108TPDA04014

衛 生 福 利 部 食 品 藥 物 管 理 署 委 辦 計 畫

「再生醫療製劑 GMP 評鑑符合性管理制度之推動與趨勢研析」

再生醫療製劑 GMP 訓練活動(1)、(2)

日 期 ：民 國 １０８ 年 ５ 月 ７ 日

主辦單位：衛生福利部食品藥物管理署

承辦單位：TPDA 社團法人中華無菌製劑協會

講 師 資 料

劉勝德 經理 / BD Biosciences 行銷經理

賴羿君 經理 / 造鑫企業有限公司 產品經理

蕭學英 GMP 專家 / 社團法人中華無菌製劑協會

時 間 表

時 間	內 容	講 師
8:30-9:00	報 到	
9:00-9:10	➢ 長官致詞	TFDA 風管組代表
9:10-10:10	➢ 流式細胞分析儀的原理與應用	BD 劉聖德 經理
10:10-10:30	➢ 流式細胞分析儀的 IQ / OQ / PQ 以及品質控制 (Quality Control)(一)	BD 劉聖德 經理
10:30-10:50	休 息	
10:50-11:30	➢ 流式細胞分析儀的 IQ / OQ / PQ 以及品質控制 (Quality Control)(二)	BD 劉聖德 經理
11:30-12:10	➢ National Sanitation Foundation International Standard 49 之生物安全櫃及其檢測法規	造鑫企業 賴羿君 經理
12:10-13:10	午 餐	
13:10-14:30	➢ ATMP 常見藥典檢驗方法及其確認	TPDA 蕭學英 GMP 專家
14:30-14:50	休 息	
14:50-16:10	➢ 偏離規格(Out Of Specification ,OOS)處理	TPDA 蕭學英 GMP 專家
16:10-16:30	交流討論 / 課後評估	

目　　錄

頁次

流式細胞儀 原理與應用介紹

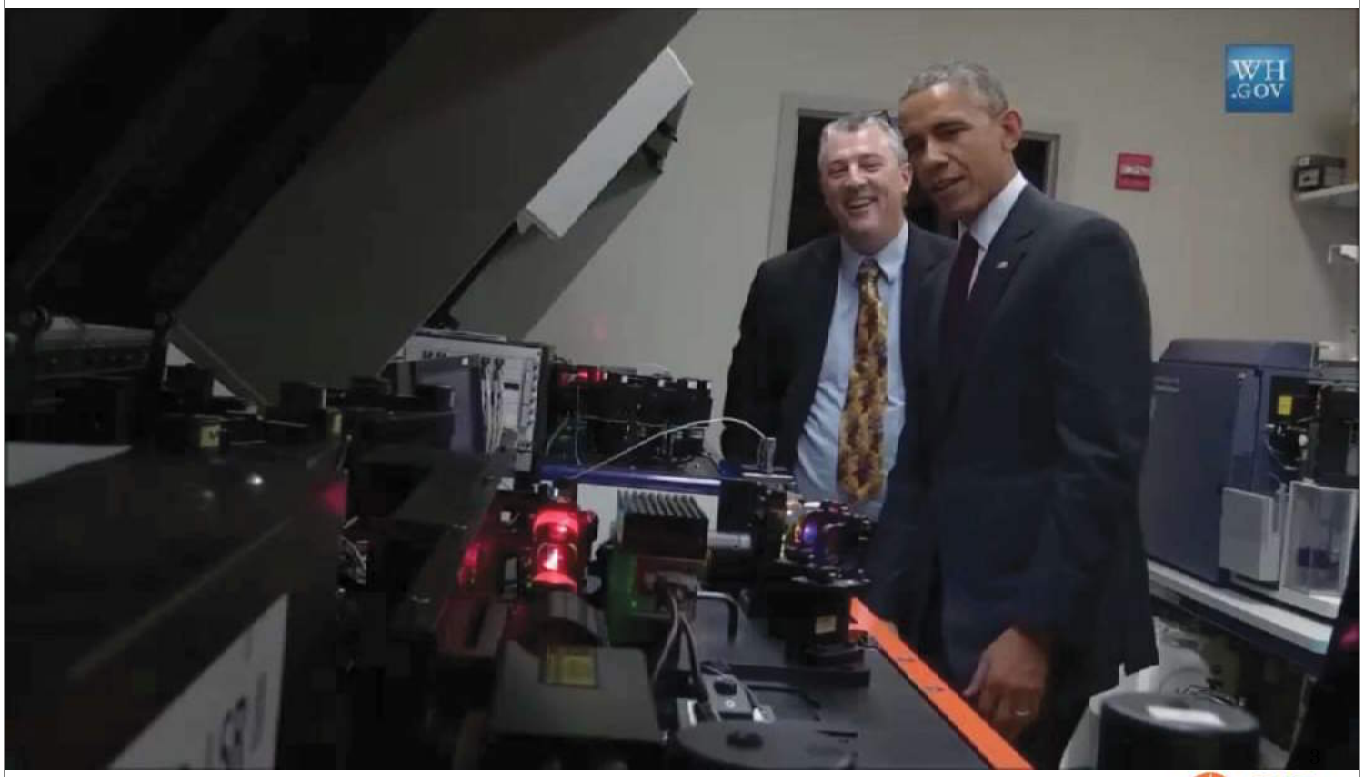
Tony Liu 劉聖德
Marketing Manager
BD Biosciences
tony.liu@bd.com

Contents

- Introduction of Flow Cytometry
- Instrument setup
- Application of Flow Cytometry

美國前總統歐巴馬學習流式細胞儀-2014,12,05

108TPDA04014



BD

108TPDA04014

What is Flow Cytometry?

Flow = Fluid

Cyto = Cell

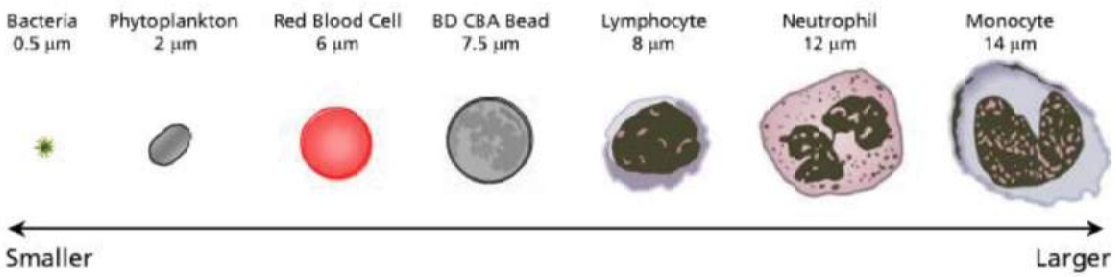
Metry = Measurement

A variety of measurements are made on cells, cell organelles, and other objects suspended in a liquid and flowing at rates of several thousands per second through a flow chamber.

BD

Particle Size

- Detection range: 0.5~50μm

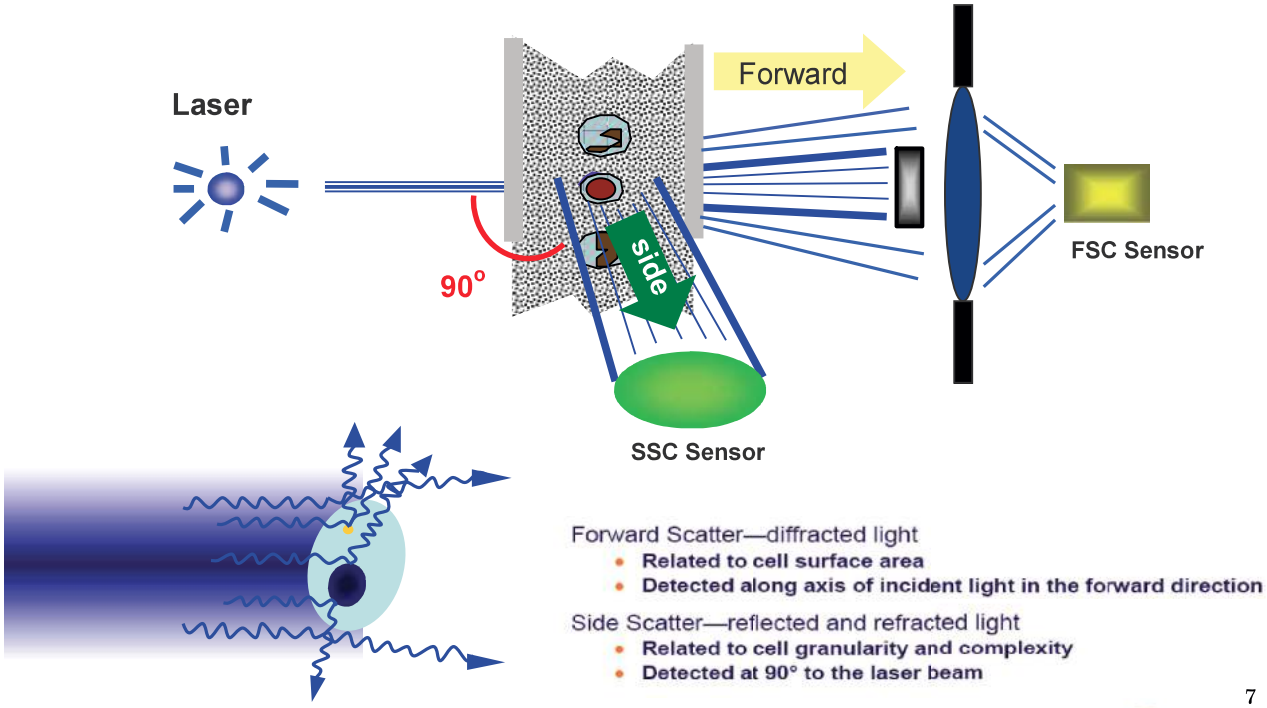


108TPDA04014

What Can a Flow Cytometer Tell Us About a Cell?

- Its relative size (Forward Scatter—**FSC**；前向散射光)
- Its relative granularity or internal complexity (Side Scatter—**SSC**；側向散射光)
- Its relative **fluorescence intensity**

Scatter Light

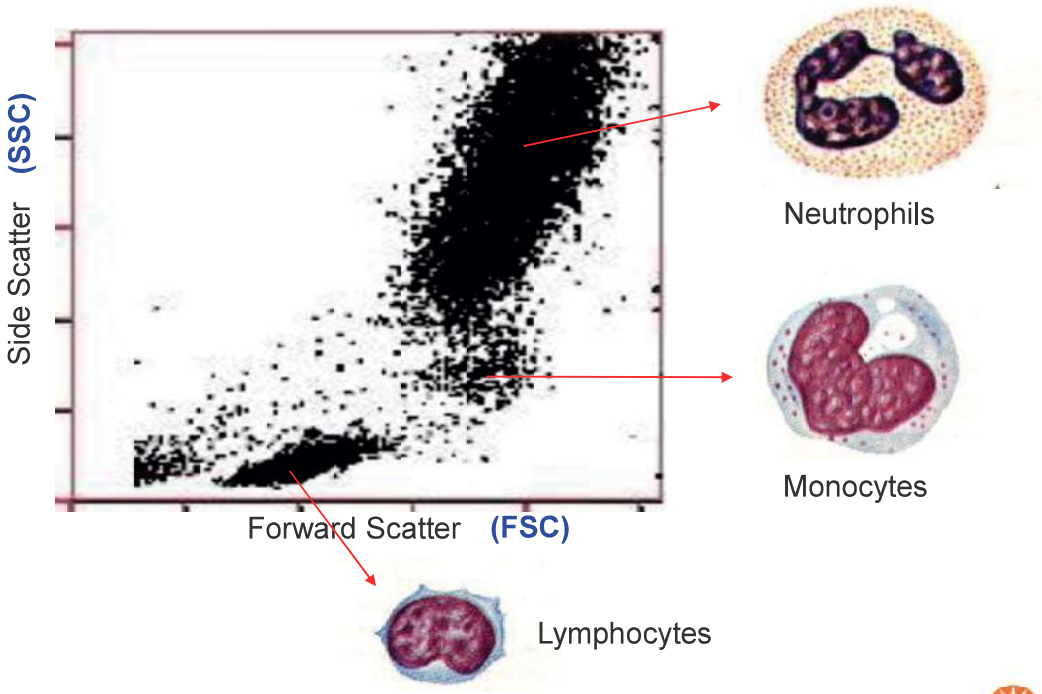


Forward Scatter—diffracted light
- Related to cell surface area
- Detected along axis of incident light in the forward direction

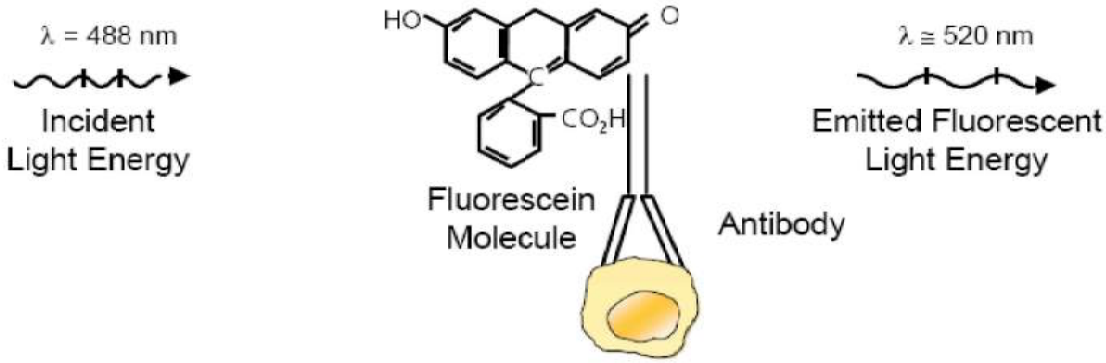
Side Scatter—reflected and refracted light
- Related to cell granularity and complexity
- Detected at 90° to the laser beam

108TPDA04014

Ex. Lysed Whole Blood



Fluorescence Light

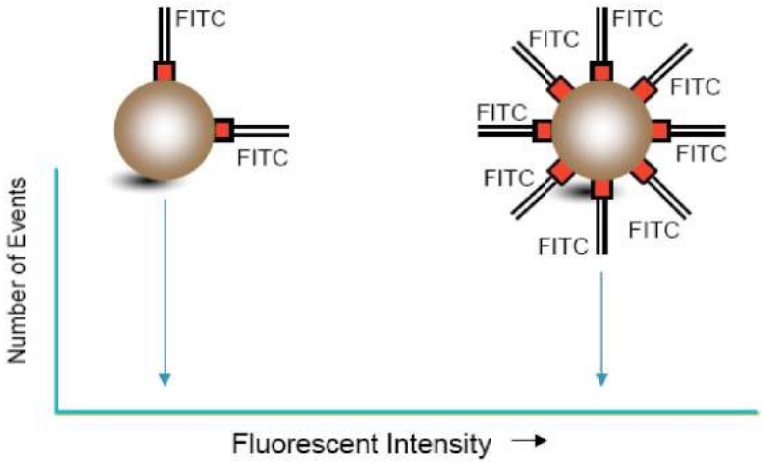


- The fluorochrome absorbs energy from the laser.
- The fluorochrome releases the absorbed energy by:
  - vibration and heat dissipation.
  - emission of photons of a longer wavelength.

