

Mikrobiologiset testimenetelmät

Tero Virtanen

Tero Virtanen

- Biokemisti, FM
- Toiminut eri tehtävissä pohjoismaisissa lääkealan ja lifesciences yrityksissä vuodesta 1998. Nykyisin Orionilla tuotekehityksessä, Pharmaceutical Sciences osastolla
- Toiminut asiantuntijajäsenenä Euroopan farmakopeaa julkaisevan EDQM:n työryhmässä Group of Experts 1, vuodesta 2017
 - Ryhmän fokusalue on "Biological Methods and Statistical Analysis" ja niihin liittyvät tekstit



1. Milloin pitää käyttää mikrobiologisia testejä?

- Yleis- ja lääkemuotomonografiat

2. Mitä mikrobiologisia testejä on?

- Steriiliystesti
- Kokonaismikrobitesti
- Endotoksiinitesti
- Muut testit

3. Muut mikrobiologiset standardit

Lista yleismonografioista, joissa viittauksia mikrobiologisiin testeihin (esimerkkejä)

Referenssi	Otsikko	Steriiliys / Mikrobilaskentatesti	Muu
01/2024:2619	Pharmaceutical preparations (Lääkevalmisteet)	"Mikrobiologinen laatu"; vaatimukset 5.1.4 mukaan.	
01/2024:2034	Substances for pharmaceutical use (lääkeaineet) <ul style="list-style-type: none"> sterile grade bacterial endotoxin-free grade 	"Mikrobiologinen laatu" 2.6.1 Sterility	2.6.14 bakteeri-endotoksiinit
04/2022:0153	Vaccines for human use (rokotteet ihmisille)		2.6.14 bakteeri-endotoksiinit
04/2019:0784	Recombinant DNA technology, products of <ul style="list-style-type: none"> Active Substance (aktiivinen aine) 	"Mikrobiologinen laatu"	endotoksiinitesti

Lista lääkeuotomonografioista, joissa viittauksia mikrobiologisiin testeihin (esimerkkejä)



Referenssi	Otsikko	Steriiliys /	Mikrobilaskentatesti /	Muu
01/2022:1163	Eye preparations (valmisteet silmälle)	2.6.1 Sterility		
01/2022:0652	Ear preparations • steriiliksi ilmoitetut	2.6.1 Sterility		
07/2021:0520	Parenteral preparations (parenteraalivalmisteet eli esim. injektiot, infuusiot, implantit)	2.6.1 Sterility		2.6.14 bakteeri-endotoksiinit
01/2021:0676	Nasal preparations (valmisteet nenään) • steriiliksi ilmoitetut	2.6.1 Sterility		
07/2022:2902	Chemical precursors for radiopharmaceutical preparations		2.6.12. Mikrobilaskentatesti	2.6.14 bakteeri-endotoksiinit

2.6.1 Steriiliytesti

- Steriiliytestissä näytteen potentiaalisesti sisältämät mikrobit siirretään aseptisesti kasvatusliuokseen (esim. "TSB/soija" ja "THIO")
- Kasvatusliuosta inkuboidaan eli säilytetään määritellyissä olosuhteissa 14 vuorokauden ajan. Kasvatusliuosta tarkastellaan säännöllisesti inkuboinnin aikana, ja mikrobikasvua ei saa ilmetä.
- Menetelmäsopivuustestissä (method suitability test) testin toimivuus tuotteen läsnäollessa osoitetaan tunnetuilla mikrobeilla (≤ 100 CFU). Näytteen kasvua verrataan positiivikontrolliin.
- Menetelmäsopivuustesti on tehtävä, kun
 - testataan uutta tuotetta tai
 - testin olosuhteita muutetaan
- Jokainen mediaerä on testattava kasvukontrollikokeella.
- Steriiliytestitekniikoita: kalvosuodatus (membrane filtration) tai suorasiirrostus (direct inoculation)
- Steriiliytesti on vain kvalitatiivinen (tulos: kasvua / ei kasvua)



Copyright: Biomerieux.com

Katso myös [5.1.9 "Guidelines for using the test for sterility"](#) ; steriiliytestitila; A-luokan laminaari tai isolaattori.

