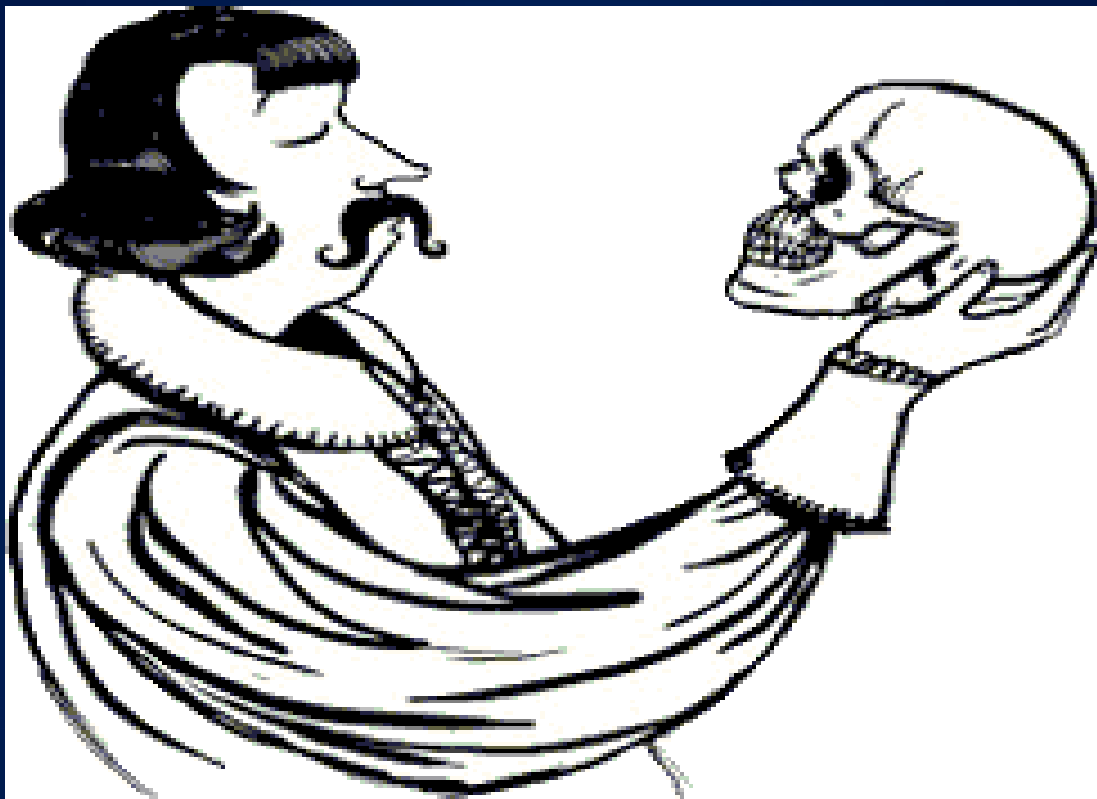




# ZKOUŠKA NA BAKTERIÁLNÍ ENDOTOXINY, POKYNY K VALIDACI, REVALIDACI

Bc. Alice Jenišová

Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha 28.01.2020



**Validovat či nevalidovat, to je oč tu běží.**

## Základní pojmy – validace, verifikace

### Validace

- Je potvrzení, které se získá na základě přezkoušením a poskytnutím objektivních důkazů, že jednotlivé požadavky byly pro zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci splněny.
- Validace potvrzuje, že měřicí postup/systém/výrobek je schopen plnit požadavky na něj kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací.

## Verifikace

- Je potvrzení získané prostřednictvím objektivních důkazů, že analytická data poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena.
- Je ověření správného fungování metody/postupu/systému v konkrétní laboratoři.
- Provádí se při zavádění všech metod, včetně normovaných, dále při jakýchkoliv změnách (personál, materiál, měřicí přístroje atd.).

## Proč validovat, verifikovat

Výsledky analytických měření mají mimořádně silný dopad v praxi, např. v klinické laboratoři mohou rozhodným a někdy fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu i samotný život pacienta.

- Validace, verifikace je činnost, kterou si laboratoř zajišťuje kvalitu dat při rutinním provozu.
- Zajištění, že vyráběná léčiva splňují požadavky jakosti, bezpečnosti a účinnosti.

- 👁️ Ochrana konečného uživatele.
- 👁️ Ochrana vlastní firmy (konečnou odpovědnost za adekvátní validaci, verifikaci postupu měření nese samotná laboratoř).
- 👁️ Vyžadují to kontrolní orgány (akreditace ➡️ vyžaduje používání řádně validovaných, verifikovaných metod (měřicích systémů atd.).

