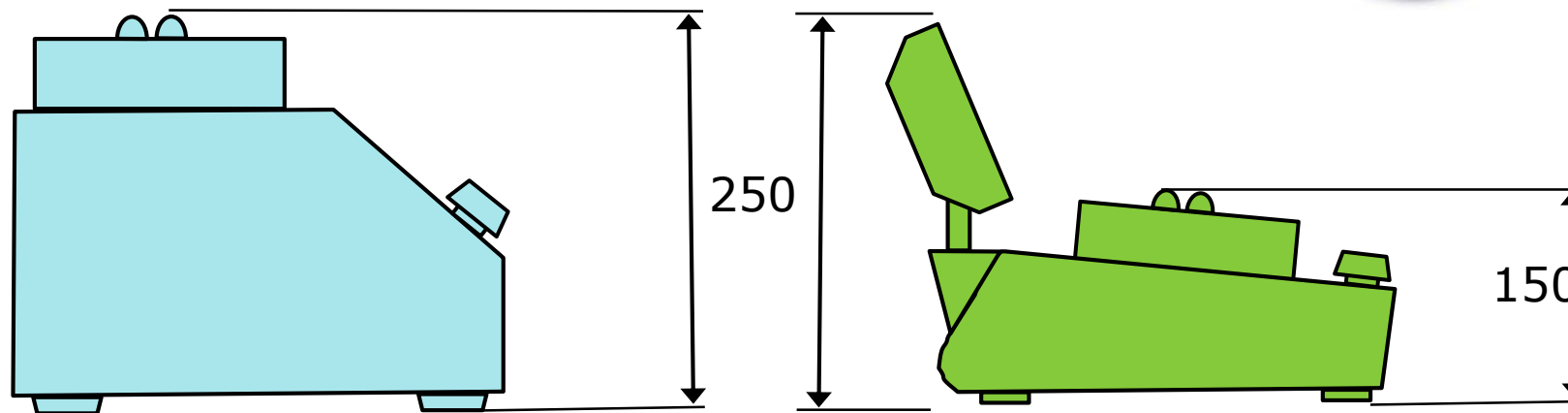
MERCK

Три модели – для разных вариантов установки

| | Steritest Symbio LFH | Steritest Symbio ISL | Steritest Symbio FLEX |
|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <p>Основной вариант</p> <p>Альтернатива</p> | | | |
| Ламинар | | | |
| Изолятор | | | |

низкий профиль – оптимизация рабочего пространства

Стеритест Симбио в сравнении с Эквиноксом:
Высота стала меньше (на 10 см ниже)



- легкая установка трубок в ламинарном шкафу
- улучшенная эргономика (вид контрольной панели стал значительно лучше и кнопка управления доступнее).

Steritest™ Symbio

MERCK

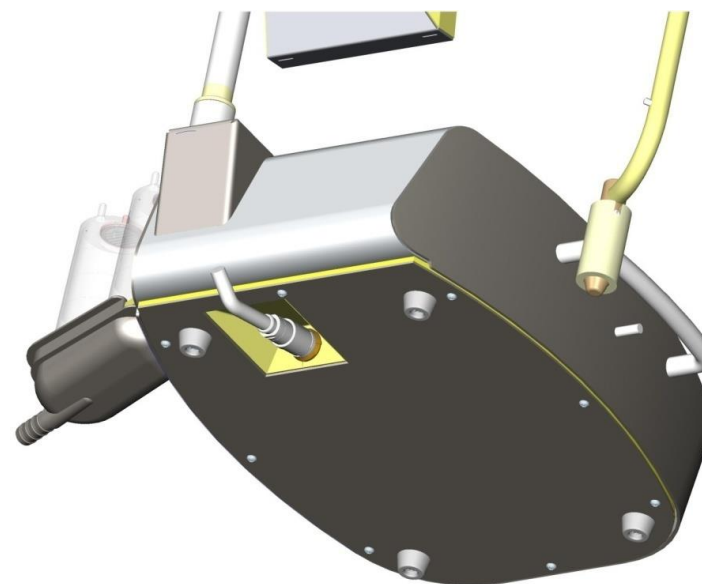
**крышка насоса закрывается автоматически –
простая и безопасная процедура установка трубок**



Время закрывания – 7 секунд

Millipore®

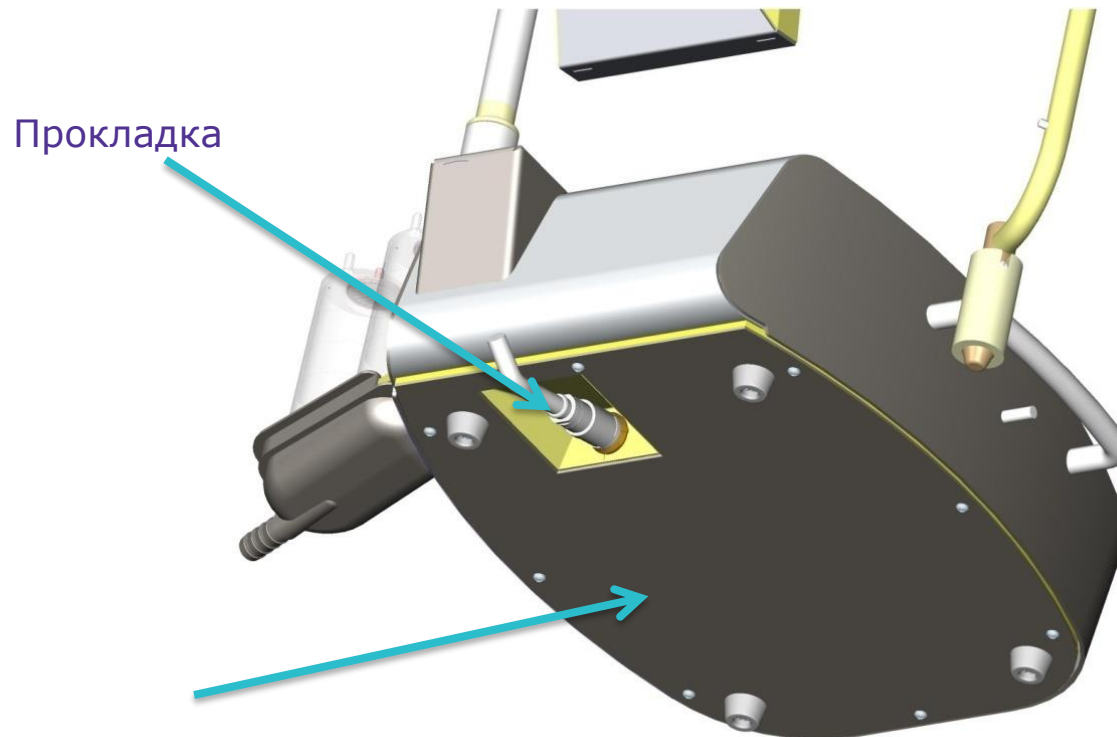
отсутствие резьбовых соединений, разъёмов, отверстий – облегчает процедуру дезобработки и повышает её эффективность



Steritest™ Symbio

Герметичность корпуса – возможность использования в изоляторах

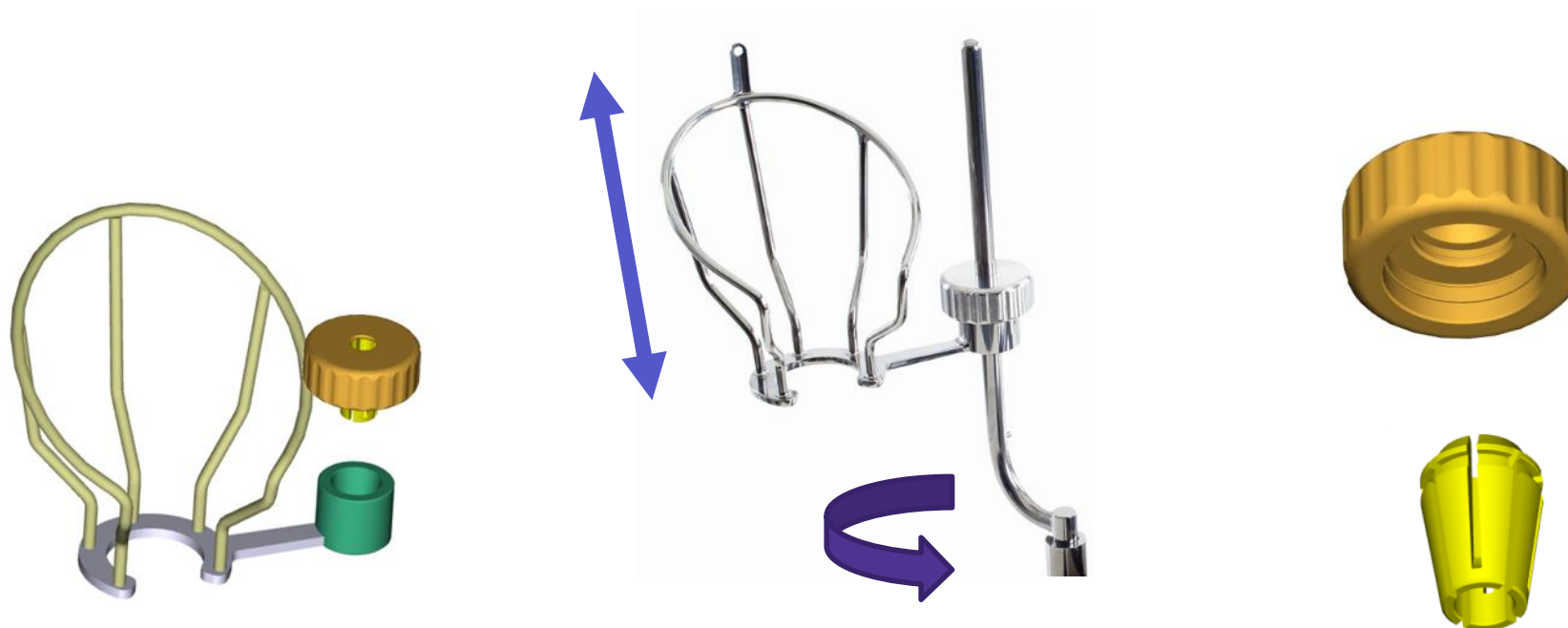
Оборудование для чистых зон: герметичные соединения и пассивный тип охлаждения предохраняют от выброса частиц



