

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA LUZNAR

**VALIDACIJA POSTOPKA STERILIZACIJE CENTRIFUGE IN
BIOREAKTORJA**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA LUZNAR

**VALIDACIJA POSTOPKA STERILIZACIJE CENTRIFUGE IN
BIOREAKTORJA
VALIDATION OF STERILIZATION PROCESS OF CENTRIFUGE
AND BIOREACTOR**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem izdelala v laboratoriju Razvojnega centra biofarmacevtike Lek d.d. v Mengšu pod mentorstvom prof.dr. Stanka Srčiča, mag. farm. in somentorstvom dr. Saše Stojkovića, univ. dipl. inž. živ. teh., biotehnologija.

Ob tej priložnosti bi se rada najprej zahvalila vsem zaposlenim v oddelku PIL Bioprocesi za pomoč pri delu z bioreaktorji in prijetno vzdušje v laboratoriju, še posebej Juretu Mohoriču, za vodenje celotne diplomske naloge, podporo in vse posredovano znanje. Posebna zahvala gre Jerneju Kmetu za stokovno pomoč in praktične nasvete pri izvedbi validacije. Iskrena hvala somentorju dr. Saši Stojkoviću za proložnost in usmerjanje pri delu s koristnimi nasveti. Hvala tudi mentorju dr. Stanku Srčiču za pripravljenost in napotke pri izdelavi diplomske naloge. Posebno lepo pa se zahvaljujem svoji družini, Andreju in prijateljem, ki so mi stali ob strani, me spodbujali in podpirali v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, pod mentorstvom prof.dr. Stanka Srčiča, mag. farm. in somentorstvom dr. Saše Stojkovića, univ. dipl. inž. živ. teh., biotehnologija.

Saša Luznar

Ljubljana, 2012

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm..

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 Validacija	1
1.1.1 Načela GMP	1
1.2 Sterilizacija	4
1.2.1 Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom	5
1.3 Stopnja zagotavljanja sterilnosti	6
1.4 Biološki indikatorji	6
1.5 Sterilizacijska kinetika	7
1.5.1 Vrednost D – toplotna odpornost	8
1.5.2 Vrednost Z – temperaturni koeficient.....	9
1.5.3 Vrednost L – stopnja smrtnosti.....	9
1.5.4 Vrednost F - smrtnost	10
1.6 Razvoj sterilizacijskega procesa	10
1.6.1 Pristop s pretiranim uničenjem MO	11
1.6.2 Pristop z mikrobno obremenitvijo	12
1.7 Validacija sterilizacije.....	13
1.7.1 Validacija SIP postopka	14
1.7.2 Izbira BI za validacijo z nasičeno vodno paro pod tlakom	15
1.7.3 Število in lokacija BI pri validaciji.....	16
2. NAMEN	18
3. MATERIALI IN METODE	19
3.1 Oprema.....	19
3.1.1 Oprema in materiali uporabljeni pri validaciji	21
3.2 Izvedba validacije	22

3.2.1	Kalibracija temperaturnih senzorjev enote in termočlenov merilnega sistema	23
3.2.2	Testiranje ustreznosti kakovosti kondenzata čiste pare.....	23
3.2.3	Testiranje integritete filtrov pred in po SIP postopku	23
3.2.4	Merjenje porazdelitve temperatur med validacijo SIP postopka.....	26
3.2.5	Zahteve za uspešno validacijo SIP posopka.....	34
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1	Rezultati validacije SIP postopka za posamezne enote	37
4.2	Rezultati merjenja porazdelitve temperatur med validacijo SIP postopka.....	60
4.3	Rezultati testiranja sterilnosti BI.....	61
4.4	Rezultati testiranja integritete filtrov pred in po SIP postopku	61
4.5	Komentar grafov	62
5.	SKLEP.....	64
6.	LITERATURA	65
7.	KAZALO PREGLEDNIC.....	67
8.	PRILOGA	68

SEZNAM OKRAJŠAV

GMP	dobra proizvodna praksa (DPP, angl.GMP)
MO	mikroorganizem
BI	biološki indikator
SIP	sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom na mestu samem
SAL	stopnja zagotavljanja sterilnosti
MOpU	mikroorganizmov na enoto (MOpE, angl. MopU)
D vrednost	merilo toplotne odpornosti MO
D_T vrednost	vrednost toplotne odpornosti v minutah za MO pri temperaturi T
T	temperatura
N_t	število MO po izpostavitvi t minutam sterilizacije
N_0	število MO pred izpostavitvijo t minutam sterilizacije
F vrednost	merilo smrtnosti procesa
$F_{(T,Z)}$ vrednost	F vrednost, izražena v smislu enakovrednega časa v minutah pri referenčni temperaturi T, z uporabo temperaturnega koeficienta Z
F_0 vrednost	F vrednost izražena v smislu enakovrednega časa v minutah pri temperaturi 121,1°C, z uporabo Z je 10
Z vrednost	sprememba temperature, ki je potrebna za spremembo D vrednosti za faktor 10
L vednost	stopnja smrtnosti
USP	United States Pharmacopeia
TC	termočlen, termočleni
IPA	izopropanol
OQ	kvalifikacija delovanja
T_{min}	najnižja izmerjena temperature med sterilizacijo
T_{max}	najvišja izmerjena temperature med sterilizacijo
\bar{T}_{min}	najnižja povprečna temperature med sterilizacijo
\bar{T}_{max}	najvišja povprečna temperature med sterilizacijo
\bar{T}	povprečna temperature vseh termočlenov med sterilizacijo

POVZETEK

Pri proizvodnji sterilnih učinkovin je zelo pomembno, da med proizvodnim procesom ne pride do mikrobiološke kontaminacije. Vsa oprema, ki jo uporabljamo pri proizvodnji mora biti zato sterilna. Bioreaktorji in centrifuge so zapleteni sistemi posod, cevi in ventilov in jih lahko steriliziramo na mestu. Ker bi bilo preverjanje sterilnosti med vsakim procesom sterilizacije zelo zamudno, izvedemo validacijo postopka sterilizacije, s čimer zagotovimo ustreznost izvedbe postopka sterilizacije in doseganje vnaprej določenih sprejemljivih kriterijev. Sterilizacija opreme z nasičeno vodno paro pod tlakom je prednostna metoda sterilizacije v farmacevtski industriji. Sterilizacijsko sredstvo je nasičena vodna para pod tlakom, ki ima energijo shranjeno v obliki latentne toplote. Ob stiku s hladno površino se para kondenzira, energija se sprosti in povzroči uničenje celic in spor mikroorganizmov. Med postopkom sterilizacije moramo zagotoviti, da dosežemo sterilizacijske pogoje v vseh delih opreme, kar nadzorujemo s fizikalnimi meritvami temperature in uporabo bioloških indikatorjev. Namen diplomske naloge je bila validacija postopka sterilizacije centrifuge in bioreaktorjev in preko nje zagotoviti ter potrditi, da predpisani postopki za izvedbo sterilizacije na mestu omogočajo doseganje predpisanih parametrov sterilizacijskega postopka, stopnjo zagotavljanja sterilnosti najmanj 10^{-6} mikroorganizmov na enoto (v nadaljevanju MOpU) in ponovljivost postopka sterilizacije. Uporabili smo pristop sterilizacije s pretiranim uničenjem mikroorganizmov, kar pomeni, da mora temperatura sterilizacije v vseh delih enote 20 minut presegati 121°C . Med postopkom sterilizacije smo merili temperature v hladnih točkah sistema in iz dobljenih podatkov vrednotili uspešnost postopka. Pri vseh bioreaktorjih in pri centrifugi smo dosegli ustrezne temperature in čas sterilizacije ter posledično ustrezno smrtnost mikroorganizmov. Učinkovitost procesa sterilizacije iz stališča sterilizacijskega sredstva in pogojev smo potrjevali tudi z uporabo bioloških indikatorjev. Vsi biološki indikatorji so bili po postopku sterilizacije sterilni, kar dokazuje učinkovitost postopka sterilizacije. Sterilizacijo smo izvajali kot začetno validacijo, kar pomeni, da smo jo na vsaki enoti trikrat uspešno izvedli in s tem dokazali ponovljivost postopka sterilizacije.

ABSTRACT

The manufacture of sterile products is subject to special requirements in order to minimize the risks of microbiological contamination; therefore all used equipment must be sterilized. Bioreactors and centrifuges are complex arrangements of vessels, valves and pipes that can be sterilized in place. The sterility of a product cannot be guaranteed by testing it during each sterilization procedure, since it would be time consuming. That is why it has to be assured by the application of a suitably validated sterilization process. Sterilization by saturated steam under pressure is the preferred method of sterilization in the pharmaceutical industry for sterilization of equipment. Sterilizing agent is saturated steam that has the energy stored in the form of latent heat. After contact with cold surface, the steam condenses; energy is released and causes destruction of cells and spores of microorganisms. Sterilization must be performed in a way to ensure that sterilization specifications are delivered to all parts of the system. Effectiveness of sterilization process should be demonstrated by physical measurements and by biological indicators where appropriate. The aim of our work was validation of sterilization process of centrifuge and bioreactors in order to prove that required procedures for carrying out sterilization in place will consistently achieve predetermined parameters of sterilization process, sterility assurance level less than 10^{-6} microorganisms per unit and the repeatability of the sterilization process. We used the overkill approach of sterilization, which meant that the sterilization temperature had to exceed 121°C for 20 minutes in all parts of the unit. We measured the temperature of cold spots during the sterilization process and then evaluated effectiveness of sterilization process from resulting data. In all bioreactors and centrifuge the required temperature and time of sterilization and consequently the adequate lethality of microorganisms was reached. The effectiveness of the sterilization process was additionally confirmed by using biological indicators. All biological indicators used during validation were sterile after sterilization process, which proved the effectiveness of sterilizing agent. Validation was successfully repeated three times on each unit, which demonstrated the repeatability of the sterilization process.

1. UVOD

1.1 Validacija

Validacija je dokumentiran postopek preskušanja in potrjevanja, ki v skladu z načeli dobre proizvodne prakse (DPP, angl.GMP) zagotavlja, da katerikoli postopek, proces, oprema, material, aktivnost ali sistem vodi do pričakovanih rezultatov (1).

Z validacijo sterilizacije dokumentirano zagotovimo in potrdimo učinkovitost in ponovljivost procesa sterilizacije, pri vnaprej določenih parametrih (sprejemljivih kriterijih) (2).

Učinkovita validacija sterilizacije prispeva k zagotavljanju zelene kakovosti izdelka, v našem primeru zdravila. Kakovost, varnost in učinkovitost moramo vgraditi v zdravilo. Kakovosti ne moremo vedno ustrezno zagotoviti s končnim testiranjem izdelka. Vsako bistveno stopnjo v razvoju, proizvodnji in kontroli zdravil nadzorujemo in s tem zagotovimo, da končni izdelek ustreza vsem zahtevam kakovosti in predpisanim specifikacijam (3).

1.1.1 Načela GMP

Proizvajalci zdravil morajo upoštevati načela GMP (dobre proizvodne prakse). Na podlagi ocene tveganja proizvajalec zdravil določi kritične procese v proizvodnem postopku, ki jih je potrebno validirati.

Revalidacijo izvajamo ob vsaki večji spremembi v prostorih, na opremi in pri procesu, ki lahko vpliva na kakovost izdelka. Za določanje področja in obsega validacij uporabimo pristop ocene tveganja (2).

1.1.1.1 Načrtovanje validacije

Validacije moramo načrtovati in ključne elemente jasno opredeliti in dokumentirati v programu validacij. Program validacij je kratek, jasen in jedrnat povzetek dokumentov, ki zadevajo validacije. Program validacij vsebuje:

- politiko proizvajalca zdravil do validacij,

- organizacijo validacijskih aktivnosti,
- povzetek opisa prostorov, sistemov, opreme in procesa, ki ga validiramo,
- dokumente, ki jih kasneje uporabimo za pisanje validacijskega protokola in poročila,
- časovno načrtovanje validacijskih aktivnost,
- obvladovanje sprememb,
- reference k obstoječemu dokumentu (2).

1.1.1.2 Dokumenti

Validacijski protokol vsebuje namen in cilj validacije, opis validiranega sistema, pogoje za pričetek postopka in odgovorne nosilce. Določa izvedbo validacij:

- postopek testiranja,
- kritične korake,
- število ponovitev,
- sprejemljive kriterije,
- pogostost izvajanja periodičnih validacij in zahteve za izvedbo revalidacij.

V validacijskem poročilu napišemo povzetek dobljenih rezultatov, doseganje sprejemljivih kriterijev in navedemo ter komentiramo vsa opažena odstopanja. Oblikujemo zaključke, ki lahko vsebujejo tudi priporočene spremembe, potrebne za odpravo odstopanj. Vsaka sprememba mora biti ustrezno utemeljena (2).

1.1.1.3 Validacija procesa

Validacijo procesa, kadar je le možno, izvedemo kot prospektivno validacijo, preden je nov izdelek vpeljan v proizvodnjo, ter pred distribucijo in prodajo izdelka na tržišče. V posebnih primerih, ko to ni mogoče, naredimo sprotno validacijo, ki poteka med redno proizvodnjo izdelka. Odločitev za sprotno validacijo mora biti utemeljena. Pri procesih, ki so v uporabi že dlje časa, so dobro uveljavljeni in še niso bili validirani, lahko naredimo retrospektivno validacijo. Validacija takih procesov temelji na zbiranju podatkov iz zgodovine izdelka, ki obsega podatke od 10 pa do 30 serij nazaj. Uporabiti moramo reprezentativne serije. Retrospektivna validacija ni primerna, če so prisotne nedavne

spremembe v sestavi izdelka, procesu ali opremi. Izvedemo jo v skladu s specifičnim protokolom in zaključimo s pregledom podatkov, ki omogočajo izdelavo zaključnega priporočila.

Prostori, sistemi in oprema, ki jo uporabljamo pri izvedbi validacije morajo biti kvalificirani in kalibrirani, uporabljene analitske metode pa morajo biti validirane. Osebe, ki sodeluje pri izvedbi validacije mora biti ustrezno usposobljeno. Prostore, sisteme, opremo in proces moramo periodično preverjati s kvalifikacijami in kalibracijami, da zagotovimo njihovo delovanje v sprejemljivem območju.

Prospektivna validacija mora vsebovati:

- kratek opis procesa,
- povzetek kritičnih mest,
- seznam opreme in prostorov, ki jih uporabljamo,
- spisek potrebnih kalibracij,
- specifikacije končnega izdelka,
- seznam analitskih metod,
- predlagano medprocesno kontrolo s kriteriji sprejemljivosti,
- dodatne teste kriterijev sprejemljivosti,
- potrebne validacije analitskih metod,
- načrt vzorčenja,
- metode za pridobivanje in vrednotenje rezultatov,
- zadolžitve in odgovornosti osebja
- predlagan plan izvedbe validacije.

Proces je uspešno validiran, ko izpeljemo tri zaporedne ponovitve procesa in so vsi rezultati znotraj kriterijev sprejemljivosti. Sklepamo, da s tremi ponovitvami dobimo dovolj podatkov o trendih in morebitnih odstopanjih od želenih kriterijev sprejemljivosti. Proces moramo validirati pri enaki velikosti serije, kot ga nato uporabljamo v proizvodnji. Proces validacije izvajamo v skladu z GMP smernicami (2).

1.1.1.4 Obvladovanje sprememb

Postopek za obvladovanje sprememb mora na podlagi zbranih podatkov zagotoviti, da bo po uvedeni spremembi, proces še naprej proizvajal izdelke predpisane kakovosti in v skladu z odobrenimi specifikacijami in GMP smernicami. Do sprememb lahko pride pri vstopajočih surovinah, ovojninah, opremi, prostorih, postopku proizvodnje in testiranju ali pri drugih spremembah, ki lahko vplivajo na kakovost izdelka in ponovljivost procesa. Vsaki večji spremembi postopka, prostorov ali vstopnih materialov sledi revalidacija procesa (2).

1.1.1.5 Revalidacija

Revalidacija je ponovitev postopka validacije z namenom zagotavljanja, da so uvedene spremembe pri postopku in opremi v skladu s kontrolo sprememb in ne vplivajo na lastnosti procesa in kakovost izdelka. Revalidacije se izvajajo v enakem obsegu kot začetna validacija (2).

1.2 Sterilizacija

Sterilnost je izraz, ki pomeni odsotnost vseh živih mikroorganizmov (v nadaljevanju MO) in njihovih spor. Sterilnosti opreme in izdelka ne moremo zagotoviti z vsakokratnim preskušanjem, saj bi to bilo zelo zamudno, lahko pa jo zagotovimo z ustrezno validiranim postopkom sterilizacije (4).

Proizvodnja sterilnih izdelkov mora ustrezati posebnim zahtevam, ki preprečujejo mikrobiološko kontaminacijo zdravila. Ena od zahtev je, da mora biti vsa oprema, ki jo uporabljamo pri pripravi zdravila, sterilizirana z validiranim postopkom sterilizacije (5).

Pri načrtovanju procesa sterilizacije moramo upoštevati načela GMP:

- osebe mora biti kvalificirano in ustrezno strokovno usposobljeno,
- prostori morajo biti primerni za proces sterilizacije,
- uporabljati moramo opremo, ki omogoča enostavno čiščenje in sterilizacijo,
- pred samo sterilizacijo moramo čim bolj zmanjšati mikrobno obremenitev opreme z ustreznim čistilnim postopkom,

- validirati moramo vse kritične stopnje postopka,
- spremljati moramo parametre procesa in okolja (4,5).

Mikrobna obremenitev je naravna obremenitev površin z MO. Pred sterilizacijo želimo čim bolj zmanjšati mikrobno obremenitev, zato uporabimo materiale s sprejemljivo nizko stopnjo mikrobiološke kontaminacije. Metode sterilizacije se uporabljajo predvsem za inaktivacijo bakterij in njihovih spor, kvasovk, ter plesni (4).

Med postopkom sterilizacije moramo zagotoviti, da dosežemo sterilizacijske pogoje v vseh delih opreme, kar nadzorujemo z meritvami temperature in uporabo bioloških indikatorjev (v nadaljevanju BI) (5).

1.2.1 Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom

Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom je metoda izbora zlasti za tekoče farmacevtske izdelke, med njimi v večini za vodo za injekcije in različne vodne pripravke (4). Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom je prednostna metoda sterilizacije v farmacevtski industriji in se uporablja tudi za sterilizacijo opreme in poroznih materialov, ki jih potrebujemo za aseptično proizvodnjo. Uporablja se za sterilizacijo medija (npr. vode) in ostalih materialov v mikrobioloških laboratorijih ter za sterilizacijo na mestu (v nadaljevanju SIP), ki jo uporabljamo pri velikih sistemih posod, ventilov in cevi (6).

Sterilizacija z nasičeno vodno paro pod tlakom je zelo zanesljiva metoda za uničevanje MO, saj uniči vse žive organizme vključno z odpornimi oblikami MO in endosporami. Uničenje MO nastopi, ko pride znotraj celice do nepopravljive in celici škodljive presnovne spremembe. Sterilizacijsko sredstvo je nasičena vodna para pod tlakom, ki ima energijo shranjeno v obliki latentne toplote. Ob stiku s hladno površino se para kondenzira in pride do prenosa toplote na celice MO. Prizadete so razne medmoelkularne vezi, kar povzroči denaturacijo kritičnih proteinov in nukleinskih kislin in posledično uničenje celic MO. Ob kondenzaciji se para skrči na majhen volumen in nastane območje nizkega tlaka, kar povzroči dotok nove pare na to področje. Pri sterilizaciji z vodno paro je toplotna kapaciteta vodne pare bistveno bolj izkoriščena v primerjavi z vročim suhim zrakom (6).

Zelo pomembna je čistost pare. Če para vsebuje vlago ali nekondenzirajoče pline (npr. N₂, CO₂), ne bo vsebovala enake količine energije kot čista para in smrtnost postopka sterilizacije ne bo takšna, kot smo predvideli za čisto paro. Pri sterilizaciji opreme pride para neposredno v stik z MO na opremi, ki jo steriliziramo. Kakršenkoli preostali zrak v bližini MO jih bo izoliral in preprečil stik MO s paro ter tako zmanjšal količino prenesene energije. Samo s spremljanjem temperatur dobimo malo podatkov o učinkovitosti pare kot sterilizacijskega sredstva, z uporabo BI pa lahko potrdimo ustrezno smrtnost sterilizacijskega postopka (6).

1.3 Stopnja zagotavljanja sterilnosti

Sterilnosti v katerikoli enoti v populaciji elementov, ki jih izpostavimo postopku sterilizacije ni možno kontrolirati, niti je ni možno dokazati. Uničenje MO s fizikalnimi in kemijskimi metodami sledi eksponentnemu zakonu, zato vedno obstaja statistična verjetnost, da lahko MO preživi postopek sterilizacije. Za dani proces se verjetnost preživetja določi glede na število, vrsto in odpornost MO, ki so prisotni in od okolja, v katerem organizmi obstajajo. Stopnja zagotavljanja sterilnosti (v nadaljevanju SAL) sterilizacijskega procesa je stopnja verjetnosti, do katere določen proces zagotavlja sterilnost izdelkov. SAL za določen proces je izražen kot verjetnost prisotnosti nesterilne enote v populaciji. SAL 10^{-6} MOpU izraža verjetnost, da v 1×10^6 steriliziranih enot ni prisoten več kot 1 živ MO. Celoten proces, vključno s proizvodnjo, shranjevanjem in prodajo mora zagotoviti SAL enak ali boljši kot 10^{-6} MOpU. SAL postopka za dani proizvod je določen s primernimi validacijskimi postopki (4).