## Kdy je třeba provést validaci, verifikaci

- ☉ Při zavádění nové metody.
- ☉ Při převodu již validované metody (zavedení metody stanovení publikované v ČL., při převzetí metody typu in house z jiné laboratoře).
- ☉ Při změně výrobce (např. diagnostické soupravy).
- ☉ Při rozšíření použití stávající metody o další účel (např. rozšíření měření o další druh biologického materiálu, analytu).



- 👁 Při změně měřícího zařízení.
- 👁 Ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém.
- 👁 Při změně jakéhokoliv kritéria definovaného ve stávající validaci → revalidace systému.
- 👁 Podle validačního plánu (opakovaná v pravidelném intervalu).

## Obecný postup validace, verifikace

- ☉ Formulace požadavků, kterých má být pro daný účel použití dosaženo.
- ☉ Určení rozsahu validace, verifikace (tj. výběr validačních parametrů, základním kritériem je dostatek údajů → možnost posouzení, zda je metoda vhodná pro zamýšlený účel).
- ☉ Vypracovat validační protokol.
- ☉ Provéřit zda použitá instrumentace má kvalifikaci pro daný účel (tj. že její technické parametry jsou pro daný účel postačující, byla kalibrována).

- 🕒 Vzorky, materiál na kterých se experiment bude realizovat.
- 🕒 Provedení příslušných experimentů.
- 🕒 Vyhodnocení výsledků.
- 🕒 Pokud je nutné, provést opatření k tomu, aby byly specifikované požadavky splněny.
- 🕒 Vytvořit dokumentaci validace, verifikace ve formě validační zprávy.

## Validace lékopisných metod

- ☉ Zkušební metody uvedené v člancích a obecných statích byly validovány v souladu s přijatou odbornou praxí a současnými doporučeními pro analytické validace.
- ☉ Lékopisné metody se považují za validované → pokud není uvedeno jinak, validace zkušebních metod se po analytikovi nepožadují.
- ☉ Při používání lékopisných metod je třeba vzít v úvahu vliv faktorů, které ČL neuvádí jako např. typ měřicího přístroje, jeho technické parametry. V takových případech je nutné provést ověření, že lékopisná metoda při daných podmínkách dává reprodukovatelné výsledky.

- V případě, že je použita lékopisná metoda pro konkrétní léčivou látku i pro léčivý přípravek, pro obsah jiných dalších složek validace této metody neplatí.
- Při změně jakéhokoliv kritéria v používané lékopisné metodě (např. jiný postup přípravy vzorků), provést revalidaci, která prokazuje, že změněná metoda dává shodné výsledky s původní metodou

## Zkoušky na pyrogenní látky v ČL/Ph.Eur.

👁 2.6.8 Zkouška na pyrogenní látky

👁 2.6.14 Zkouška na bakteriální endotoxin (BET)

👁 2.6.30 Zkouška aktivace monocytů (MAT)

👁 5.1.10 Pokyny pro použití zkoušky na endotoxiny

## 5.1.10 Pokyny pro použití zkoušky na bakteriální endotoxiny

- ☞ Pokyny pro použití zkoušky na bakteriální endotoxiny jsou uvedené v ČL. článek 5.1.10.
- ☞ Výběr vhodné metody na stanovení BET v testovaném LP.
- ☞ Metody předepsané ve statích *2.6.14 Bakteriální endotoxiny* a *2.6.30 Zkoušky aktivace monocytů* nemusí být jako takové revalidované, pokud se neuvažuje jejich použití pro specifické látky nebo produkty ve specifickém prostředí pro daný LP či k ověření správného provedení zkoušky s komerčně dodávanými testovacími soupravami v příslušné laboratoři.

- 👁️ Postupy, materiály, zkoumadla použité v metodách musí být validovány dle. předpisu v příslušných zkouškách.
- 👁️ Vyžadovat od výrobců komerčních testovaných souprav všechny údaje o validacích, které mají k dispozici a týkají se náhrady zkoušky u látek a produktů, podrobnosti o přípravě vzorků, postupy k odstranění interferujících faktorů.
- 👁️ Přítomnost interferujících faktorů (postupů na jejich odstranění) zkouška provedena na nejméně 3 šaržích testovaných vzorků.