Steritest™ Symbio

эргономичный держатель флаконов

- Легко меняющаяся высота держателя для флаконов
- Легкая смена положения держателя для флаконов
- Простота дезобработки



Steritest™ Symbio

цветной экран

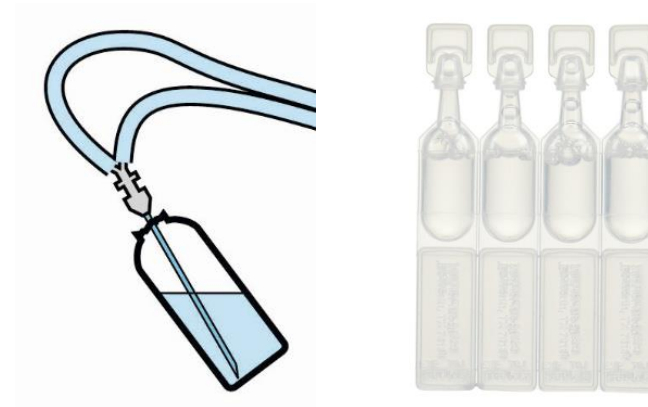
- 4,3 дюймовый (11 см) цветной LCD экран, с удобным размещением
- Подходит для различного типа ламинарных шкафов
- Легко меняющийся угол обзора (без резьбовых соединений)



таймер – точность отбора небольших образцов

Наиболее точная работа «функции таймера» на сегодняшний день: небольшие объемы отбираются еще более точно в сравнении с системой Эквинокс.

Уникальный дизайн ротора в дополнение к системе позиционирования самого ротора (впервые появилось на Эквинокс)



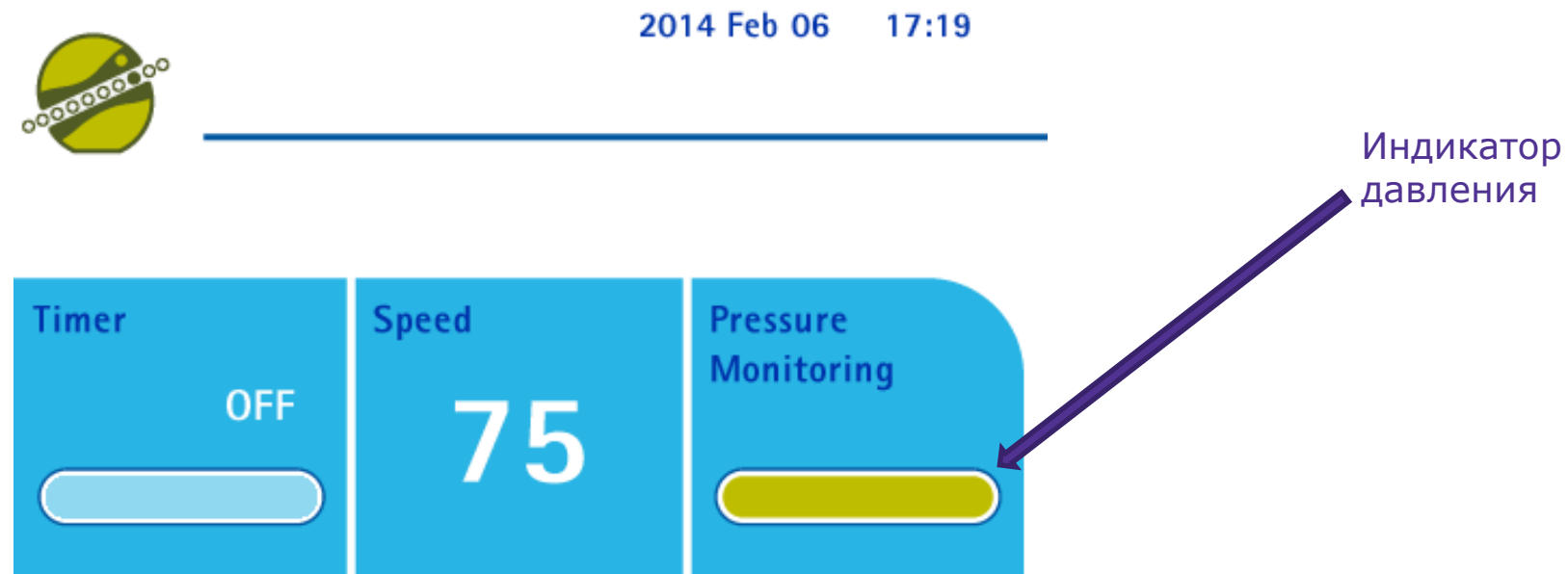
| Объем: 1,04 мл | Стеритест Эквинокс | Стеритест Симбио |
|----------------|--------------------|-------------------|
| Время переноса | 2,45 | 1,96 |
| | Speed 2 & Timer 1 | Speed 2 & Timer 1 |

- Воспроизводимость результатов на более высоком уровне
- Уровень безопасности значительно выше (нет дополнительной закачки воздуха)

КОНТРОЛЬ ДАВЛЕНИЯ ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА – ДОСТОВЕРНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТА

Усовершенствованная система контроля давления:

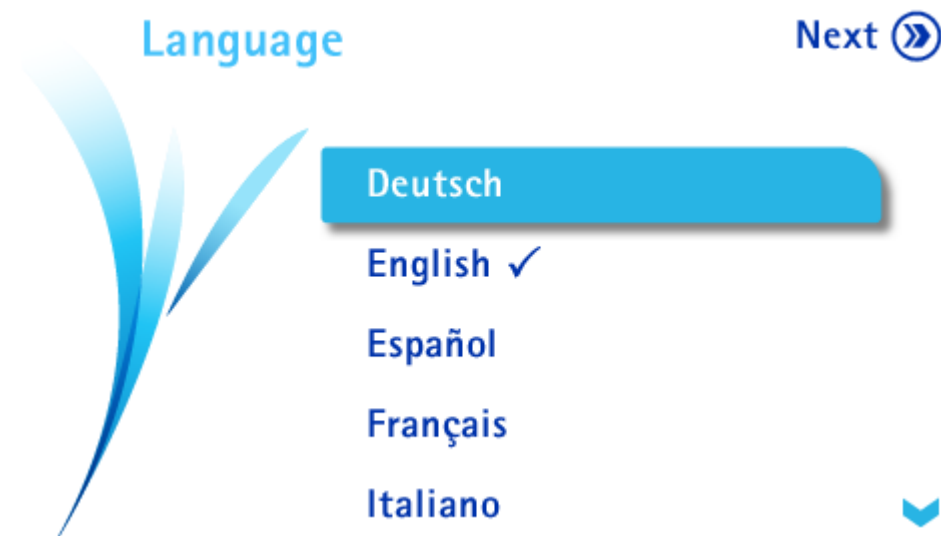
- Два режима контроля давления при переносе образца (Pressure Monitoring или Pressure Regulation)
- Легкость смены режимов
- Выбранный режим всегда виден
- Визуальный и звуковой сигналы оповещения



Steritest™ Symbio

выбор языка меню

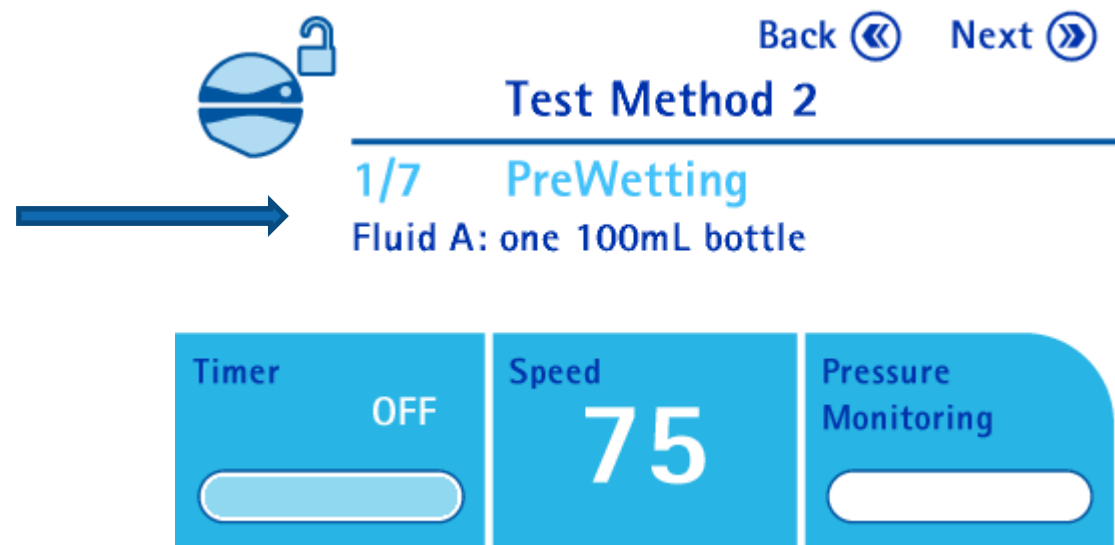
На выбор предоставлены следующие языки: **русский**, французский, английский, немецкий и др.