1.4 Biološki indikatorji

Biološki indikatorji so standardizirani testerji izbranih mikroorganizmov, ki jih uporabljamo za določevanje in potrjevanje uspešnosti postopka sterilizacije. Običajno so sestavljeni iz populacije bakterijskih spor, ki so inkubirane v/na primernem inertnem nosilcu. Suspenzijo spor imamo lahko tudi v zatesnjenih ampulah. Vsebnik je oblikovan tako, da zaščiti vsebino pred dejavniki okolja in kontaminacijo, hkrati pa omogoča stik sterilizacijskega sredstva z MO. BI opredelimo z bakterijsko vrsto, ki se uporablja kot

referenčni MO, s številko prvotnega seva, s številom za razmnoževanje sposobnih spor na nosilcih in z D vrednostjo (4).

Z BI ugotavljamo ali so bili med sterilizacijo doseženi sterilizacijski pogoji. Biološki indikatorji ne zamenjujejo rezultatov termometričnih študij. Sterilnost je le verjetnost, da so mikroorganizmi odsotni, zato za doseganje večje zanesljivosti zagotavljanja sterilnosti, uporabimo merjenje temperature in biološke indikatorje (5).

Po izpostavljenosti sterilizacijskemu sredstvu v simuliranem ali realnem postopku uporabimo aseptični postopek prenosa nosilca spor v ustrezno gojišče, tako da v času testa ne pride do kontaminacije. Lahko pa uporabimo tudi BI, kjer je nosilec s spori zaprt neposredno v ampulo z gojiščem. Vsi biološki indikatorji, ki so bili izpostavljeni postopku sterilizacije, morajo biti sterilni, kontrolni biološki indikator, ki pa postopku sterilizacije ni bil izpostavljen, pa je seveda nesterilen. S pozitivnimi kontrolami, ki jih ne izpostavimo pogojem sterilizacije, preverimo kakovost uporabljenih bioloških indikatorjev. Po inkubaciji nam rast referenčnih MO, ki so bili izpostavljeni sterilizacijskim pogojem kaže na to, da postopek sterilizacije ni bil zadovoljiv (4).

1.5 Sterilizacijska kinetika

Kinetika uničenja homogene kulture MO, ki jo pri postopku sterilizacije izpostavimo konstantnemu letalnemu stresu, je oblike eksponencialne reakcije prvega reda. Stopnja mikrobiološkega uničenja je funkcija temperaturne odpornosti MO in letalnega stresa ter je neodvisna od števila MO v postopku. Kinetika uničenja MO je Logaritemska skala krivulje preživetja nikoli ne doseže vrednosti nič. To pomeni, da pri nobeni temperaturi, ob katerem koli času, ne moremo zagotoviti, da bodo uničeni vsi MO. Sterilizacijski proces mora biti tako specificiran, da zagotavlja, da je preživetje MO dovolj nizko za zagotovitev varnosti pacienta. Doseči moramo SAL 10^{-6} MOpU. Linearna oblika krivulje preživetja nam pove, da je sterilizacija s paro napovedljiv proces. To je pomembno, ker na podlagi tega lahko s poznavanjem števila in temperaturne odpornosti MO, razvijemo sterilizacijske specifikacije in parametre, ki nam zagotavljajo učinkovit in napovedljiv proces (6).

poznana kot krivulja preživetja MO. Krivuljo preživetja MO lahko opišemo s semilogaritemskim modelom prvega reda (8). Obstaja linearni odnos med logaritemsko

vrednostjo preživetja izpostavljenih MO in časom izpostavljenosti pri določeni temperaturi (6).

$$\log N_t = -F_{(T,Z)}/D_T + \log N_0 \quad (1)$$

Logaritemska skala krivulje preživetja nikoli ne doseže vrednosti nič. To pomeni, da pri nobeni temperaturi, ob katerem koli času, ne moremo zagotoviti, da bodo uničeni vsi MO. Sterilizacijski proces mora biti tako specificiran, da zagotavlja, da je preživetje MO dovolj nizko za zagotovitev varnosti pacienta. Doseči moramo SAL 10^{-6} MOpU. Linearna oblika krivulje preživetja nam pove, da je sterilizacija s paro napovedljiv proces. To je pomembno, ker na podlagi tega lahko s poznavanjem števila in temperaturne odpornosti MO, razvijemo sterilizacijske specifikacije in parametre, ki nam zagotavljajo učinkovit in napovedljiv proces (6).

1.5.1 Vrednost D – toplotna odpornost

Vrednost D je merilo toplotne odpornosti MO. Pomeni vrednost sterilizacijskega parametra, ki je potreben, da se populacija živih MO zmanjša za 90 odstotkov prvotne vrednosti, oziroma izraženo v log enotah za 1 log. D_T je čas v minutah, ki je pri temperaturi T potreben za zmanjšanje populacije živih MO za 1 log enoto (4).

Vrednost D določamo, ko želimo oceniti temperaturno odpornost izdelka, ko želimo ugotoviti vpliv spremembe formulacije na toplotno odpornost, za določanje toplotne odpornosti MO, ki smo jih izolirali iz proizvodnega okolja in za določanje vrednosti D BI (7).

Vrednost D_T določimo s pomočjo krivulje preživetja. D_T je obratno sorazmeren z naklonom premice semilogaritemskega modela. D_T lahko izračunamo z metodo direktnega štetja ali z metodo negativne frakcije (7).

Pri metodi direktnega štetja določamo število preživelih spor v vzorcih, ki smo jih različno dolgo časa izpostavljali določeni temperaturi. Čas, ki je potreben, da se populacija MO zmanjša za 1 log, lahko določimo grafično iz krivulje preživetja, lahko pa ga izračunamo po enačbi, ki jo dobimo iz naklona krivulje preživetja z uporabo linearne regresije (7).

Pri metodi negativne frakcije večje število vzorcev s spori izpostavimo enakim pogojem temperature in časa. Izberemo več časov sterilizacije in po inkubaciji določamo število

sterilnih in nesterilnih vzorcev ob določenih časih sterilizacije. Z metodo Spearman – Karber določamo povprečen pričakovan čas, ki je potreben, da vzorec z MO postane sterilen. Z metodo Stumbo – Murphy – Cochran pa analiziramo najverjetnejše število preživelih MO (7).

1.5.2 Vrednost Z – temperaturni koeficient

Pri sterilizaciji s paro nam vrednost Z pokaže vpliv spremembe temperature na toplotno odpornost (vrednost D) MO. Vrednost Z je sprememba temperature, ki je potrebna za spremembo vrednosti D za faktor 10 (4).

Proces sterilizacije s paro navadno izvajamo pri ozkem območju temperatur (od 110 do 135 °C), zato iz praktičnih razlogov uporabljamo vrednost Z kot konstanto in sicer 10 °C.

Vrednost Z najlažje določamo grafično. Določimo temperaturi pri spremembi vrednosti D za faktor 10 (7).

$$Z = (T_2 - T_1) / (\log D_1 - \log D_2) \quad (2)$$

D1 = D vrednost mikroorganizmov pri temperaturi T1

D2 = D vrednost mikroorganizmov pri temperaturi T2

1.5.3 Vrednost L – stopnja smrtnosti

Temelj določanja učinkovitosti sterilizacijskega procesa je povezava med časom pri točno določeni temperaturi in uničenjem MO. Pri praktičnem izvajanju sterilizacije pa temperature lahko malce nihajo okrog določene referenčne temperature (navadno 121,1 °C). Ta nihanja so navadno majhna, lahko pa imajo velik vpliv na smrtnost (vrednost F). Zato za vsako temperaturo, ki jo izmerimo v določenih časovnih intervalih, izračunamo stopnjo smrtnosti (vrednost L) (7).

$$L_{(121,1^\circ\text{C}, Z)} = 10^{(T - 121,1^\circ\text{C})/Z} \quad (3)$$

Ker je L eksponentna funkcija temperature, že majhne spremembe v temperaturi pomenijo velike spremembe v stopnji smrtnosti (7).

1.5.4 Vrednost F - smrtnost

Vrednost F je merilo smrtnosti procesa, to je sposobnosti mikrobiološke inaktivacije sterilizacijskega procesa. Vrednost F označuje čas sterilizacije z enakovrednim učinkom mikrobiološkega uničenja, kot pri določeni referenčni temperaturi (7).

Skupna vrednost F upošteva faze segrevanja in ohlajanja in se lahko izračuna z integriranjem stopnje smrtnosti glede na čas v določenih temperaturnih intervalih (4).

$$F = \left(\sum_{t=0}^{t=x} L \right) d \quad (4)$$

d = čas med dvema meritvama temperature v minutah

x = čas celotnega testa

Vrednost F_0 postopka sterilizacije z nasičeno paro je smrtnost izražena v smislu enakovrednega časa v minutah pri temperaturi 121,1 °C, ki jo s postopkom dostavimo do izdelka. Predpostavimo, da imajo MO teoretično vrednost Z 10 °C. Ko sterilizacijo s paro izberemo na podlagi koncepta F_0 , je treba zelo paziti, da dosledno zagotovimo ustrezno zanesljivost procesa. Poleg validacije procesa je prav tako treba izvajati neprekinjen mikrobiološki nadzor med rutinsko proizvodnjo, da dokažemo, da so mikrobiološki parametri znotraj določene tolerance, in da nam dajo SAL boljši od 10^{-6} MOpU (4).

$$F_0 = D_{121} (\log N_0 - \log N) \quad (5)$$

1.6 Razvoj sterilizacijskega procesa

Pri razvoju sterilizacijskega procesa ločimo razvoj sterilizacijskih specifikacij in razvoj sterilizacijskih parametrov. Pri farmacevtskih snoveh in materialih, ki jih uporabljamo pri aseptični proizvodnji, so sterilizacijske specifikacije vezane na temperaturo in čas izpostavljenosti MO sterilizacijskim pogojem, na F_0 ali pa na kombinacijo F_0 , temperature in časa. Ti pogoji morajo biti doseženi na mestu prisotnosti MO, znotraj vodne raztopine, na površini gumijastega zamaška ali kovinskih delov aparature ali znotraj gub vložka filtra (6).

Sterilizacijski parametri so praktična merila, ki jih moramo določiti pri nastavitvah naprave, da zagotovimo doseg sterilizacijskih specifikacij v vseh delih opreme. Vedno vključujejo specifikacije za temperaturo in čas ter nastavitvev primernih tlakov. Poleg tega pa upoštevajo tudi, toplotne lastnosti materialov, ki jih steriliziramo (6).

Sterilizacijske specifikacije so specifične za posamezno opremo, sterilizacijski parametri pa so odvisni od opreme, vrste potencialnih kontaminantov in od kakovosti sterilizacijskega medija. Sterilizacijske specifikacije za enoto lahko določimo s pomočjo literature ali eksperimentalno dobljenih podatkov. Sterilizacijski parametri morajo zagotoviti, da dosežemo sterilizacijske specifikacije v vseh delih opreme. Niso prenosljivi in morajo biti razviti posamezno za vsak tip opreme (6).

Poznamo dva osnovna pristopa pri razvoju sterilizacijskega procesa, pristop pretiranega uničenja MO in pristop z mikrobnobno obremenitvijo (ang. bioburden) osnovan na lastnostih izdelka. Oba pristopa zagotavljata enak SAL, odločitev o izboru pristopa je zato navadno odvisna od temperaturne odpornosti materiala, ki ga steriliziramo (7).

1.6.1 Pristop s pretiranim uničenjem MO

Pri pristopu s pretiranim uničenjem MO ne upoštevamo števila in temperaturne odpornosti MO, ampak predpostavimo najslabši možni primer mikrobnobne obremenitve 10^6 MOpU. MO, ki jih najdemo v farmacevtskem proizvodnem okolju imajo zelo redko D_{121} vrednost v vodi večjo kot 0,5 minute, zato lahko kot najslabši možni primer vzamemo D_{121} vrednost 1 minuta. Pri sterilizaciji želimo doseči SAL 10^{-6} MOpU in z Enačbo 4 lahko izračunamo F_0 , ki je 12 minut (7).

V Evropski farmakopeji so za metodo sterilizacije z nasičeno vodno paro pod tlakom pri populaciji 10^9 MOpU, referenčni pogoji za sterilizacijo vodnih pripravkov s pretiranim uničenjem MO segrevanje na najmanj 121°C za 15 minut. Druge kombinacije časa in temperature se lahko uporabljajo pod pogojem, da je bilo zadovoljivo dokazano, da izbrani postopek zagotavlja ustrezno in ponovljivo stopnjo smrtnosti v skladu z uveljavljenimi odstopanji (4). Definicija specifikacij za sterilizacijo s pretiranim uničenjem MO po USP za populacijo 10^6 MOpU je 12 D (6).

Visoke teoretične zahteve pretiranega uničenja MO so pogojene z D vrednostmi v vodi, ki odražajo D vrednosti v ali na izdelku. Večina farmacevtskih izdelkov zmanjša temperaturno odpornost MO glede na D vrednost v vodi. Za nekatere druge materiale, kot

je na primer guma, pa je znano, da povečajo temperaturno odpornost MO, zaradi fizikalnih karakteristik porazdelitve toplote. Vpliv materialov na temperaturno odpornost lahko določimo le empirično v laboratoriju z uporabo temperaturno odpornih bakterijskih endospor, pogosto *Bacillus stearothermophilus*. Uporaba *Bacillus stearothermophilus* v ta namen je posledica pogoste uporaba enakih BI pri sterilizaciji (6).

1.6.2 Pristop z mikrobno obremenitvijo

Uporaba specifikacij pretiranega uničenja MO ni obvezna. V nekaterih primerih je farmacevtski izdelek občutljiv na povišano temperaturo ali energijski prispevek sterilizacijskih specifikacij. V teh primerih specifikacije razvijemo z izračunom SAL 10^{-6} MOpU iz podatkov o številu in temperaturni odpornosti MO, ki dejansko kontaminirajo izdelek. To je pristop z mikrobno obremenitvijo. Predpostavimo najvišje in najnižje število MO, ki potencialno kontaminirajo naš izdelek pred sterilizacijo. Za sterilne parenteralne pripravke je najvišje dovoljeno število 10^2 MOpU, ker vrednosti nad 10^3 MOpU lahko predstavljajo tveganje za razvoj pirogenosti. Najnižja vrednost je lahko 1 MOpU. Da dosežemo SAL 10^{-6} MOpU iz začetnega števila 10^2 MOpU, moramo populacijo MO zmanjšati za 8 log. Če uporabimo 8 log zmanjšanje pri domnevno najslabšem možnem primeru temperaturne odpornosti (D_{121} v vodi je 1 minuta), dobimo sterilizacijsko specifikacijo 8 minut pri temperaturi 121°C . Dosežek SAL 10^{-6} MOpU pri začetnem številu 1 MOpU zahteva 6 log zmanjšanje populacije MO. Če uporabimo 6 log zmanjšanje pri domnevno najslabšem možnem primeru temperaturne odpornosti (D_{121} v vodi je 1 minuta), pa dobimo sterilizacijsko specifikacijo 6 minut pri temperaturi 121°C . Določanje temperaturne odpornosti je tehnično zapleteno in zahteva posebno opremo (6).

Ker je malo verjetno, da lahko *Bacillus spp.* izključimo iz raziskave o mikrobiološki kontaminaciji, lahko sklepamo, da bodo izolirane tudi spore z D_{121} vrednostjo 0,3 minute. Če za temperaturno odpornost namesto 1 minute uporabimo 0,3 minute, lahko SAL 10^{-6} MOpU pri 121°C preračunamo na 2,4 minut za število 10^2 MOpU in 1,8 minut za 1 MOpU. Kratke sterilizacijske specifikacije reda 2-3 min vzdrževanja temperature pri 121°C so predpisane, ko je MO kontaminacija popolnoma določena v smislu števila in temperaturne odpornosti MO. V praksi je take omejitve časavzdrževanja temperature težko natančno nadzorovati. Ker so časi vzdrževanja temperature pri sterilizacijskih specifikacijah v primerjavi s časom segrevanja in ohlajanja tako majhni, jih težko

utemeljimo regulatornim organom. Brez popolne določitve temperaturne odpornosti so specifikacije preračunane iz pristopa z mikrobno obremenitvijo komaj značilno krajše kot specifikacije pri pristopu s pretiranim uničenjem MO. Zaradi tega navadno izbiramo le med pristopom s pretiranim uničenjem MO ali aseptično proizvodnjo temperaturno občutljivih izdelkov. Nekateri izdelki pa so lahko temperaturno občutljivi samo nad določenim pragom temperature. Če prenesejo temperaturo v območju od 110-118°C ne morejo pa prenesti temperature 121°C, lahko pri želeni temperaturi s podatki o temperaturni odpornosti MO pri tej temperaturi določimo sterilizacijske specifikacije. Pri nižjih temperaturah še vedno lahko dosežemo sterilnost, le daljši čas vzdrževanja temperature potrebujemo (6).

1.7 Validacija sterilizacije

Z validacijo sterilizacije dokumentirano zagotovimo in potrdimo učinkovitost sterilizacijskega postopka izvedenega v skladu z navodili za delo in GMP smernicami. Bistveno je, da izbran postopek sterilizacije zagotavlja učinkovitost, kakovost in varnost zdravila. Če pride do večjih sprememb v postopku sterilizacije, je treba izvesti revalidacijo (4).

Fazi razvoja sterilizacijskih specifikacij in parametrov sledi faza validacije sterilizacijskega postopka. Namen validacije je potrditi, da sterilizacijske specifikacije dosledno dosegajo svoj namen, da smrtnost MO pri uporabi predpisanega postopka ni signifikantno različna od pričakovane smrtnosti. Postopek vodimo tako, da uporabimo sterilizacijske parametre, pridobljene iz razvoja postopka in postopek trikrat ponovimo. Preizkušamo skladnost z vnaprej določenimi kriteriji sprejemljivosti. Sterilizacijske specifikacije so podane kot temperatura in čas z zgornjo in spodnjo mejo odstopanja. Pri sterilizaciji so kritične spodnje meje specifikacij. Čas navadno enostavno nadzorujemo z visoko točnostjo in natančnostjo. Pri avtomatiziranih sistemih nam sistem sam začne meriti čas, ko temperatura doseže temperaturo sterilizacije in po 20 minutah se faza sterilizacije tudi avtomatsko zaključi. Čas sterilizacije je navadno določen v celih minutah. Temperature ni tako enostavno natančno nadzorovati in med fazo sterilizacije navadno malo niha. Temperaturo v območju sterilizacijskih specifikacij ohranjamo z regulacijo tlaka preko ventilov, nemogoče pa je, da bi temperaturo vzdrževali na najnižji meji sterilizacijskih

specifikacij čez celo fazo sterilizacije. Že majhne razlike v temperaturi dajo značilne razlike v količini smrtnosti MO, ki je dostavljena. Na primer, pri temperaturi sterilizacije 121°C lahko napaka 1 °C poveča ali zmanjša količino smrtnosti za 25% (6).

Kriteriji sprejemljivosti pri sterilizaciji z nasičeno vodno paro pod tlakom je uničenje vseh MO.

To pomeni, da je detekcija preživelih MO v BI nesprejemljiva in postopek sterilizacije je v tem primeru neustrezen. Lahko pa so podatki, ki kažejo na preživetje nekaterih, ampak ne vseh, MO v BI dragoceni v razvoju procesa sterilizacije, še posebno v razvoju sterilizacijskih specifikacij in parametrov za porozne materiale. Iz podatka, da imamo nekaj preživelih MO, lahko sklepamo, da ni vsaka točka v opremi izpostavljena enakim sterilizacijskim pogojem (6).

1.7.1 Validacija SIP postopka

SIP postopek je postopek sterilizacije na mestu. Pogosto so to zapleteni sistemi posod, cevi in ventilov. Izziv pri SIP postopku je odstranitev zraka iz posode in povečevanje temperature skozi cevovod tako, da preprečimo izgubljanje toplote in kondenzacijo. Pri razvoju sterilizacijskih specifikacij za SIP postopek na posamezni enoti je največja pozornost usmerjena v fazo gretja. Doseči moramo, da je temperatura sterilizacije povsod dosežena in ugotoviti je treba, kje jo dosežemo najkasneje. Te točke imenujemo hladne točke sistema, na katere je med validacijo potrebno namestiti termo člene (v nadaljevanju TC) in če je mogoče tudi BI (6).

Pogosto so ogromne količine toplotne smrtnosti MO dostavljene že v fazi segrevanja sistema, ampak te temperature so dosežene v prisotnosti mešanice pare in zraka in zato ne moremo sklepati, da je biološka smrtnost med fazo segrevanja sistema enaka tisti, doseženi s čisto paro. Čas, za katerega moramo sistem držati pri določeni temperaturi sterilizacijske specifikacije, je določen v razvoju postopka. Navadno se odločimo za temperaturo 121°C in čas 15, 20 ali 30 minut. Opiramo se na farmakopejske zahteve za pristop sterilizacije s pretiranim uničenjem MO. Če na primer domnevamo, da je dejansko maksimalno število MO znotraj sistema 10^{12} MOpU, potem je potrebna redukcija 18 log, da zagotovimo ne več kot eno možnost preživetja na milijon. Ob predpostavki, da ima vsak MO D_{121} vrednost 1 minuto, lahko predlagamo sterilizacijske specifikacije pri temperaturi 121°C za 20 minut z dodatkom 2 log redukcije kot varnostni faktor (6).

