



Novinky a změny v mikrobiologických textech, moderní mikrobiologické metody a trochu matematiky

Ing. Ivana Kohoutová

Nové a revidované texty v ČL 2017 Doplněk 2018

- 👁 **5.1.1** Metody přípravy sterilních produktů
- 👁 **5.1.2** Biologické indikátory a příbuzné mikrobiální přípravky použité při výrobě sterilních produktů
- 👁 **5.1.6** Alternativní metody kontroly mikrobiologické jakosti
- 👁 **5.1.11** Stanovení baktericidní, fungicidní a levurocidní účinnosti antiseptických léčivých produktů
- 👁 **2.6.27** Mikrobiologické zkoušení buněčných přípravků

5.1.11 Stanovení baktericidní, fungicidní a levurocidní účinnosti antiseptických léčivých produktů

- 👁 Použití pro antiseptické **LP** mísitelné s vodou
- 👁 Potvrzení „in vitro“ účinnosti, není náhradou klinických zkoušek
- 👁 2 metody – neutralizační metoda a metoda MF
- 👁 Zkušební kmeny
- 👁 Kritéria přijatelnosti:
 - baktericidní – snížení nejméně o 5 log
 - fungicidní - snížení nejméně o 4 log
 - levurocidní - snížení nejméně o 4 log

5.1.1 Metody přípravy sterilních produktů

👁 Odkaz na 5.1.2

👁 Každý typ sterilizace musí mít stanoveny podmínky, musí být validován a kontrolován ➡ nové členění na princip, používané zařízení, sterilizační cyklus, účinnost cyklu, rutinní kontrola

👁 Aseptická příprava

👁 Podrobnější popisy validací

5.1.2 Biologické indikátory (BI) a příbuzné mikrobiální přípravky použité při výrobě sterilních produktů

- ☉ Kompletně přepracován a rozšířen
- ☉ **Použití BI** – vývoj a validace sterilizačního procesu konečných produktů
- ☉ **Kritéria pro výběr BI** – typ procesu, typ výrobku požadovaná účinnost...
- ☉ **Obecný popis BI** - typy
- ☉ **Požadavky na BI** – na každou šarži, specifikace požadavků uživatele

- ☉ **Kontrola kvality BI** – čistota, identita a počet životaschopných buněk, vhodnost použití
- ☉ **BI pro jednotlivé typy sterilizace** – suchým teplem, vlhkým teplem, plynem, zářením a filtrací
- ☉ **Sterilizace teplem** – podrobný popis validačního cyklu, použití různých časů při validaci, musí se najít podmínky cyklu, kdy sterilizace není kompletní a potvrdit, že za validovaných podmínek je inaktivace úplná (redukce MO je alespoň 10^6); vhodné kmeny pro sterilizaci suchým a vlhkým teplem


- ☉ Sterilizace **plynem** – jediný typ sterilizace, kdy se BI používají i pro rutinní kontrolu každého cyklu; zkušební kmeny (EO – *B. atrophaeus*, ostatní – *Geobacillus stearothermophilus*)
- ☉ Sterilizace **zářením** – např. pro tkáně a buňky; použití BI není nutné, ale může být požadováno; zkušební BI je *Bacillus pumilus* nebo jiný adekvátní
- ☉ Sterilní filtrace – filtry musí být schopné zachytit nejméně 10^7 CFU/1 cm² užitečné plochy filtru za stejných nebo podobných podmínek jako při výrobě; kmeny *Brevundimonas diminuta* (0,22 μm) a *Acholeplasma laidlawii* (0,1 μm) nebo kmeny izolované z produktu nebo prostředí, pokud jsou větší zátěží než kontrolní kmeny

5.1.6 Alternativní metody kontroly mikrobiologické jakosti

- ☉ Struktura článku – úvod, principy metod a validace metod
- ☉ Nově – použití v PAT pro **mezioperační kontrolu a monitoring prostředí**
- ☉ **3 typy zkoušek podle použití** – kvalitativní, kvantitativní a identifikační
- ☉ Nemusí být korelace mezi výstupem a kritérii přijatelnosti – nutno validovat a stanovit ekvivalenci, validační požadavky jsou dány užitím

- 🌀 **Všeobecné principy metod** – metody založené na růstu, přímé měření, detekce buněčných komponent
- 🌀 **Výběr metody** – rychlost stanovení, destrukce buněk možná, potřeba následné identifikace, existuje vhodná knihovna (lze rozšiřovat uživatelem?), relevance signálu a požadavku
- 🌀 **Popis metod** – princip, kritické aspekty, možné užití

- 🌀 **Validace metod** – primární a pro daný účel
- 🌀 Součástí validace je popis principu metody (dodavatel) a zvážení rizik a přínosů (uživatel)
- 🌀 Primární validace – typ odpovědi, specifita, detekční limit, limit kvantifikace, rozsah, linearita, přesnost a správnost, robustnost – dodavatel
- 🌀 Validace pro daný účel – specifikace požadavků uživatelem, DQ, IQ, OQ, PQ

-  PQ – 1. ověření primární validace (ověření s kontrolními kmeny – lékopisnými, z prostředí, „stressed“, pomalurostoucí)
2. ověření pro zamýšlený účel (zkouška vhodnosti metody pro daný LP, limit a rozsah detekce vzhledem ke vzorku, specifita odpovědi v přítomnosti vzorku, linearita odpovědi v přítomnosti vzorku, přesnost a správnost s ohledem na typy vzorků)
3. zkouška rovnocennosti