108TPDA04014

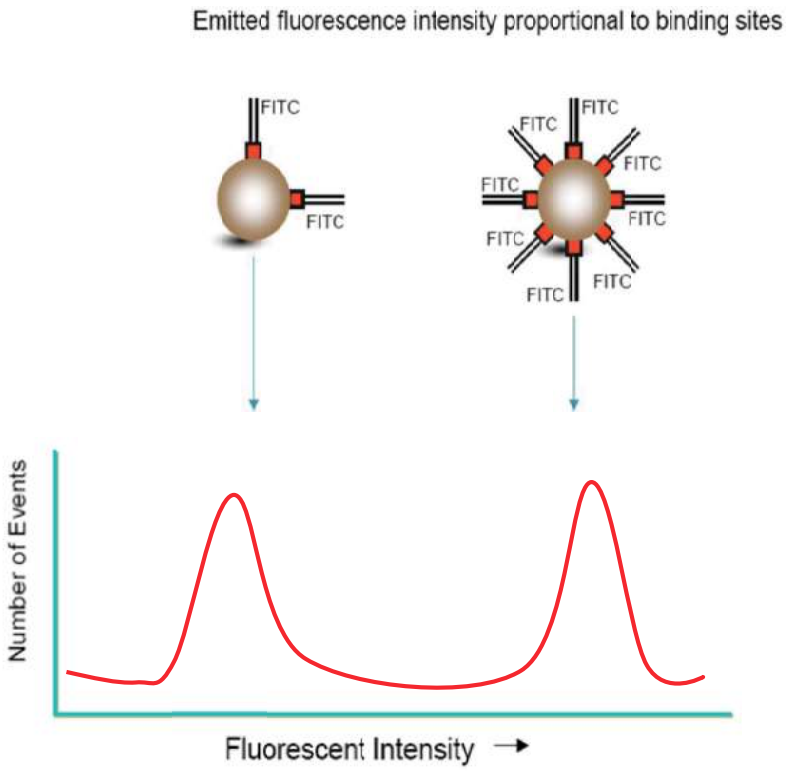
Fluorescence intensity

Emitted fluorescence intensity proportional to binding sites



Fluorescence intensity

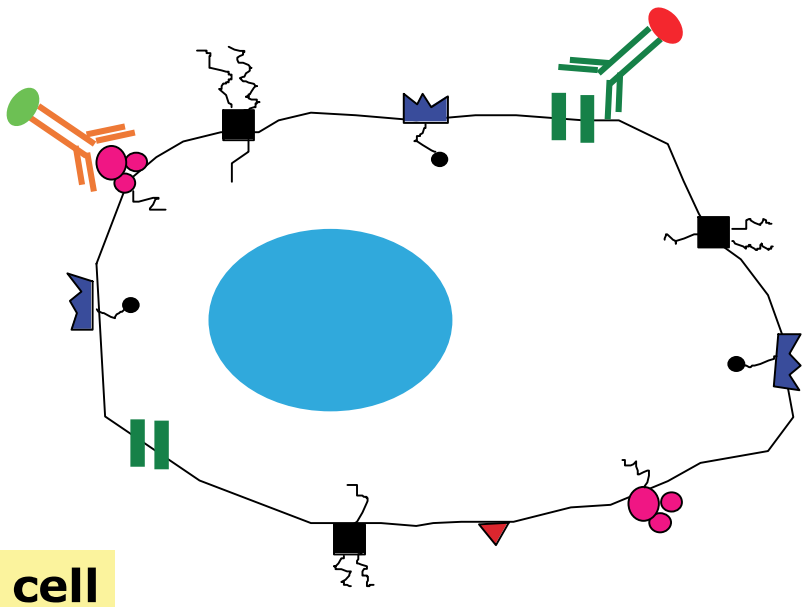
108TPDA04014



11

108TPDA04014

Flow Cytometry Detection Principle



:Antigen CD4

:Antigen CD3

T cell

12

Main Component

Fluidics 液流系統

To introduce and focus the cells for interrogation.

Optics 光學系統

To generate and collect the light signals.

Electronics 電子系統

To convert the optical signals to proportional digital signals, process the signals, and communicate with the computer.

108TPDA04014

Fluidics

Housekeeping Solution Capacities

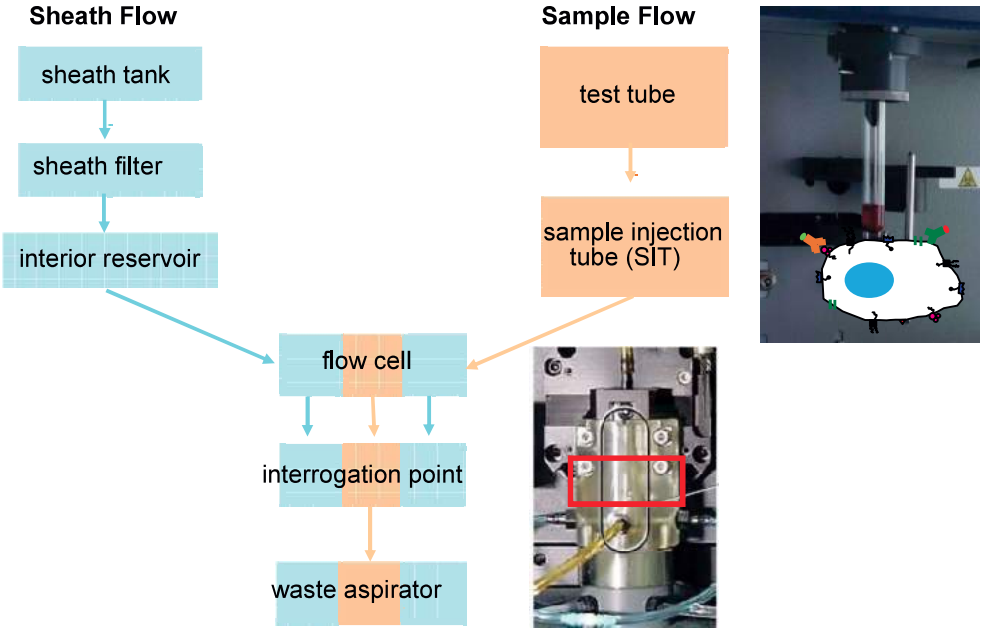
BD FACSFlow™ sheath solution 20 L

BD™ FACSClean solution 5 L

BD FACS™ shutdown solution 5 L

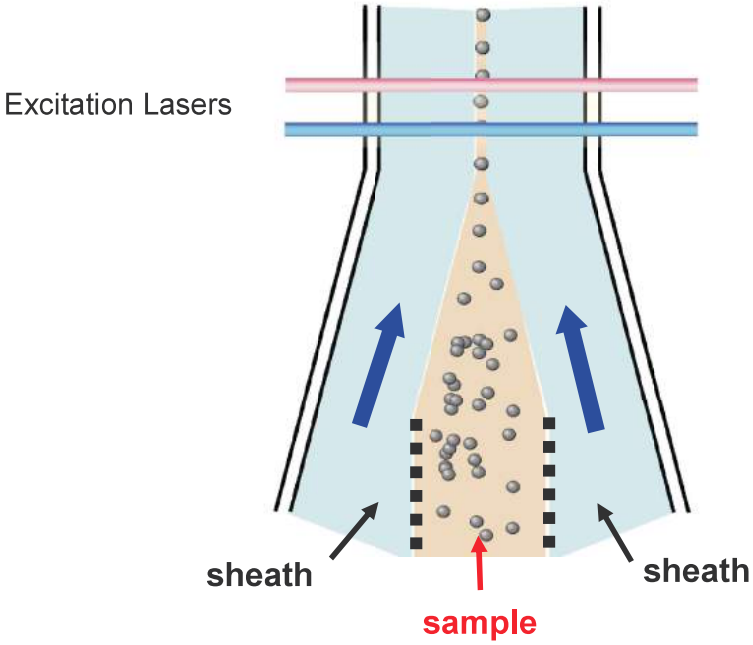
Waste tank 10 L

Fluidics



108TPDA04014

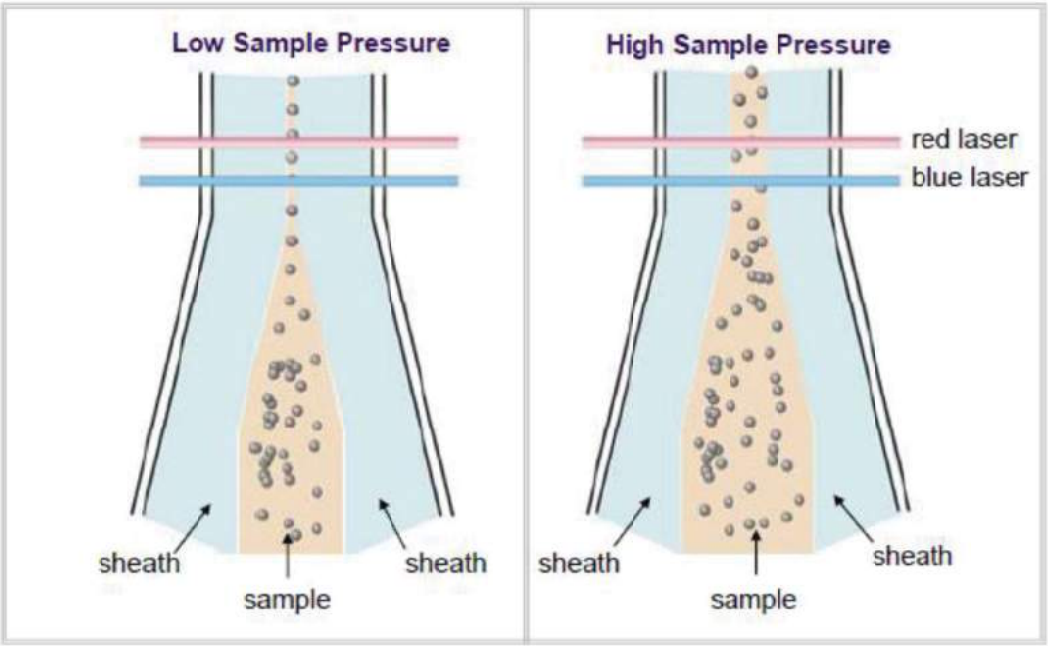
Sample Flow



Hydrodynamic Focusing

Flow Cell

Sample Differential

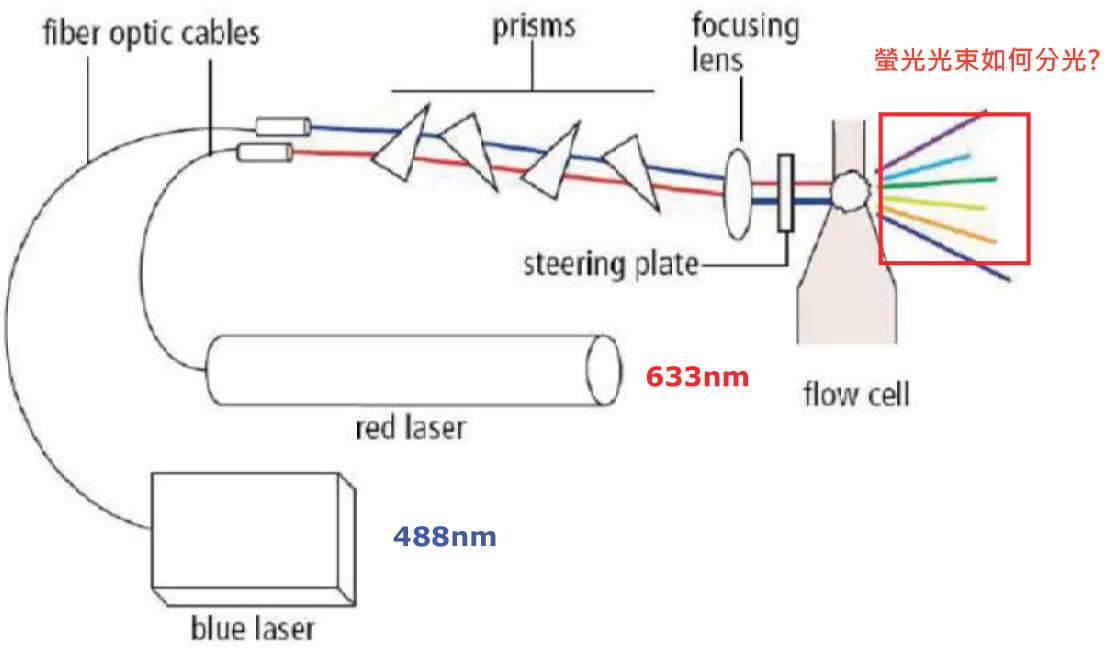


108TPDA04014

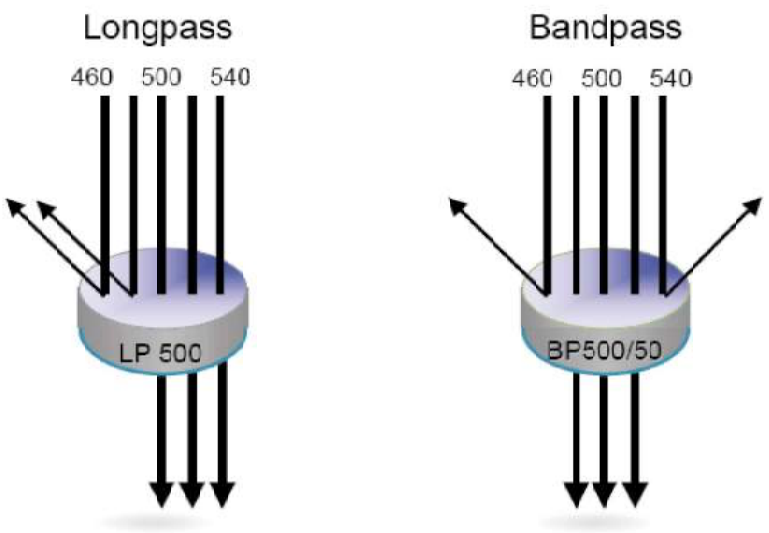
Optical

- Excitation optics:
  - Lasers
  - Filters and mirrors that route the laser light to the fluid stream
- Collection optics:
  - Fiber optic cables that direct the emitted light to the appropriate emission block
  - Filters that direct the signals in the emission block to the appropriate photomultiplier tube (PMT)