Sistemi so lahko zelo majhni in je temperatura v vseh točkah dosežena v območju dveh do treh minut, lahko pa imamo zelo velik sistem posod, ventilov in cevi, kjer doseganje sterilizacijskih specifikacij v najpočasnejšem primeru (v hladnih točkah) traja tudi 20 do 30 minut (6).

Validacija SIP postopka je ključnega pomena za ustrezno delovanje sistema (6). Z validacijo dokažemo, da postopki in previdnostni ukrepi dajejo SAL 10^{-6} MOpU in boljše. Med postopkom merimo in beležimo temperaturo, tlak in čas. Temperatura se običajno meri s termočleni, ki jih namestimo v posodo in na nekatera druga mesta, ki jih določimo na podlagi predhodno določenih hladnih točk, določenih s temperaturnim mapiranjem. Ko izvajamo biološko oceno, moramo uporabiti ustrezne biološke indikatorje (4).

Določiti moramo točke, ki najpočasneje dosežejo temperaturo sterilizacijske specifikacije. To so navadno ohišja filtrov in nizke točke, kjer se lahko nabira kondenzat. Hladne točke sistema določamo s temperaturnim mapiranjem, ki ga izvedemo pred začetkom validacije. BI moramo namestiti tako, da pokrijemo cel sistem, kar pomeni nameščanje tudi na mesta, kjer so BI zaradi časa segrevanja sistema, temperaturi sterilizacijske specifikacije izpostavljeni dvakrat, trikrat ali štirikrat dlje, kot BI v najhladnejši točki sistema (6). Pogoje v vsakem ciklu ustrezno prikažemo kot graf temperature v odvisnosti od časa (4).

1.7.2 Izbira BI za validacijo z nasičeno vodno paro pod tlakom

Pri izbiri MO, ki jih uporabimo v BI upoštevamo določena načela:

- odpornost izbranih sevov mora biti primerna za določeno metodo sterilizacije, ki jo validiramo in primerljiva z odpornostjo potencialno kontaminirajočih MO (4),
- MO morajo biti visoko odporni na pogoje sterilizacije, kar pa ne pomeni, da morajo biti najbolj odporni poznani MO (6),
- MO morajo imeti stabilno odpornost, ki jo ohranijo preko daljšega časovnega obdobja shranjevanja pred samo uporabo (6),
- izbrani sevi ne smejo biti patogeni in morajo biti enostavni za gojenje (4),
- določanje v kulturi je čim bolj enostavno (6).

Pri validaciji postopka sterilizacije s paro pod tlakom je priporočena uporaba BI namenjenih za sterilizacijo s paro. To so najpogosteje spore *Bacillus stearothermophilus*

(*Geobacillus stearothermophilus*), poleg njih pa lahko uporabimo tudi druge MO, ki imajo dokazano enako učinkovitost. Populacija bakterijskih spor v biološkem indikatorju mora biti večja od $5 \cdot 10^5$ spor/mL, če ni predpisano drugače in D_{121} vrednost mora biti večja od 1,5 minute. Če BI izpostavimo pari pri temperaturi $121 \pm 1^\circ\text{C}$ za 6 min ostanejo spore, ki so ponovno sposobne za razmnoževanje, če pa BI izpostavimo pari pri temperaturi $121 \pm 1^\circ\text{C}$ za 15 min, pa ni rasti referenčnih MO (4). *Bacillus stearothermophilus* ima D_{121} vrednost od 1 do 4 minute odvisno od pogojev v kulturi. To je višji D_{121} kot pri večini spor *Bacillus spp.*, ki imajo D_{121} vrednosti navadno pod 0.5 minut. *Bacillus stearothermophilus* je sposoben rasti v enostavnem mediju pri 55 do 60°C (2). Običajno uporabimo BI s populacijo 10^6 spor/mL, oziroma v območju od 10^5 do 10^7 spor/mL. To število bolj kot na znanosti temelji na navadi in praktičnosti. Manjše vrednosti zmanjšajo občutljivost testa, večje vrednosti pa je težko obvladovati pri kultivaciji, kar se lahko odraža z večjimi napakami pri štetju (6).

Uporabimo MO znane populacije, čistosti in odpornosti. Populacija spor v BI in njihova odpornost sta navadno večji kot pri mikrobnih obremenitvi. Pomembno je, da določimo temperaturno odpornost BI v obliki, ki jo uporabimo pri postopku validacije, saj poleg vrste MO na odpornost vpliva tudi testno okolje:

- temperatura in čas izpostavljenosti pogojem sterilizacije,
- nosilec na katerega je BI nanesen ali tekočina, v kateri je suspendiran,
- shranjevanje po postopku sterilizacije in pogoji inkubacije (7).

Sposobnost uničenja 10^6 spor/mL *Bacillus stearothermophilus* ne zagotavlja SAL 10^{-6} MOpU. Res je, da uničenje 10^6 spor/mL *Bacillus stearothermophilus* s farmakopejsko odobreno minimalno D vrednostjo 1,5 minut v desetih od stotih ponovitev zagotavlja doseganje SAL boljše od 10^{-6} MOpU za najslabši primer mikrobne obremenitve bioburdna. (6).

1.7.3 Število in lokacija BI pri validaciji

Število BI pri validaciji ni natančno določeno, želimo pa doseči, da z validacijo pokrijemo celotno enoto in lahko z gotovostjo trdimo, da vsi deli prejmejo zadostno količino toplotne energije. Običajno namestimo toliko BI kot je TC (termočlenov). Namestimo jih poleg TC, kar nam omogoča boljše povezovanje dobljenih temperaturnih in bioloških rezultatov.

Priporočeno je, da imamo vsaj 5 BI, ne glede na to, kako težko jih namestimo. BI namestimo tudi na mesta, kjer obstaja verjetnost, da TC delujejo kot kanali za odstranjevanje zraka ali penetracijo pare in tako prikazujejo lažno visoko stopnjo smrtnosti MO (6). BI namestimo na mesta, za katera smo pri temperaturnem mapiranju ugotovili, da so najslabše dostopna za sterilizacijsko sredstvo (4). Na mestih, kjer ni mogoč dostop čiste pare do BI (kadar je TC vezan na zunanjo stran posode ali cevi, ki se sterilizira), le teh ni treba namestiti (6).

2. NAMEN

Namen diplomske naloge je z validacijo postopka sterilizacije centrifuge in bioreaktorjev zagotoviti in dokazati, da predpisani postopki za izvedbo sterilizacije na mestu omogočajo doseganje pričakovanih in ustreznih rezultatov. Doseči želimo predpisane parametre sterilizacijskega postopka in stopnjo zagotavljanja sterilnosti najmanj 10^{-6} MOpU. Z uspešno zaključeno validacijo bomo potrdili tudi ponovljivost postopka sterilizacije na mestu.

Uspešnost doseganja predpisanih sterilizacijskih parametrov bomo potrjevali z merjenjem temperatur v hladnih točkah sistema preko celotnega postopka sterilizacije, zahtevano stopnjo zagotavljanja sterilnosti pa bomo potrdili z uporabo bioloških indikatorjev. Ponovljivost postopka bomo dokazali s tremi uspešnimi zaporednimi postopki sterilizacije na vsaki referenčni enoti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Oprema

Bioreaktorji: Validacijo smo izvajali na sedmih 10 L, enem 30 L in enem 100 L-bioreaktorju. Vsi trije tipi bioreaktorjev se uporabljajo za gojenje celic in proizvodnjo bioloških učinkovin. Vsi bioreaktorji so izdelani iz nerjavečega jekla kvalitete 316L, ki preprečuje nastanek korozije. Vsak bioreaktor je opremljen z naslednjimi elektrodami:

- dvema pH elektrodama,
- dvema dO₂ elektrodama,
- dCO₂ elektrodo,
- manometrom,
- bioreaktorsko temperaturno sondo,
- temperaturnimi sondami za nadzor sterilizacije (na odvodih kondenzata).

Vsak bioreaktor je opremljen z enim ali dvema vstopnima filtroma in enim izstopnim filtrom, ki nam omogočajo ohranjanje sterilnega mikrookolja v bioreaktorju. Na 10 L in 30 L bioreaktorju sta vstopni in izstopni filter enaka:

- Millipore: Hydrophobic Pleated Cartridge z velikostjo por 0,22 µm
Serijske številke: C9MN439980216, C9KN206760187, C9MN439980222,
C9MN439980490, C9KN206760012, C9MN439980534, C9KN206760110,
C9MN439980477, C9MN439980523, C9MN439980223, C9KN2067600182,
C9MN439980235

100 L bioreaktor je opremljen z dvema vstopnima filtroma in enim izstopnim filtrom:

- Pall: Emflon[®] PFR Filter z velikostjo por 0,22 µm
Serijske številke: IN7144040, IN7144182, IL4009209, IN7313418, IN7313421



Slika 1: Primer bioreaktorja.

Centrifuga: Centrifuga je namenjena primarni separaciji gojišča in celic. Narejena je iz nerjavečega jekla 316L. Poznamo različne tipe centrifug, ki različno vplivajo na kulturo, ki jo centrifugiramo. Centrifuga, ki smo jo validirali, nam omogoča, da v času večdnevnega procesa ostane material sterilen in da se med centrifugiranjem ne uničijo celice in nam omogoča izvajanje procesa z menjavanjem gojišča. Centrifuga je opremljena s temperaturnimi sondami, ki nam omogočajo nadzor sterilizacije. Centrifuga je opremljena z vstopnim in izstopnim filtrom, ki nam omogočata ohranjati sterilnost centrifuge med izvajanja procesa:

- Pall: Emflon® II z velikostjo por 0,22 μm
Serijske številke: FP75751385, FP77760152, FP75751384, FP77760133



Slika 2: Primer centrifuge.

3.1.1 Oprema in materiali uporabljeni pri validaciji

- Večkanalni registrirnik temperature Almemo A5690-2 KL, serijska številka 07070148
Termometri: termočleni, tipa T
Referenčni termoblok Kaye LTR-25/140, ser. št.: A39849H
- Referenčna oprema
Večkanalni registrirnik temperature Almemo A5690-2 KL, serijska številka 07070148
Termometer: Pt-100, Ahlborn FPA32L035, ser.št.: 3207

- Biološki indikatorji
Plastične ampule (Attest 1262) 3M, EZ Test Self-Contained Biological Indicators for Steam Sterilisation. Populacija spor *Bacillus stearothermophilus* je $2,4 \times 10^6$ spor/mL
- Integritetni tester filtrov Millipore Integritest[®] 4N: Integritetni tester je namenjen za testiranje filtrov pred in po sterilizaciji.

3.2 Izvedba validacije

Validacijo SIP postopkov bioreaktorjev in centrifuge smo izvedli kot začetno validacijo, kar pomeni, da smo na vsaki enoti izvesti tri uspešne ponovitve SIP postopka. Uspešno izvedena validacija nam zagotavlja, da ob izvajanju validiranega postopka vsakič dobimo ustrezne rezultate.

V postopek validacije je bilo vključenih 10 enot, in sicer bioreaktorji volumna 10 L z oznakami V631, V632, V633, V634, V635, V636, V760, 30 L bioreaktor z oznako V637, 100 L bioreaktor z oznako V638 in centrifuga CF644. Ker so 10 L bioreaktorji V631, V632, V633, V634, V635 in V636 enakega tipa in volumna, smo se na podlagi matričnega modela odločili za združevanje enot, kar pomeni, da smo validacijo SIP postopka na enoti V636 ponovili trikrat, na vseh ostalih enotah enakega tipa in volumna pa enkrat.

Uporabili smo pristop sterilizacije s pretiranim uničenjem MO. Z zahtevo $T=121^{\circ}\text{C}$ ($-0^{\circ}\text{C}/+19^{\circ}\text{C}$), minimalno 20 min, smo zagotovili doseganje SAL 10^{-6} MOpU in zmanjšanje populacije spor MO za 12 log.

Uspešnost SIP postopkov smo vrednotili na podlagi podatkov, ki smo jih pridobili z merjenjem temperatur v hladnih in kritičnih točkah posameznega sistema.

Meritve smo izvajali z zunanjim merilnim sistemom, in sicer z večkratnim registrirnikom temperature, ki je bil na našo enoto povezan preko termočlenov. Temperature smo merili v hladnih in kritičnih točkah, ki smo jih predhodno določili s temperaturnim mapiranjem in evaluacijo kritičnih mest sistemov, ki smo ju izvedli pred začetkom izvajanja vialidacije postopka SIP. Na vsaki enoti smo med izvajanjem SIP postopka merili temperature v okoli 30-ih točkah. Za izvajanje validacije smo izbrali šest najhladnejših točk sistema in po dve

točki (na sterilni in nesterilni strani) na vsakem filtru, ki so bile definirane kot kritične točke sistemov.

Poleg temperaturnih sond smo uporabili tudi BI. Z njimi smo prav tako preverjali uspešnost sterilizacijskega postopka, s stališča učinkovitosti sterilizacijskega medija.

3.2.1 Kalibracija temperaturnih senzorjev enote in termočlenov merilnega sistema

TC smo pred začetkom meritev kalibrirati po ustrezni metodi. Sistem mora zaznavati temperaturo z ločljivostjo $\leq 0,1$ °C in delovati z negotovostjo merilnega sistema boljšo od 0,5 °C. Pred začetkom merjenja temperatur smo kalibrirali TC v treh točkah, pri 70 °C, 121 °C in 140 °C, po izvedbi meritev pa le v eni točki in sicer pri 121 °C. Med samim postopkom kalibriramo TC le v primeru menjave, in sicer v vseh treh točkah. Tudi merilna negotovost temperaturnih senzorjev enote pri kalibraciji mora biti boljša od 0,5 °C.

3.2.2 Testiranje ustreznosti kakovosti kondenzata čiste pare

Za izvedbo SIP postopkov smo uporabljali čisto paro. Čisto paro smo kot sterilizacijsko sredstvo uvajali v bioreaktorje in centrifugo skozi filtre, ki imajo pore velikosti 0,22 μm . Čisto paro smo pridobili iz vode za injekcije, ki mora ustrezati naslednjim zahtevam:

- Lastnosti: bistra brezbarvna tekočina
- Specifična prevodnost: $\leq 1,3$ $\mu\text{S/cm}$ ($T = 25^\circ\text{C}$)
- Totalni organski ogljik: ≤ 500 ppb
- Skupno število MO: ≤ 10 CFU/100 mL
- Bakterijski endotoksini: $< 0,25$ IU/mL

Pred začetkom validacije SIP postopka smo izvedli testiranje kakovosti kondenzata čiste pare na odzemnih mestih.

3.2.3 Testiranje integritete filtrov pred in po SIP postopku

Membranski filtri so na vstopu in izstopu iz sistema. Vstopni filtri nam omogočajo vzdrževanje sterilnega okolja v bioreaktorju pri dovajanju medijev (čiste pare med SIP

postopkom in plinov med kultivacijo) v sistem. Izstopni filtri nam prav tako omogočajo ohranjati sterilno okolje v bioreaktorju pri odvajanju plinov iz sistema. Vstopni in izstopni filtri imajo membrano iz PVDF z velikostjo por 0,22 μm . S testiranjem integritete filtrov pred in po SIP postopku smo preverili vpliv SIP postopka na kakovost filtrov.

Naprava Integritest 4N Millipore je namenjena testiranju integritete filtrov. Z napravo lahko testiramo tako hidrofilne (tekočinske), kot tudi hidrofobne (plinske) membranske filtre. Omogoča izvajanje testov: preizkus iztisa mehurčka, preskus difuzije, preskus z zadrževanjem tlaka in preskus toka tekočine.

Naprava mora biti postavljena tako, da je omogočen dovod zraka pri nadtlaku 6 bar. Temperaturno območje delovanja naprave je med 1°C in 40°C. Relativna vlažnost okolice je lahko med 5 % in 95 %. Za izvajanje testov potrebujemo čisti zrak (delci s premerom, manjšim od 40 μm , rosišče je $\leq -20^\circ\text{C}$) ali dušik pri sobni temperaturi. Najvišji vhodni tlak ≤ 8300 mbar. Najnižji vhodni tlak je določen z zahtevanimi tlaki pri izvedbi testa. Priporočljiv je za 1040 mbar višji vhodni tlak od tlaka pri katerem izvajamo test.

Inegritetni test smo izvedli tako, da smo filter, vstavili v ohišje (ki je sicer del bioreaktorja) in ga priklopili na dovod plina (zrak ali dušik). Ohišje smo obrnili tako, da je bil onemogočen dotok tekočine v dovod plinov. Pri izvajanju validacije SIP postopka smo uporabljali dva različna tipa testov:

3.2.3.1 Preskus difuzije za določanje integritete filtrov

Tekočina se v porah filtra zadržuje zaradi površinske napetosti in kapilarnih sil. Ko je tlak zraka višji, kot je površinska napetost topila (izopropanola), pride do iztisa le-tega iz por filtra. Tej točki pravimo iztis mehurčka. Test je osnovan na dejstvu, da pri tlakih, ki so nižji od tlaka iztisa mehurčka, stisnjen zrak ali dušik prehajata skozi tekočino, ki je v porah filtra. Merili smo pretok preko membrane filtra.

Ta tip testa smo izvedli pri filtrih: IN7144040, IN7144182, IL4009209, FP75751385, FP77760152, FP75751384, FP77760133.

Pred izvajanjem integritetnega testa smo filter popolnoma omočili s testno tekočino, ki je pri preizkusu difuzije 60% IPA (izopropanol). Filter smo pustili popolnoma potopljen v 60 % IPA-i 20 minut, nato pa smo ga vstavili v ohišje filtra. Na vrhu vsakega ohišja je oddušni ventil, na katerega smo med testom priklopili dovod plina. Ventil smo med testom odprli, da je bil omogočen pretok plina.

Uporabljeni filtri se razlikujejo po velikosti in sestavi membrane. Zato ima vsak tip filtra specifične parametre testiranja integritete. Pred izvajanjem testa smo naredili testni program za vsak tip filtra:

- Filtri IN7144040, IN7144182, IL4009209;
izbrali smo test MCY2230PFRPH4; pretok $\leq 2,7$ ml/min pri tlaku 1040 mbar, čas testa je 600 s
- Filtri FP75751385, FP77760152, FP75751384, FP77760133:
izbrali smo test SL7002V002PV; $\leq 5,5$ ml/min pri tlaku 830 mbar, čas testa je 300 s

3.2.3.2 *Preizkus toka tekočine*

Temelji na dejstvu, da pore hidrofobnih filtrov odbijajo vodo. Minimalen tlak, ki je potreben za potisk tekočine v največje pore imenujemo tlak vdora vode. Preizkus toka tekočine se izvaja pri tlakih nižjih od tlaka vdora vode. Pri nepoškodovanih filterih ne pride do toka tekočine skozi membrano. Merili smo pretok vode, ki je rezultat stiskanja površine filtra, kar je posledica tlaka.

Ta tip testa smo izvedli pri filterih: C9MN439980216, C9KN206760187, C9MN439980222, C9MN439980490, C9KN206760012, C9MN439980534, C9KN206760110, C9MN439980477, C9MN439980523, C9MN439980223, C9KN2067600182, C9MN439980235, IN7313418, IN7313421.

Pred izvajanjem integritetnega testa smo filter popolnoma omočili s testno tekočino, ki je bila v tem primeru prečiščena voda. Filter smo dali v ohišje, nato pa smo v ohišje nalili vodo, ter dobro zatesnili nesterilno stran ohišja. Pazili smo, da v ohišju ni ostal zračni mehurček, ki bi lahko povzročil lažno negativne rezultate testa. Oddušni ventil ohišja filtra smo med testom odprli, da smo omogočili pretok plina.

V programu naprave za testiranje integritete filtrov smo oblikovali test z zahtevanimi testnimi parametri:

- Filtri C9MN439980216, C9KN206760187, C9MN439980222, C9MN439980490, C9KN206760012, C9MN439980534, C9KN206760110, C9MN439980477, C9MN439980523, C9MN439980223, C9KN2067600182, C9MN439980235.

Izbrali smo test LAGR04TP6: pretok $\leq 0,2$ ml/min pri tlaku 2620 mbar, čas testa je bil 600 s.

- Filtra IN7313418, IN7313421.

izbrali smo test MCY444PFRPJ: pretok $\leq 0,1$ ml/min pri tlaku 2500 mbar, čas testa je bil 600 s.

Pretoke plina med testom smo spremljali na kontrolni enoti integritetnega testerja.

Po končanem testu se pojavi znak OK za uspešno opravljen test ali znak ~~OK~~ za neuspešno opravljen test. Na zaslonu se izpiše tudi podatek o pretoku na koncu testa. V primeru napake pri testiranju (na primer zaradi slabega tesnjenja ohišja filtra) se pojavi znak Test failure.