Steritest™ Symbio

режим предустановленного метода (test Method Mode)

Следуйте указаниям на экране насоса



- Экономия времени за счет предустановленных скоростей и значений таймера для каждого из шагов текущего анализа
- Отсутствие отклонений от процедуры испытания

простое ПО

Библиотека СОПов: можно внести до 250 протоколов, включающих 30 шагов каждый. Легкость переноса посредством USB (или кабелем)



Test methods library

A set of small icons for navigating the software interface, including symbols for home, back, forward, search, and other functions.

| Number | Title | Version | Status |
|-------------------------------|---------------|---------|---------|
| <input type="checkbox"/> 0001 | Test Method 1 | 2 | Current |
| <input type="checkbox"/> 0002 | Test Method 2 | 1 | Current |
| <input type="checkbox"/> 0003 | Test Method 3 | 4 | Current |
| <input type="checkbox"/> 0004 | Test Method 4 | 1 | Pending |
| <input type="checkbox"/> 0005 | Test method 5 | 1 | Current |



Доступно с сайта Merck

Бесплатно (нужна только регистрация)

Возможен импорт методик из Эквинокс

валидационный сервис

Выбор валидационных услуг:

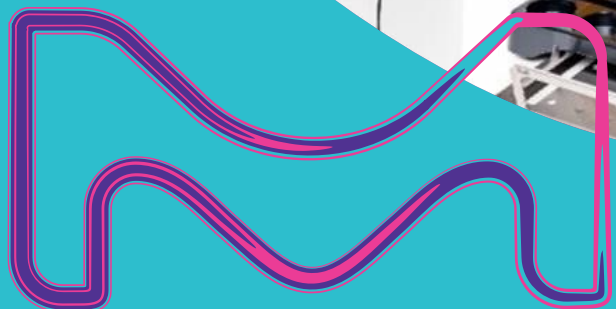
- Стандартный валидационный протокол – VMP/IQ/OQ/PQ/FR
- Проведение IQ/OQ на рабочем месте
- Консультации по проведению PQ





ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ НАСОСОВ SYMBIO

Устройства, облегчающие процедуру
тестирования



MERCK

Оптимизация рабочего пространства, безопасность оператора

MERCK

АМПУЛОВСКРЫВАТЕЛЬ **steritest_M**



- Независимый от насоса
- Сохраняет рабочую поверхность в чистоте, свободной от осколков стекла и капель образца
- Частицы стекла от ампул собираются в контейнер (до 40 ампул)
- Устойчивое основание

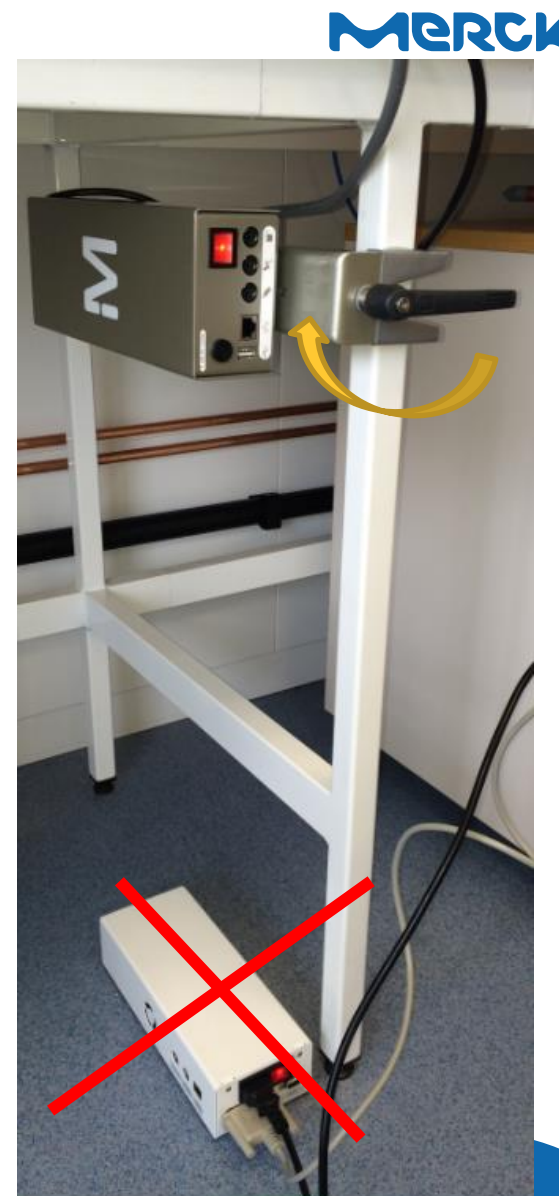
Millipore®

Оптимизация рабочего пространства

держатель для блока управления насоса

Может быть закреплён на ножке ламинара

- Нет необходимости ставить блок в ламинар, на пол или специальный стол
- Самый безопасное для блока место без риска повреждения



MERCK

Millipore®

держатель мешков

Легко устанавливается на стержень держателя флаконов.

- Появляется дополнительное пространство в ламинаре
- Устойчив к обработке парами H_2O_2 и автоклавированию



держатель венткамеры **steridilutor**[®]

Легко устанавливается на стержень держателя флаконов.

- С использованием этого держателя венткамера Steridilutor[®] всегда будет находиться выше уровня жидкости в системе, что гарантирует вентилирование флаконов с образцом и отсутствие протечек из-за остаточного давления
- Держатель устойчив к обработке парами H₂O₂ и автоклавированию

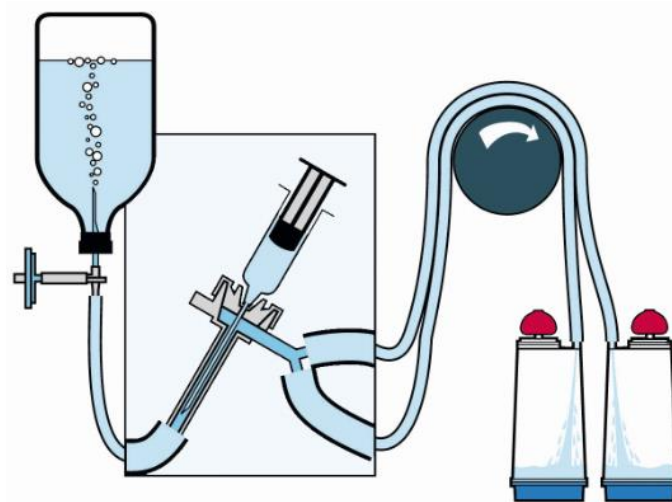


Безопасность манипуляций, стандартизация процедур
держатель шприцев



Легко устанавливается на стержень держателя флаконов.

- Облегчает и делает более безопасными для оператора манипуляции со шприцами



Уменьшение риска пролива фильтрата и приостановки испытания

MERCK

датчик переполнения сборника фильтрата

Легко устанавливается на разные типы контейнеров

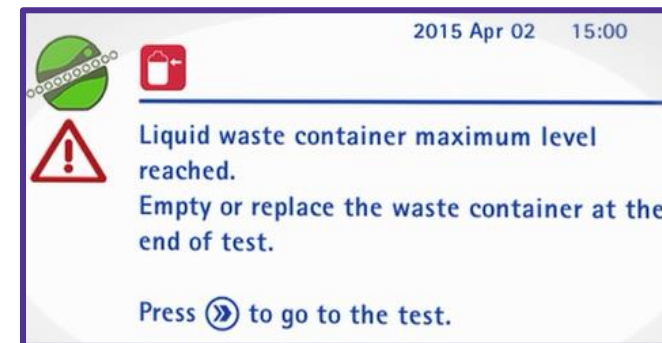


Контейнеры могут быть стеклянными, пластиковыми и непрозрачными



Спокойная уверенность: контейнер для сбора фильтрата обычно располагается внизу – с датчиком нет необходимости проверять уровень жидкости, чтобы избежать её пролива.

!!! ВНИМАНИЕ!!! Безопасность: некоторые жидкости могут быть опасными (радиофармацевтики, цитостатики...)



Millipore®

Оптимизация рабочего пространства, безопасность оператора

лотки для канистр **steritest** и подставка



- Один пластиковый лоток обеспечивает безопасный перенос и инкубацию 5 канистр
- Отсутствует риск выпадения канистры из лотка
- Капли среды остаются в лотке, если из-за неплотно установленных жёлтых заглушек произошла протечка
- Устойчив к обработке парами H_2O_2 и автоклавированию
- Возможность считывания результатов в 5 канистрах без их извлечения из лотка
- Экономия пространства
 - Штабелируются, если пустые
 - Отверстия для закрепления в изоляторе



- Переносная подставка – опция для пользователей с большим кол-вом тестов
- Вмещает 4 лотка (= 20 канистр)
- Нерж.сталь высококачественная
- Может использоваться и во время инкубации





ФИЛЬТРОЭЛЕМЕНТЫ steritest

Steritest™ NEO

MERCK

СИСТЕМА СТЕРИТЕСТ: ФИЛЬТРОЭЛЕМЕНТЫ (КАНИСТРЫ) 4 ПОКОЛЕНИЯ



Steritest™
зжатая мембрана



Steritest™ впаянная мембрана



Steritest™ EZ



Steritest™ NEO



Фильтроэлементы Steritest™ NEO

Удобно, надёжно, безопасно

MERCK



Зажимы разного цвета

Предустановленные на трубках зажимы разного цвета, как и черная маркировка одной из трубок, предотвращают ошибки при заполнении канистр средами и упрощают эту процедуру.