2.6.1 Steriiliystesti

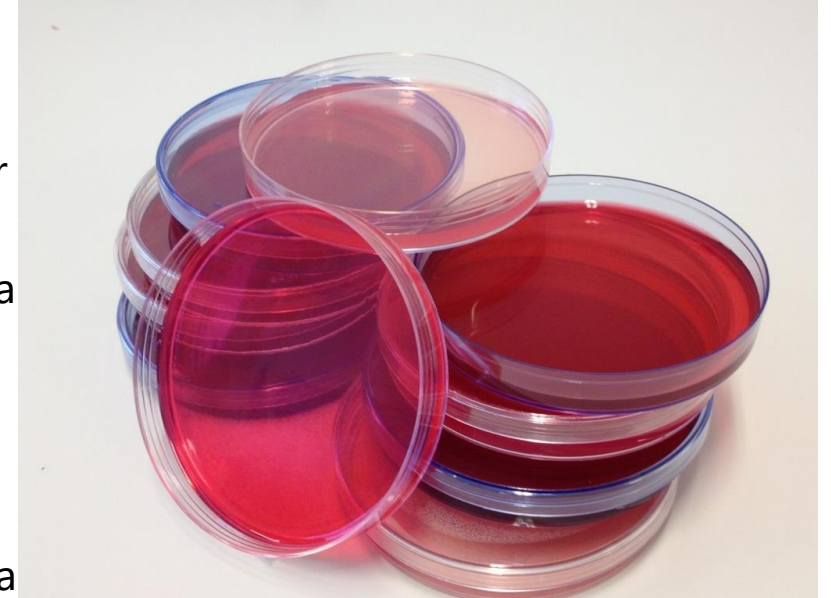


2.6.12 Mikrobilaskentatesti; ei-steriilit tuotteet



2.6.12 Mikrobilaskentatesti; ei-steriilit tuotteet

- Mikrobilaskentatestissä näytteen sisältämiä mikrobeja kasvatetaan kasvatusmaljalla, ja havaitut pesäkkeet lasketaan. Tulos ilmoitetaan tyypillisesti CFU (colony forming units / pesäkkeitä muodostavat yksiköt) per gramma tai per millilitra (tuotetta)
- TAMC eli total aerobic microbial count on pesäkkeiden määrä soijakaseiiniagarilla ("TSA") ja
- TYMC eli Total yeasts and moulds count on pesäkkeiden määrä sabouraud-dekstroosiagarilla ("SAB"/"SDA")
- Laskentamenetelmän menetelmäsopivuustestissä (suitability of the counting method) testin toimivuus tuotteen läsnäollessa osoitetaan tunnetuilla mikrobeilla (≤ 100 CFU). Positiivi- ja negatiivikontrollit ovat mukana testissä. CFU-määrä saa poiketa korkeintaan kertoimella 2 (pos.kontrolli vs. näyte).
- 2.6.12 tekniikoita ovat kalvosuodatusmenetelmä (membrane filtration) sekä plate-count menetelmät maljavalumenetelmä (pour-plate) ja pintalevitysmenetelmä (surface-spread)
- Jokainen mediaerä on testattava kasvukontrollikokeella.
- Näytemäärä : 10 g tai 10 ml tuotetta.



Katso myös

- [usein kysytyt kysymykset](#) EDQM:n Knowledge Databasesta ja
- [5.1.4. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use](#) (hyväksyntäraajat)

2.6.14 Bakteeriendotoksiinit

- Bakteeriendotoksiinitestillä (BET; test for bacterial endotoxins) joko havaitaan endotoksiinien läsnäolo tai lasketaan endotoksiinien määrä näytteessä.
 - Gel-clot testi (joko raja-arvotesti tai kvantitatiivinen)
 - Turbidometrinen eli sameuden mittaus
 - Kromogeeninen eli värin intensiteetin mittaus
- Tulos ilmoitetaan IU (international unit eli kansainvälinen yksikkö tai E.U. eli endotoxin unit eli endotoksiiniyksikkö); 1 IU = 1 E.U.
- Tyypillisesti testikittejä ja tietokoneistettuja järjestelmiä, ja jäljitettävissä kansainväliseen standardiin (esim. [Endotoxin Standard BRP](#))
- Lysaattireagenssin herkkyys varmistettava eräkohtaisesti ja testin aikana positiivikontrolleilla
- Test for interfering factors (endotoksiinitestin määrittystä häiritsevät tekijät tuotteen läsnäollessa): lisätyn endotoksiinin saanto pitää tyypillisesti olla 50 – 200 %