3.2.4 Merjenje porazdelitve temperatur med validacijo SIP postopka

3.2.4.1 Priprava na SIP

3.2.4.1.1 Priprava bioreaktorja

Pred začetkom izvajanja SIP postopka smo na bioreaktorju preverili in po potrebi zamenjali vsa tesnila, ter namestili zaslonke na mestih, kjer smo želeli zmanjšati pretok čiste pare. Zagotovili, da je bil na bioreaktor priklopljen kalibriran analogni manometer. Na mestih, kjer smo odstranili ventile za pripravo linij, smo namestili pralna kolena. Pred izvedbo SIP postopka smo v ohišje filtrov namestili zračne filtre s predhodno preverjeno ustrežno integriteto.

Pred začetkom izvajanja smo izvedli še kalibracijo pH sond (kalibracija v dveh točkah) in CO₂ sonde. Preverili smo tudi ustreznost delovanja dO₂ sond.

Pred začetkom sterilizacije smo na izpustni ventil namestili 40 cm dolgo silikonsko cev. Preverili smo, da so pred začetkom SIP dovodi pare na ventilih za dodajanje dodatkov in dovod pare na vzorčnem in spodnjem ventilu v zaprtem položaju, da ne bi prišlo do prehitrega naraščanja tlaka v bioreaktorju.

3.2.4.1.2 Priprava centrifuge

Centrifuga smo pred začetkom SIP očistili in sestavili v skladu z originalnimi navodili. Iz hladilnega plašča smo izpraznili hladilno tekočino in namestili dovodni in odvodni filter. Cevi za dovod in odvod hladilne vode smo povezali s centrifugo. Tako je hladilni plašč ostal odprt in v njem ni moglo priti do naraščanja tlaka zaradi povišane temperature.

3.2.4.1.3 Namestitev termočlenov in Bioloških indikatorjev

TC smo namestili na hladne točke, ki smo jih na osnovi rezultatov temperaturnega mapiranja določili kot najbolj kritične.

Zaradi nedostopnosti nekaterih točk sistema, smo morali določene TC prilepiti na zunanjo stran cevi sistema. TC smo nalepili s trakom, ki prevaja toploto, nato pa smo ga še dobro zaščitili z izolacijskim sredstvom. S tem smo zagotovili čim boljše pogoje za natančno merjenje in učinkovanje temperature. Na mestih, kjer TC pride v neposredni stik s čisto paro, smo s pomočjo termoadhezivnega traku 3M namestili tudi BI. TC in BI smo namestili tako, da niso imeli nobenega vpliva na odstranjevanje zraka in ostalih nekondenzirajočih plinov ter kondenzata iz sistema. Vsak test smo spremljali tudi s kontrolnimi BI, ki niso bili izpostavljeni SIP postopku. Populacija spor v BI mora biti $\geq 5 \times 10^5$ spor/mL in $D_{121} \geq 1,5$ min. Vsi biološki indikatorji, ki so bili izpostavljeni postopku sterilizacije, morajo biti sterilni, kontrolni biološki indikator, ki pa postopku sterilizacije ni bil izpostavljen, pa mora biti nesterilen.

Pred sterilizacijo smo BI hranili pri sobnih pogojih: $T = 15 - 30$ C, pri relativni vlažnosti 35-60%. Po sterilizaciji smo BI indikatorje hranili v hladilniku pri $T = 2-8$ C. Po koncu SIP postopka smo jih odnesli na analizo.

V spodnjih shemah so navedeni razlogi za izbor posameznih mest.

Preglednica I: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorjih V631, V632, V633, V634, V635 in V636.

TC	Mesto TC	Razlog za izbor mesta
TC04	Ohišje filtra na dovodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC05	Ohišje filtra na dovodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC06	Ohišje filtra na odvodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC07	Ohišje filtra na odvodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC08 TC09 TC10 TC12 TC13 TC14	Temperaturni senzor (na odvodu kondenzata)	Nizka temperatura med OQ
TC24	Stena posode na 1/3 višine (levo)	Notranjost bioreaktorja
TC25	Stena posode na 2/3 posode (desno)	Notranjost bioreaktorja
TC26	Pod pokrovom posode	Notranjost bioreaktorja

Zaradi nedostopnosti notranjosti samih cevi sistema smo termočlene TC04 do TC14 prilepili na njihovo zunanjo stran. K termočlenom TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 smo namestili tudi BI.

Preglednica II: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorju V637.

TC	Mesto TC	Razlog za izbor mesta
TC04	Ohišje filtra na dovodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC05	Ohišje filtra na dovodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC06	Ohišje filtra na odvodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC07	Ohišje filtra na odvodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC10 TC12 TC14 TC15 TC16 TC17	Temperaturni senzor (na odvodu kondenzata)	Nizka temperatura med OQ
TC24	Stena posode na 1/3 višine (levo)	Notranjost bioreaktorja
TC25	Stena posode na 2/3 posode (desno)	Notranjost bioreaktorja
TC26	Pod pokrovom posode	Notranjost bioreaktorja

Zaradi nedostopnosti notranjosti samih cevi sistema smo termočlene TC04 do TC17 prilepili na njihovo zunanjo stran. K termočlenom TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 smo namestili tudi BI.

Preglednica III: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorju V638.

TC	Mesto TC	Razlog za izbor mesta
TC01	Pralna glava	Notranjost bioreaktorja
TC03	Ohišje filtra na dovodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC04	Ohišje filtra na dovodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC05	Ohišje filtra na dovodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC06	Ohišje filtra na dovodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC07	Ohišje filtra na odvodu zraka (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC08	Ohišje filtra na odvodu zraka (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC15 TC17	Temperaturni senzor (na odvodu kondenzata)	Nizka temperatura med OQ
TC30	Stena posode na 1/3 višine (levo)	Notranjost bioreaktorja
TC31	Stena posode na 2/3 posode (desno)	Notranjost bioreaktorja
TC34	Zgornja lopatica mešala	Notranjost bioreaktorja

Zaradi nedostopnosti notranjosti samih cevi sistema smo termočlene TC03 do TC17 prilepili na njihovo zunanjo stran. K termočlenom TC01, TC03, TC04, TC05, TC06, TC07, TC08, TC30 in TC34 smo namestili tudi BI.

Preglednica III: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorju V760.

TC	Mesto TC	Razlog za izbor mesta
TC01	Izpustni ventil	Notranjost bioreaktorja
TC02	Ohišje filtra (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC03	Ohišje filtra (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC04	Ohišje filtra (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC05	Ohišje filtra (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC07	Spodnja lopatica mešala	Notranjost bioreaktorja
TC08	Zgornja lopatica mešala	Notranjost bioreaktorja
TC10	Stena posode na 1/3 višine (levo)	Notranjost bioreaktorja
TC12	Nozzle N24	Nizka temperatura med OQ
TC15	Pod pokrovom posode	Nizka temperatura med OQ

Zaradi nedostopnosti notranjosti same cevi sistema je smo termočlen TC02 prilepili na njeno zunanjo stran. K termočlenom TC02, TC03, TC04, TC05, TC07, TC08, TC10 in TC15 smo namestili tudi BI.

Preglednica V: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri centrifugi.

TC	Mesto TC	Razlog za izbor mesta
TC01	Ohišje filtra (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC02	Ohišje filtra (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC03	Ohišje filtra (nesterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC04	Ohišje filtra (sterilna stran)	Kritičen del sistema za zagotavljanje sterilnosti
TC06	Odvod celic iz centrifuge	Nizka temperatura med OQ
TC07	Komora za zbiranje žetve (pod pokrovom)	Notranjost centrifuge
TC08	Sredina komore za zbiranje žetve	Notranjost centrifuge
TC09	Dno komore za zbiranje žetve	Notranjost centrifuge
TC10	Cev za odvod žetve	Ni temperaturnega senzorja
TC11	Cev za odvod žetve (pri ventilu HV280)	Nizka temperatura med OQ
TC12	Temperaturni senzor	Nizka temperatura med OQ

Zaradi nedostopnosti same cevi smo termočlen TC06 prilepili na njeno zunanjo stran. K termočlenom TC01, TC02, TC03, TC04, TC07, TC08, TC09 in TC10 smo namestili tudi BI.

3.2.4.2 Izvedba SIP Bioreaktorjev

Izvedba in vodenje SIP postopka sta potekala avtomatizirano preko kontrolne enote bioreaktorja z manjšim številom ročnih operacij. Kontrolna enota nam je omogočala spremljanje parametrov in lažji nadzor nad celotnim postopkom. Pred začetkom sterilizacije smo na kontrolni enoti bioreaktorja preverili parametre sterilizacije:

Preglednica VI: **Parametri sterilizacije na kontrolni enoti.**

	Trajanje	Temperatura (°C)	Tlak (bar)	Pretok zraka (l/min)
Tlačni test	30 min		1,10	10,0
Predgretje filtra	2 min	45,0°C		
Faza 2			1,40	
Sterilizacija	20 min	124,0°C		
Hlajenje		115,0°C	1,10	10,0
Hlajenje 1		80,0°C	0,80	8,0
Hlajenje 2		50,0°C	0,50	5,0
Konec		37,0°C	0,20	2,0
Najnižja temperatura sterilizacije			121,0°C	
Najnižji tlak pri hlajenju			0,10 bar	
Najnižji padec tlaka pri tlačnem testu			0,10 bar	

Pred začetkom sterilizacije smo odprli ventile za dovod čiste in tehnične pare. Za izvedbo SIP postopkov smo uporabili čisto paro, ki smo jo pridobili iz vode za injekcije. Čisto paro smo kot sterilizacijsko sredstvo uvajali v bioreaktorje in centrifugo. Za ogrevanje plašča reaktorja smo uporabili tehnično paro, za ohlajanje pa hladilno vodo (15 – 30°C). Med SIP postopkom smo zagotovili stalno izločanje kondenzata in zraka ter ostalih nekondenzirajočih plinov.

Faze sterilizacije:

Tlačni test

Z zvedbo tlačnega testa smo preverili tesnjenje celotnega sistema. Za izvedbo testa je bilo treba v posodo dovesti zrak. Odprli smo ventila za dovod zraka v posodo preko vstopnega filtra. Odprli smo tudi naslednje ventile: vzorčni ventil, talni ventil, ventile na linijah za dodajanje dodatkov. Vseostale ventile (ventili na dovodih pare, odvodih kondenzata, izpustni ventil, izpustni vzorčni ventil...) smo pustili zaprte. Preverili smo tudi ventil za izstop zraka iz bioreaktorja, ki mora biti prav tako zaprt. Na kontrolni enoti smo začeli postopek sterilizacije. Ko smo v posodi dosegli tlak 1.1 bar, smo zaprli ventila za dovod zraka preko vstopnega filtra, ter začeli s testom tesnjenja, ki je trajal 30 min. Dovoljen padec tlaka po 30 min je 0.10 bar. Po končanem testu smo odprli ventile za odvod kondenzata na linijah za dodajanje dodatkov, pri vzorčnem ventilu in pri izpustnem ventilu ter ventilu za izpust zraka iz bioreaktorja. Nato smo začeli postopek SIP.

Faza 1 – Predgretje bioreaktorja

V tej fazi se je plašč bioreaktorja segreval s pomočjo tehnične pare. Ko je temperatura v bioreaktorju dosegla 45°C, se je avtomatsko začel naslednji korak.

Predgretje filtra

Ventila za dovod zraka preko vstopnega filtra v posodo sta morala biti zaprta. Predgretje filtra je trajalo 2 min. Po dveh minutah smo odprli ventila za dovod zraka preko vstopnega filtra in prešli v naslednji korak.

Faza 2 – Segrevanje do temperature sterilizacije

V tej fazi je potekalo segrevanje bioreaktorja, dokler nismo dosegli nastavljenе temperature sterilizacije. Na kontrolni enoti smo spremljali temperaturo in tlak v posodi bioreaktorja. Ko je temperatura v posodi dosegla 100°C smo rahlo odprli izstopni ventil, da smo omogočili počasno izhajanje pare in kondenzata. Tako smo preprečili zalitje cevi za odvajanje kondenzata in omogočili njeno sterilizacijo. Tekom faze 2 tlak v bioreaktorju ni smel preseči 1.65 bar. Tudi temperature smo na posameznih temperaturnih senzorjih spremljali s pomočjo kontrolne enote. Ko smo na vseh temperaturnih senzorjih dosegli 121°C, smo avtomatsko prešli v naslednji korak.

Sterilizacija

Sterilizacija je potekala 20 minut pri 121°C. Med fazo smo lahko spremljali temperature na kontrolni enoti bioreaktorja. Če bi temperatura na kateremkoli senzorju padla pod 121°C, bi se korak sterilizacije prekinil. Ko bi se temperature na vseh temperaturnih senzorjih ponovno dvigneile nad 121°C, bi se ponovno začelo odštovati 20 min. Na temperature smo lahko vplivali z nadzorovanjem tlaka pri 1,5 bar. Tlak smo nadzorovali z ventilom za dovod pare in izpustnim ventilom. Po 20 min sterilizacije se je na kontrolni enoti pojavi znak OK. To pomeni, da je bil korak sterilizacije uspešno zaključen in lahko preidemo v naslednji korak ohlajanja.

Hlajenje

Zaprli smo ventile: izpustni ventil, ventil za dovod pare, ventile za odvod kondenzata pri izpustnem ventilu, vzorčnem ventilu in na linijah za dodajanje dodatkov, talni ventil in vzorčni ventil ter pritisnili OK. S tem se je začelo ohlajanje bioreaktorja. Nato smo zaprli še ventile na linijah za dodajanje dodatkov. Ko smo prišli v fazo hlajenje 1, jetlak padel na okoli 0.60 bar. Previdno smo odprli talni ventil in ventil za odvod kondenzata pri izpustnem ventilu ter spustili kondenzat iz bioreaktorja, pri čemer niti za trenutek nismo smeli izgubiti nadtlaka v posodi. Če po sterilizaciji v bioreaktorju ne bi bilo kondenzata, bi lahko ta korak izpustili. Ko se je bioreaktor ohladi na 37°C se je avtomatsko zaključil zadnji korak ohlajanja.

Sterilizacija povezav

Po končani sterilizaciji posode smo sterilizirali še povezave za dodajanje dodatkov ter vzorčni in spodnji ventil. Prepričali smo se, da so ventili na linijah za dodajanje dodatkov zaprti. Odprli smo najprej ventile za dovod pare, nato pa še ventile za odvod kondenzata. Sterilizacijo povezav smo izvajali 20 min pri 121°C. Temperaturo na posameznem temperaturnem senzorju smo spremljali na kontrolni enoti, čas pa smo tokrat merili ročno s štoparico. Po končani sterilizaciji smo zaprli najprej ventile za odvod kondenzata, nato pa še ventile za dovod pare.

Po končani sterilizaciji smo v bioreaktor začeli dovajati sterilni zrak. Tako smo omogočili, da se je v bioreaktorju ustvaril nadtlak, ki preprečuje kontaminacijo sterilnega bioreaktorja z mikroorganizmi iz okolja.

3.2.4.3 Izvedba SIP centrifuge

Izvedba SIP centrifuge je potekala avtomatizirano z manjšim številom ročnih operacij. Parametre smo spremljali preko kontrolne enote, ki nas je z navodili vodila preko celotnega postopka.

Integritetni test centrifuge

S testom smo potrdili, da je bila centrifuga ustrezno sestavljena in je sposobna vzdrževati nadtlak. Parametri testa so bili: nadtlak v centrifugi je bil 0,69 bar, maksimalen padec tlaka je bil 0,1 bar, čas vzpostavljanja tlaka je bil 90 s, trajanje integritetnega testa je bilo 1800 s. Zaprli smo vse ventile, ki so na linijah za dovod kulture, za izpust celičnega koncentrata, za izpust žetve, za praznjenje posode in na linijah za odvod kondenzata. S pokrovčkom smo zaprli tudi dovod pare. Ventili na liniji za dovod pare v posodo smo pustili odprte. Po končanem testu smo zaprli ventile na liniji za dovod pare in odstranili pokrovček.

Sterilizacija

Sterilizacijo smo izvajali 20 minut pri 121°C. Priklopili smo dovod pare in odprli ventile na liniji za dovod pare preko vstopnega filtra v posodo. Odprli smo tudi ventile za odvod kondenzata. Nastavili smo tlak čiste pare na največ 2 bar in odprli paro. Počakali smo, da je temperatura dosegla 100°C in odprli ventil za odvod zraka. Ko je temperatura na vseh temperaturnih senzorjih dosegla 121°C, je začel teči čas sterilizacije. Po 20 minutah se je sterilizacija zaključila. Zaprli smo ventil za odvod zraka in počakali, da tlak pade na 0,5 bar. Nato smo zaprli ventile na linijah za odvod kondenzata in na liniji za dovod pare, ter odklopili dovod pare. Hlajenje centrifuge je potekalo brez uporabe hladilne vode.

3.2.5 Zahteve za uspešno validacijo SIP posopka

Za merjenje temperature med postopkom SIP bioreaktorjev in centrifuge smo uporabili zunanji merilni sistem, ki je zajemal podatke na eno minuto. Iz dobljenih podatkov smo izračunali parametre, s katerimi smo nato vrednotili uspešnost SIP postopka. Izračune smo naredili s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2007.

Preglednica VII: Parametri SIP postopka.

Parameter	Oznaka	Zahteva
minimalno T za vsak TC med fazo sterilizacije	$T_{\min TC}$	121°C
maksimalno T za vsak TC med fazo sterilizacije	$T_{\max TC}$	140°C
povprečno T za vsak TC med fazo sterilizacije	\bar{T}_{TC}	121°C -0°C, +19°C
povprečno T vseh TC med fazo sterilizacije	\bar{T}	Minimalno 121°C
F_0 vrednosti za vsak posamezen TC	F_0	≥ 20 min

F_0 smo izračunali po spodnji enačbi:

$$F_0 = \sum_{i=1}^n L_i * d_i$$

$$L = 10^{((T_{TC}-121,1)/z)} = 10^{\frac{(T-121,1)}{z}}$$

d = čas med dvema meritvama temperature v minutah

x = čas celotnega testa

z = 10°C

Spremljali smo še nekatere druge parametre. Pomembno je bilo, da smo dosegli sterilizacijski čas 20 minut in da smo imeli med fazo sterilizacije ustrezen tlak v posodi. Sterilizacijski čas smo določili iz podatkov meritev temperatur med postopkom sterilizacije, tlak pa smo spremljali preko kontrolne enote med postopkom. Po postopku sterilizacije smo pregledali še, če so bili ohišja filtrov in filtri, ter sama enota osušeni. Ostale parametre smo spremljali informativno za boljši opis postopka.

Preglednica VIII: Dodatni parametri SIP postopka.

Parameter	Zahteva
Minimalen in maksimalen F_0	Informativno
Hladna točka (določimo z uporabo F_0 vrednosti)	Informativno
Dosežen sterilizacijski čas in tlak	20 min, ustrezna korelacija T– tlak
Čas ogrevanja sistema do T sterilizacije	Informativno
Čas ohlajanja	Informativno
Minimalna T na mestu izpusta kondenzata	Informativno
Osušenost ohišja / filtra po izvedeni sterilizaciji	Vizualno osušeno
Osušenost enote po SIP postopku	Vizualno osušeno

BI smo odstranili iz sistema po vsaki ponovitvi postopka SIP in jih shranili na temperaturi od 2 do 8°C. Pri naslednji ponovitvi smo namestili nove BI. Vse uporabljene BI skupaj s kontrolnimi BI smo poslali v analizo, kjer so za vsak posamezen BI določili sterilnost ali nesterilnost.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

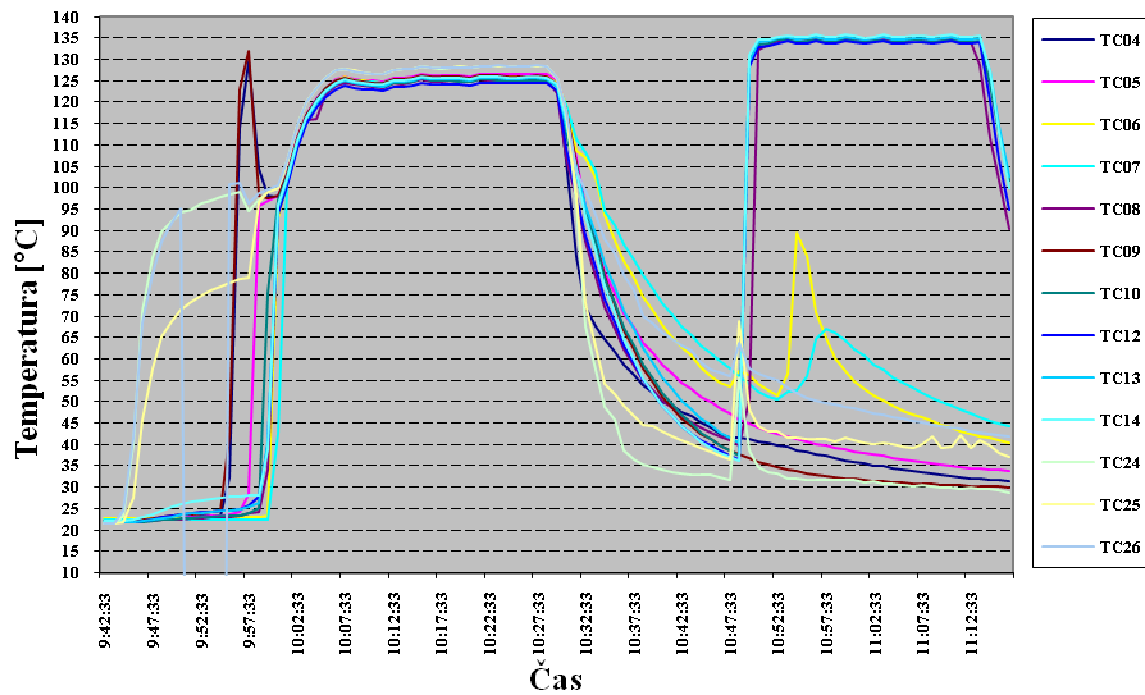
4.1 Rezultati validacije SIP postopka za posamezne enote

V spodnjih preglednicah so rezultati validacije sterilizacije bioreaktorjev in centrifuge. Rezultate smo za vsako ponovitev postopka SIP izračunali iz podatkov, ki smo jih dobili z merjenjem temperature v hladnih točkah sistema med sterilizacijo. Surovi podatki merjenja temperatur za vsako ponovitev postopka SIP se nahajajo v Prilogi 2. Rezultati testiranja integritete dihalnih filtrov se nahajajo v Prilogi 1.