Градуировка 25 мл

Дополнительная отметка 25 мл на канистрах Steritest™ NEO делает процесс добавления жидкостей в канистры более точным.



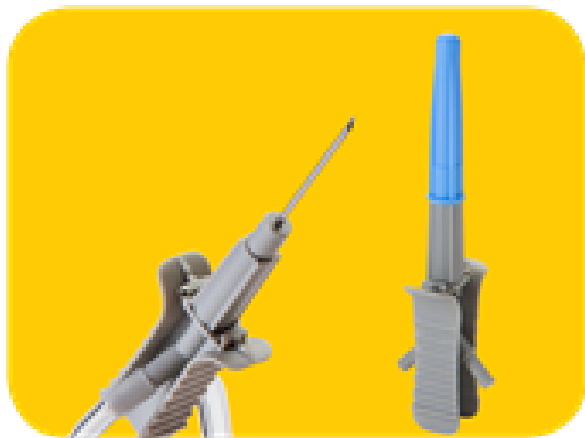
Новый конверт с заглушками

Открыть конверт теперь гораздо проще благодаря нанесённой заранее перфорации. Ножницы не нужны.

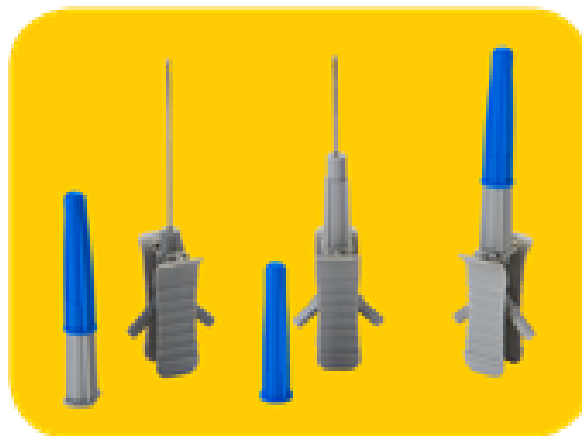
Фильтроэлементы Steritest™ NEO

Удобно, надёжно, безопасно

MERCK



Новый дизайн держателя иглы и её защитного колпачка с канавками и выступами, обеспечивает более легкую и безопасную работу с иглой руками в перчатках



Новые защитные колпачки из 2-х частей с цветовой кодировкой для наших LA, AB, SL и PC фильтроэлементов Steritest™ NEO с возможностью выбора короткой (35 мм) или длинной (60 мм) иглы в зависимости от размера контейнера



Новая короткая (20 мм) игла предназначена для очень маленьких упаковок, таких как картриджи или мягкие пластиковые контейнеры, когда вентиляция не требуется. Гораздо безопаснее по сравнению с длинной иглой

Фильтроэлементы Steritest™ NEO

Удобно, надёжно, безопасно



Цветовая кодировка на этикетке.

Быстрая идентификация коробок: выбрать коробку с нужными канистрами Steritest™ NEO теперь проще по этикетке благодаря рисунку пробоотборного узла и окрашенной полоске, цвет которой соответствует цвету основания канистр.



Снимаемая этикетка

Этикетку с коробки теперь можно снять и наклеить в лабораторный журнал, что облегчает работу с информацией.



Маркировка для установки трубок

Маркировка на трубках позволяет точно располагать их при заправке в головку насоса.

Фильтроэлементы Steritest™ NEO



Новые фильтроэлементы Steritest™ NEO не отличаются от предыдущих в отношении следующего:

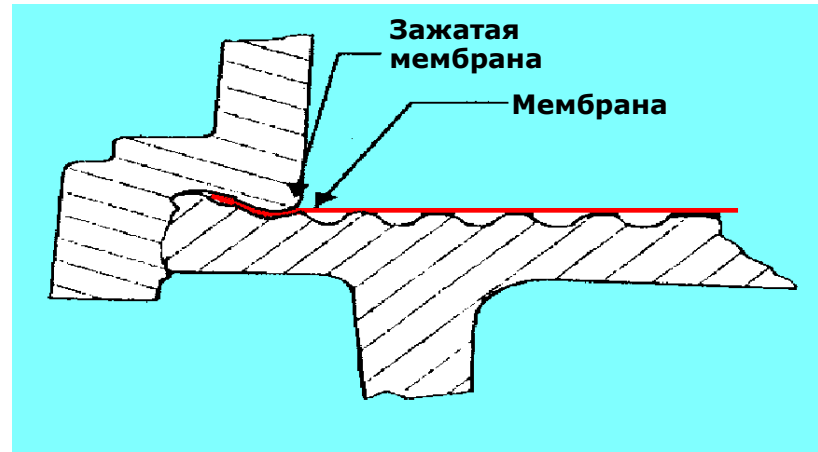
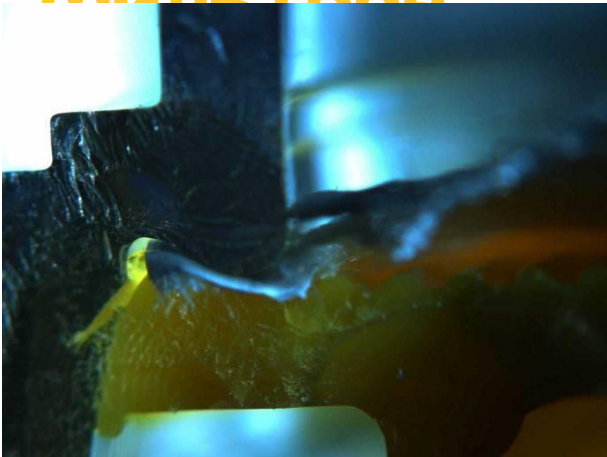
- Материалов, контактирующих с фильтруемыми жидкостями, например, канистры, мембраны, трубки, иглы, заглушки
- Размеров мембраны и канистры
- Рабочих характеристик устройства (время фильтрации, точка пузырька)
- Процесса стерилизации
- Материалов и размеров первичной упаковки

**Такое отсутствие изменений в материалах и рабочих характеристиках фильтроэлементов НЕ требует проведения ревалидации утверждённых методик (СОП).
Все кат.номера новых канистр остались прежними!**

Фильтроэлементы Steritest™ NEO

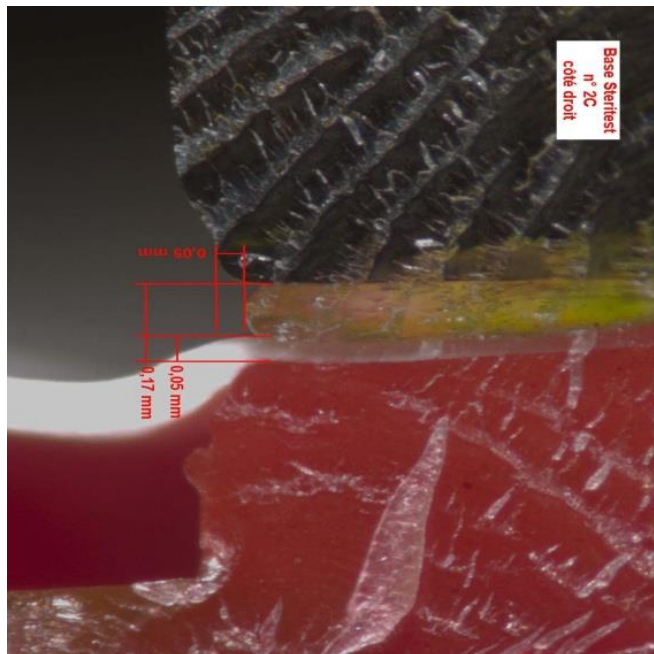
| Цвет основания канистры | Тип мембран | Особенности | Применение |
|---|--------------------------------------|--|--|
|  | Смешанные эфиры целлюлозы (МСЕ) | Высокая скорость фильтрации (1000 мл/мин воды при 0.69 бар). Используется особая технология ВПАИВАНИЯ мембраны в корпус канистры | Продукты без анти-микробной активности «Легкофильтруемые» растворы (солевые и др.) |
|  | Мембрана Дюрапор (с низкой сорбцией) | Используется особая технология ВПАИВАНИЯ мембраны в корпус канистры (исключена возможность сорбции антибиотиков в месте фиксации мембраны). Имеется дополнительное дренажное кольцо в основании канистры (улучшается промывка мембраны) | Антибиотики и продукты с антимикробным действием |
|  | Мембрана Дюрапор (с низкой сорбцией) | <p><u>Все что характерно для красных канистр плюс:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> •Материал корпуса ГРИЛАМИД (более устойчив к растворителям и ИПМ) •Особое соединение трубки с канистрой (выдерживает большее давление) | <ul style="list-style-type: none"> •Растворители •Крема •Мази •Растворимые продукты на основе Вазелина |

Мембранная фильтрация: сравнение зажатого и впаянного фильтра



Зажатая мембрана

- Мембрана зажимается между верхней и нижней частями канистры:
 - капиллярная диффузия
 - остатки продукта



Впаянная мембрана

- Мембранный фильтр и затем верхнюю часть канистры припаивают к её основанию:
 - отсутствие капиллярной диффузии и остатков продукта

проверка пригодности метода

Антимикробное действие

➤ Некоторые препараты могут содержать **бактериостатические и фунгистатические вещества**, которые, если их не нейтрализовать, будут ингибировать рост микроорганизмов, присутствующих в образце, что приведет к получению **ложных отрицательных** результатов.