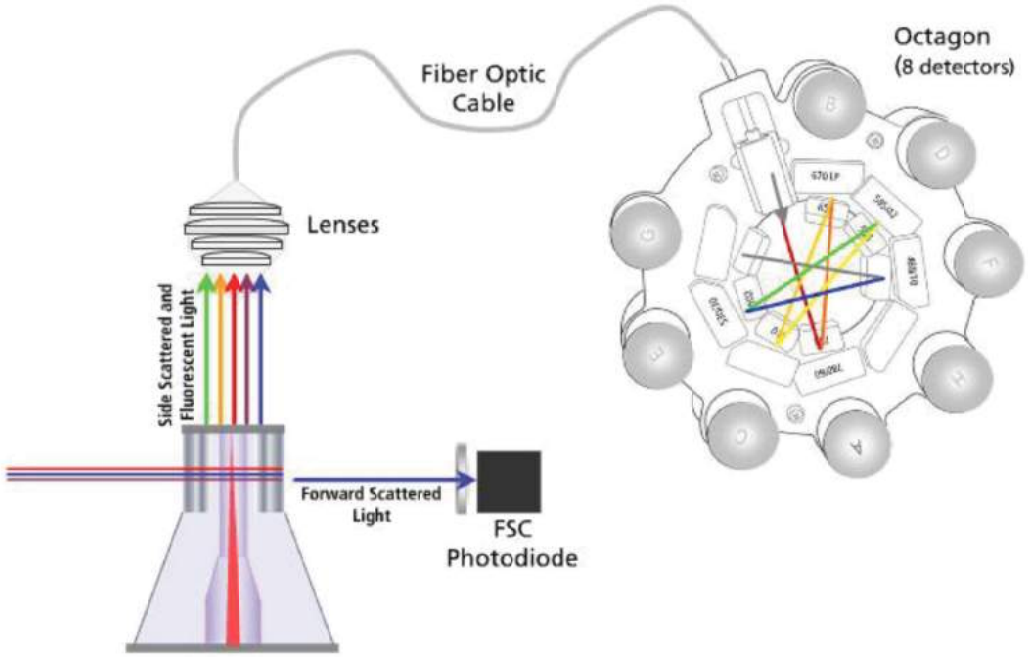
Excitation Optics



Optical Filters



Collection Optics

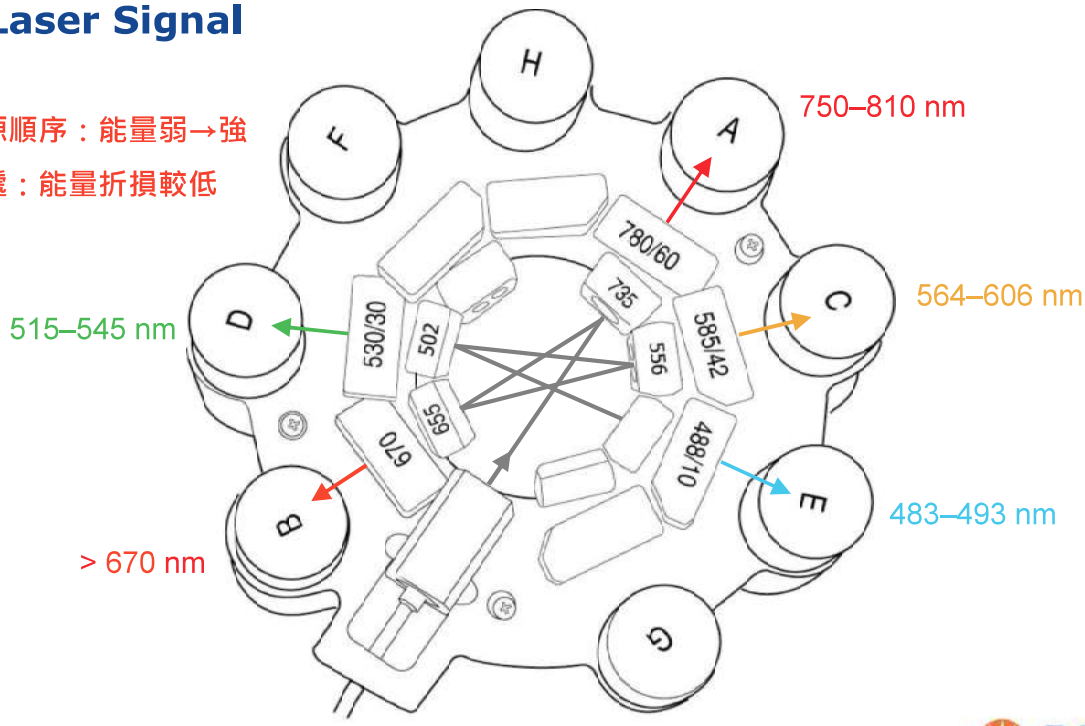


108TPDA04014

Collection Optics—Octagon

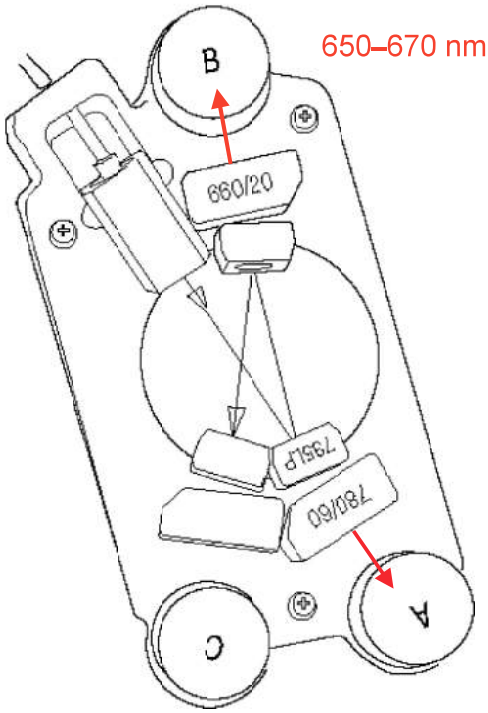
Blue Laser Signal

- 接收光源順序：能量弱→強
- 反射傳遞：能量折損較低



Collection Optics—Trigon

Red Laser Signal



650–670 nm

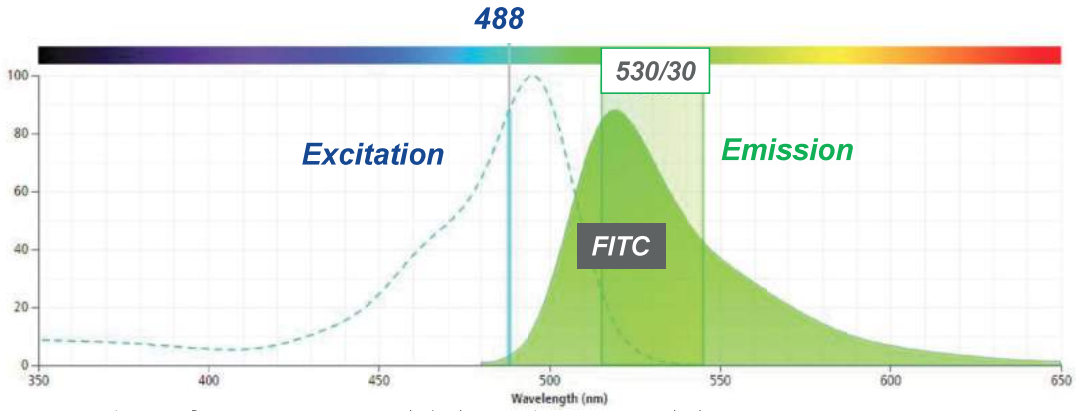
750–810 nm

FACSCanto II™—Octagon and Trigons

(BD專利設計)

Excitation and Emission

- Use the maximum excitation wavelengths to **determine lasers** that can be used to excite the fluorochrome.
- Use the maximum emission wavelengths to **determine filters and PMTs** that can be used to measure the signal.



BD FACSCanto Configuration

2 lasers, 4 – 2 Configuration

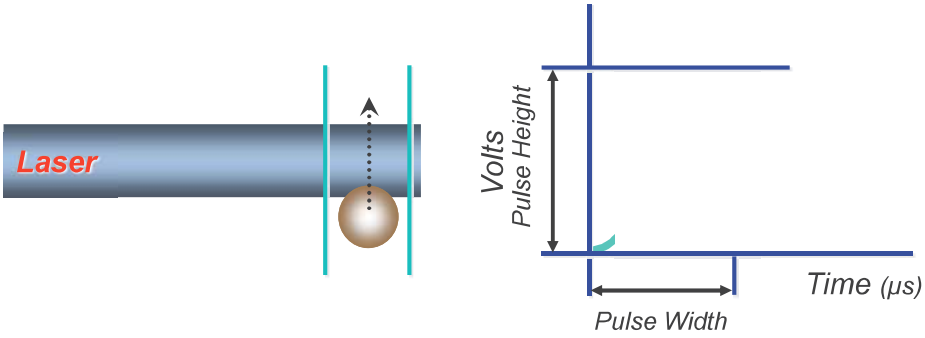
488nm Blue Laser		
Alexa Fluor 488, FITC, BB515	530/30	502LP
PE	585/42	556LP
	NA	610LP
PI, PerCP, PerCP-Cy5.5, BB700	670LP	655LP
PE-Cy7	780/60	735LP
640nm Red Laser		
APC, Alexa Fluor 647	660/20	N/A
	NA	685LP
APC-Cy7, APC-H7	780/60	735LP

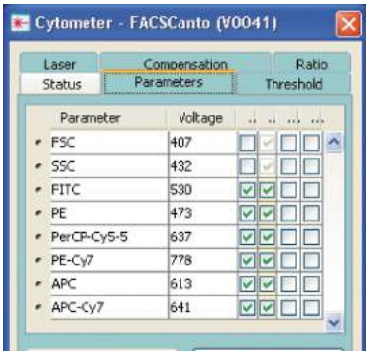
Electronics

- PMTs and preamps convert photons to voltage pulses.
- Analog-to-digital converters translate analog signals to proportional digital signals.
- Compute area and height for each pulse.
- Perform compensation and calculate ratios and width.
- An embedded computer interfaces with the computer workstation for data transfer.

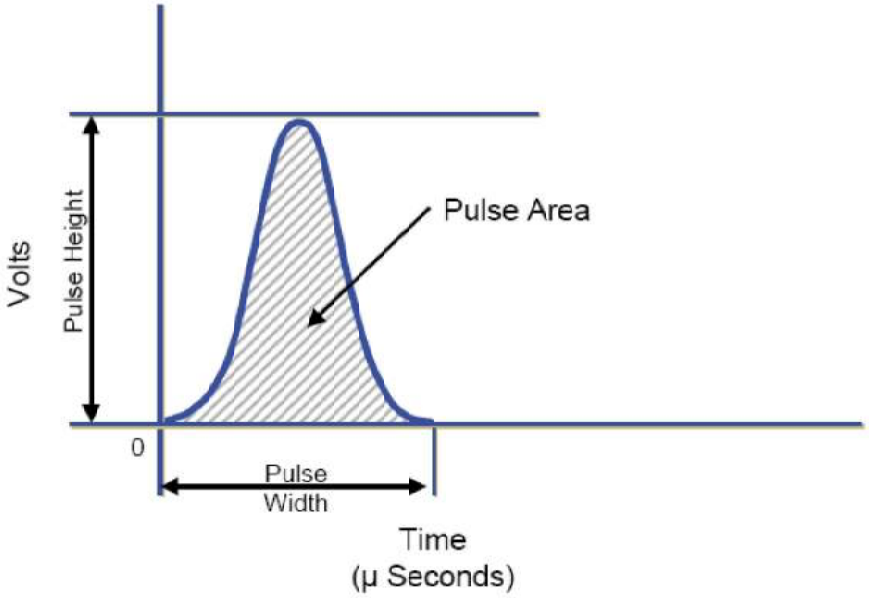
108TPDA04014

Creation of a Voltage Pulse





Quantification of a Voltage Pulse



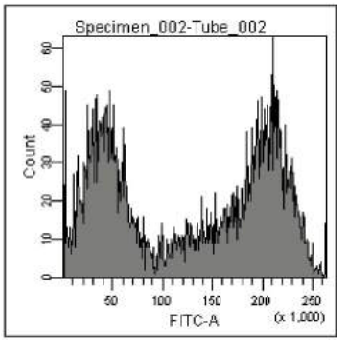
108TPDA04014

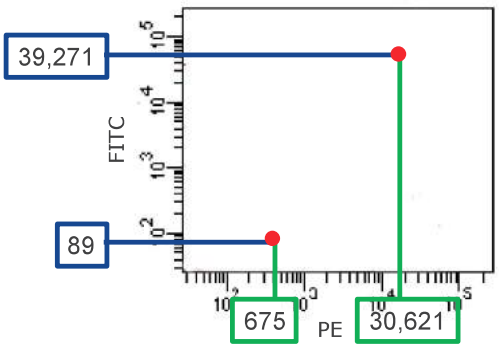
Data Storage

List-Mode Data

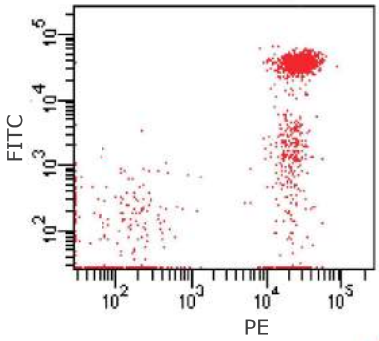
	Time	FSC	SSC	FITC	PE
Event 1	0	60	120	89	675
Event 2	10	160	65	39,271	30,621
Event 3	30	650	160	22,688	6,189

Histogram



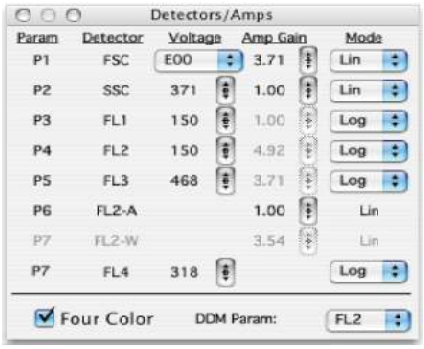


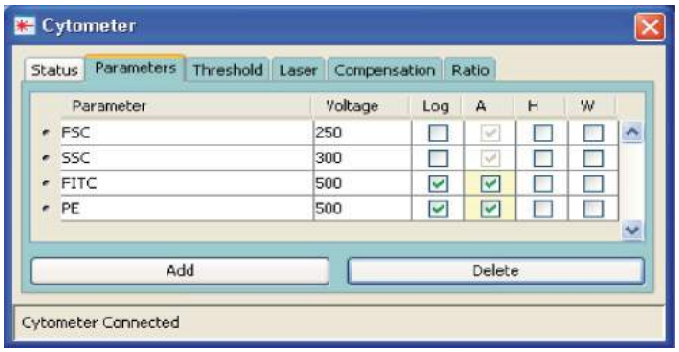
Dot Plot



Data Display

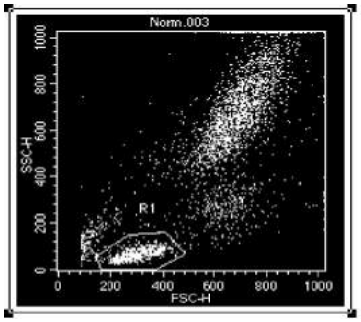
- Linear Scaling
- Log Scaling

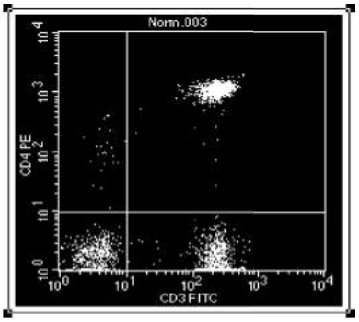




108TPDA04014

Linear v. Log Amplification

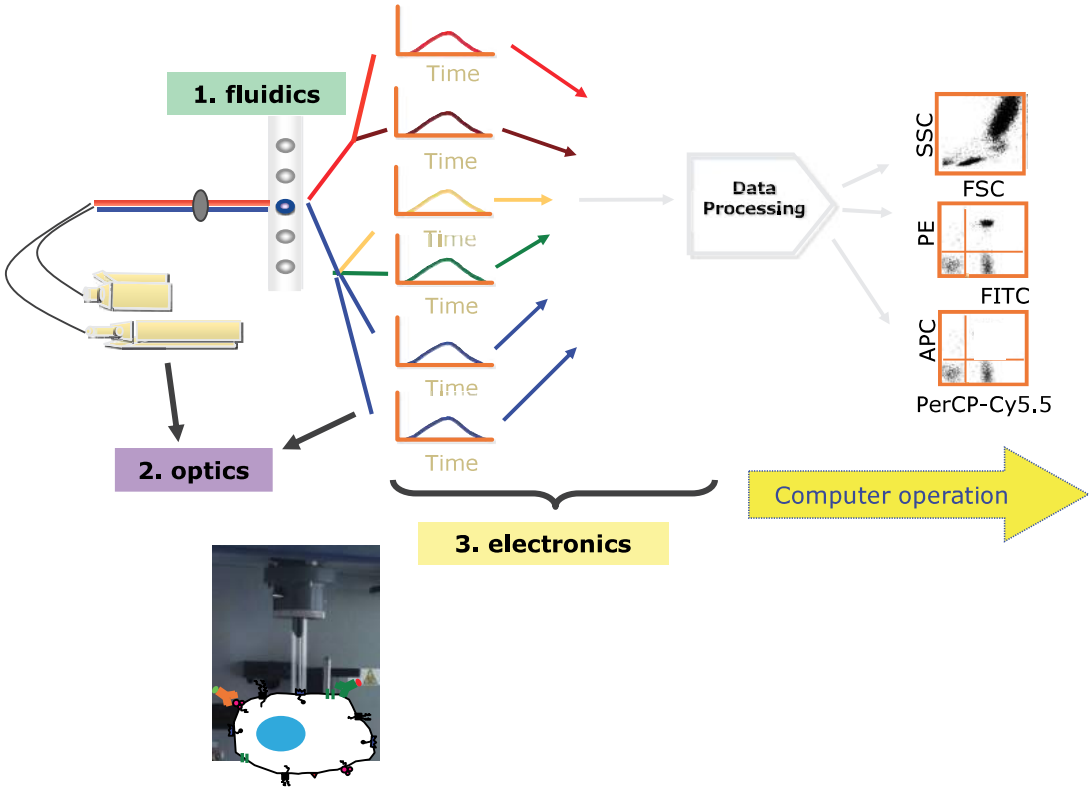




- **Linear** amplification is usually used for light scatter parameters and DNA analysis.
- **Log** amplification is used for fluorescence signals with a large dynamic range.