Preglednica VIII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V631.

Bioreaktor V631-10 I					
Datum	20. 12. 2010				
Začetek testa	9:42		Trajanje testa		118 min
Konec testa	11:16				
Začetek sterilizacije	10.08		Trajanje sterilizacije		20 min
Konec sterilizacije	10:28				
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	122,7	128,5	124,1	128,8	125,9
Sonda - TC	TC12	TC26	TC12	TC26	
$F_{0\min}$	65,5 (TC07)				
$F_{0\max}$	725,3 (TC14)				

Bioreaktor V631-101



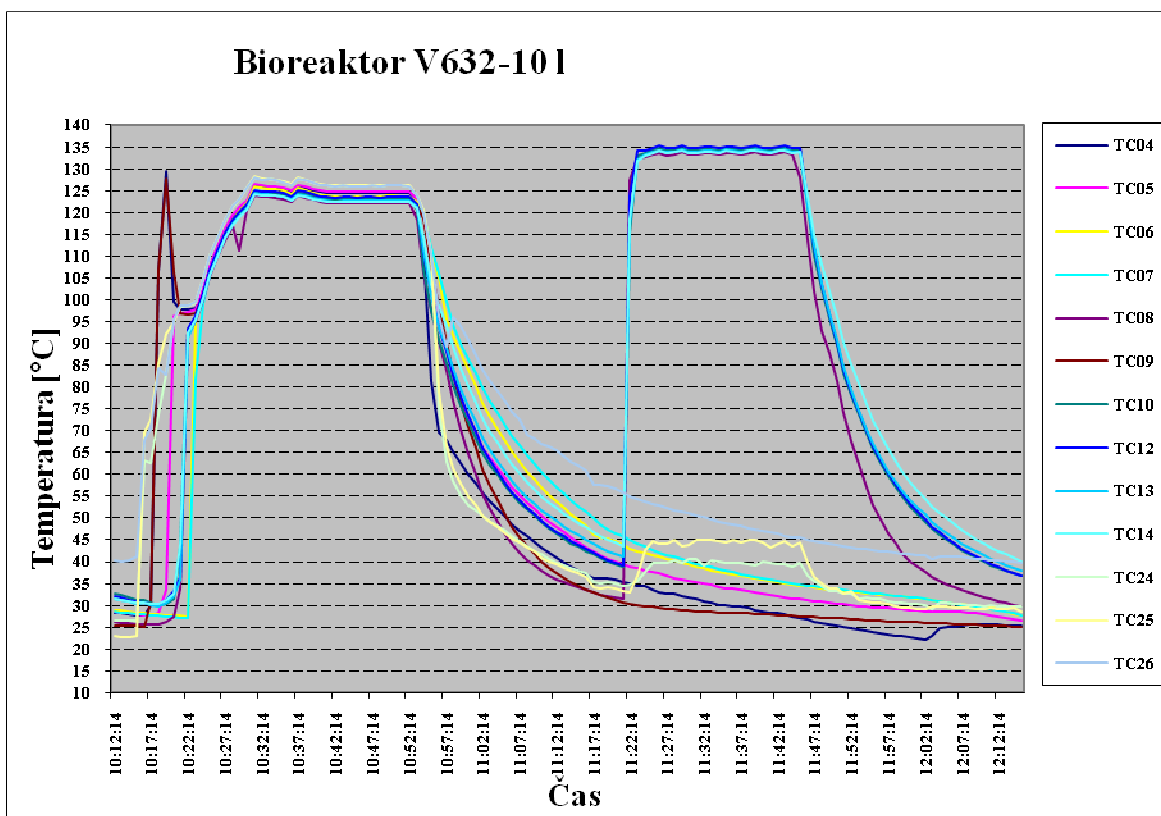
Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP pri bioreaktorju V631.

Vsi BI, ki smo jih namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem SIP postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Oba filtra C9MN439980523 in C9MN439980477 sta pred in po SIP postopku uspešno opravila test integritete filtrov.

Preglednica X: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V632.

Bioreaktor V632-10 1					
Datum	24. 12. 2010				
Začetek testa	10:12	Trajanje testa		123 min	
Konec testa	12:15				
Začetek sterilizacije	10:32	Trajanje sterilizacije		20 min	
Konec sterilizacije	10:52				
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	122,1	127,8	122,6	126,6	124,3
Sonda - TC	TC08	TC25	TC08	TC25	
$F_{0\min}$	43,14 (TC07)				
$F_{0\max}$	597,6 (TC12)				



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP pri bioreaktorju V632.

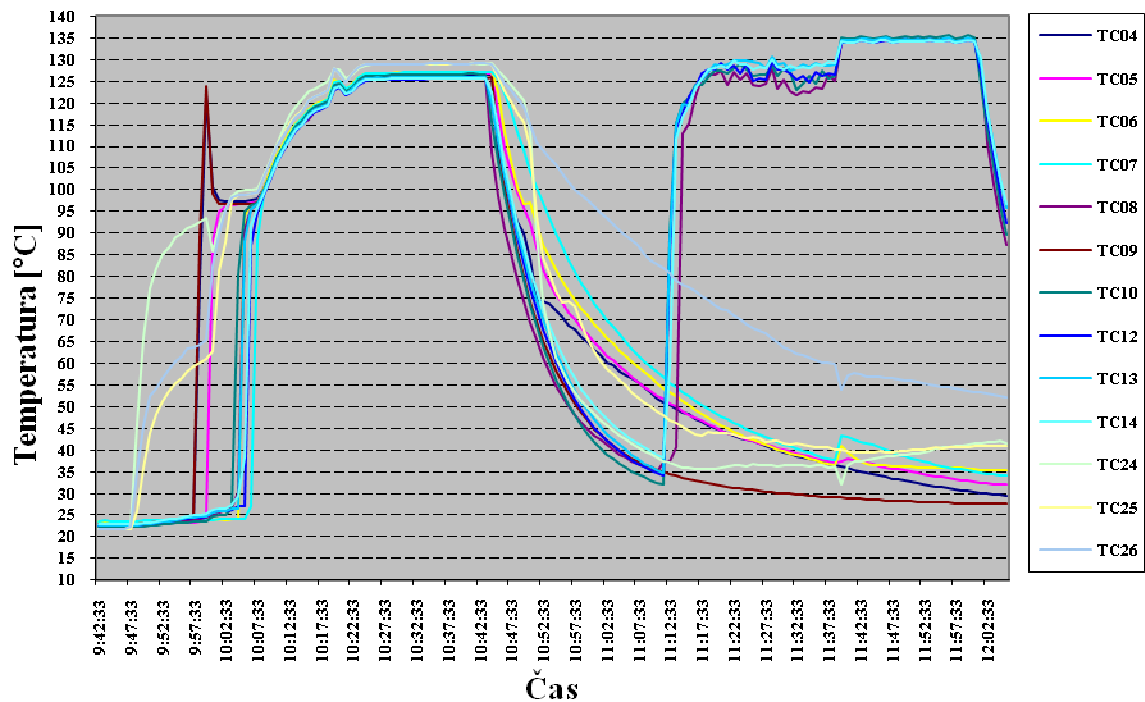
Vsi BI, ki smo jih namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem SIP postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Oba filtra C9MN439980223 in C9KN2067600182 sta pred in po SIP postopku uspešno opravila test integritete filtrov.

Preglednica XI: **Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V633.**

Bioreaktor V633-10 I					
Datum	20. 12. 2010				
Začetek testa	9:42			Trajanje testa	167 min
Konec testa	12:05				
Začetek sterilizacije	10:23			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	10:43				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	124,3	129,2	125,4	129,0	126,8
Sonda - TC	TC12	TC26	TC12	TC26	
F_{0min}	74,9 (TC09)				
F_{0max}	736,5 (TC10)				

Bioreaktor V633-101



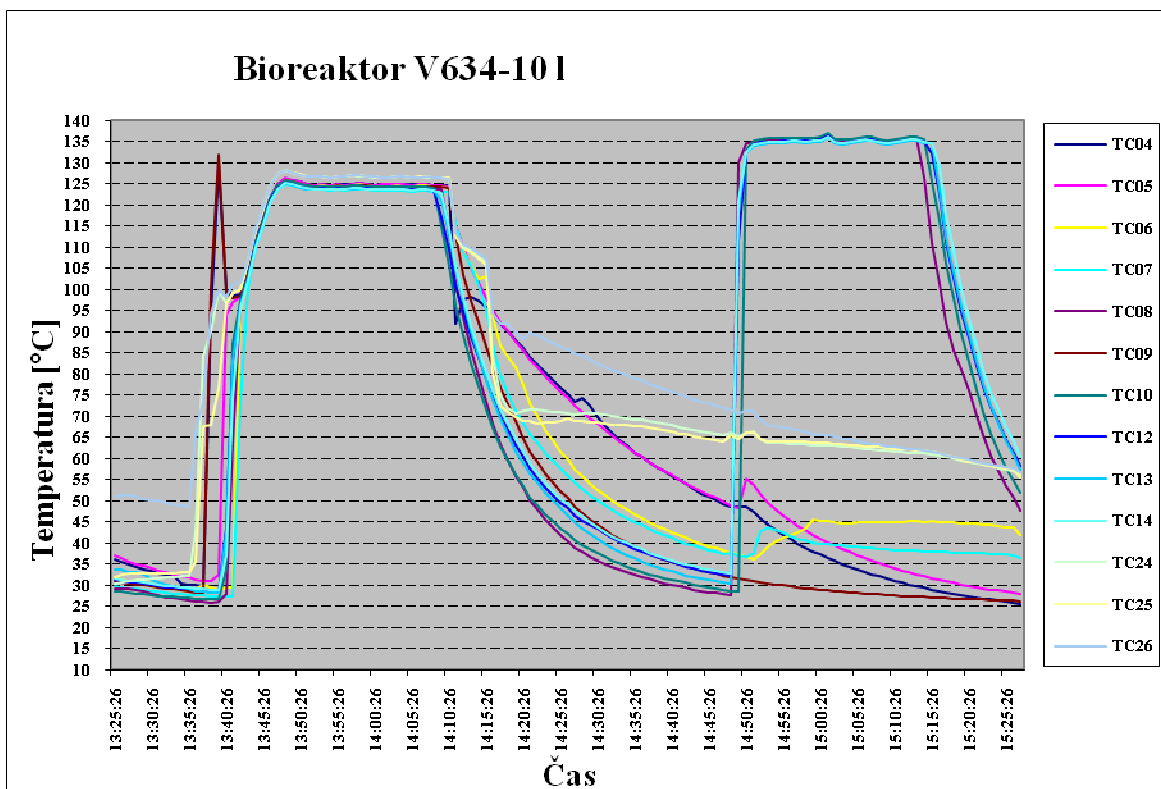
Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP pri bioreaktorju V633.

Vsi BI, ki smo jih namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem SIP postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Oba filtra C9MN439980235 in C9MN439980232 sta pred in po SIP postopku uspešno opravila test integritete filtrov.

Preglednica XII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V634.

Bioreaktor V634-10 I					
Datum	10. 12. 2010				
Začetek testa	13:25	Trajanje testa		122 min	
Konec testa	15:27	Trajanje sterilizacije		20 min	
Začetek sterilizacije	13:48	Trajanje sterilizacije		20 min	
Konec sterilizacije	14:08	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	123,0	128,3	123,6	126,9	124,9
Sonda - TC	TC07	TC25	TC07	TC25	
$F_{0\min}$	44,0 (TC07)				
$F_{0\max}$	780,6 (TC10)				



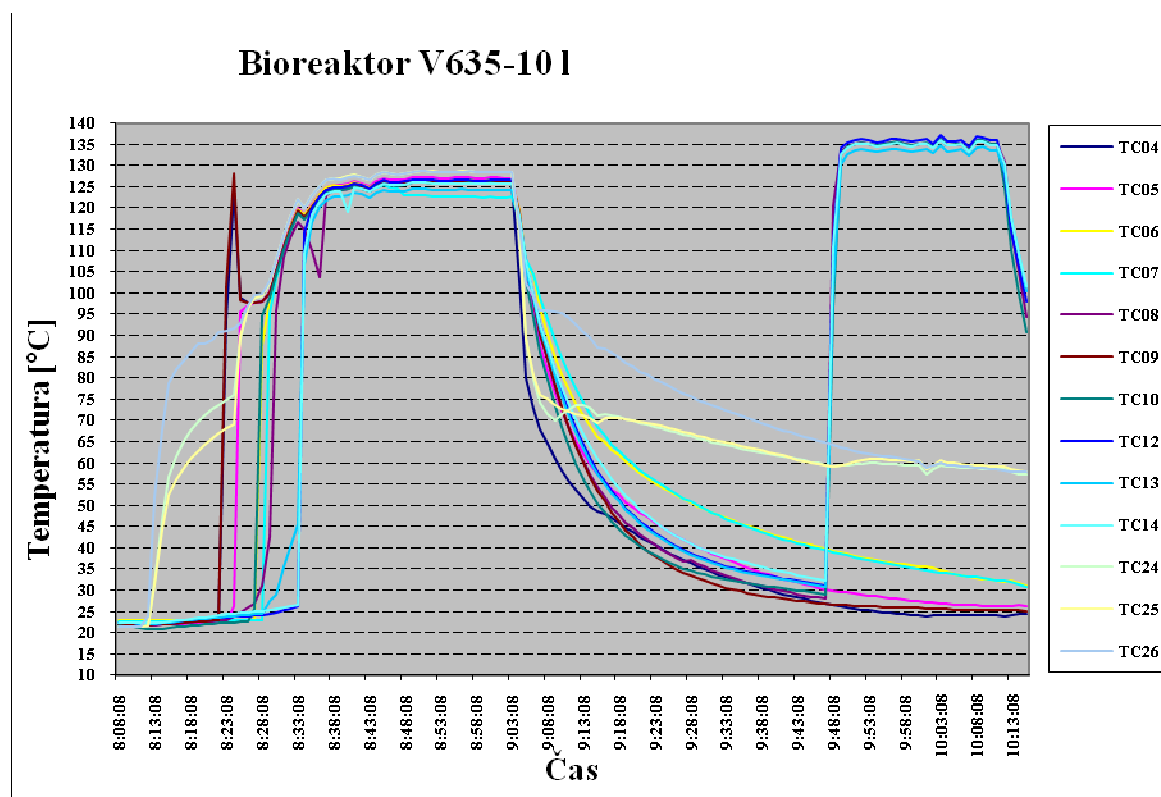
Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP pri bioreaktorju V634.

Vsi BI, ki smo jih namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem SIP postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Oba filtra C9MN439980477 in C9MN439980223 sta pred in po SIP postopku uspešno opravila test integritete filtrov.

Preglednica XIII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V635.

Bioreaktor V635-10 I					
Datum	13. 12. 2010				
Začetek testa	8:08				
Konec testa	10:15	Trajanje testa		127 min	
Začetek sterilizacije	8:43				
Konec sterilizacije	9.03	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	122,4	128,7	123,2	128,4	126,2
Sonda - TC	TC07	TC25/26	TC07	TC25	
$F_{0\min}$	52,4 (TC07)				
$F_{0\max}$	780,0 (TC12)				



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP pri bioreaktorju V635.

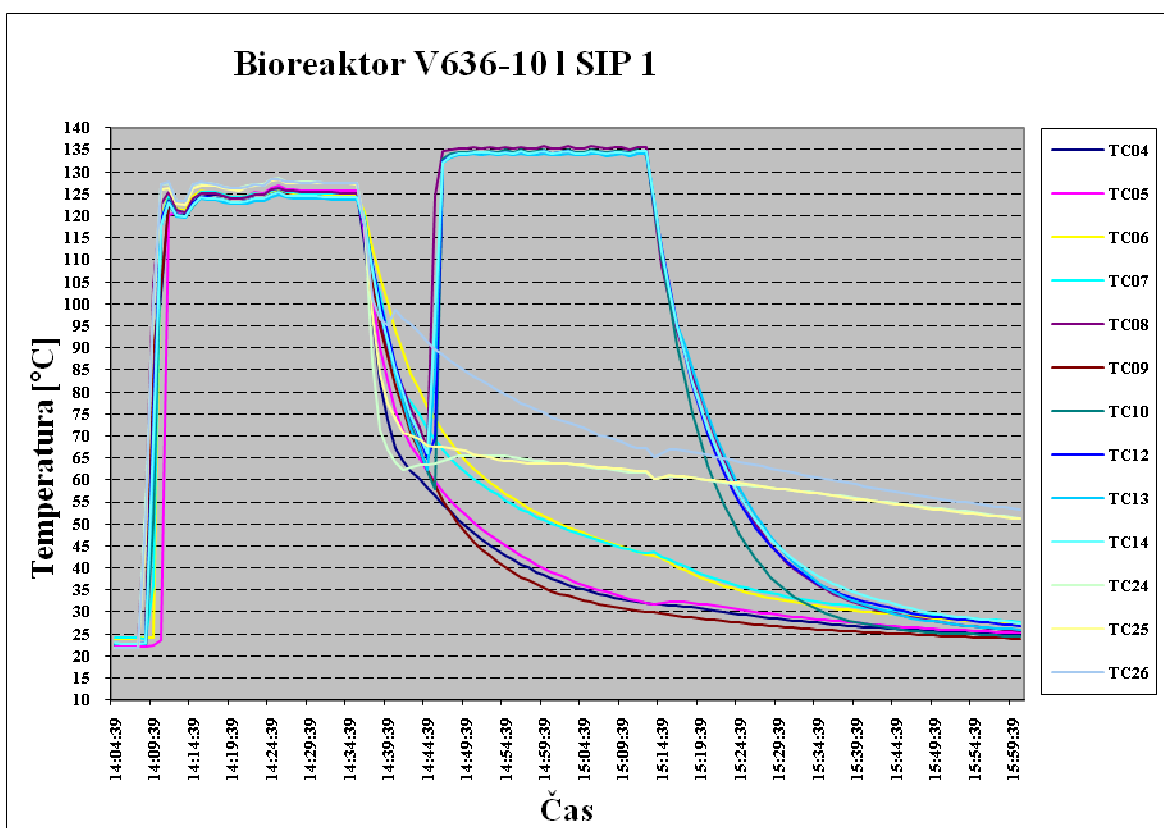
Vsi BI, ki smo jih namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem SIP postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Oba filtra C9MN439980490 in C9KN206760012 sta pred in po SIP postopku uspešno opravila test integritete filtrov.