➤ **Нейтрализация этих веществ может быть осуществлена:**

- разбавлением
- химическим путем
- **фильтрацией**
- ферментами
- комбинированием указанных методов

проверка пригодности Метода Антимикробное действие

➤ Определение антимикробного действия

- “Тест проводят в тех же условиях, как описано для **испытания препарата на стерильность, используя те же методы ...**”
- Небольшое число микроорганизмов (не более 100 КОЕ) вносят в последнюю порцию стерильной жидкости, используемой для промывания фильтра (МФ)
- **Используют те же микроорганизмы**, которые рекомендованы для испытания ростовых свойств питательных сред
- **Время инкубации: не более 5 суток**
- Если отмечается рост : “...Антимикробная активность в условиях испытания отсутствует или была эффективно удалена. **Испытание на стерильность может быть проведено без дальнейших модификаций**”
- Если рост не отмечен : “... Препарат обладает антимикробной активностью, которая не была нейтрализована в условиях проводимого испытания. **В процедуру испытания необходимо внести изменения для удаления активности и повторить валидационный тест.**”

**Риск
ложного
отрица-
тельного
результата**

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Тестирование препаратов с антимикробным действием

- Правильный выбор мембраны/фильтроэлемента
- Медленное предварительное смачивание мембраны перед фильтрацией
- Правильный выбор промывочной жидкости для подготовки мембраны
- Растворение и разбавление препарата
- Быстрая фильтрация препарата и промывка сразу после фильтрации
- Эффективность медленной промывки
- Учитывать явление поверхностного натяжения и свойства различных промывных жидкостей. Жидкости D и K (с ПАВ) снижают эффект капиллярного действия
- Осторожность при использовании жидкости K: последняя промывка должна осуществляться жидкостью A (пептонная вода).

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Интерпретация результатов

Наблюдение и интерпретация Результатов

- Периодически проводят наблюдение в течение инкубации
- Просматривают среды на предмет макроскопических доказательств роста
- Если возникает помутнение среды, в результате которого отсутствие или наличие роста не может быть визуально установлено, через 14 суток после начала инкубации переносят порции (каждая не меньше 1мл) сред в новые емкости с такими же средами и затем инкубируют исходную и новую емкости не менее 4 суток
- Если признаков микробиологического роста не обнаружено, тестируемый продукт отвечает требованиям стерильности
- При наличии признаков микробиологического роста, продукт не отвечает требованиям стерильности, если не может быть очевидно продемонстрирована несостоятельность теста, не связанная с испытуемым продуктом.



ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Интерпретация результатов



ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВАЛИДИРОВАТЬ И ПРОВОДИТЬ ТЕСТ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ В УСЛОВИЯХ, ПОЗВОЛЯЮЩИХ ПОЛУЧАТЬ НАИБОЛЕЕ ДОСТОВЕРНЫЕ ДАННЫЕ.

Избегать ложных отрицательных результатов

- Минимизировать окисление тиогликолевой среды
- Проверка ростовых свойств питательных сред
- Правильный выбор фильтрационного метода
- Валидационный тест на антимикробное действие препарата
- Точное следование валидированной методике (СОП)

Избегать ложных положительных результатов

- Помещение класса А / Изолятор
- Микробиологический мониторинг условий проведения испытания
- Эффективность дезобработки
- Правильный выбор фильтрационного метода
- Уменьшение числа отклонений в процедуре испытания
 - Квалификация операторов
 - Упрощение манипуляций
 - Валидация метода

ИСПЫТАНИЕ НА ПИРОГЕННОСТЬ

Определение бактериальных эндотоксинов и
других пирогенов



Millipore®

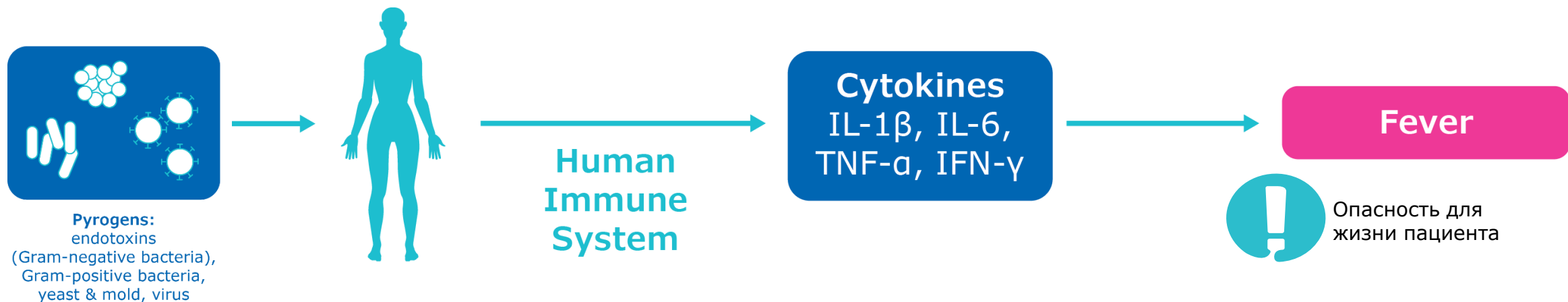
Preparation, Separation,
Filtration & Testing Products

Что такое пирогены?



ПИРОГЕНЫ: ВЕЩЕСТВА, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ЛИХОРАДКУ

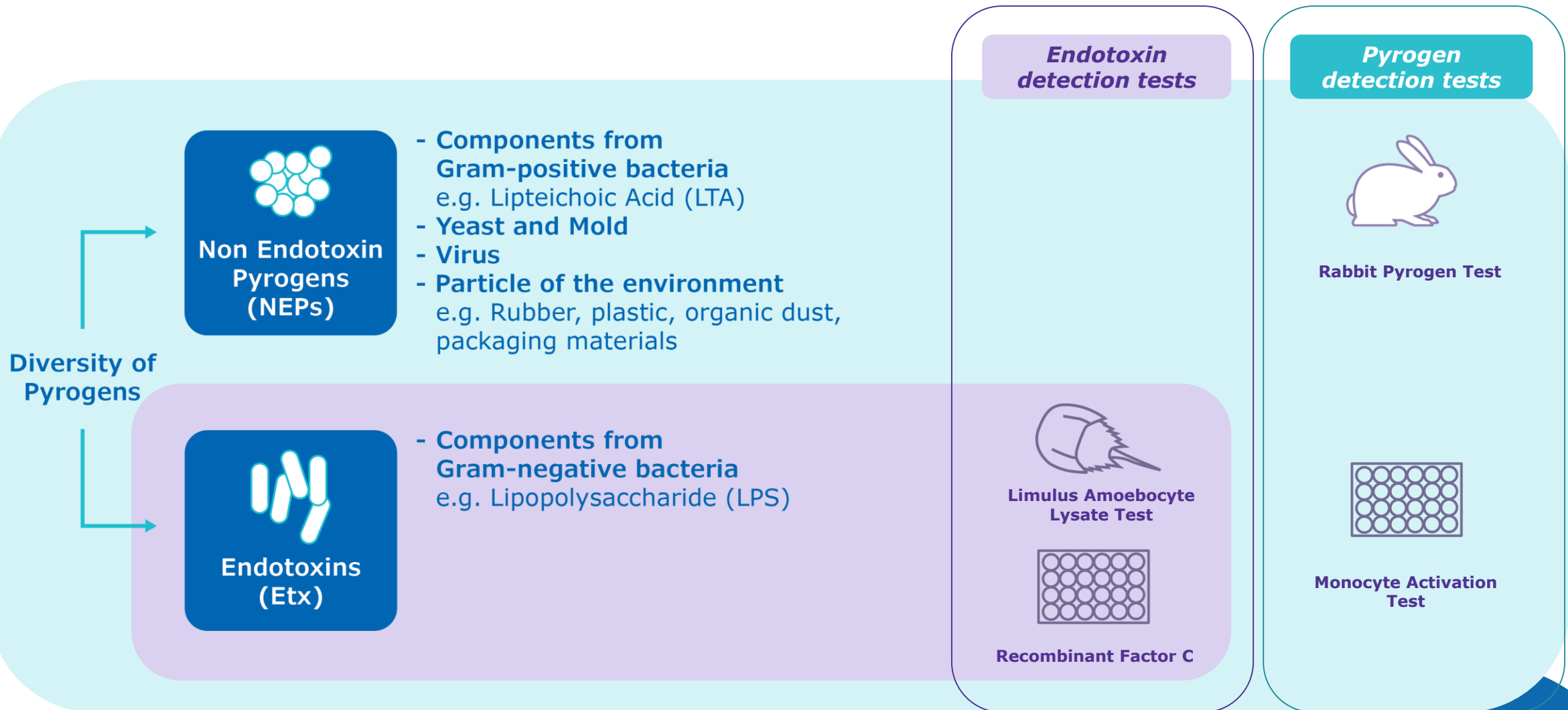
Пироген, по определению, это вещество, вызывающее **повышение температуры** у человека или животного. Присутствуя в фармацевтическом инъекционном продукте в качестве загрязняющих примесей, пирогены могут вызывать опасное для жизни лихорадочное состояние.