Copyright: Lonza Bioscience

Katso myös [5.1.10 Guidelines for using the test for bacterial endotoxins](#); mm. endotoksiinihyväksyntärajan laskenta ja määrittystä häiritsevien tekijöiden poistaminen analyysin aikana.

Biologisten lääkkeiden mikrobiologiset testimenetelmät

Farmakopeaseminaari 2023

Hanna Kankkonen, FT
Erikoistutkija
MYLA/Biologinen jaosto, Fimea

Muut mikrobiologiset testit (2.6. Biological tests)

- 2.6.2. Mycobacteria
- **2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms**
 - Usein kysytyt kysymykset: [FAQ, Knowledge Database](#)
- **2.6.21. Nucleic acid amplification techniques**
- **2.6.30. Monocyte-activation test**
- **2.6.31. Microbiological examination of herbal medicinal products for oral use and extracts used in their preparation**
- **2.6.32. Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C**
- **2.6.36. Microbiological examination of live biotherapeutic products: tests for enumeration of microbial contaminants**
- **2.6.38. Microbiological examination of live biotherapeutic products: tests for specified micro-organisms**

5.1. General texts on microbiology

- 5.1.4. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use
- 5.1.9. Guidelines for using the test for sterility
- 5.1.10 Guidelines for using the test for bacterial endotoxins

General Chapter esimerkki: 2.6.12. Mikrobilaskentatesti

2.6.12. Microbiological examin... x +
 https://pheur.edqm.eu/app/11-4/content/11-4/20612E.htm?highlight=on&terms=2.6.12

EUROPEAN PHARMACOPOEIA PHARMEUROPA EUROPEAN PAEDIATRIC FORMULARY FREEPUB

COUNCIL OF EUROPE
 CONSEIL DE L'EUROPE

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.4

edqm
 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare / Direction européenne de la qualité des médicaments & soins de santé

HOME 11TH EDITION ▾ ARCHIVES TERO VIRTANEN ▾

Document en Français PDF Knowledge Database

General Notices apply to all monographs and other texts. See the information section on general monographs.

01/2021:20612

2.6.12. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON-STERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS⁽¹⁾ (SEE NOTE)

1. INTRODUCTION

The tests described hereafter will allow quantitative enumeration of mesophilic bacteria and fungi that may grow under aerobic conditions. The tests are designed primarily to determine whether a substance or preparation complies with an established specification for microbiological quality. When used for such purposes follow the instructions given below, including the number of samples to be taken, and interpret the results as stated below. The methods are not applicable to products containing viable micro-organisms as active ingredients. Alternative microbiological procedures, including automated methods, may be used, provided that their equivalence to the Pharmacopoeia method has been demonstrated.

2. GENERAL PROCEDURES

Carry out the determination under conditions designed to avoid extrinsic microbial contamination of the product to be examined. The precautions taken to avoid contamination must be such that they do not affect any micro-organisms that are to be revealed in the test. If the product to be examined has antimicrobial activity, this is insofar as possible removed or neutralised. If inactivators are used for this purpose, their efficacy and their absence of toxicity for micro-organisms must be demonstrated. If surface-active substances are used for sample preparation, their absence of toxicity for micro-organisms and their compatibility with inactivators used must be demonstrated.

3. ENUMERATION METHODS

2.6.12. Microbiological examin... x Monograph Details x +
 https://extranet.edqm.eu/4DLink1/4DCGI/Web_View/mono/20612

Search Database online Knowledge Database edqm

Detailed view of Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests (2.6.12.).