## 2.6.14 Zkouška na bakteriální endotoxiny

### Validace (revalidace) metody, kritéria přijatelnosti

- ☉ Zkouška může být provedena jakoukoliv ze šesti metod popsanou v ČL. (2.6.14 *Bakteriální endotoxiny*).
- ☉ Zkouška se provede způsobem vylučující kontaminaci endotoxinem.
- ☉ Proveďte se výpočet nejvyššího účinného ředění (MVD) vzorec pro výpočet uveden v příslušném článku ČL. s ním související vzorec pro výpočet limitní koncentrace endotoxinů.
- ☉ Součástí validace (revalidace) je kromě pracování v souladu s doporučením výrobce testovací soupravy (např. každé měření provádět s negativní, pozitivní kontrolou, vhodnou úpravou pH, atd.). Ověření citlivosti lyzátu, vyloučení a odstranění možných interferujících faktorů

## Provedení zkoušky podle metody A a B

Pro ověření přesnosti a validity se musí ověřit:

- ☉ Deklarovaná citlivost lyzátu (ověření se provede na 4 vzorcích dle postupu uvedeném v článku 2.6.14 *Bakteriální endotoxiny*, provede se i v případech nové šarže lyzátu a při jakékoliv změně, která by mohla ovlivnit výsledek zkoušky).
- ☉ Provést zkoušku na interferující faktory (postupy na jejich odstranění) zkouška provedena na nejméně 3 šaržích testovaných vzorků.

## Provedení zkoušek podle kvantitativních metod (metody C, D, E a F)

K zajištění přesnosti, platnosti turbidimetrických, chromogenních metod provést předběžná zkoušení pro prokázání:

- ☉ Vhodnosti kritérií standardní kalibrační křivky.
- ☉ Provádění zkoušky pro každou šarži lyzátu.
- ☉ Sestrojit kalibrační křivku za použití nejméně 3 koncentrací standardního roztoku endotoxinu (rozmezí je určeno výrobcem lyzátu).

- 👁 Zkoušku provést nejméně ve 3 zkumavkách každého ředění standardního endotoxinu dle doporučení výrobce lyzátu (poměry objemů, teplota atd.). Absolutní hodnota korelačního koeficientu  $|r|$  standardní křivky musí být  $\geq 0,980$ .
- 👁 Zamezení interferencí ve zkoušeném roztoku.
- 👁 U některých látek, produktů problém  $\rightarrow$  inhibují/aktivují enzymatickou reakci (jako jsou  $\beta$ -D-glykany), nelze u nich upravit pH na požadované rozmezí zkoušky. Nutnost provést předběžnou zkoušku na interferující faktory (provedení ověření na 3 testovaných šaržích vzorků).

- Roztok se považuje za prostý interferujícími faktory pokud hodnota přidaného endotoxinu ke zkoušenému roztoku po odečtení vykazuje hodnotu 50 % až 200 % známé koncentrace přidaného endotoxinu (pozitivní kontrola).
- Hodnota endotoxinu mimo vymezený rozsah předpokládá interferujícími faktory ve zkoušeném roztoku. Vždy opakování zkoušky po odstranění možných interferujících faktorů nebo změnách experimentálních podmínek (možnost ovlivnění výsledků zkoušek).

## 2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

- ☞ Přednostně určena k použití jako alternativní náhrada zkoušky na pyrogenní látky na králících. Nutná validace pro jednotlivé přípravky.
- ☞ *V ČL 2.6.30 Zkouška aktivace monocytů jsou uvedeny 3 metody (Metoda A Kvantitativní zkouška, metoda B Semikvantitativní zkouška, metoda C Porovnávací zkouška s referenční šarží).*
- ☞ Provedou se předběžná zkoušení (slouží zajištění přesnosti, platnosti zkoušky).

## 🕒 Ověření kritérií kalibrační křivky

- Sestrojení kalibrační křivky za použití nejméně 4 koncentračních hladin standardního roztoku endotoxinu.
- Připraví se nejméně ve 4 souběžných stanovení koncentračních hladin standardního roztoku endotoxinu.
- Provést slepou zkoušku (bez přídavku standardního endotoxinu).
- Ředění neinterferuje se zkouškou.

☞ Zkouška musí umožňovat detekovat endotoxiny a neendotoxické kontaminující látky. Roztok vzorku neinterferuje s detekčním limitem metody.

☞ Zkouška na interferující faktory.

- Provést předběžné zkoušky na interferující faktory → prokázání, že zkoušené roztoky nepodléhají interferenčním vlivům.



## Zkouška na bakteriální endotoxin pomocí faktoru C

- ☞ Zkouška využívající ke stanovení rekombinantní faktor C je považována za alternativní metodu, není to lékopisná zkouška.
- ☞ Nově bude uvedena v Ph.Eur. 10, doplněk 3, platnost od 1.7.2020, tato metoda bude uvedena jako: *2.6.32 Zkouška na bakteriální endotoxin pomocí faktoru C.*



## 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](mailto:posta@sukl.cz)