Preglednica XIV: **Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V636.**

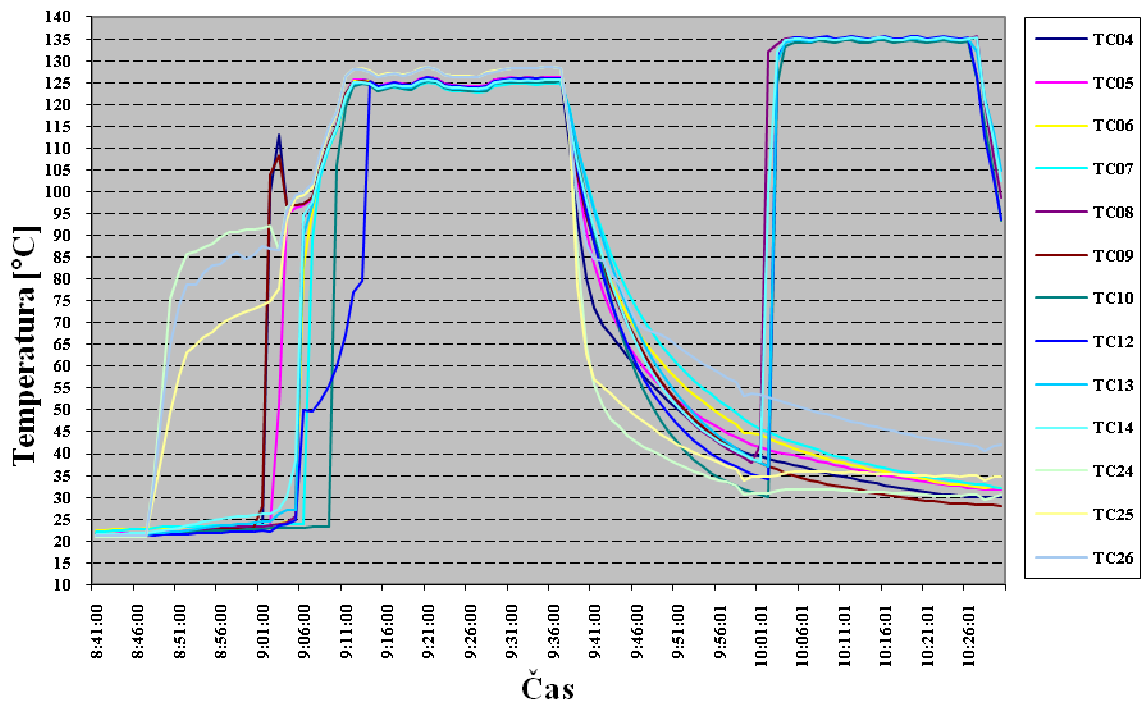
Bioreaktor V636-10 1					
SIP 1					
Datum	13. 12. 2010				
Začetek testa	14:04			Trajanje testa	116 min
Konec testa	16:00				
Začetek sterilizacije	14:15			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	14:35				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	122,6	128,6	123,7	127,4	125,2
Sonda - TC	TC13	TC24	TC13	TC24	
F_{0min}	48,0 (TC09)				
F_{0max}	798,2 (TC08)				
SIP 2					
Datum	17. 12. 2010				
Začetek testa	8:41			Trajanje testa	109 min
Konec testa	10:30				
Začetek sterilizacije	9:17			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	9:37				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	122,6	128,5	124,0	127,6	125,5
Sonda - TC	TC07	TC24/25	TC07	TC25	
F_{0min}	54,5 (TC07)				
F_{0max}	688,9 (TC08)				

SIP 3					
Datum	17. 12. 2010				
Začetek testa	10:47				
Konec testa	13:05	Trajanje testa		138 min	
Začetek sterilizacije	11:03				
Konec sterilizacije	11:23	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	122,7	128,4	124,1	127,5	125,4
Sonda - TC	TC10	TC25/26	TC10	TC25/26	
$F_{0\min}$	48,7 (TC07)				
$F_{0\max}$	656,4 (TC12)				



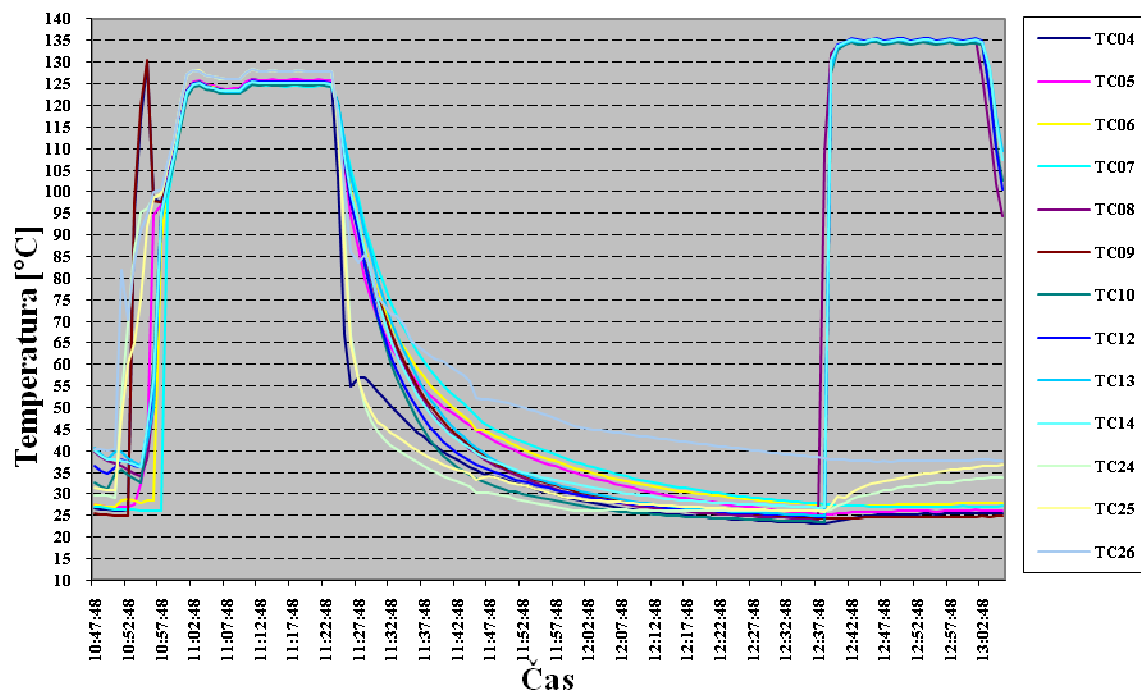
Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 1 pri bioreaktorju V636.

Bioreaktor V636-10 I SIP 2



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 2 pri bioreaktorju V636.

Bioreaktor V636-10 I SIP 3



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 3 pri bioreaktorju V636.

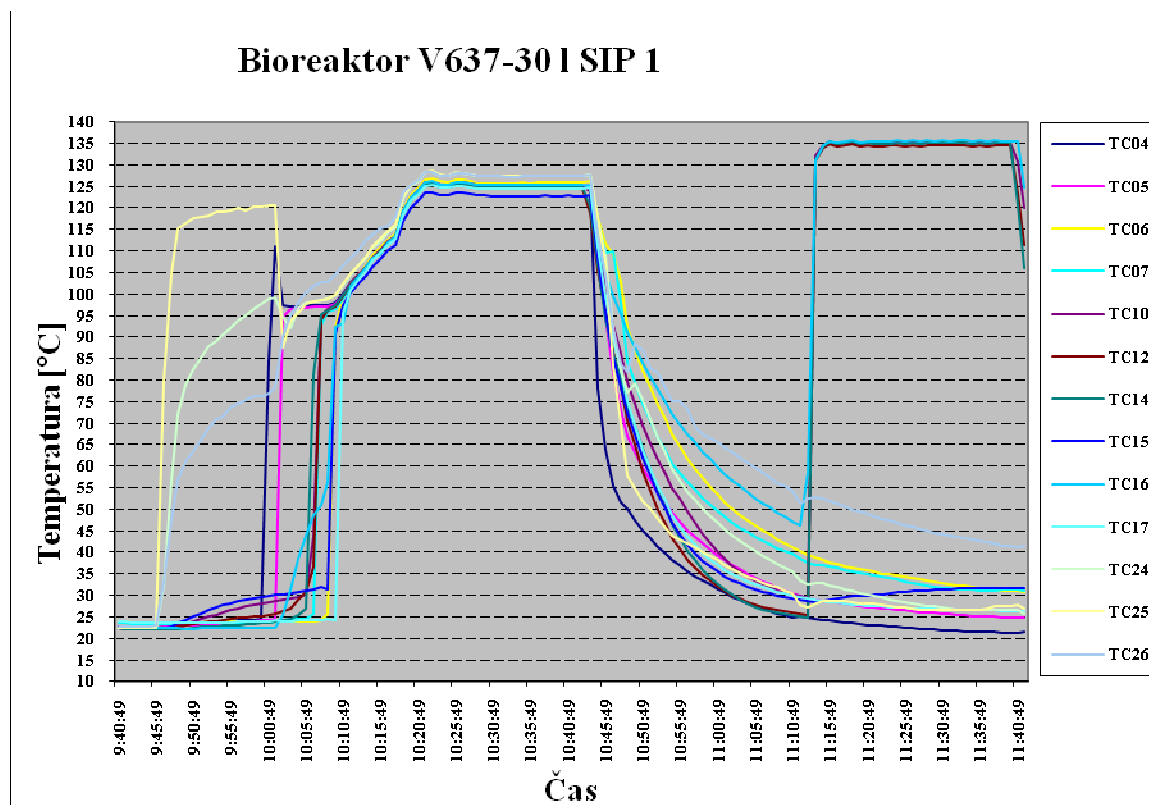
Vsi BI, ki smo jih pri vseh treh ponovitvah SIP postopka namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Pri SIP 1 in SIP 2 smo uporabili filtra C9MN439980534 in C9KN206760110, pri SIP 3 pa smo uporabili filtra C9MN439980216 in C9KN206760187, ki smo si ju izposodili pri bioreaktorju V637. Vsi filtri so uspešno opravili teste integritete filtrov

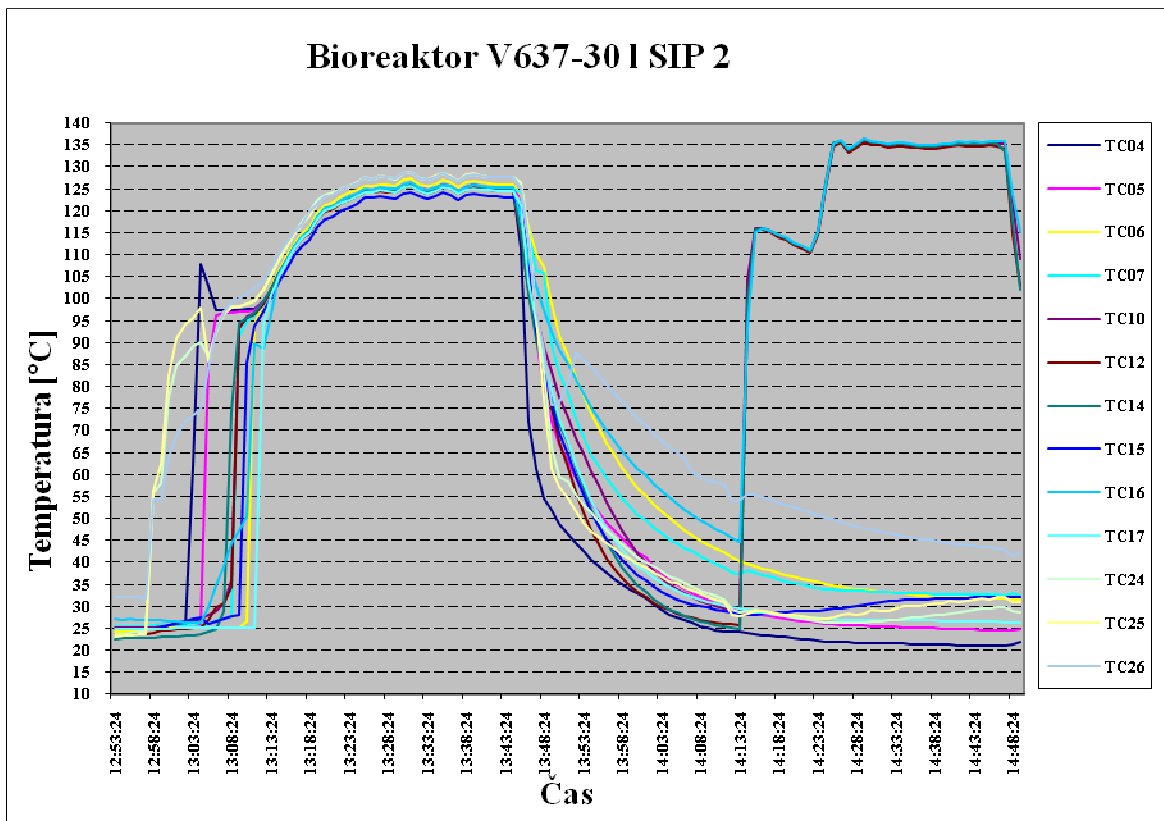
Preglednica XV: **Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V637.**

Bioreaktor V637-30 1					
SIP 1					
Datum	09. 12. 2010				
Začetek testa	9:40				
Konec testa	11:41	Trajanje testa		121 min	
Začetek sterilizacije	10:22				
Konec sterilizacije	10:42	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	122,6	128,5	122,9	127,6	125,5
Sonda - TC	TC15	TC24/25	TC15	TC25	
F_{0min}	37,8 (TC15)				
F_{0max}	815,6 (TC16)				
SIP 2					
Datum	09. 12. 2010				
Začetek testa	12:53				
Konec testa	14:49	Trajanje testa		116 min	
Začetek sterilizacije	13:24				
Konec sterilizacije	13:44	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	121,6	128,8	123,2	127,7	125,5
Sonda - TC	TC15	TC24/25	TC15	TC25	
F_{0min}	38,6 (TC15)				
F_{0max}	695,8 (TC16)				

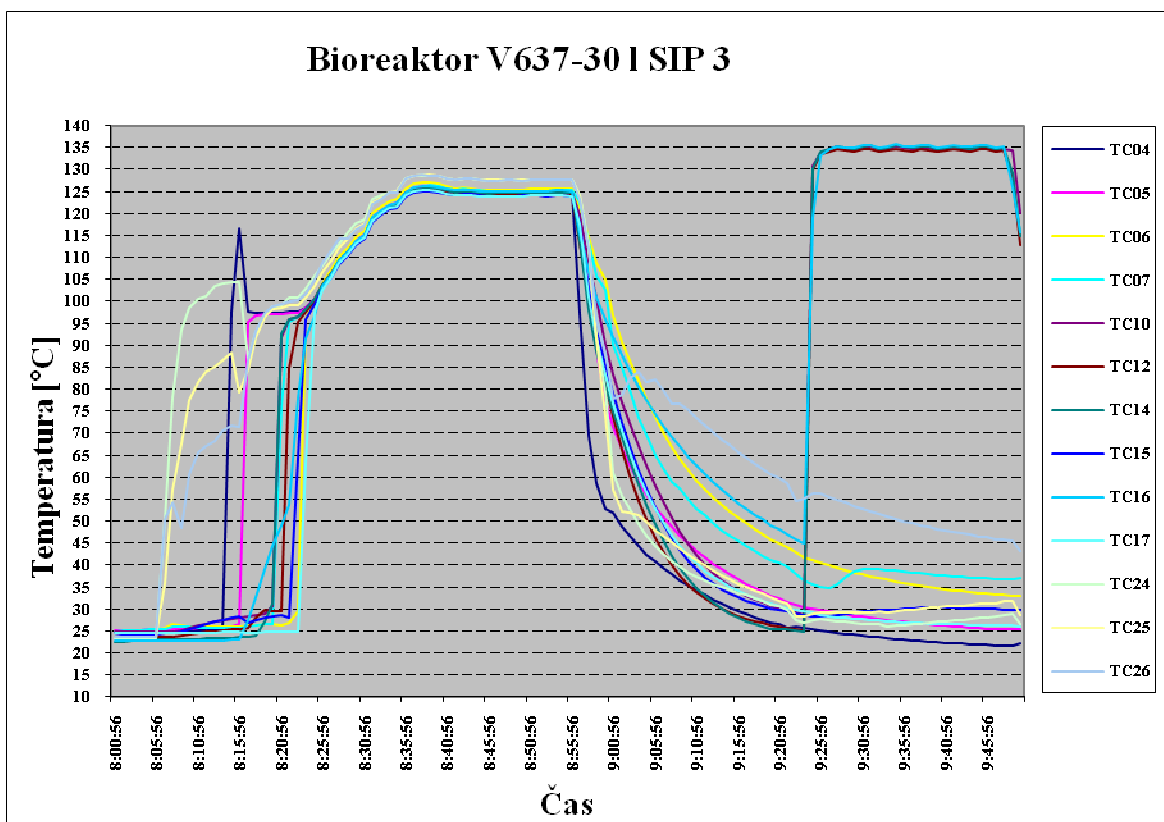
SIP 3					
Datum	10. 12. 2010				
Začetek testa	8:00				
Konec testa	9:49	Trajanje testa		109 min	
Začetek sterilizacije	8:35				
Konec sterilizacije	8:55	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	123,7	128,7	124,2	127,9	125,6
Sonda - TC	TC17	TC24/25/26	TC15	TC25	
$F_{0\min}$	47,4 (TC15)				
$F_{0\max}$	655,1 (TC16)				



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 1 pri bioreaktorju V637.



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 2 pri bioreaktorju V637.



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 3 pri bioreaktorju V637.

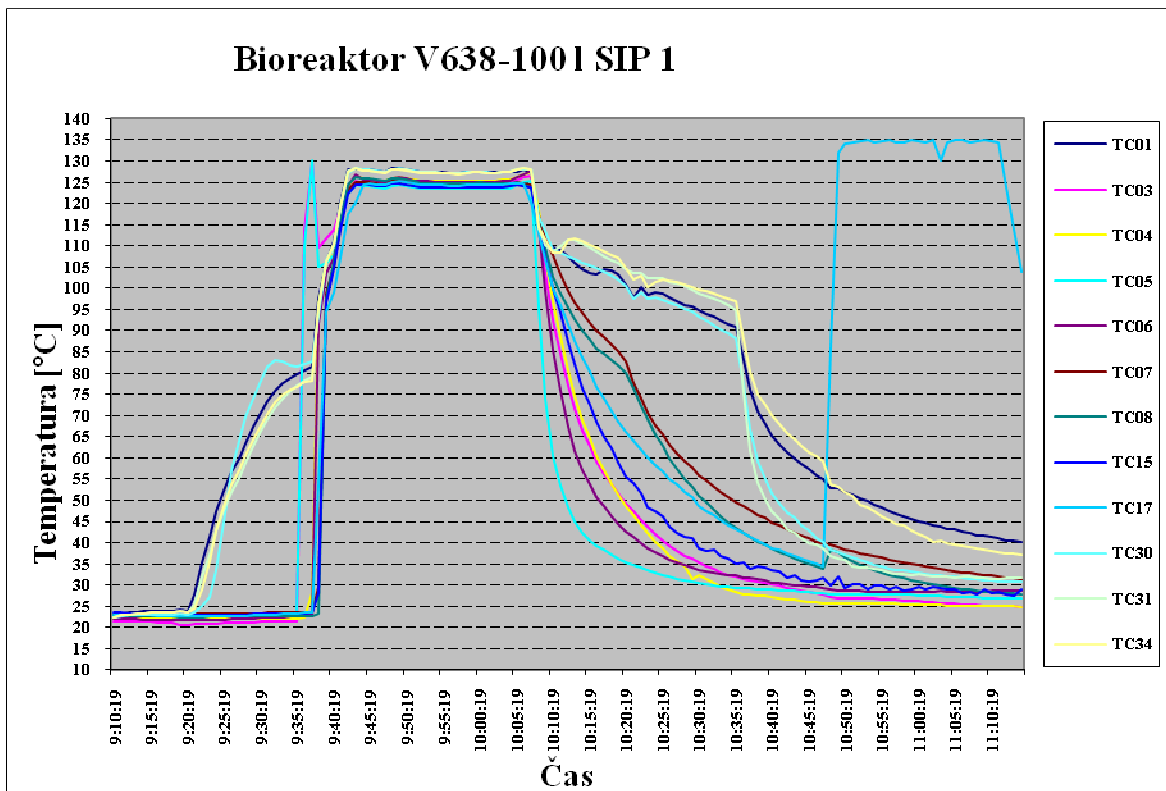
Vsi BI, ki smo jih pri vseh treh ponovitvah SIP postopka namestili poleg termočlenov TC04, TC05, TC06, TC24, TC25 in TC26 so bili po končanem postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Pri SIP 1 smo uporabili filtra C9MN439980216 in C9MN439980222, ki sta pred in po SIP postopku uspešno opravila test integritete filtrov. Pri SIP 2 smo si izposodili filtre bioreaktorja V633, ki pa nista naredila testa integritete pred SIP postopkom. V ohišje filtrov smo zato vstavili popolnoma nova filtra in smo test integritete izvajali samo po SIP 2 postopku. Oba filtra, C9MN439980235 in C9MN439980232, sta po SIP 2 postopku uspešno opravila test integritete filtrov. Pri SIP 3 smo ponovno uporabili filtra iz SIP 1 C9MN439980216 in C9MN439980222. Po SIP 3 postopku je filter C9MN439980216 opravil test integritete, filter C9MN439980222 pa testa ni opravil. SIP 3 postopek smo zato v celoti ponovili z novim filtrom C9KN206760187. Oba filtra C9MN439980216 in C9KN206760187 sta nato po ponovljenem SIP 3 postopku uspešno opravila test integritete.

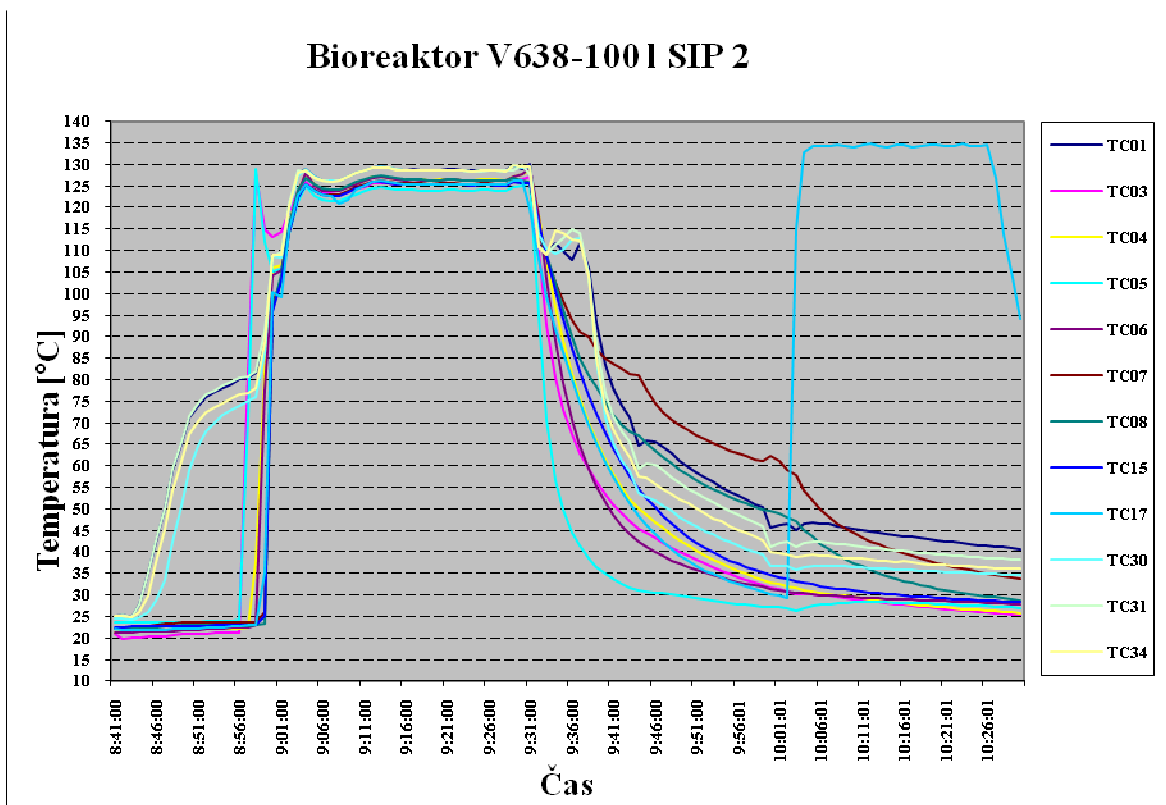
Preglednica XVI: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V638.