Flow Cytometry Detection Principle

108TPDA04014



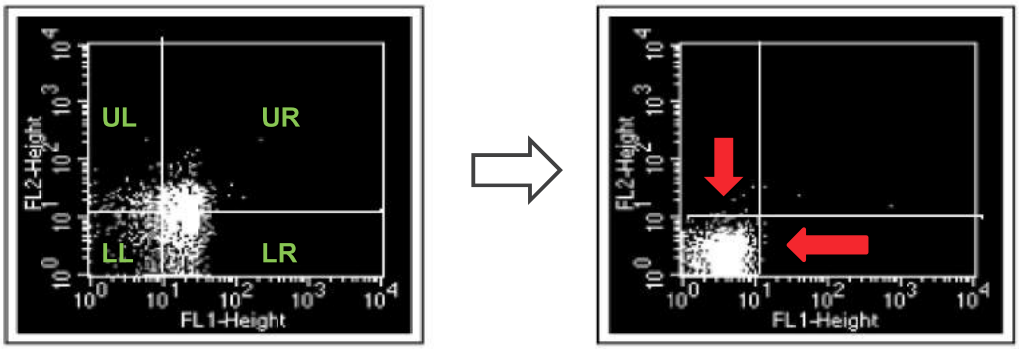
108TPDA04014

Topic

- Introduction of Flow Cytometry
- Instrument setup
- Application of Flow Cytometry

Auto-fluorescence

Non-stain sample



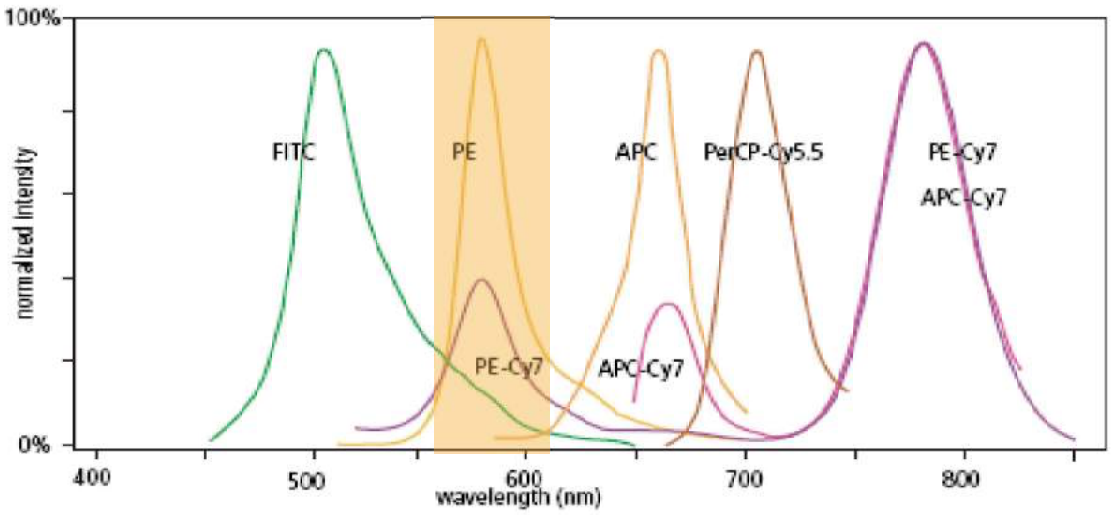
Auto-fluorescence

After voltage adjustment

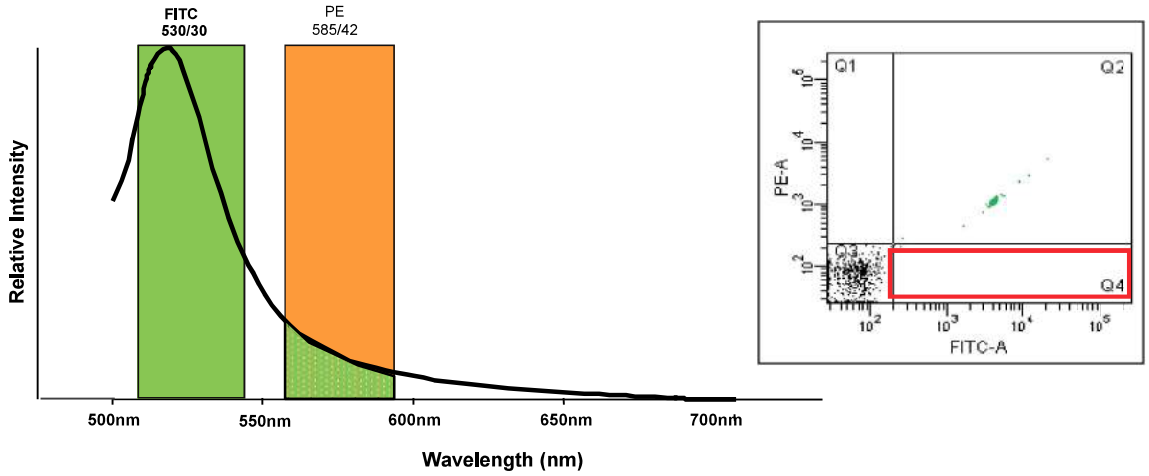
108TPDA04014

Compensation theory

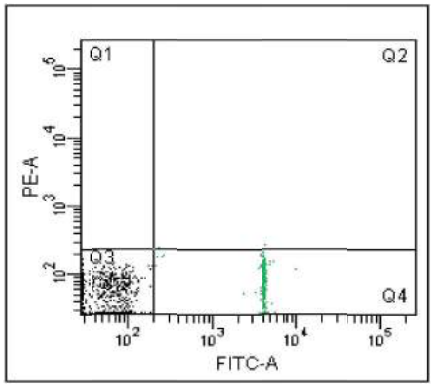
Emission Optics



FITC Spillover



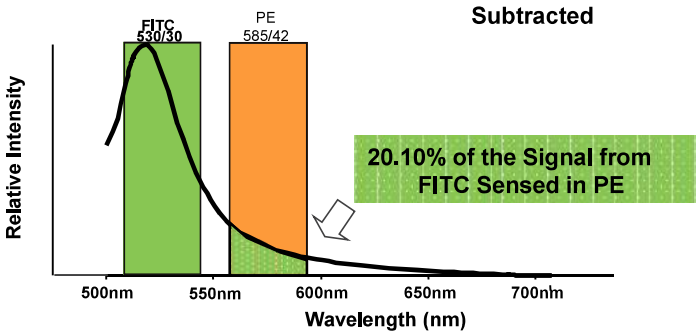
FITC Compensation



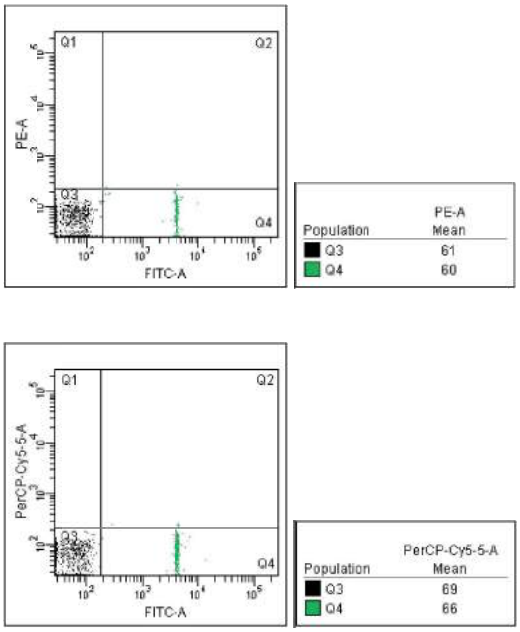
To Lower Cluster

Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
PE	FITC	20.10

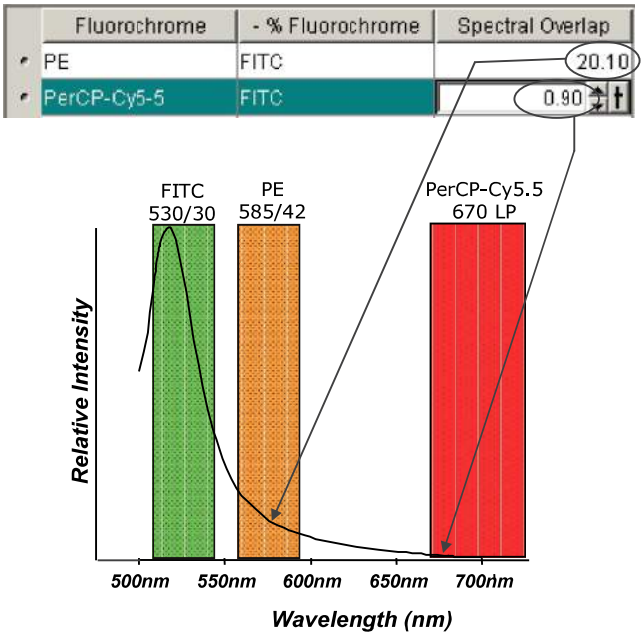
Increase % Subtracted



FITC Compensation



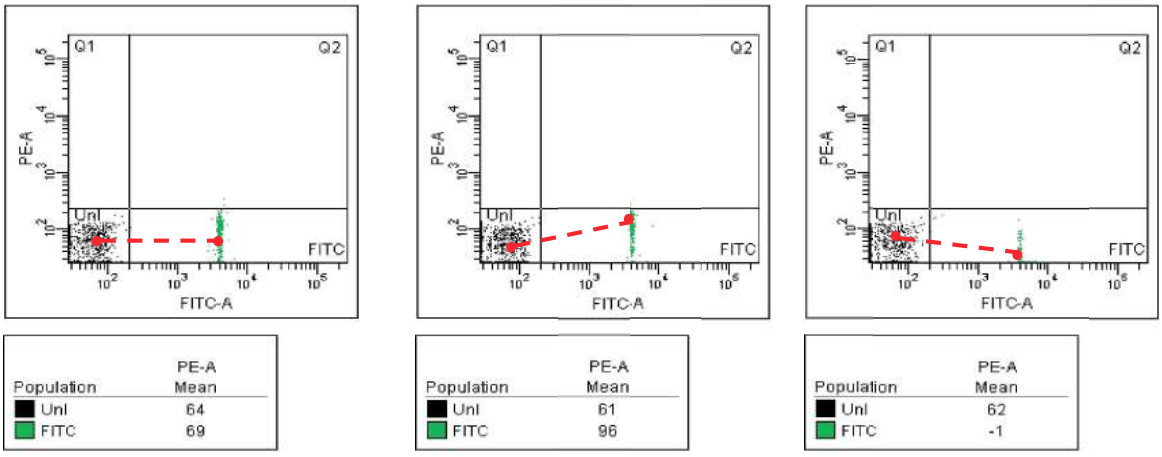
To lower cluster, increase value.



Compensation Examples

Incorrect Compensation

Correct Compensation | **Undercompensation** | **Overcompensation**



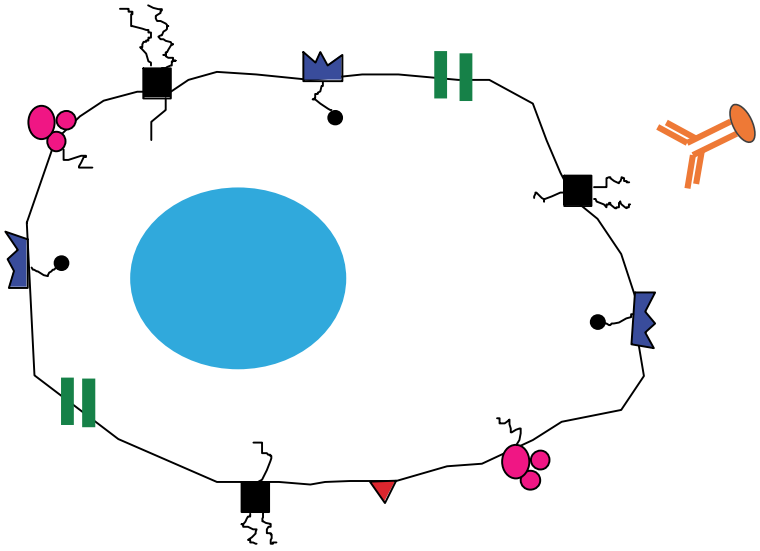
Topic

- Introduction of Flow Cytometry
- Instrument setup
- Application of Flow Cytometry

Applications

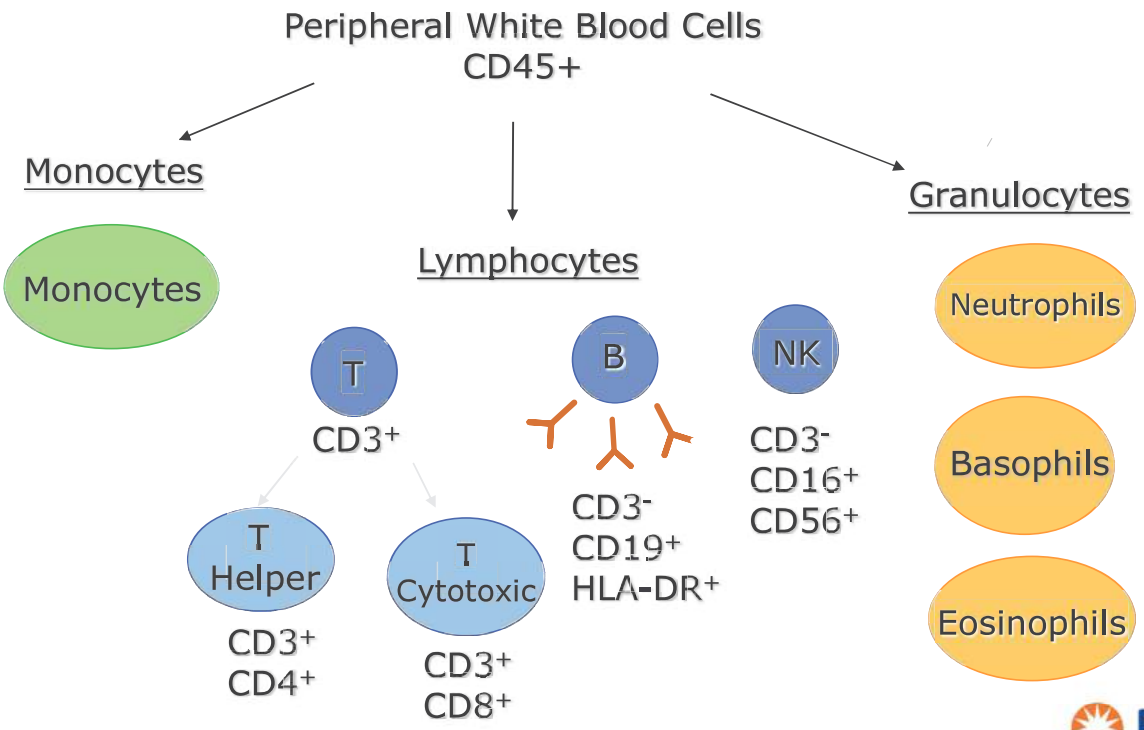
- **Phenotype Analysis**
  (Cell Surface Antigens/Markers)
- **Intracellular Analysis**
  -- Eg. Cytokines, Signal Transduction molecules…etc.
- **DNA Analysis**
  -- Eg. Viability, Cell cycle, Apoptosis…etc.
- **Cell Fuction Analysis**
  -- Eg. Free radicals, Ca^{2+}, Reporter genes…etc.
- **CBA (Cytometric Bead Array)**
  -- cytokine detection