“For each batch of drug product purporting to be **sterile and/or pyrogen free**, there shall be appropriate laboratory testing to determine conformance to such requirements”

21CFR211.167 (a)

ТЕСТЫ НА ПИРОГЕНЫ VS ТЕСТЫ НА ЭНДОТОКСИНЫ



ТРАДИЦИОННЫЙ ТЕСТ НА ЭНДОТОКСИНЫ

Принцип

Использование иммунной реакции амебоцитов мечехвоста на Грам-отрицательные бактерии

Статьи в EP

2.6.14
5.1.10

Статья в USP

<85>

Статья в ГФ РФ

ОФС.1.2.4.0006.15



- **Простота в применении**
- **Высокая чувствительность в некоторых методиках (от 0,03 до 0,001 ЕЭ/мл)**
- **Экономичный**

- **Выявление только эндотоксинов** : не отражает полной картины пирогенности
- **Зависимость от условий испытания:** pH, ионная сила, активность ферментов, маскирующий эффект
- **Неприменимость к некоторым продуктам:** препараты крови, клеточные препараты, протеины, липиды, адьюванты гидроокиси алюминия (обычны в вакцинах)
- **Использование животных:** смертность около 30,000 особей в год



«ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ» В ИСПЫТАНИЯХ НА ПИРОГЕНЫ

Принцип

- Измерение повышения температуры у 3-х кроликов после внутривенной инъекции испытуемого препарата.
- Для препаратов, которые могут переноситься кроликами в дозе, не превышающей 10 мл/кг при внутривенном введении в течение не более 10 минут.

Статья в EP

2.6.8

Статья в USP

<151>

Статья в ГФ РФ

ОФС.1.2.4.0005.15



- **Неспецифичность:** определяет как эндотоксины, так и пирогены неэндоксинной природы (NEPs)
- **Исторически устоявшийся метод** для испытания на пирогены в соответствии с международными нормативами и руководствами.

- **Низкая чувствительность** (0,5 ЕЭ/мл) в сравнении с другими методами
- **Не количественный**
- **Низкая устойчивость:** стресс у кролика может повлиять на результат
- **Животное как модель:** иммунная реакция у кролика может отличаться от человеческой
- **Не применим ко многим типам фармацевтических продуктов:** от химиотерапевтических до иммунодепрессивных веществ, препараты из клеток человека (препараты крови & стволовые клетки)
- **Использование животных :** необходимость в большом количестве животных для выявления редких образцов, содержащих пирогены

In vitro альтернатива тесту на кроликах

Принцип

Моноциты, активированные пирогенными веществами, вырабатывают противовоспалительные белки - цитокины/интерлейкины (IL), наличие которых определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Статья в ЕР

2.6.30

Статья в USP

*Нет статьи
Упомянут в <151> как
альтернативный метод*

Статья в ГФ РФ

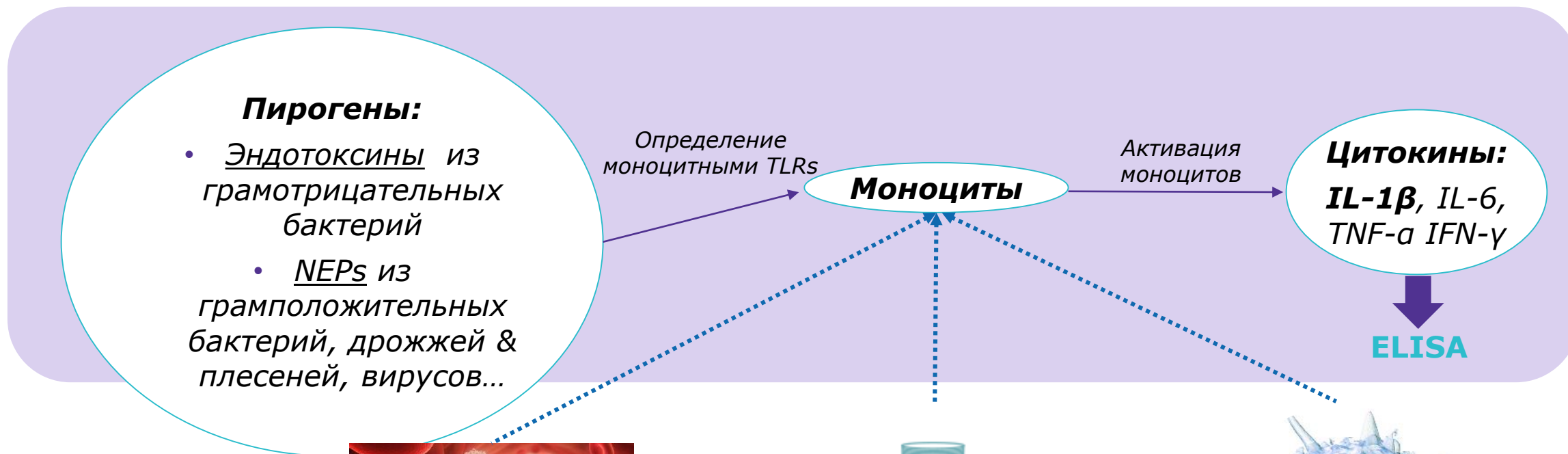
ОФС.1.2.4.0016.18



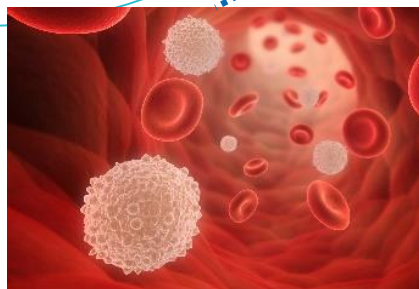
- **Основан на человеческой реакции на пирогены:** позволяет лучше предсказывать активность пирогенов, чем тесты LAL или RPT.
- **Определяет как эндотоксины, так и пирогены неэндотоксинной природы.**
- **Применим к большему разнообразию препаратов, чем LAL или RPT.**
- **Легко внедряем:** нет необходимости в ЖИВОТНЫХ
- **Более низкий предел обнаружения и большая точность, чем у RPT.**

- **Более низкая чувствительность, чем у LAL теста**
- **Время получения результата дольше, чем у LAL теста**

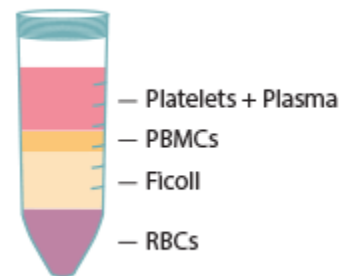
Методы, основанные на разных источниках моноцитов



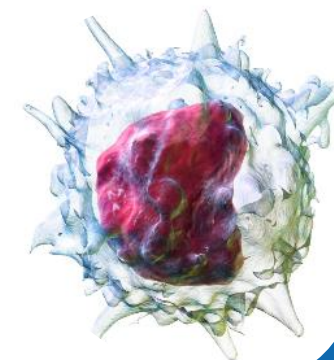
Источники моноцитов для MAT



Цельная кровь



PBMC : Мононуклеарные клетки периферической крови

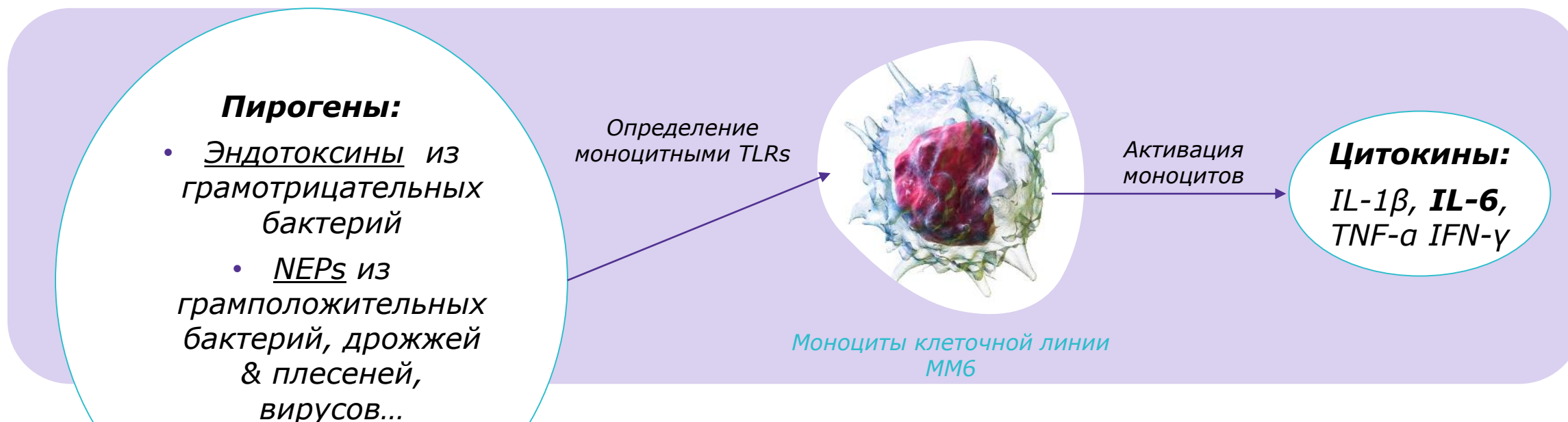


Клеточная линия моноцитов



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ M060 MAC 6 ДЛЯ ИМИТАЦИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

Если образец контаминирован пирогенами, **моноциты (клеточной линии MM6)** будут активироваться и производить цитокины, в т.ч. **интерлейкин-6**, который будет обнаружен методом иммуноферментного анализа (ELISA).