- ☉ Stanovena **validační kritéria** pro jednotlivé typy metod v tabulce (kvalitativní, kvantitativní, identifikační)
- ☉ Kvalitativní a kvantitativní zkoušky – vždy **zkouška vhodnosti** (za přítomnosti LP) a **zkouška rovnocennosti** s lékopisnou zkouškou (paralelní testování)
- ☉ **Příklady validací konkrétních metod odstraněny** – v budoucnu budou uveřejňovány **na webu EDQM**

Možné příklady použití AMM a jejich úskalí

Možná úskalí

- jiný typ signálu než kritéria přijatelnosti
- relevance – živý neznamená životaschopný (CFU)
- matrice vzorku
- destrukce MO
- používání jinak než doporučuje výrobce
- knihovny

Příklady použití

- NAT - zkouška na mykoplazmata, sterilita, identifikace MO
- bioluminiscence – monitoring vody, vzduchu
- autoluminiscence – monitoring vody, meziprojektu, vzduchu
- detekce plynu, turbidimetrie – zkouška na sterilitu
- at line x on line
- na webu EDQM budou zatím tyto typy validací:
 - rychlý test na sterilitu
 - kvantitativní test cytometrie v pevné fázi
 - PCR pro identifikaci

2.6.27 Mikrobiologické zkoušení buněčných přípravků

- 🌀 Buněčné přípravky (BP) – definice
- 🌀 Úvod – doba použitelnosti, složení a velikost vzorku, výběr metody zkoušení
- 🌀 Výběr metody s ohledem na zdroj buněk, použití BP, podmínky při výrobě, složení BP – automatické metody založené na růstu, jejich kombinace s alternativní metodou, alternativní metoda, klasická zkouška na sterilitu

- ☉ Doba propuštění – nový pojem **aktuálně negativní výsledek (negative-to-date)** – validace a risk analýza
- ☉ Při kultivačně pozitivním výsledku na konci zkoušky možnost identifikace a stanovení antibiogramu (není v článku)
- ☉ **Vzorek** přednostně z finálního produktu a obsahující všechny komponenty

- ☉ Metody založené na růstu –podrobnější popis –
růstové vlastnosti půd, ověření vhodnosti metody
pro daný BP, vzorkování a možné modely pro
kultivační schéma, odečítání a hodnocení (pozor na
rychle rostoucí kontaminanty a prodlevu před
kultivací – možnost falešně negativního výsledku, vliv
složení na růst MO)
- ☉ Alternativní metody – odkaz na související články –
2.6.21 (NAT, PCR), 2.7.24 (průtoková cytometrie),
5.1.6 (Validace)

Matematika a mikrobiologie

- Statistické zpracování výsledků je důležité nejen pro validace metod, ale také pro hodnocení výsledků a trendů
- Nejistoty měření
- OOS, OOT

Logaritmus čísla 3 bude někde mezi $\log_{10}1$ a $\log_{10}10$, tedy reálné číslo někde mezi nulou a jedničkou. Z tabulky můžeme zjistit, že $\log_{10} 3 = 0,47712125472$, takže číslo 3 můžeme zapsat jako $10^{0,47712125472}$.

Test on the Efficacy of Antimicrobial Preservation

Please note: PRELIMINARY Results!

| Parameter | Specification / Demands | Result |
|-----------------------------------|--|-----------------------|
| Experimental start of examination | | 18 Aug 2017 |
| Analysis in accordance to | Ph. Eur. 5.1.3 (current edition) (Product-specific suitability test / transfer of method is not available!) | |
| Sample container | | laboratory containers |
| Inoculation ratio of the sample | | 1:100 |
| Microbial count method | surface-spread method (spiral plater) | |

The test was conducted in compliance with GMP guidelines. There were no test-related deviations.

Inoculum

| No | Test Organisms | Požadované inokulum Specification / Demands | Skutečné inokulum Result |
|----|--|--|-----------------------------|
| 01 | Escherichia coli (ATCC 8739): | min 100000 to 1000000 CFU/g | 610000 CFU/g |
| 02 | Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027): | min 100000 to 1000000 CFU/g | 430000 CFU/g |
| 03 | Staphylococcus aureus (ATCC 6538): | min 100000 to 1000000 CFU/g | 260000 CFU/g |
| 04 | Candida albicans (ATCC 10231): | min 100000 to 1000000 CFU/g | 550000 CFU/g |
| 05 | Aspergillus brasiliensis (ATCC 16404): | min 100000 to 1000000 CFU/g | 170000 CFU/g |
| 06 | Zygosaccharomyces rouxii (NCYC 381): | min 100000 to 1000000 CFU/g | 360000 CFU/g |

Result of the recovery [CFU/g]:

Test Organism Počty kolonie tvořících jednotek- průměr z více misek

| Time | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 |
|------|-------|-------|-------|-------|------------|------|
| 14 d | < 100 | < 100 | < 100 | < 100 | 330000 !!! | 4200 |

Není konkrétní číslo, ale interval = nelze logaritmovat

Došlo ke zvýšení počtu CFU: 170000-330000
= -160000
Záporné číslo nelze logaritmovat!!!

Log reduction of CFU:

Test Organism Logaritmus snížení počtu CFU = logaritmus rozdílu mezi počátečním skutečným inokulem a počtem CFU po 14 dnech

| Time | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 |
|------|----|----|----|----|----|----|
| 14 d | 4 | 4 | 3 | 4 | 0 | 2 |

Odhad logaritmu snížení - nekorektní
 $\log(610000-99) = \log 609901$

Opět odhad! Správný výpočet: $\log(360000-4200) = \log 355800 = 5,5$



Děkujeme za pozornost

STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV

Šrobárova 48, 100 41 Praha 10

tel.: +420 272 185 111

fax: +420 271 732 377

e-mail: posta@sukl.cz