Phenotype Analysis

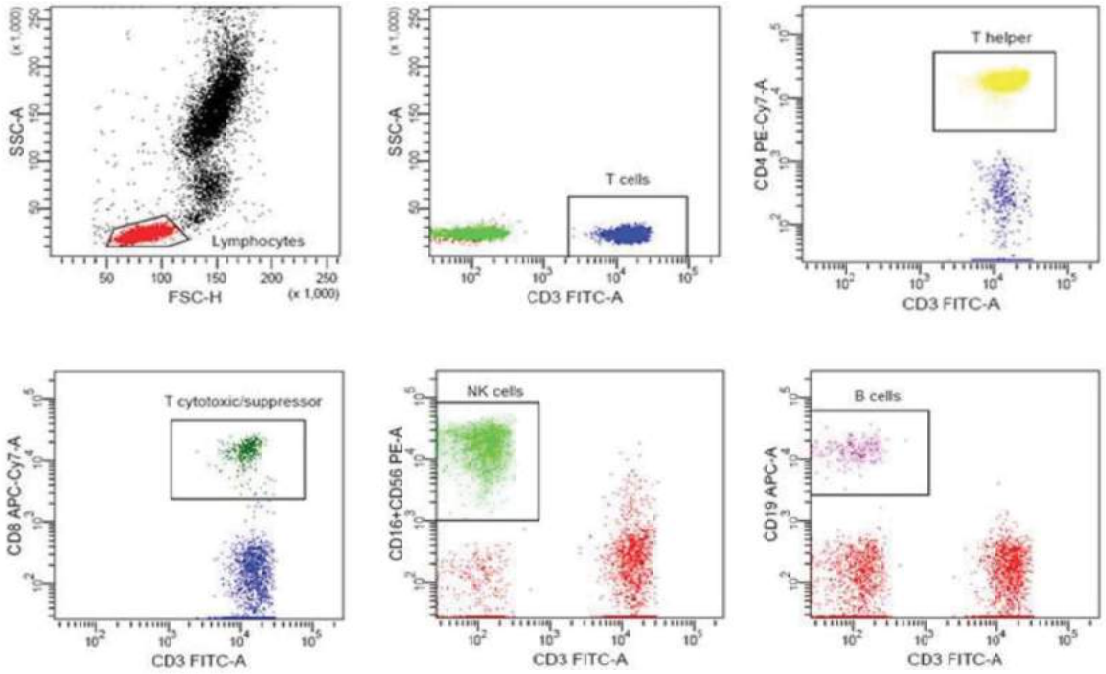


- Ligand
- Receptor
- Adhesion molecule
- …etc

Lysed Whole Blood Components

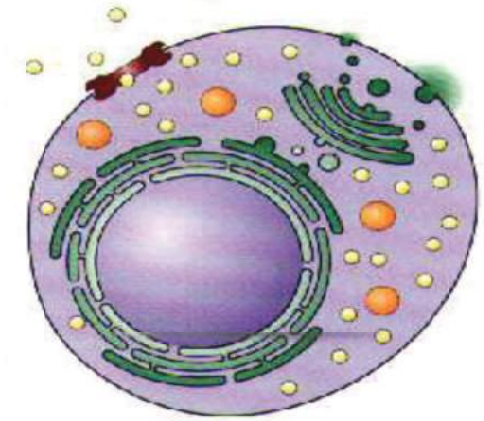


Lymphocyte Subset



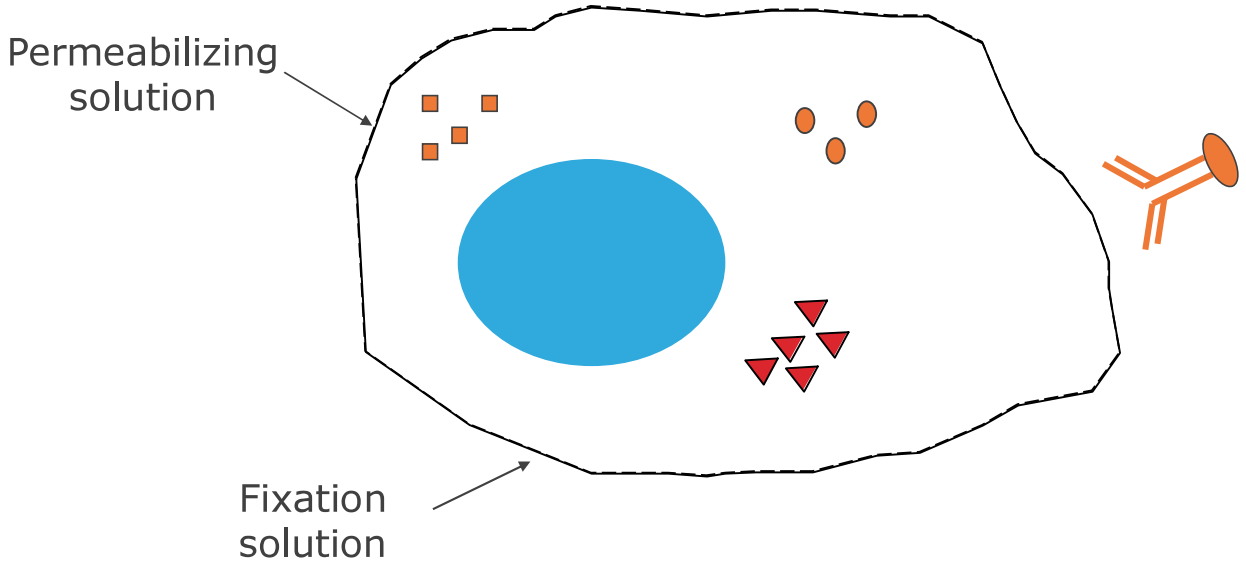
108TPDA04014

Intracellular Analysis



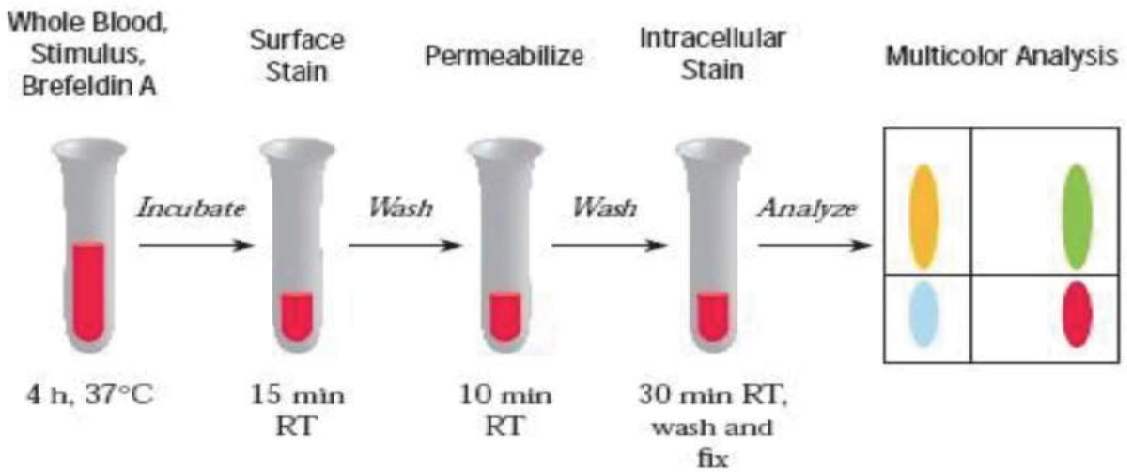
- Cytokine
- Enzymes
- Structure Proteins
- Intracellular Signaling

Intracellular Analysis

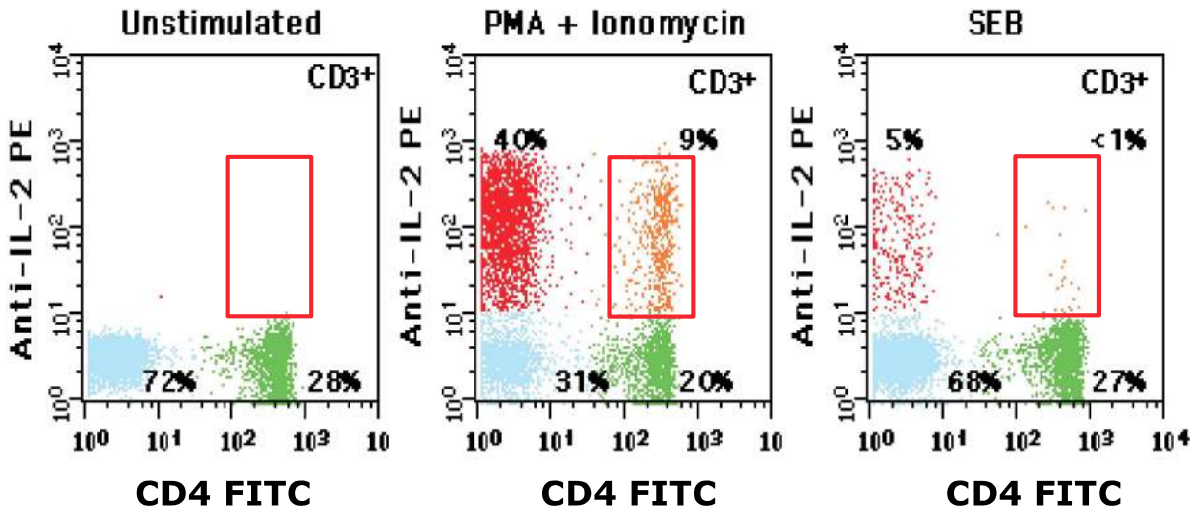


Cell Surface and Cytoplasmic Stain protocol

108TPDA04014



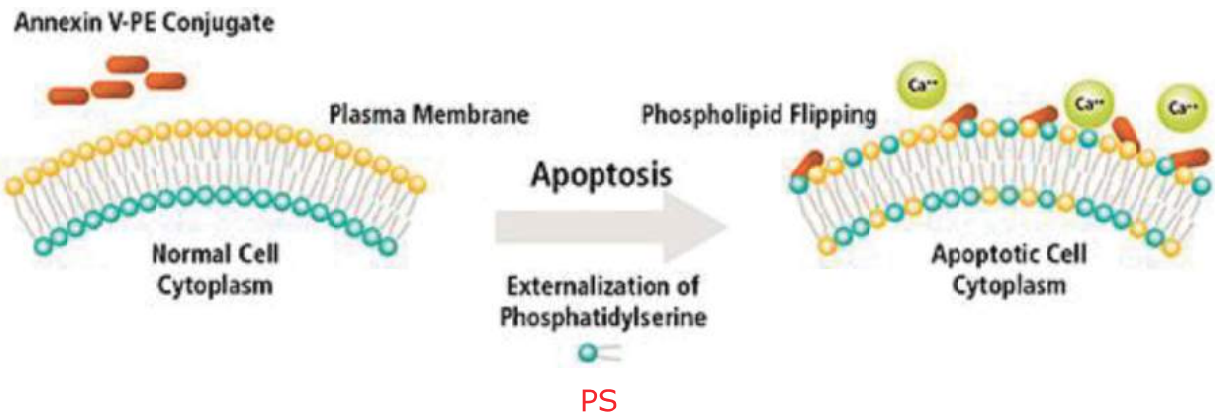
Detection of Cell Surface and IC Cytokine