Клеточная линия MM6:

- Подтверждена на экспрессию всех экстрацеллюлярных TLRs (определение полного спектра пирогенов)
- Готовая к использованию (нет необходимости в клеточном культивировании)

ГОТОВАЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СИСТЕМА...

Состав набора PyroMAT kit Хранение 2-8°C

ШАГ 1

- Апиrogenная вода
- 96-луночный планшет
- Среда RPMI

Шаг 2

- 96-луночный ELISA планшет
- Разбавитель
- Промывной р-р
- Реагент А
- Реагент В
- Останавливающий р-р

Клетки PyroMAT отгружаются отдельно Хранение при -80 °C или ниже (-150 °C)

Клетки MONO MAC 6
(2 флакона / планшет)



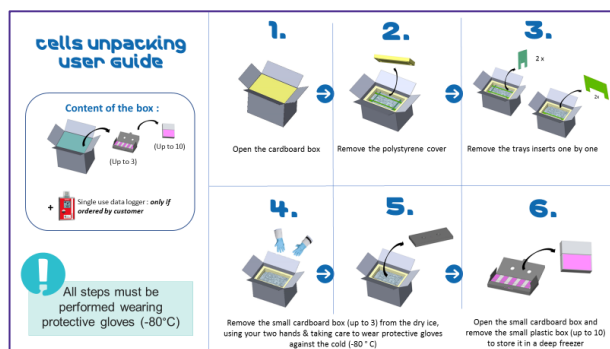
Дополнительно к набору для отдельного заказа

- Эталонный стандарт эндотоксина (RSE)
- Контрольная проба пирогенов неэндотоксинной природы (NEP)
 - Термоинактивированная культура Staph Aureus, HKSA
 - Флагеллин
- Контроль IL-6 (только для валидации конкретного препарата)
- ПО для анализа данных (совместимое с Gen5 Secure от Biotek) : загружается бесплатно он-лайн

+ Сервис



...СПЕЦИАЛЬНАЯ УПАКОВКА ДЛЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ КЛЕТОК



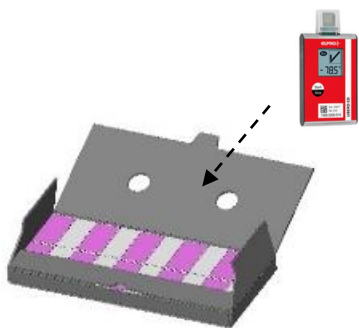
В каждую картонную коробку DI-4 вложена инструкция по распаковыванию



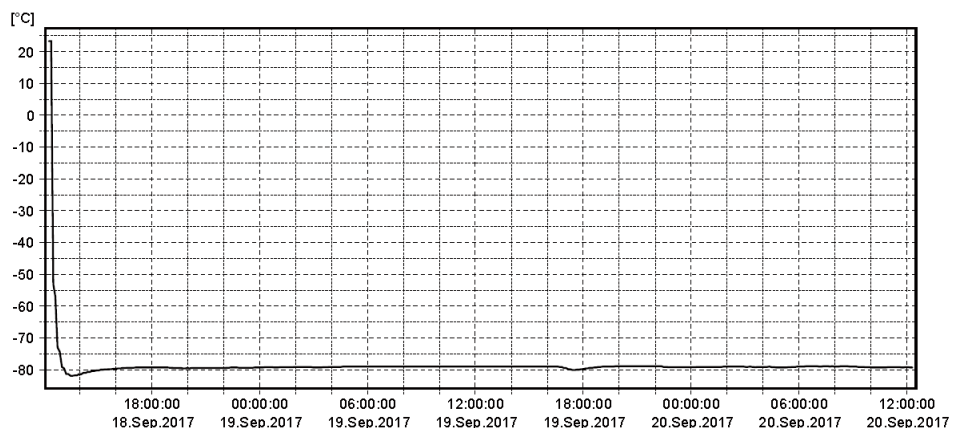
Опционально
Одноразовый регистратор данных (логгер)

Millipore®

ВОЗМОЖНОСТЬ ОТСЛЕЖИВАНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ВО ВРЕМЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ



- Для обеспечения мониторинга температуры во время транспортировки можно заказывать регистратор данных.
- Его необходимо указать отдельной строчкой в заказе.
- Регистратор помещается непосредственно во вторичную упаковку с коробками с клетками PyroMAT.



- Транспортировка клеток PyroMAT™ cells осуществляется в упаковке, разработанной и отвалидированной для поддержания необходимой температуры **в течение максимально 5 дней.**
- Проверяйте среднюю температуру транспортировки: она НЕ должна быть выше -75°C
- В случае отклонения температуры вы можете связаться с клиентской службой Merck

Ref:
DataLogger95



ПРОСТОЙ В ВЫПОЛНЕНИИ АНАЛИЗ

ШАГ 1 ПОДГОТОВКА & ИНКУБАЦИЯ С КЛЕТКАМИ PyroMAT™

В ламинаре



ИНКУБАЦИЯ

Без CO2 , в увлажнении



ШАГ 2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ IL-6 МЕТОДОМ ИФА

На лаб.столе



Получение стандартной кривой

- Серия разведений RSE в апиrogenной воде
- Разведение NEP в апиrogenной воде

Подготовка проб

- Разведение образца в апиrogenной воде
- Добавление RSE & NEP (положительный контроль)

Подготовка клеток ММ6

- 2 флакона / планшет
- Смешивание с культуральной средой (RPMI)



Стандартный ИФА*

- Перенос в планшет ИФА
- Отмывки и инкубация с реагентами

Считывание и анализ результатов

- ПО Gen-5: получение протокола испытания

** Для системы PyroMAT™ был разработан оптимизированный ИФА протокол, который является рекомендуемой стандартной процедурой.*

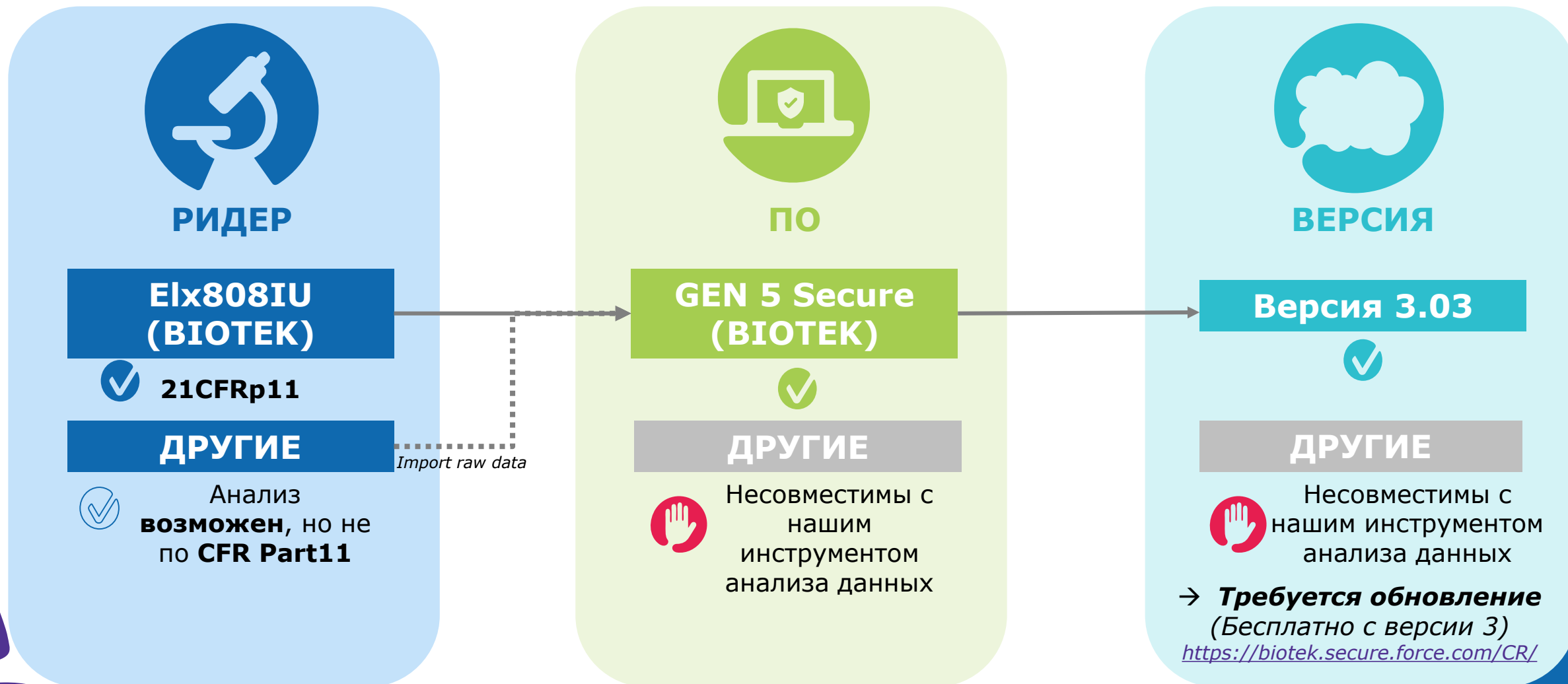
Для сложных матриц может использоваться специальная процедура ИФА, которая включает дополнительный этап