Bioreaktor V638-100 I					
SIP 1					
Datum	14. 12. 2010				
Začetek testa	9:10		Trajanje testa		124 min
Konec testa	11:14				
Začetek sterilizacije	9:46		Trajanje sterilizacije		20 min
Konec sterilizacije	10:06				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	123,4	128,3	123,8	127,6	125,7
Sonda - TC	TC05	TC30/31	TC05	TC01	
F_{0min}	51,8 (TC15)				
F_{0max}	557,1 (TC17)				

SIP 2					
Datum	17. 12. 2010				
Začetek testa	8:41			Trajanje testa	109 min
Konec testa	10:30				
Začetek sterilizacije	9:10			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	9:30				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	123,1	129,9	124,1	128,9	126,7
Sonda - TC	TC05	TC01	TC05	TC01	
F_{0min}	60,9 (TC05)				
F_{0max}	560,3 (TC17)				
SIP 3					
Datum	17. 12. 2010				
Začetek testa	10:47			Trajanje testa	140 min
Konec testa	13:07				
Začetek sterilizacije	11:12			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	11:32				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	123,0	129,5	124,3	128,9	126,6
Sonda - TC	TC17	TC01/30/31/34	TC05	TC01	
F_{0min}	68,4 (TC05)				
F_{0max}	591,9 (TC17)				

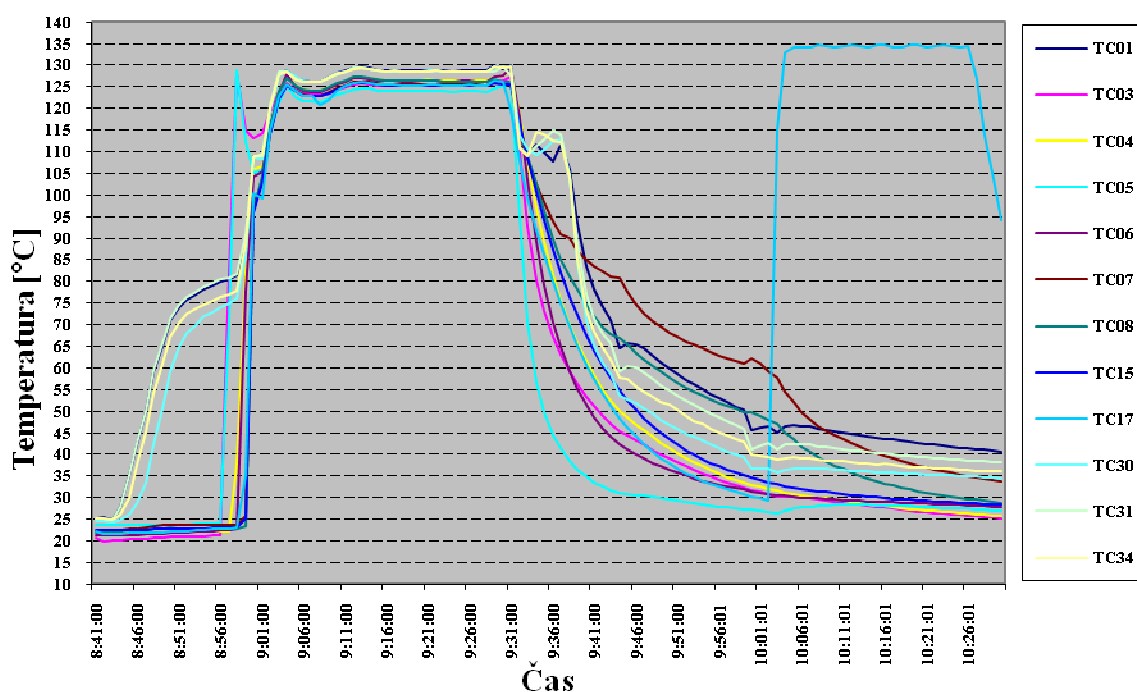


Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 1 pri bioreaktorju V638.



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 2 pri bioreaktorju V638.

Bioreaktor V638-1001 SIP 3



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 3 pri bioreaktorju V638.

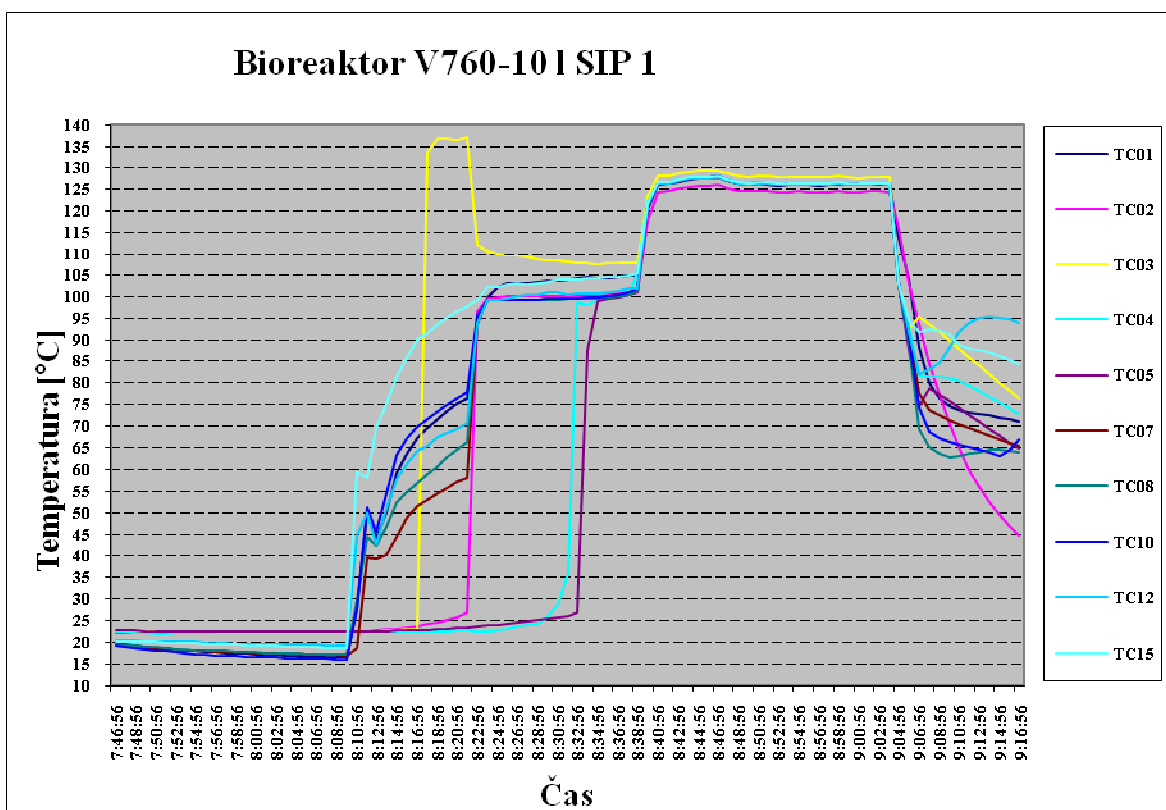
Vsi BI, ki smo jih pri vseh treh ponovitvah SIP postopka namestili poleg termočlenov TC01, TC03, TC04, TC05, TC06, TC07, TC08, TC30 in TC34 so bili po končanem postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Vsi filtri, ki smo jih uporabili pri SIP 1, SIP 2 in SIP 3 postopkih IN7144040, IN7144209, IN7144182, IN7313418 in IN7313421 so pred in po vsaki posamezni sterilizaciji uspešno opravili test integritete filtrov.

Preglednica XVII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V760.

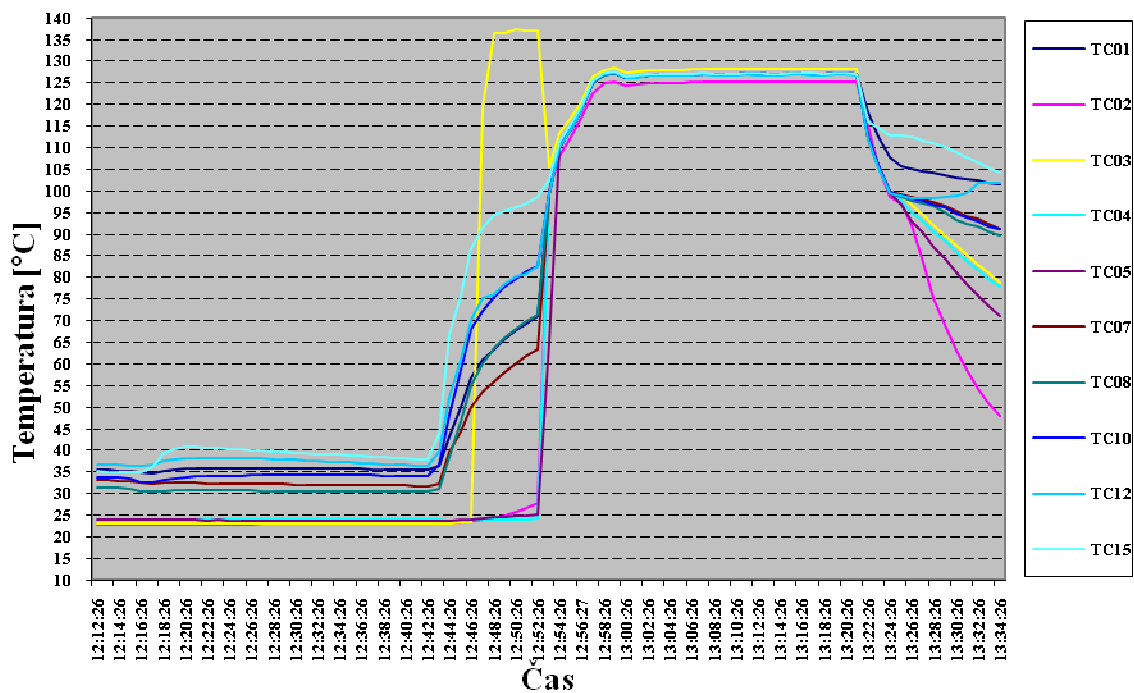
Bioreaktor V760-10 1					
SIP 1					
Datum	10. 12. 2010				
Začetek testa	7:46			Trajanje testa	90 min
Konec testa	9:16				
Začetek sterilizacije	8:43			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	9:03				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	124,3	129,5	124,8	128,3	126,6
Sonda - TC	TC02	TC03	TC02	TC03	
F_{0min}	55,5 (TC02)				
F_{0max}	293,9 (TC03)				
SIP 2					
Datum	10. 12. 2010				
Začetek testa	12:12			Trajanje testa	82 min
Konec testa	13:34				
Začetek sterilizacije	13:01			Trajanje sterilizacije	20 min
Konec sterilizacije	31:21				
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	124,6	128,3	125,1	128,1	126,9
Sonda - TC	TC02	TC03	TC02	TC03	
F_{0min}	62,8 (TC02)				
F_{0max}	315,0 (TC03)				

SIP 3					
Datum	13. 12. 2010				
Začetek testa	8:39		Trajanje testa		57 min
Konec testa	9:36				
Začetek sterilizacije	9:03		Trajanje sterilizacije		20 min
Konec sterilizacije	9:23				
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	124,1	129,1	124,4	128,1	126,3
Sonda - TC	TC02	TC03	TC02	TC03	
$F_{0\min}$	51,0 (TC02)				
$F_{0\max}$	275,1 (TC03)				



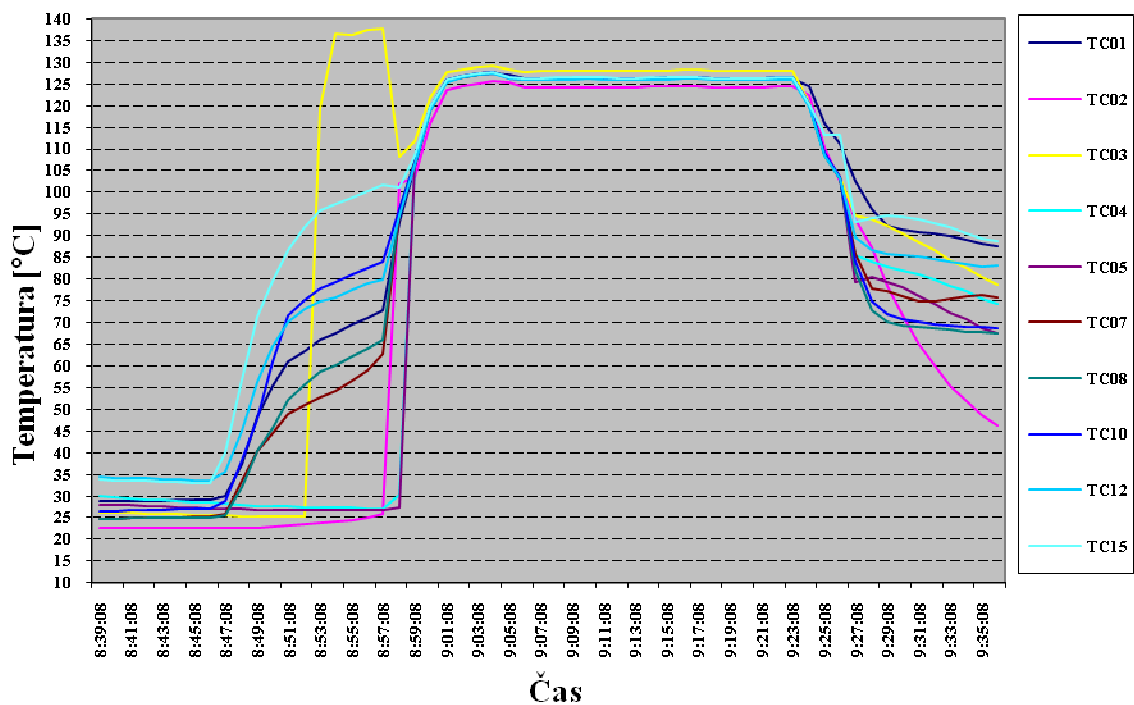
Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 1 pri bioreaktorju V760.

Bioreaktor V760-10 I SIP 2



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 2 pri bioreaktorju V760.

Bioreaktor V760-10 I SIP 3



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 3 pri bioreaktorju V760.

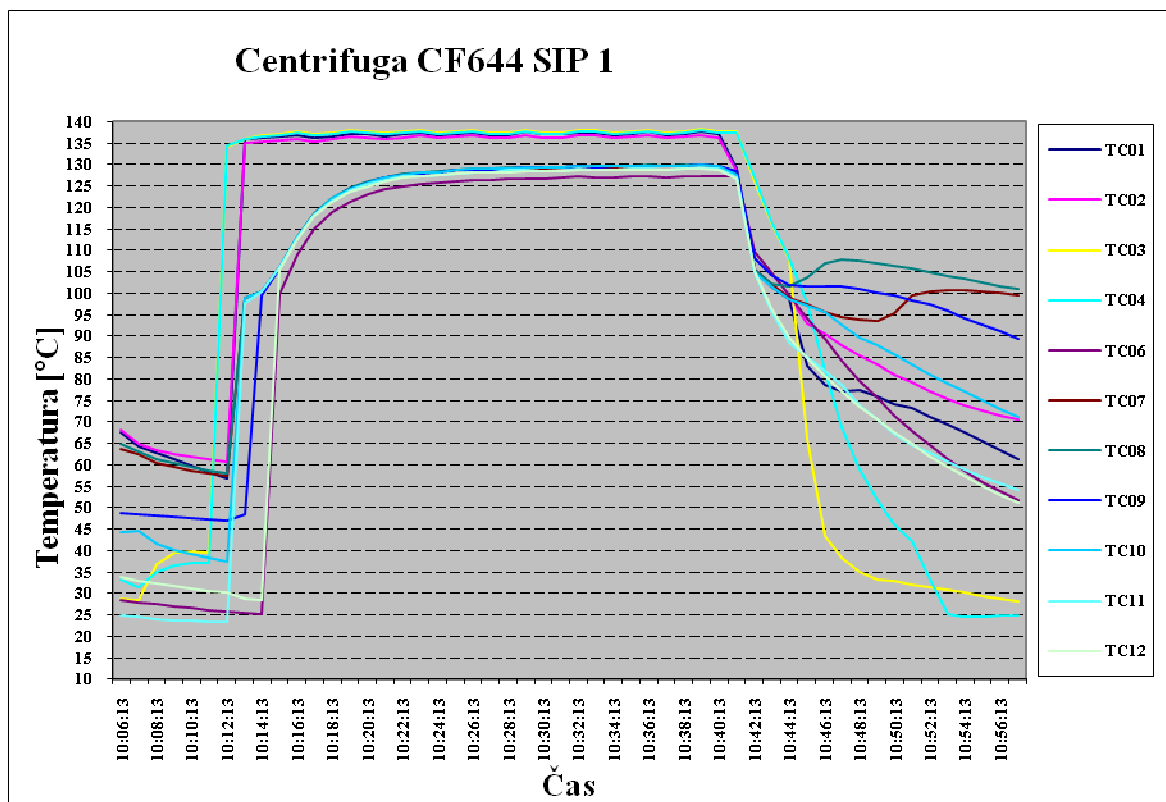
Vsi BI, ki smo jih pri vseh treh ponovitvah SIP postopka namestili poleg termočleno TC02, TC03, TC04, TC05, TC07, TC08, TC10 in TC15 so bili po končanem postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Vsi filtri, ki smo jih uporabili pri SIP 1, SIP 2 in SIP 3 postopkih IN7144040, IN7144209, IN7313418 in IN7313421 so pred in po vsaki posamezni sterilizaciji uspešno opravili test integritete filtrov.