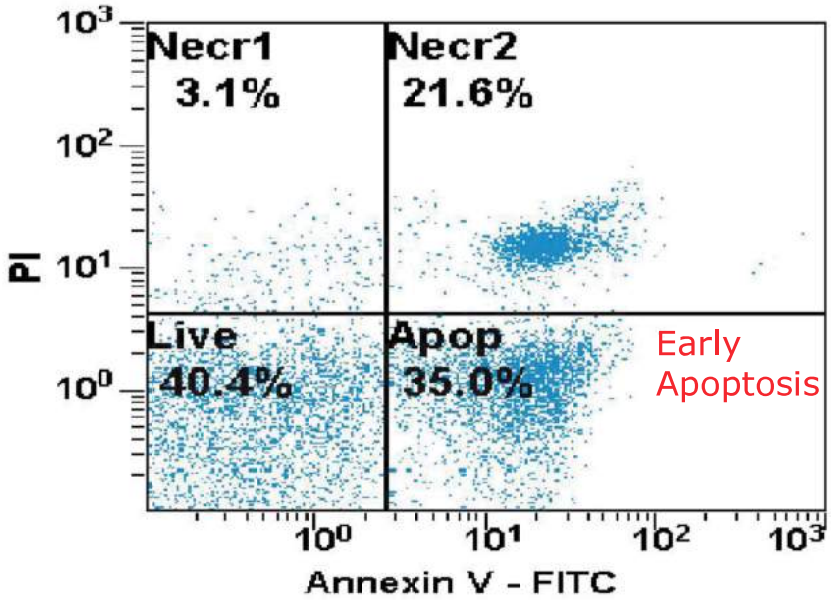
108TPDA04014

Cell Apoptosis 細胞凋亡

- Annexin V Apoptosis Assay

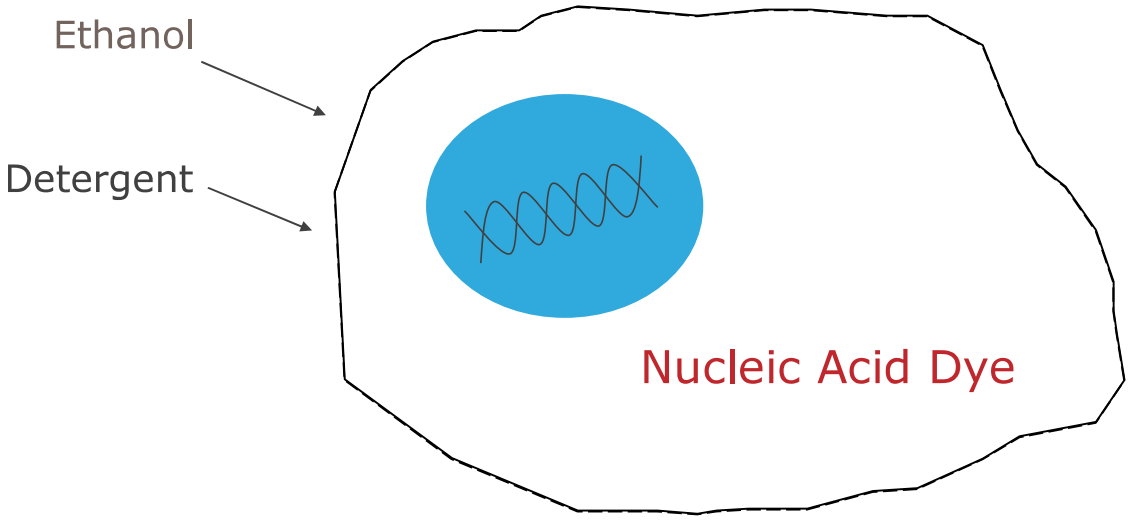


Annexin V/PI Double Staining



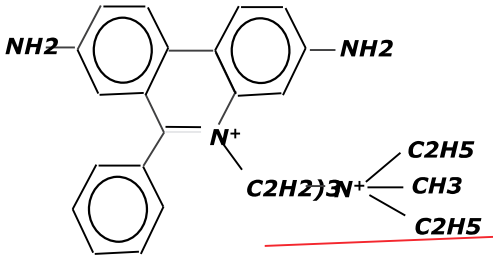
108TPDA04014

DNA Analysis

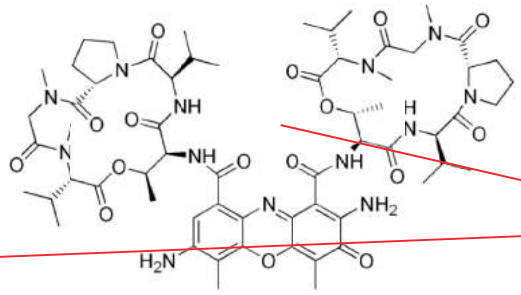


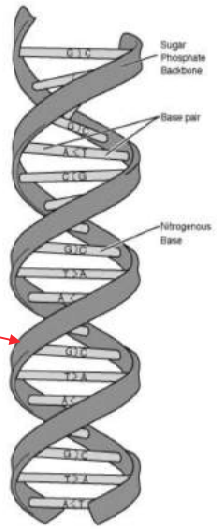
DNA Dye

Propidium



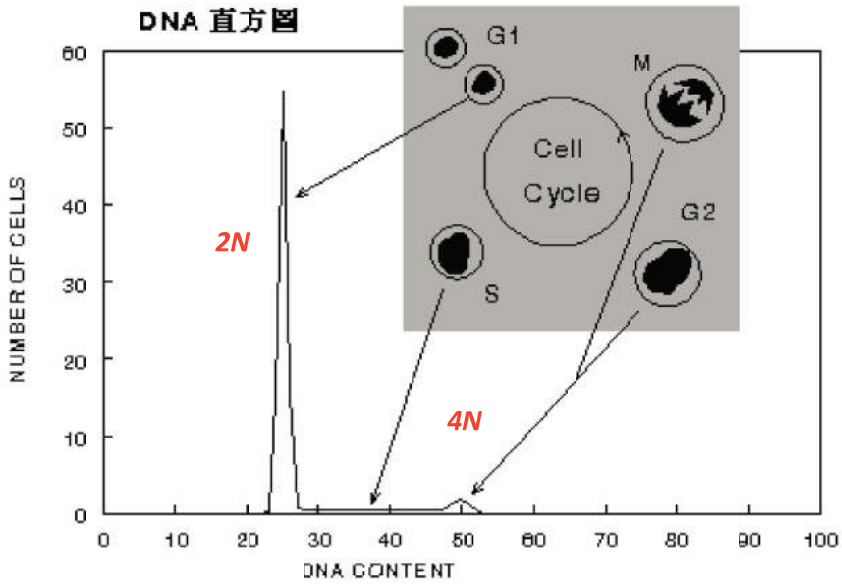
7-AAD



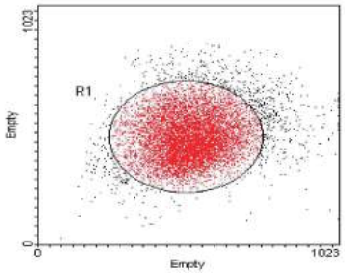


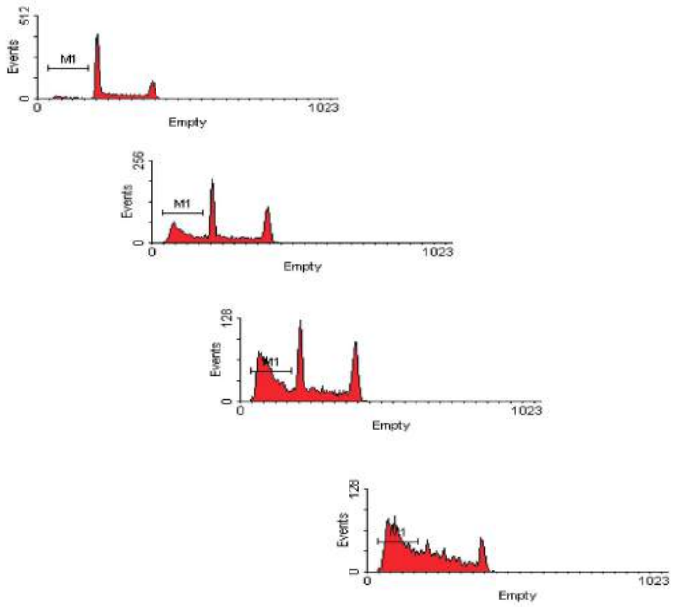
108TPDA04014

Cell Cycle Analysis



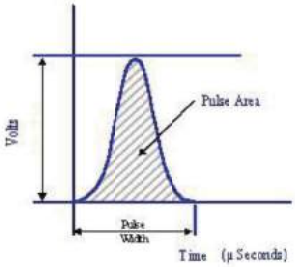
Apoptosis (Sub G1)



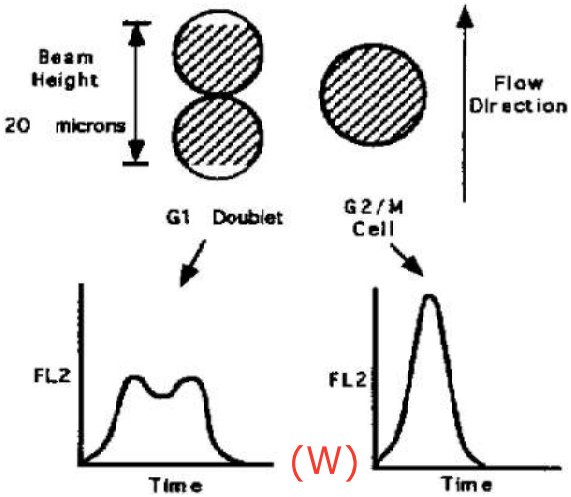


108TPDA04014

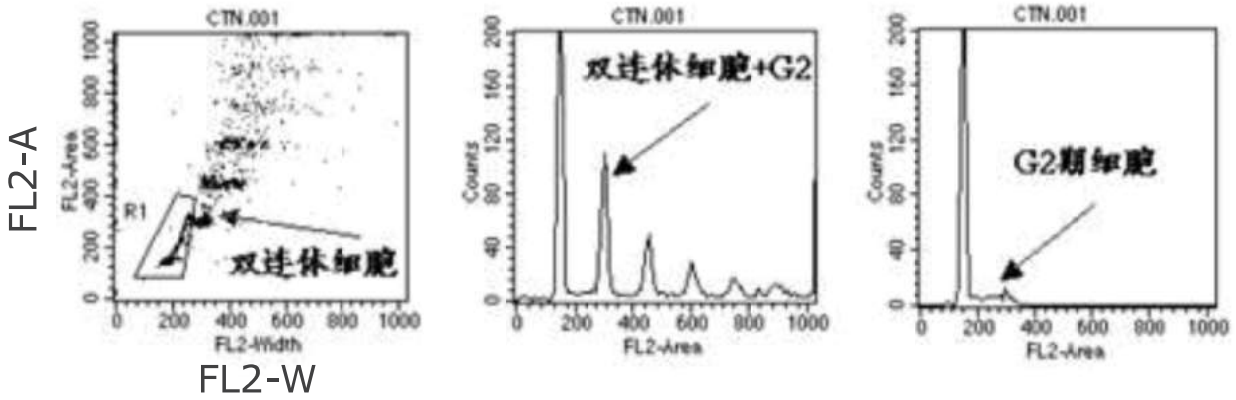
Cell cycle study



FL2-A
FL2-W

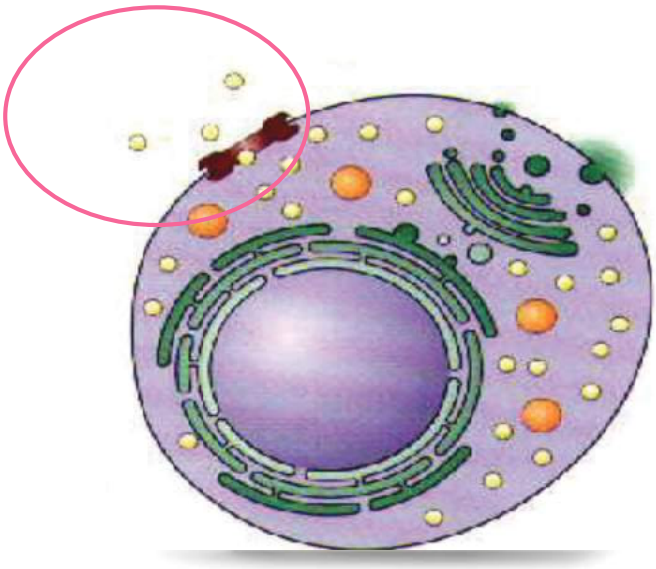


Cell cycle study

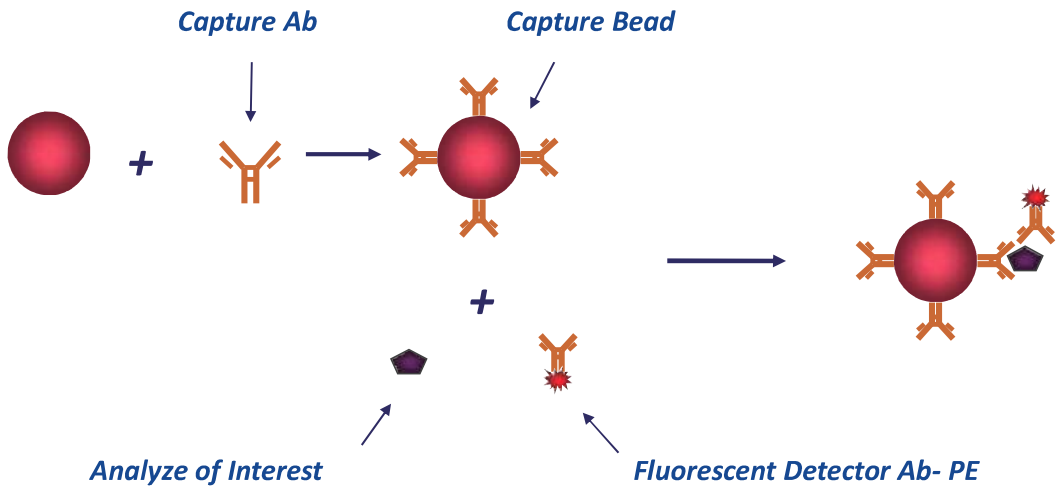


Application of Flow Cytometry

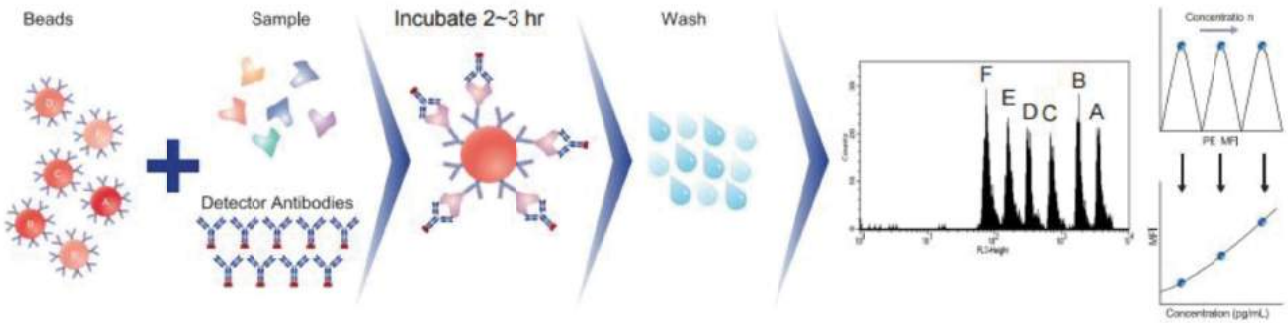
- ***Soluble form protein detection***

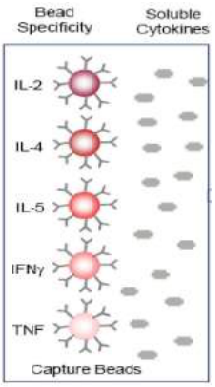


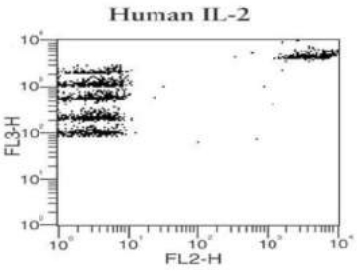
Cytometric Beads Array (CBA): antibody-coated beads to capture analytes



Cytometric Beads Array (CBA)

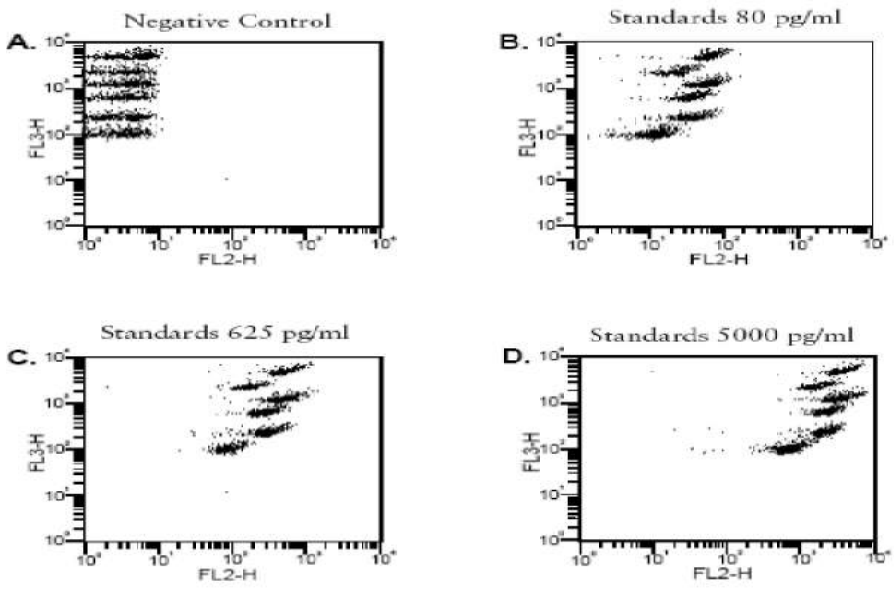






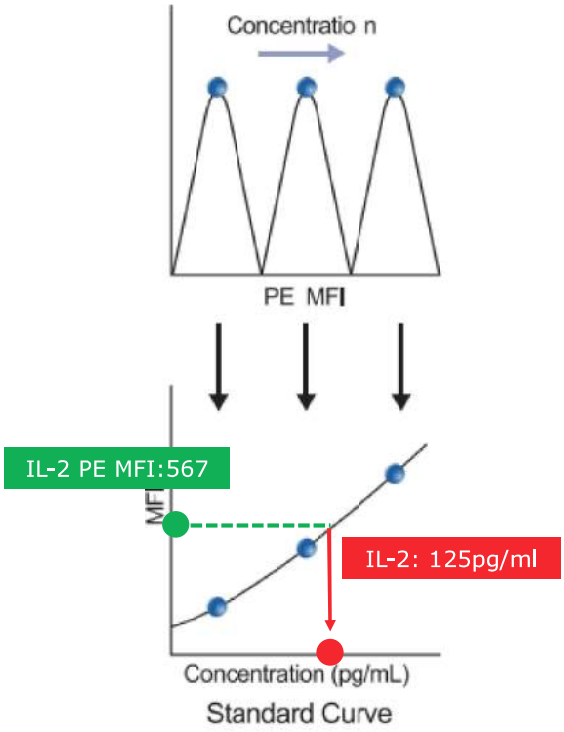
Simultaneous Analysis of Multiple Cytokines

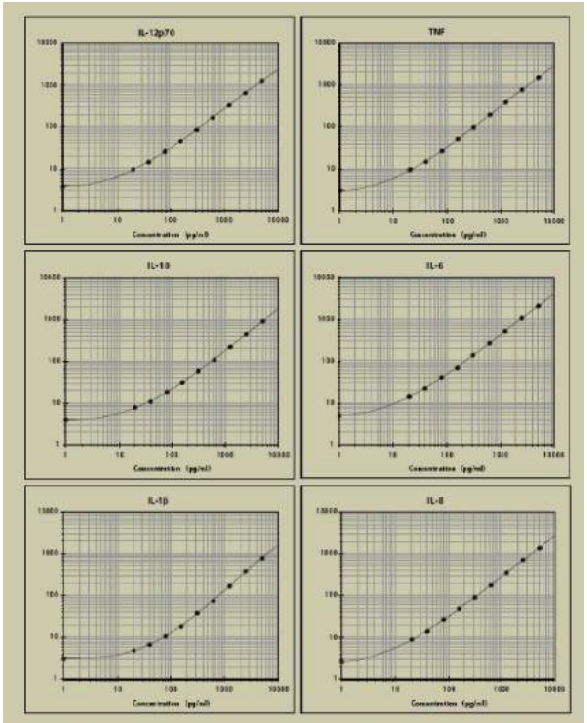
Typical Data



BD

Standard Curves





Representative standard curves generated using the BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit.