Время работы: ~5ч

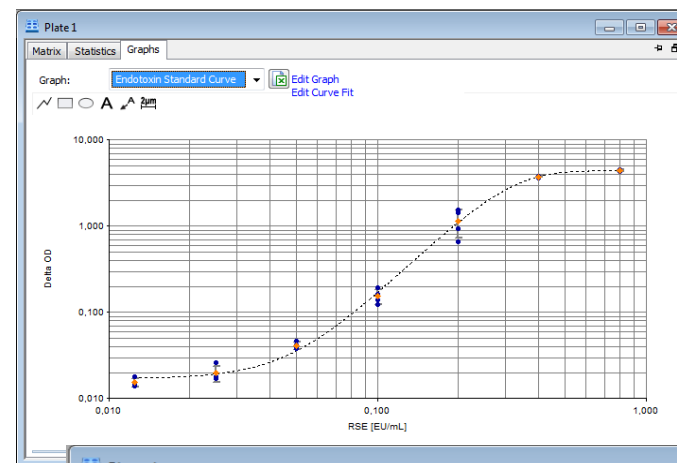
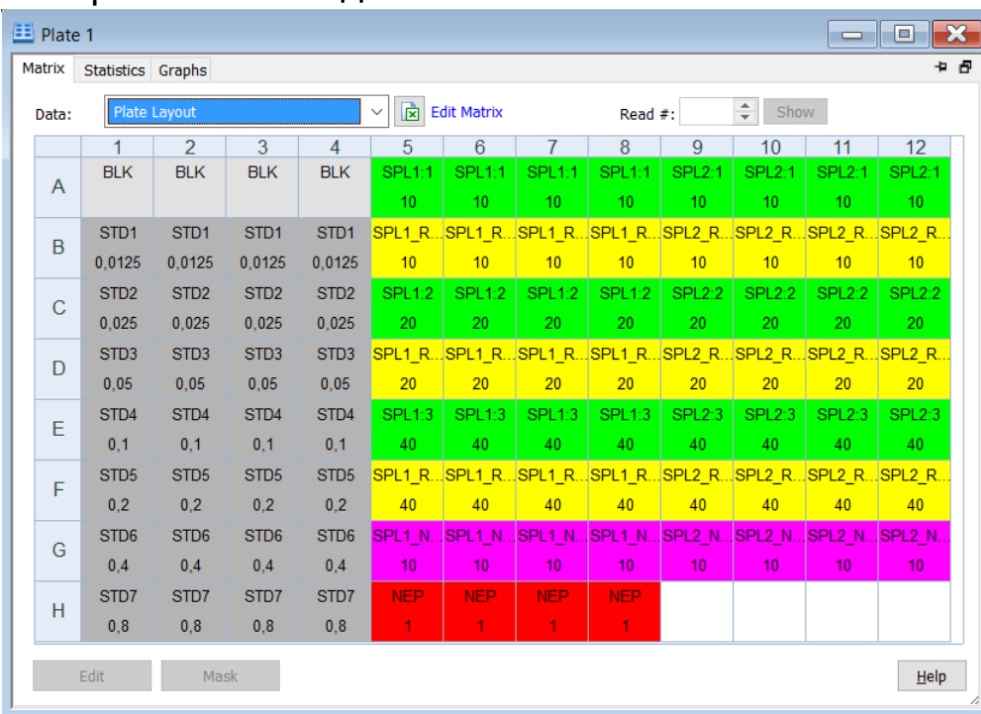
Время до получения результата (включая инкубации) : 1,5 дня

обработка данных проводится с помощью ПО GEN5 SECURE



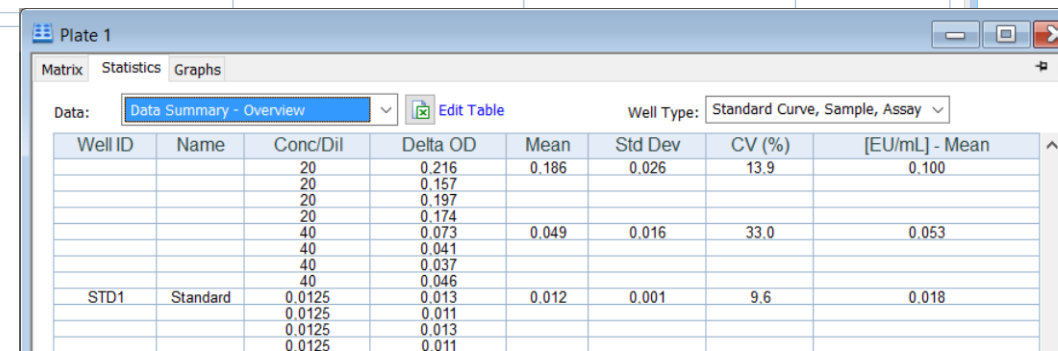
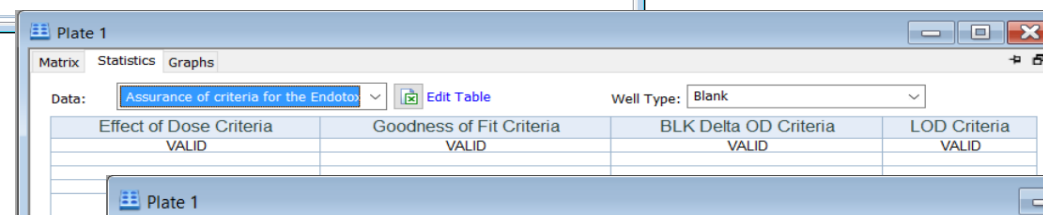
ПРОТОКОЛЫ PYROMAT™ ДЛЯ GEN5 SECURE ПРЕДНАЗНАЧЕНЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ

После открытия программного обеспечения Gen5 создайте новый эксперимент «из существующего протокола» и выберите один из наших протоколов PyroMAT™ в соответствии с выбранным методом испытания



После считывания планшета или импорта необработанных данных из ридера ПО автоматически проанализирует результаты с планшета и выполнит статистический анализ.

Выдаются PASS / FAIL выводы для испытания, и отчет может быть распечатан.



Отвалидированное ПО для соответствия нормативным требованиям



SOFTWARE

GEN 5 Secure

Наши инструменты анализа данных (протоколы для программного обеспечения Gen5) разработаны для обеспечения **статистического анализа и предоставления заключения для каждого анализа** в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи

При использовании в комбинации с ридером BioTek ПО Gen5 Secure обеспечивает полное соответствие требованиям **21CFRPart11**

→ Мы предлагаем удобное и простое решение для выполнения MAT от проведения до анализа данных в вашей лаборатории!

**Преимущества
MAT**

Испытание на пирогены :
определение как **эндотоксинов,**
так и **других пирогенов**

MAT может заменить RPT и дает значительное преимущество по сравнению с LAL, поскольку позволяет обнаруживать NEP в дополнение к эндотоксинам

Гибкость в ассортименте образцов для тестирования

По сравнению с RPT и LAL, MAT обеспечивает большую гибкость в отношении продуктов, подлежащих тестированию (препараты крови, клеточные продукты, белки ...)

Тест in vitro, который имитирует иммунную реакцию человека

Будучи методом in vitro, MAT соответствует этическим тенденциям сокращения использования животных для испытаний.

Тест in vitro, который может быть выполнен внутри лаборатории

Будучи методом in vitro, MAT может выполняться внутри лаборатории. Это главное преимущество для клиентов, которые в настоящее время занимаются аутсорсингом RPT.

MAT поддерживается **международными нормативами и инструкциями**

MAT описан в EP как фармакопейный метод и упоминается в USP как альтернативный. Присутствие этого метода в нормативных документах растёт (напр., ГФ РФ).

Система PyroMAT™

полное предложение

MERCK
в наличии!

Расходные

Набор, клеточная линия,
стандарты & контроли



Валидированный инструмент анализа данных



Система PyroMAT™

Сервисы

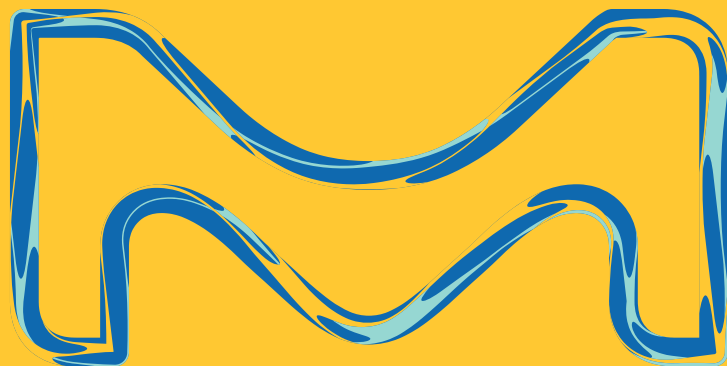
(проверка применимости,
разработка метода)



Обучение



СПАСИБО !



ООО «Мерк»:

115054, Москва, ул.Валовая, 35

Тел: (495) – 937 33 04

Факс: (495) – 937 33 05

e-mail: mm.russia@merckgroup.com