Status	In use
Monograph Number	20612
English Name	Microbiological examination of non-sterile products: microbial enumeration tests (2.6.12.)
French Name	Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien (2.6.12.)
Latin Name	
Pinyin Name	
Chinese Name	
Pharmeuropa	30.1
Published in English Supplement	10.3
Published in French Supplement	10.3
Chromatogram	Not available
Additional information	Available
History	View history
Interchangeable (ICH_Q4B)	YES (10.3)
Pharmacopoeial harmonisation	YES (10.3)
Reference standards	
Practical Information	Test(s) Brand Name/Information
CEP	

[New Search](#) [Back](#)

How to read this table

- Status** : "in use" the monograph is published in the European Pharmacopoeia, "elaboration" monograph is under elaboration and has not yet been published
- Monograph number** : the unique number allocated to a monograph or a general method as soon as it is authorised for elaboration. This number never changes

Muita mikrobiologisia standardeja tai tietolähteitä

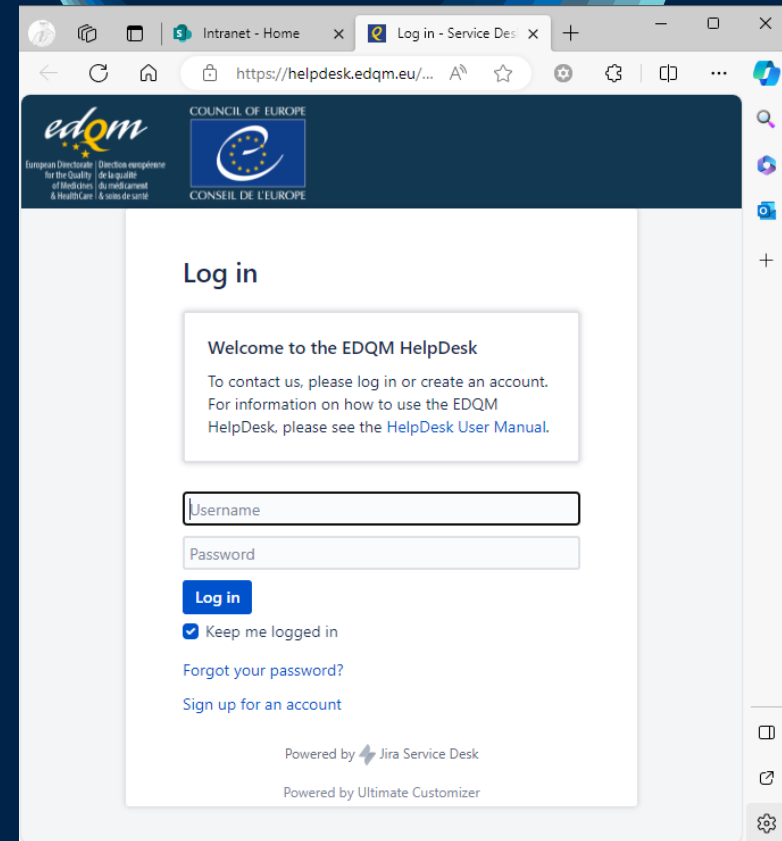
- WHO index of [world pharmacopoeias](#)
- [ISO](#) standards
 - ISO 11737-1:2018 Sterilization of health care products — Microbiological methods
- European Medicines Agency (EMA)
 - [Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials \(europa.eu\)](#) "For sterilisation by filtration the maximum acceptable bioburden prior to the filtration must be stated in the application. In most situations NMT 10 CFU/100 ml will be acceptable."
- Eudralex – [EU GMP](#)
 - Annex 1 [Manufacture of Sterile Medicinal Products](#)
 - Part IV - ATMP GMP ([Guidelines on GMP specific to Advanced Therapy Medicinal Products](#))
- FDA guidances
 - [Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy](#)
- International Conference on Harmonisation (ICH)
 - [Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products](#)



Kiitos! Kysymyksiä?

Tero.Virtanen@orionpharma.com

FIMEAPHARMACOPOEIA@fimea.fi





Orion

Building well-being