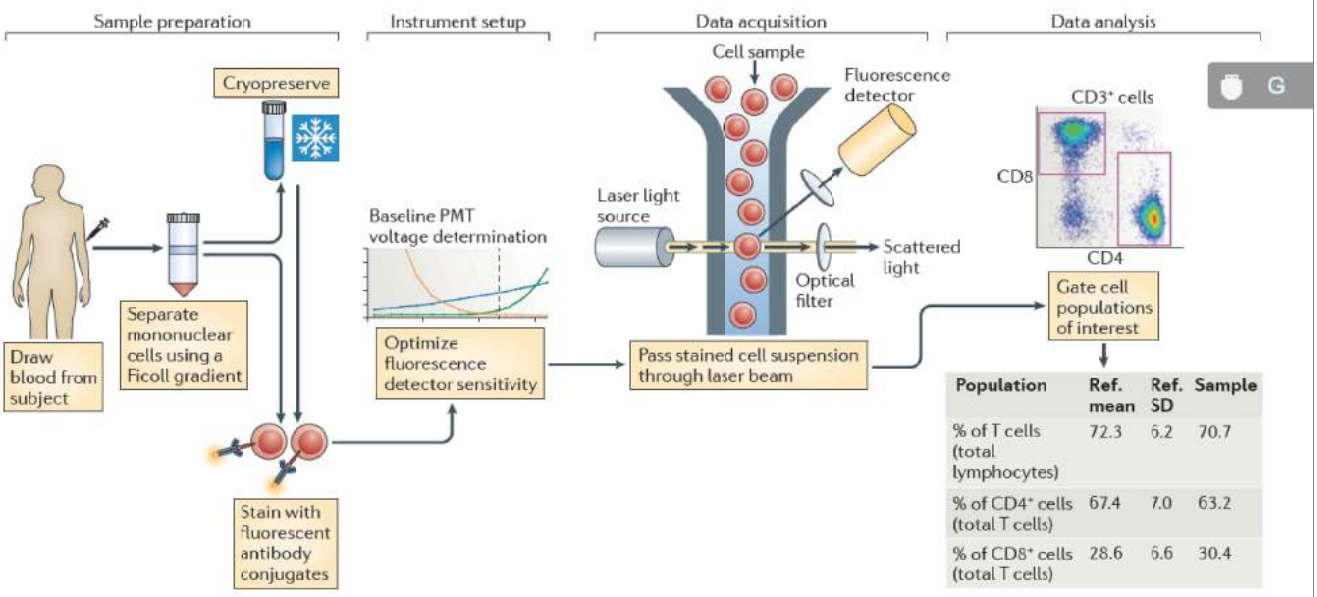
BD

Questions ?

流式細胞技術的品質控制

Tony Liu 劉聖德
Marketing Manager
BD Biosciences
tony.liu@bd.com

流式細胞儀的分析流程



Population	Ref. mean	Ref. SD	Sample
% of T cells (total lymphocytes)	72.3	6.2	70.7
% of CD4+ cells (total T cells)	67.4	7.0	63.2
% of CD8+ cells (total T cells)	28.6	6.6	30.4

流式細胞技術的QC (品質控制)

108TPDA04014

流式細胞技術（Flow Cytometry ,FCM）廣泛的應用在科學研究中，管理者和操作人員必須把握好研究流程以及結果分析的品質把關。在研究過程中分為分析前、分析中、分析後的質量控制：

分析前	分析中	分析後
標本採集、保存和傳送等.	儀器的品質控制，實驗操作過程的控制	對資料結果的處理，對研究結果的可信度評價

BD 67

Quality Control

108TPDA04014

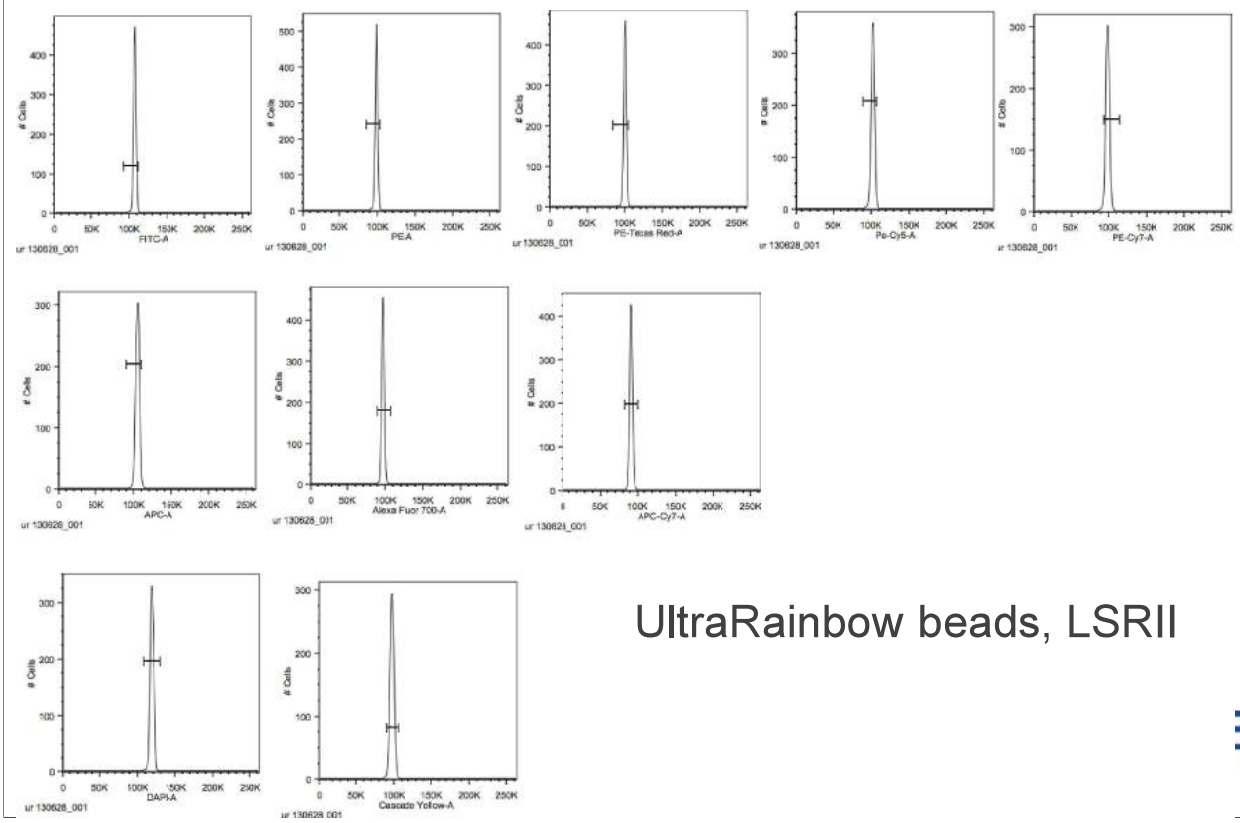
標準化 (standardization) 以及 監控 (monitoring):

- Run QC beads at least once a day
- When clog, bubbles or weird data.
- Some laboratories insist that QC beads are run with every experiment. This is ideal.

BD 68

Daily check: A typical run

108TPDA04014

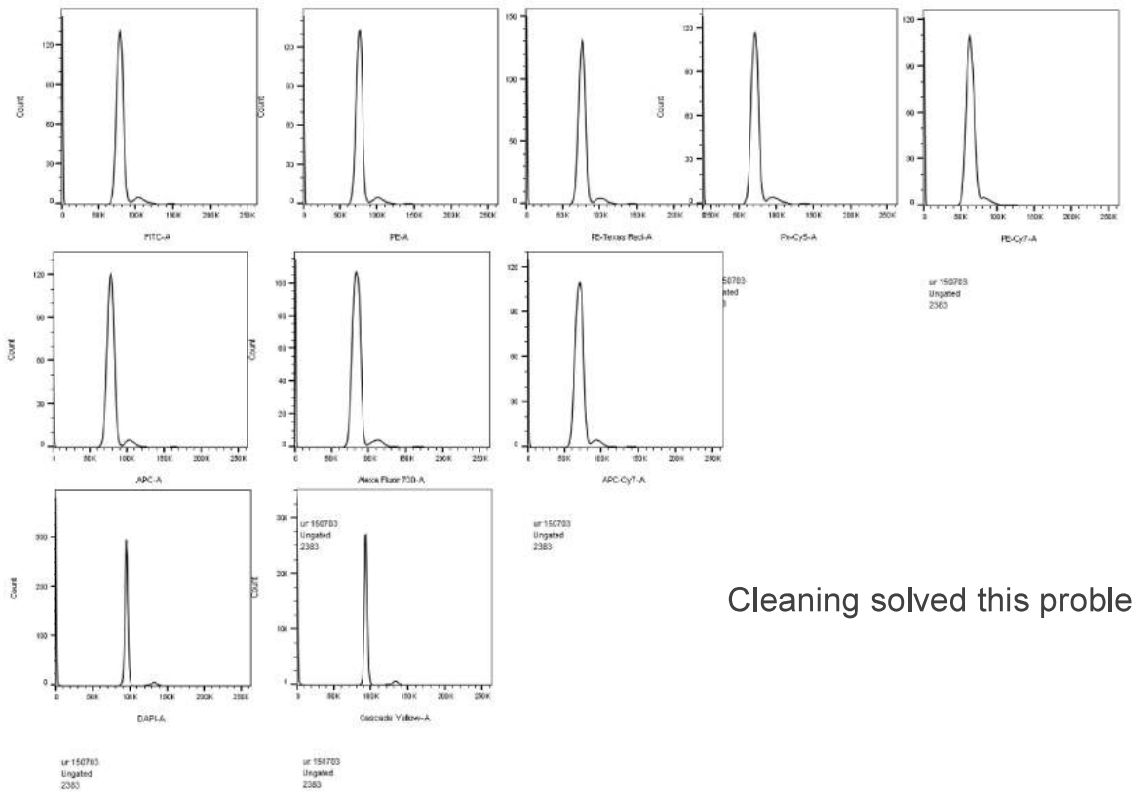


UltraRainbow beads, LSRII

BD 69

There's a problem

108TPDA04014

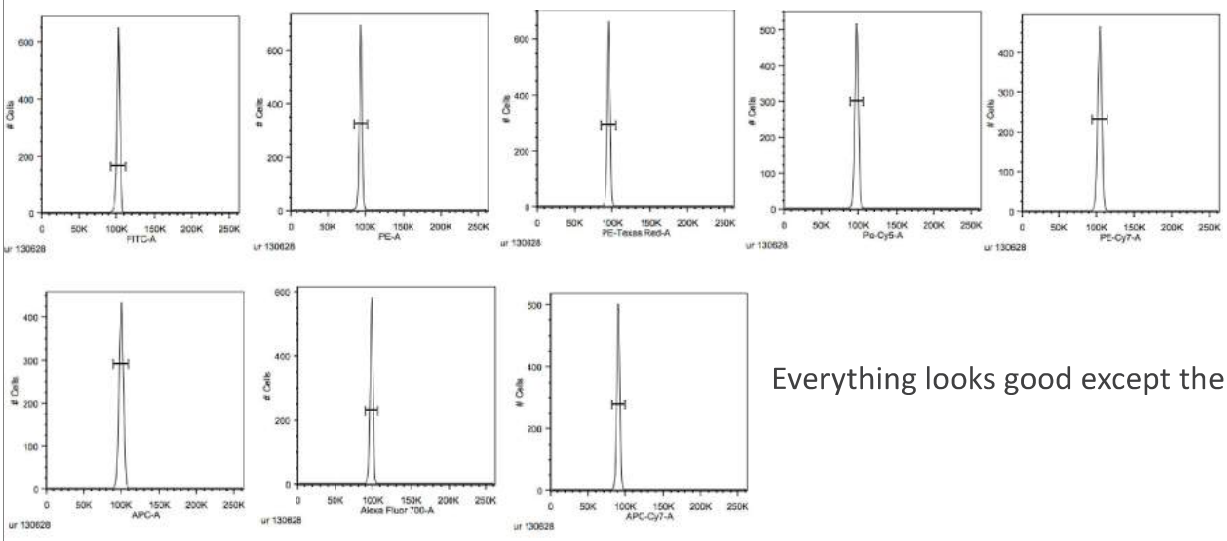


Cleaning solved this problem

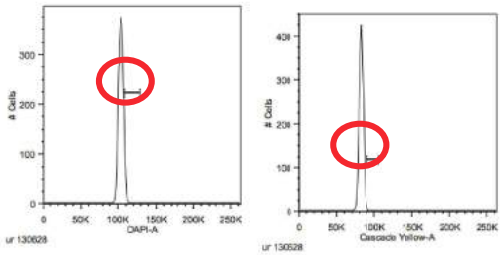
BD 70

Daily check: where's the problem?

108TPDA04014



Everything looks good except the violets



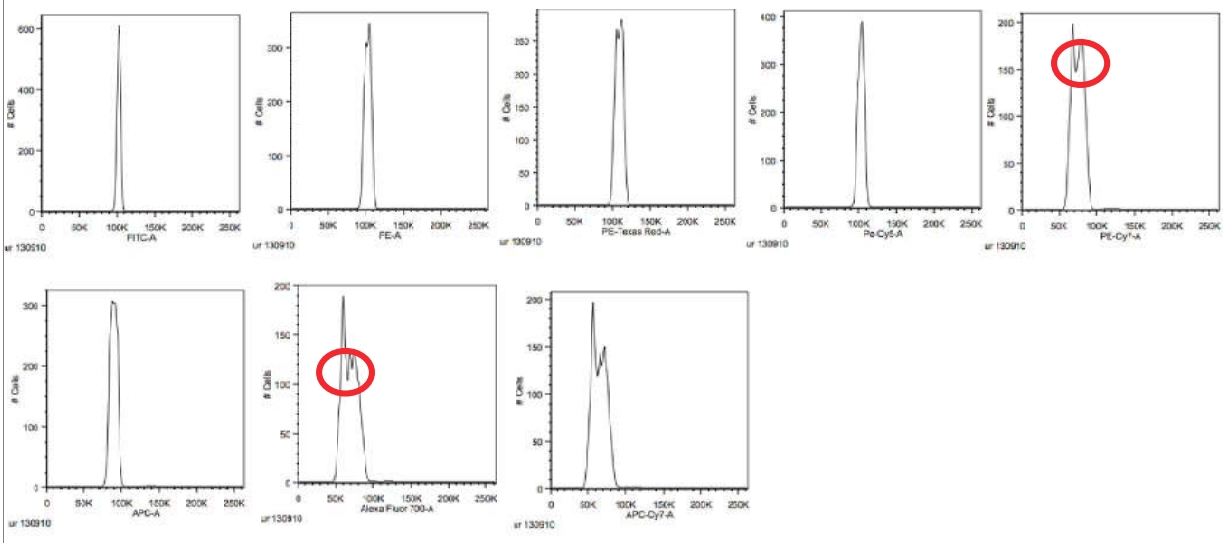
Channel difference from normal: 15,000
PMT voltage difference: 9v

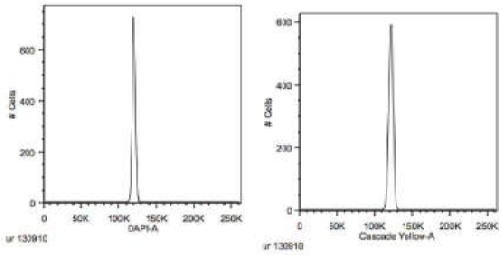
Violet laser alignment drifting

BD 71

Daily check: there's a problem

108TPDA04014





Bead problem:
UR beads fluorescence has degraded in the reds
(they don't like contact with bleach)

BD 72

許多國際學術機構召集專家開會取得共識，發佈質量控制標準

International Clinical Cytometry Society （ICCS）

International Society for Analytical Cytometry (ISAC)

European Federation of Flow Cytometry Societies (EFFCYTS)