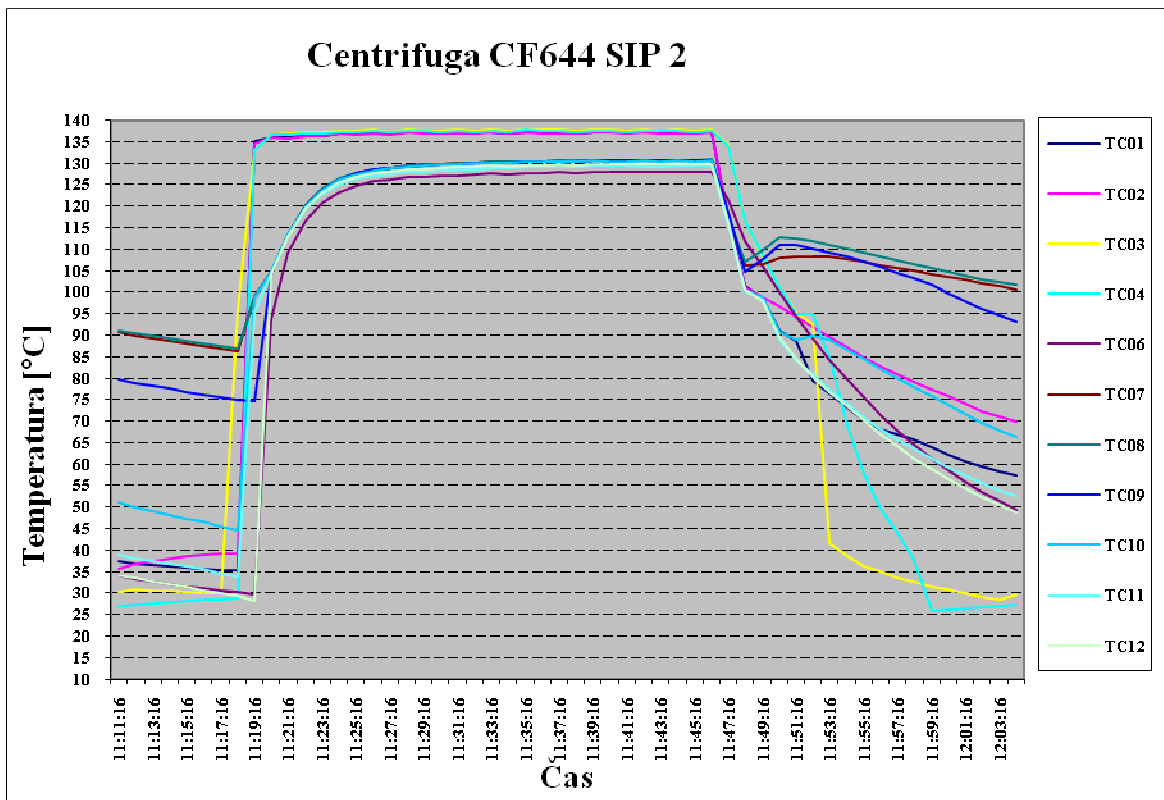
Preglednica XVIII: **Rezultati validacije sterilizacije centrifuge.**

Centrifuga CF644					
SIP 1					
Datum	23. 12. 2010				
Začetek testa	10:03				
Konec testa	10:57	Trajanje testa		54 min	
Začetek sterilizacije	10:21				
Konec sterilizacije	10:41	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	124,2	138,2	126,6	137,7	131,6
Sonda - TC	TC06	TC03	TC06	TC03	
F_{0min}	79,4 (TC06)				
F_{0max}	1303,2 (TC03)				
SIP 2					
Datum	23. 12. 2010				
Začetek testa	11:11				
Konec testa	12:04	Trajanje testa		53 min	
Začetek sterilizacije	11:26				
Konec sterilizacije	11:46	Trajanje sterilizacije		20 min	
	T_{min} (°C)	T_{max} (°C)	T̄_{min} (°C)	T̄_{max} (°C)	T̄(°C)
Temperatura	125,3	137,9	127,5	137,7	132,3
Sonda - TC	TC06	TC03	TC06	TC03	
F_{0min}	99,5 (TC06)				
F_{0max}	1234,0 (TC03)				

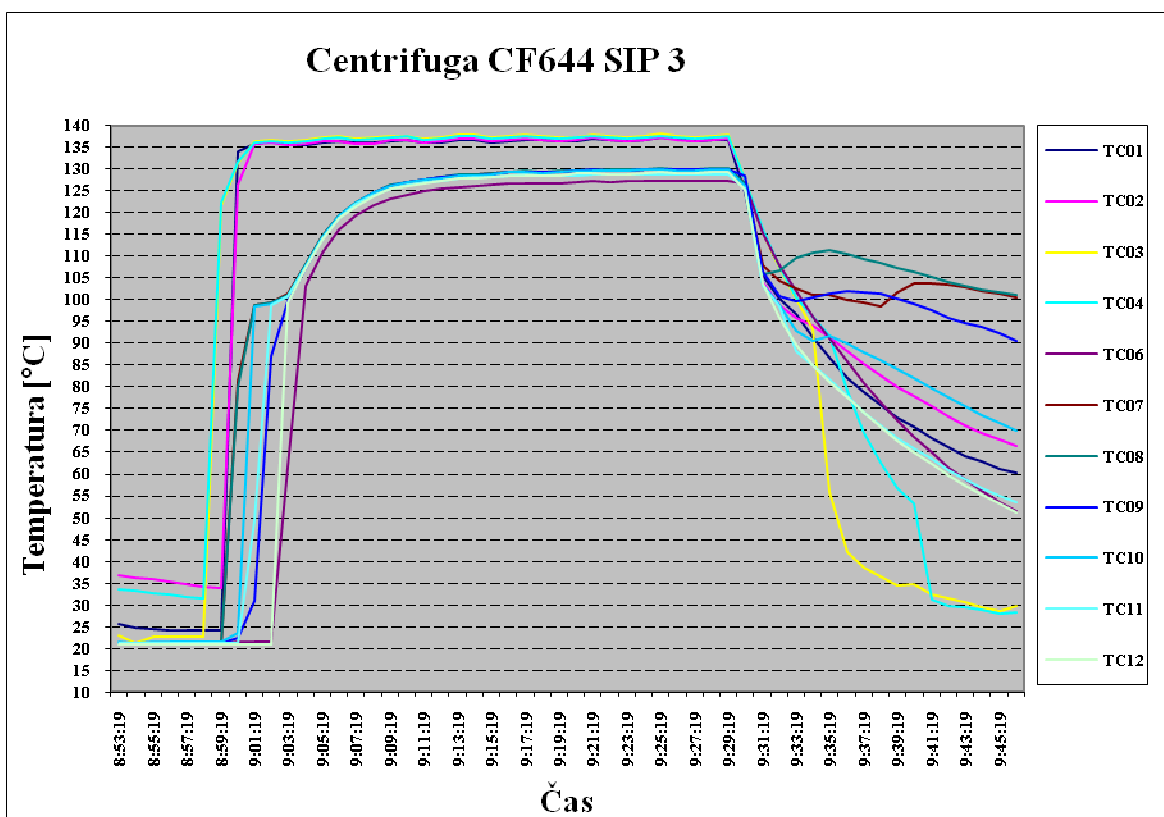
SIP 3					
Datum	24. 12. 2010				
Začetek testa	8:53				
Konec testa	9:49		Trajanje testa	56 min	
Začetek sterilizacije	9:09				
Konec sterilizacije	9:29		Trajanje sterilizacije	20 min	
	T_{\min} (°C)	T_{\max} (°C)	\bar{T}_{\min} (°C)	\bar{T}_{\max} (°C)	\bar{T} (°C)
Temperatura	123,3	138,1	126,5	137,6	131,6
Sonda - TC	TC06	TC03	TC06	TC03	
$F_{0\min}$	80,4 (TC06)				
$F_{0\max}$	1259,3 (TC03)				



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 1 pri centrifugi.



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 2 pri centrifugi.



Slika: Temperatura v odvisnosti od časa med postopkom SIP 3 pri centrifugi.

Vsi BI, ki smo jih pri vseh treh ponovitvah SIP postopka namestili poleg termočlenov TC01, TC02, TC03, TC04, TC07, TC08, TC09 in TC10 so bili po končanem postopku sterilni, referenčni BI pa je bil nesterilen.

Vsi filtri, ki smo jih uporabili pri SIP 1, SIP 2 in SIP 3 postopkih FP75751385, FP77760152, FP75751384 in FP75751384 so pred in po vsaki posamezni sterilizaciji uspešno opravili test integritete filtrov.

4.2 Rezultati merjenja porazdelitve temperatur med validacijo SIP postopka

Iz rezultatov v zgornjih preglednicah je razvidno, da smo pri vseh ponovitvah na vseh enotah dosegli zahtevane sterilizacijske specifikacije pristopa sterilizacije s pretiranim uničenjem MO. Temperatura je bila na vseh TC, ki smo jih namestili na hladne točke sistema pri vseh ponovitvah na vseh enotah višja ali enaka 121°C najmanj 20 minut.

Najnižje temperature T_{\min} in najnižje povprečne temperature \bar{T}_{\min} smo največkrat dobili na TC, ki je bil nameščen na enem od odvodov kondenzata, pri nekaterih enotah V634, V635, V638 in V760, pa je bil TC z najnižjimi temperaturami nameščen na ohišju filtra. Gre za mesta enote, ki najpočasneje dosežejo temperaturo sterilizacije 121°C in imajo med fazo sterilizacije najnižjo temperaturo. Ta mesta so na delih enote, ki so najbolj izpostavljena hladni okolici, zato je segrevanje počasnejše in vzdrževanje temperature težje. Odvodi kondenzata so tudi najslabše dostopni za sterilizacijsko sredstvo. Na teh mestih najlažje pride do padca temperature med fazo sterilizacije, ki je posledica kondenzacije pare. Prav tako pri nobenem TC nismo presegli najvišje dovoljene temperature sterilizacije 140°C. Najvišje temperature T_{\max} in najvišje povprečne temperature \bar{T}_{\max} smo v večini primerov izmerili pri TC, ki so bili nameščeni v notranjosti enote. To so mesta, ki se najhitreje segrejejo in tudi bolje ohranjajo temperaturo, ter so najlažje dostopna za sterilizacijsko sredstvo. Povprečna temperatura \bar{T} med fazo sterilizacije je bila pri bioreaktorjih od 124,3°C pa do 126,9°C, pri centrifugi pa je bila višja od 131,6°C pa do 132,3°C. Višje temperature pri centrifugi so posledica malce višjega tlaka kot pri sterilizaciji bioreaktorjev.

Smrtnost procesa F_0 nam pove, kako učinkovit je proces sterilizacije. Večji, kot je F_0 , bolj je proces sterilizacije učinkovit. Višje kot so temperature, večja je sposobnost

mikrobiološke inaktivacije toplote vodne pare ter posledično boljša učinkovitost procesa sterilizacije. Pri višjih temperaturah pare se ob kondenzaciji prenese na MO večja količina toplotne energije. Pri vseh TC smo presegli najnižjo dovoljeno vrednost F_0 20 minut. Najnižjo vrednost parametra F_0 smo v največ primerih dobili pri TC, ki so bili nameščeni na ohišja filtrov. V tem primeru gre za mesta, ki so dobila najnižjo količino toplotne energije preko celotnega postopka sterilizacije. TC na odvodih kondenzatov na linijah za dodajanje dodatkov, kjer smo v večini primerov dobili najnižje temperature med fazo sterilizacije, so bili med celotnima postopkom sterilizacije dvakrat po 20 minut izpostavljeni pogojem sterilizacije, saj smo takoj za sterilizacijo celotne enote izvedli še sterilizacijo povezav. TC na teh mestih so tako prejeli večjo količino toplotne energije, kljub temu, da so bile temperature med fazo sterilizacije celotne enote lahko nižje. Nižje temperature na odvodih kondenzata tekom SIP postopka so lahko posledica dejstva, da so bili ne teh mestih termočneni pritrjeni na zunanjo stran cevi in niso bili v neposrednem stiku s sterilizacijskim medijem. Najvišje vrednosti F_0 smo tako dobili pri TC nameščenih na odvodih kondenzatov na linijah za dodajanje dodatkov.

4.3 Rezultati testiranja sterilnosti BI

BI, ki smo jih namestili na enoto poleg TC so bili po končanem postopku sterilizacije s pretiranim uničenjem MO vsi sterilni, referenčni BI, pa so bili nesterilni. Iz tega lahko sklepamo, da je bila učinkovitost sterilizacijskega sredstva ustrezna. Nasičena vodna para pod tlakom je imela pri doseženi temperaturi sterilizacije v obliki latentne toplote shranjeno dovolj veliko količino energije za uničenje MO in doseganje SAL 10^{-6} MOpU.

4.4 Rezultati testiranja integritete filtrov pred in po SIP postopku

Za uspešno opravljeno validacijo postopka sterilizacije morajo uporabljeni filtri pred in po SIP postopku uspešno opraviti test integritete filtrov. S testiranjem integritete filtrov smo preverjali, če SIP postopek poškoduje filter. Pred SIP postopkom smo testirali integriteto filtrov z namenom, da smo preverili, če je filter nepoškodovan in ga lahko uporabimo pri validaciji. Trije filtri pred SIP postopkom niso naredili testa, zato smo jih zamenjali z novimi. Testa integritete pri novih filtrih ni treba narediti. Po SIP postopku smo ponovno

testirali filtre in v vseh primerih razen filtra C9MN439980222 pri SIP 3 na enoti V637 so vsi filtri uspešno opravili test integritete filtrov. Ker filter po SIP postopku ni opravil testa integritete, smo predpostavili, da obstaja možnost, da SIP postopek poškoduje filter. Druga možnost je, da se je iztekla življenjska doba filtra. Celoten SIP postopek smo zato ponovili z novim filtrom in ponovno naredili test integritete. Oba filtra, ki sta bila izpostavljena ponovljenemu postopku SIP, sta test uspešno opravila, zato lahko sklepamo, da SIP postopek na enoti V637 ne poškoduje filtrov. V primeru filtra C9MN439980222 gre tako lahko za iztek življenjske dobe filtra, ki pa ga ni mogoče vnaprej predvideti.

4.5 Komentar grafov

Iz grafov, ki prikazujejo temperaturo v odvisnosti od časa med postopkom sterilizacije, lahko vidimo, da je časovni potek doseganja temperatur sterilizacije podoben pri vseh ponovitvah na vseh enotah, a nikoli popolnoma enak. Največje razlike so predvsem v fazi segrevanja. Razlogov za raznolikost je več.

- Bioreaktorji in centrifuge so zapleteni sistemi posod, cevi in ventilov, zato je segrevanje enote zapleteno in poteka v več stopnjah.
- Vsaka enota ima glede na obliko in velikost, ter na samo postavitev v prostoru svoje lastnosti in posebnosti, ter zato tudi malo drugačen potek sterilizacije. Na časovni potek temperatur lahko vpliva tudi tlak čiste pare v sistemu.
- Na eni enoti smo ponovitve sterilizacij izvajali zaporedno, zato je bila celotna enota pri drugi in tretji ponovitvi že segreta na 37°C (in ne na sobno temperaturo) in smo zato potrebovali manj časa, da smo temperaturo sterilizacije dosegli po celotnem sistemu.
- Dovajanje sterilizacijskega sredstva v sistem poteka z ročnim upravljanjem z ventili, kar pomeni, da ne moremo zagotoviti popolnoma enakega časovnega poteka odpiranja in zapiranja ventilov. Pri centrifugi je manj ročnih operacij in predvsem je sistem cevi ventilov in posod manj zapleten, razlike v časovnem poteku temperatur med postopkom sterilizacije pa so manjše.
- SIP postopke moramo nadzorovati in spremljati glede na temperaturo in tlak, ter v primeru padca temperature z ročnimi operacijami ponovno vzpostaviti ustrezno razmerje tlaka in temperature.

Rezultat vseh teh dejavnikov je krivulja, ki v fazi sterilizacije ni popolnoma ravna, ampak malce niha. Želimo si čim manjša nihanja, popolnoma preprečiti pa jih ne moremo. Pomembno je, da temperatura ne pade pod 121°C.

5. SKLEP

Validacija postopka sterilizacije z nasičeno vodno paro je bila pri vseh bioreaktorjih in centrifugi uspešna. Z validacijo postopka sterilizacije smo potrdili, da predpisani postopki za izvedbo sterilizacije na mestu (SIP) zagotavljajo doseganje pričakovanih in ustreznih rezultatov. Dosegli smo predpisane parametre sterilizacijskega postopka s pristopom pretiranega uničenja MO. Pri vseh bioreaktorjih in centrifugi smo dosegli ustrezne temperature in čase sterilizacije ter posledično ustrezno smrtnost mikroorganizmov. Temperatura je bila v vseh delih opreme in pri vsaki ponovitvi, na vseh enotah najmanj 20 minut višja od 121°C. Pri validaciji smo dosegli stopnjo zagotavljanja sterilnosti najmanj 10^{-6} MOpU in tako potrdili učinkovitost izbranega postopka sterilizacije. Vsi BI, ki smo jih namestili na enoto poleg TC, so bili po končanem postopku sterilizacije s pretiranim uničenjem MO sterilni, vsi referenčni BI pa nesterilni. Pri vseh različnih tipih enot smo s tremi uspešnimi zaporednimi postopki sterilizacije potrdili ponovljivost postopka sterilizacije.

6. LITERATURA

1. Nash R A: Validation of Pharmaceutical Processes, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition, 2006, 1: 3928 - 3940

2. European Commission: Qualification and Validation, Final Version of Annex 15 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice, 2001, 1-11

<http://www.labcompliance.de/documents/europe/h-214-eu-gmp-annex15.pdf>, na dan 8.3.2011

3. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration: Process Validation: General Principles and Practices, Guidance for Industry Current Good Manufacturing Practices (CGMP) Revision 1, 2011, 3-14

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf>, na dan 18.3.2011

4. Council of Europe: General Texts on Sterility. In: European Pharmacopoeia 7th edition, European Pharmacopoeia Laboratory, 2011, 1: 445-450

5. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version), EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use, European Commission, 2008, 1-16

http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf, na dan 26.2.2011

6. Halls N A: Bio-Validation of Steam Sterilization, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 2006, 1: 325- 334

7. Agalloco J P et al.: Validation of Moist Heat Sterilization Process: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control, Technical Report No. 1, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2007, 61: 4-28

7. KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorjih V631, V632, V633, V634, V635 in V636.	28
Preglednica II: <i>Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorju V637.</i>	28
Preglednica III: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorju V638	29
Preglednica IIII: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri bioreaktorju V760.....	30
Preglednica V: Mesta namestitve TC in razlogi za izbor pri centrifugi.	30
Preglednica VI: Parametri sterilizacije na kontrolni enoti	31
Preglednica VII: Parametri SIP postopka.	35
Preglednica VIII: Dodatni parametri SIP postopka.	36
Preglednica VIII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V631.....	37
Preglednica X: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V632	39
Preglednica XI: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V633.....	40
Preglednica XII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V634	42
Preglednica XIII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V635	43
Preglednica XIV: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V636.....	44
Preglednica XV: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V637	47
Preglednica XVI: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V638.....	50
Preglednica XVII: Rezultati validacije sterilizacije bioreaktorja V760.....	54
Preglednica XVIII: Rezultati validacije sterilizacije centrifuge	57

8. PRILOGA

Priloga 1: Rezultati testiranja integritete filtrov pred in po SIP postopku.

Enota	SIP	filter	pred SIP			po SIP		
			rezultat	pretok	datum	rezultat	pretok	datum
V631	SIP 1	C9MN439980523	OK	0,20	9.12.2010	OK	0,19	21.12.2010
		C9MN439980477	OK	0,20	10.12.2010	OK	0,18	21.12.2010
V632	SIP 1	C9MN439980223	OK	0,06	10.12.2010	OK	0,06	24.12.2010
		C9KN2067600182	OK	0,04	9.12.2010	OK	0,06	24.12.2010
V633	SIP 1	C9MN439980235	OK	0,50	9.12.2010	OK	0,50	21.12.2010
		C9MN439980232	OK	0,10	9.12.2010	OK	0,14	21.12.2010
V634	SIP 1	C9MN439980477	OK	0,12	8.12.2010	OK	0,20	10.12.2010
		C9MN439980223	OK	0,05	8.12.2010	OK	0,06	10.12.2010
V635	SIP 1	C9MN439980490	OK	0,00	9.12.2010	OK	0,13	14.12.2010
		C9KN206760012	OK	0,07	9.12.2010	OK	0,08	14.12.2010
V636	SIP 1	C9MN439980534	OK	0,06	9.12.2010	OK	0,05	14.12.2010
		C9KN206760110	OK	0,04	9.12.2010	OK	0,06	14.12.2010
	SIP 2	C9MN439980534	OK	0,05	14.12.2010	OK	0,06	20.12.2010
		C9KN206760110	OK	0,06	14.12.2010	OK	0,06	20.12.2010
	SIP 3	C9MN439980216	OK	0,14	14.12.2010	OK	0,12	21.12.2010
		C9KN206760187	OK	0,04	15.12.2010	OK	0,05	20.12.2010
V637	SIP 1	C9MN439980216	OK	0,08	7.12.2010	OK	16,00	9.12.2010
		C9MN439980222	OK	0,08	7.12.2010	OK	0,15	9.12.2010
	SIP 2	C9MN439980235	OK	nov filter		OK	0,50	9.12.2010
		C9MN439980232	OK	nov filter		OK	0,10	9.12.2010
	SIP 3	C9MN439980216	OK	0,16	9.12.2010	OK	0,15	10.12.2010
		C9KN206760187	OK	nov filter		OK	0,04	15.12.2010
V638	SIP 1	IN7144040	OK	1,80	12.12.2010	OK	1,40	14.12.2010
		IN7144209	OK	0,00	13.12.2010	OK	1,60	14.12.2010
		IN7313421	OK	0,08	12.12.2010	OK	0,06	15.12.2010
	SIP 2	IN7144040	OK	1,40	14.12.2010	OK	0,00	17.12.2010
		IN7144182	OK	0,00	14.12.2010	OK	0,00	17.12.2010
		IN7313418	OK	0,05	16.12.2010	OK	0,05	20.12.2010
	SIP 3	IL4009209	OK	1,60	14.12.2010	OK	0,00	17.12.2010
		209 040 182	OK	0,00	17.12.2010	OK	0,00	20.12.2010
		IN7313421	OK	0,06	15.12.2010	OK	0,00	20.12.2010
V670	SIP 1	IL4009209	OK	1,60	8.12.2010	OK	1,80	12.12.2010
		IN7313421	OK	0,00	7.12.2010	OK	0,00	12.12.2010
	SIP 2	IN7144040	OK	1,00	8.12.2010	OK	1,80	12.12.2010
		IN7313418	OK	-0,02	9.12.2010	OK	0,05	12.12.2010
	SIP 3	IL4009209	OK	1,80	12.12.2010	OK	0,00	13.12.2010
IN7313421		OK	0,00	12.12.2010	OK	0,08	12.12.2010	
CF644	SIP 1	FP75751385	OK	1,40	21.12.2010	OK	1,50	23.12.2010
		FP77760152	OK	1,30	21.12.2010	OK	1,40	23.12.2010
	SIP 2	FP75751384	OK	1,50	21.12.2010	OK	1,70	24.12.2010
		FP77760133	OK	1,40	21.12.2010	OK	1,60	24.12.2010
	SIP 3	FP75751385	OK	1,50	23.12.2010	OK	1,30	24.12.2010
		FP77760152	OK	1,40	23.12.2010	OK	1,40	24.12.2010