European Cytometry Network

Clinical & Laboratory Standard Institute

ICCS, CLSI/ICSH標準和指南

Current Related References and Guidelines

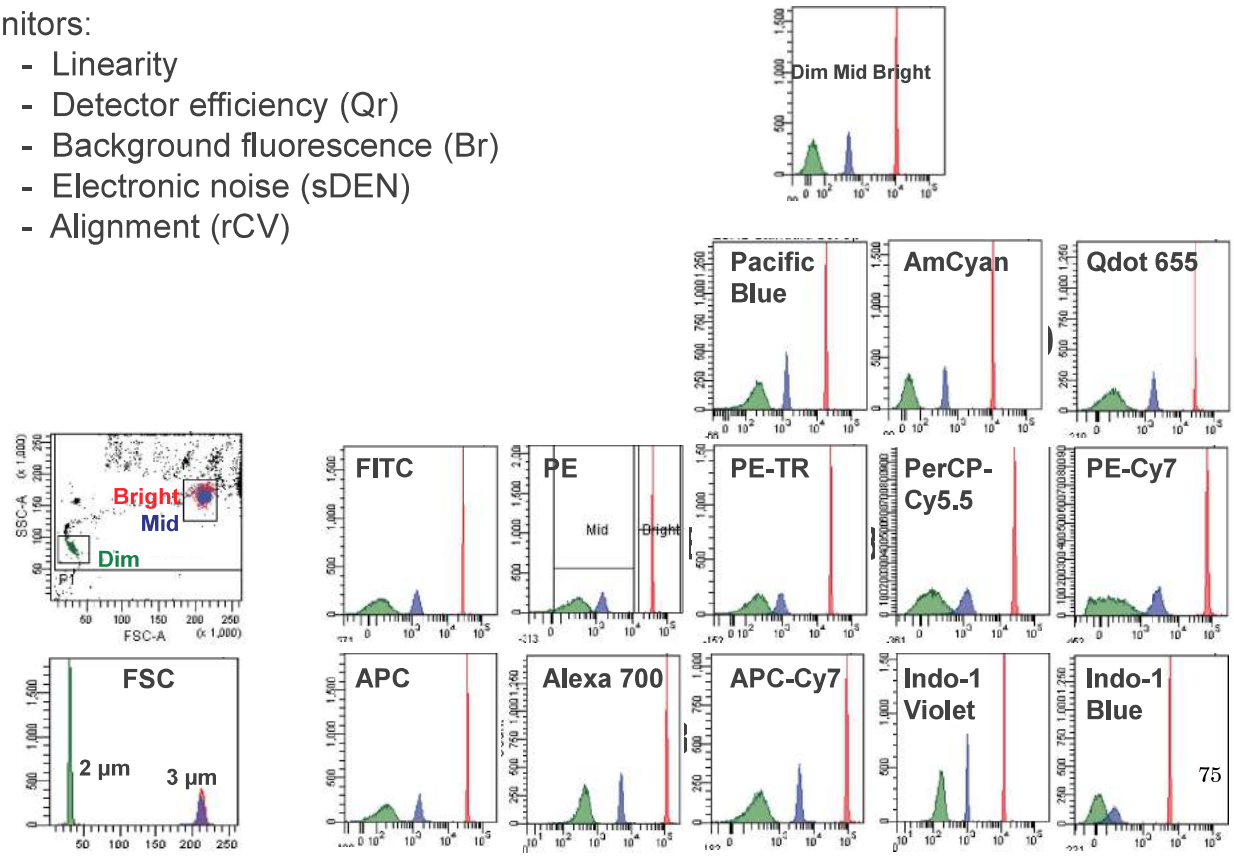
- **International Clinical Cytometry Society (ICCS) consensus guidelines:**
  - Borowitz et al: Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. 78B:211-230, 2010.
  - Davis BH et al. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Medical indications. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 30:249-263, 1997 .
  - Davis BH et al: 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia: Medical Indications. Cytometry, 72B:S5-S13, 2007
  - Wood BL et al: 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia 72B: S14-S22, 2007
- **CLSI Document guidelines for flow cytometry, some co-authored with ICSH:**
  - H42-A2, Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition, 2007
  - H43-A2, Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline—Second Edition, 2007
  - H44-A2, Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline—Second Edition, 2003
  - H52-A, Fetal Red Cell Detection; Approved Guideline, 2001 (A2 to be released within next 3-6 months)
  - I/LA24-A, Fluorescence Calibration and Quantitative Measurement of Fluorescence Intensity; Approved Guideline, 2004
  - I/LA26-A, Performance of Single Cell Immune Response Assays; Approved Guideline, 2004
  - I/LA29-A, Detection of HLA-Specific Alloantibody by Flow Cytometry and Solid Phase Assays; Approved Guideline, 2008

BD Cytometer Setup & Tracking (CST) System

108TPDA04014

Monitors:

- Linearity
- Detector efficiency (Qr)
- Background fluorescence (Br)
- Electronic noise (sDEN)
- Alignment (rCV)



75

BD Cytometer Set-up & Tracking (CS&T) System

108TPDA04014

- BD設計的自動最佳化儀器條件設置及QC系統
- **自動化校正追蹤軟體+CS&T beads**
  - Functions of CST:
    - Characterizes **baseline** performance
    - **Optimizes and Standardizes** instrument setup
    - Tracks instrument performance
  - Benefits of CST
    - Day-to-Day reproducibility of data
    - Helps in designing **multi-color** experiments
      - Higher quality data from these experiments
    - Early identification of degradation of instrument performance

BD

76

定義儀器基準線 (Define baseline)

108TPDA04014

•目的：

依據儀器狀態，計算並獲得最佳化螢光電壓(optimized PMTV)作為日後品品質管控比對標準。

•原理：

在不同螢光電壓設定下收取CS&T beads的訊號，得出不同電壓值下rSD, rCV曲線，經過軟體計算獲得讓背景訊號遠離電子雜訊的最佳化螢光電壓，並以此optimized PMTV作為日後儀器品管的比對標準。以optimized PMTV收取beads訊號，即可得到此批號beads的”target value”。

•使用時機：

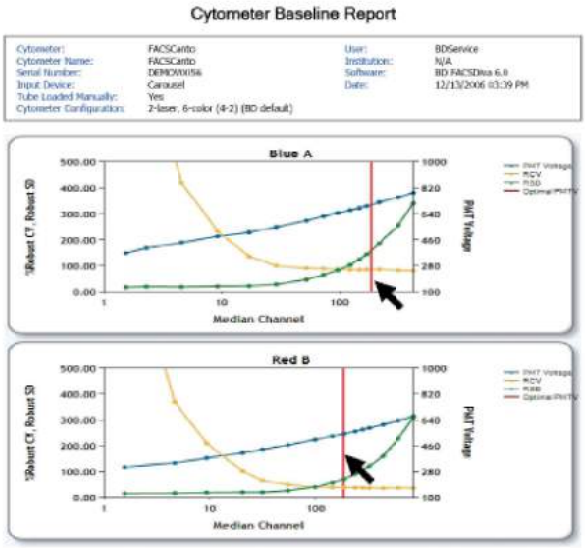
新機第一次使用前、建立新的儀器規格時、儀器狀態改變(如維修)。

BD 77

Baseline set up: 最佳化儀器螢光電壓設置

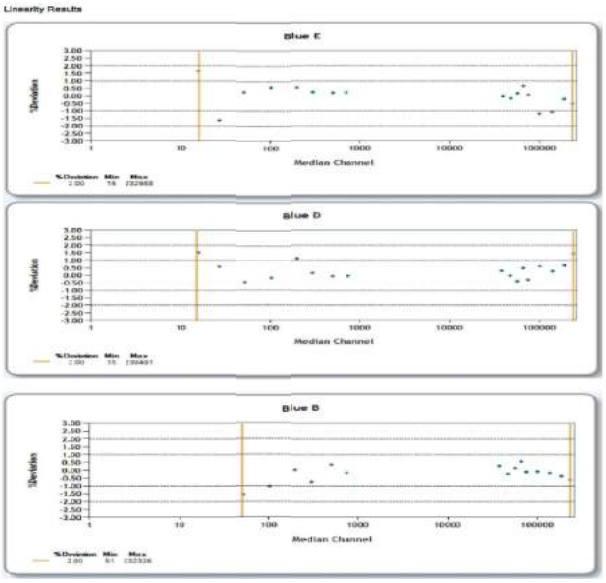
108TPDA04014

最佳化螢光電壓設置



- CV, SD較小且電子雜訊可以和弱訊號區分的最佳螢光電壓。
- 紀錄最佳化螢光電壓下beads的螢光位置(Target Value)。

偵測器有效線性範圍



- 測定儀器有效線性範圍。
- 訊號須於線性範圍內，光電轉換才會呈固定正比比例。

BD 78

Baseline Report: 詳細儀器狀態

108TPDA04014

Baseline報告

Cytometer Baseline Report

Cytometer:	FACSCantoII	User:	Administrator
Cytometer Name:	FACSCantoII	Institution:	N/A
Serial Number:	V96100767	Software:	BD FACSDiva 6.1.1
Input Device:	Carousel	Date:	09/15/2008 01:55 PM
Setup Bead Position:	1		
Cytometer Configuration:	2-laser, 6-color (4-2) (BD default)		

Setup Beads

Bead Product: CST Setup Beads, Part #: 910723
Lot ID: 10000, Expiration Date: 12/31/2009
Bead Lot Information: Available

Detector Settings

Laser	Detector	Parameter	PMTV	New Target Value	Old Target Value	Bright Bead %Robust CV	Mic Bead Median Channel	Mid Bead % Robust CV	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Robust CV
Blue	FSC	FSC	541	125000	N/A	2.36	131625	2.31	21917	2.51
Blue	F	SSC	395	125000	N/A	4.78	117611	4.72	60027	3.15
Blue	E	FITC	439	29707	N/A	3.06	1426	8.64	163	31.41
Blue	D	PE	520	31075	N/A	2.82	1175	8.91	247	27.33
Blue	B	PerCP-Cy5-5	511	52302	N/A	3.64	2317	12.22	243	37.07
Blue	A	PE-Cy7	567	37911	N/A	5.07	1218	19.88	80	84.35
Red	C	APC	614	64067	N/A	3.29	5126	11.00	273	50.72
Red	A	APC-Cy7	473	54852	N/A	2.82	2862	8.21	141	42.36

Detector Settings (Continued)

Laser	Detector	Parameter	Linearity Min Channel	Linearity Max Channel	Slope	Intercept	Electronic Noise Robust SD	Qr	Br
Blue	FSC	FSC	N/A	N/A	0.0039	N/A	N/A	N/A	N/A
Blue	F	SSC	N/A	N/A	7.5000	N/A	N/A	N/A	N/A
Blue	E	FITC	42	235860	7.4795	-15.3	26.7	0.0282	293
Blue	D	PE	17	230392	7.1944	-15.0	24.6	0.0278	356
Blue	B	PerCP-Cy5-5	230	240185	7.5277	-15.7	25.6	0.0132	42
Blue	A	PE-Cy7	162	235361	7.4323	-15.9	22.7	0.0222	22
Red	C	APC	98	236695	7.3929	-15.8	24.5	0.0112	117
Red	A	APC-Cy7	238	243208	7.5080	-15.3	24.1	0.0052	1176

Baseline報告內包含

- CST beads在最佳化電壓下的螢光強度位置
- 各偵測器偵測訊號CV
- 各偵測器有效線性度範圍
- 各偵測器偵測螢光效率 Qr
- 光學背景值追蹤 Br
- 電子雜訊干擾背景追蹤 SDen

BD 79

每次開機執行品管量測及校正 (Check Performance)

108TPDA04014

- **目的：**

每次上機前品管，確認儀器當日效能 。

- **原理：**

使用執行baseline的同一批號微珠，軟體自動調整電壓至微珠訊號達到target value位置後，將當日調整電壓與baseline電壓比較，並記錄訊號CV值，藉以確認儀器效能及穩定度。

- **使用時機：**

每次使用儀器檢測前執行。

BD 80

Daily CS&T QC 判讀標準

108TPDA04014

Cytometer Performance Report

Cytometer:	FACSCantoII	User:	BDService
Cytometer Name:	FACSCantoII	Institution:	N/A
Serial Number:	V13896201929	Software:	BD FACSDiva 7.0
Input Device:	Carousel	Date:	08/13/2013 04:57 PM
Setup Bead Position:	1	Cytometer Baseline:	08/13/2013 04:53 PM
Cytometer Configuration:	3-laser, 8-color (4-2-1)	P/F:	Pass

Setup Beads

Bead Product:	CST Setup Beads	Part #:	910858
Lot ID:	15950	Expiration Date:	05/31/2014
Bead Lot Information:	Available		

Detector Settings

Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference: Target Value	Bright Bead % Robust CV	Mid Bead Median Channel	Mid Bead % Robust CV
Blue	FSC	FSC	125000	124517	-1	0.95	124625	0.96
Blue	F	SSC	125000	125697	0	1.42	126765	1.39
Blue	E	FITC	13120	12908	-2	1.99	304	14.12
Blue	D	PE	22336	21991	-4	1.62	550	11.40
Blue	B	PerCP-Cy5-5	36603	36031	-2	2.90	952	14.88
Blue	A	PE-Cy7	32441	33024	1	4.21	534	17.84
Red	C	APC	56277	55536	-2	2.72	1857	13.37
Red	A	APC-Cy7	45404	45429	0	[illegible]	955	10.83
Violet	B	Pacific Blue	9103	9069	-1	2.57	583	8.38
Violet	A	AmCyan	30948	30347	-2	2.67	705	9.93

Detector Settings (Continued)

Laser	Detector	Parameter	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Robust CV	PMTV	Δ PMTV	Qr	Br	P/F
Blue	FSC	FSC	18466	1.37	524	-10	N/A	N/A	Pass
Blue	F	SSC	60812	1.31	418	-1	N/A	N/A	Pass
Blue	E	FITC	58	46.33	497	-1	0.0391	98	Pass
Blue	D	PE	113	37.85	463	-2	0.2091	215	Pass
Blue	B	PerCP-Cy5-5	137	41.62	574	-1	0.0140	26	Pass
Blue	A	PE-Cy7	72	84.01	677	2	0.0205	13	Pass
Red	C	APC	336	32.45	598	-1	0.0180	79	Pass
Red	A	APC-Cy7	131	35.64	463	0	0.0062	901	Pass
Violet	B	Pacific Blue	86	41.29	422	0	0.1396	3242	Pass
Violet	A	AmCyan	117	33.25	488	-1	0.0228	1075	Pass

Specifications

PMTV Delta from baseline:	50 (BD)
Violet Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
Blue Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
Red Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)

Specifications

PMTV Delta from baseline:	50 (BD)
Violet Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
Blue Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)
Red Laser Primary Channel Bright Bead %Robust CV:	6.00 (Recommended)

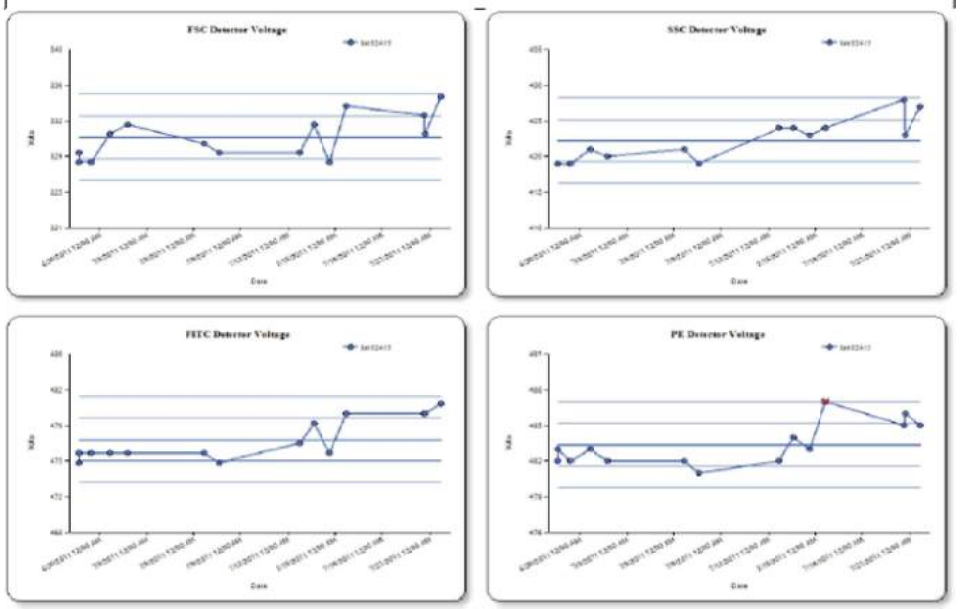
- Daily set up 螢光電壓與Baseline螢光電壓差異在50 Volts內
- 紫色雷射Primary Channel (Pacific Blue) 最亮的BEADS訊號，其CV<6
- 藍色雷射Primary Channel (FITC) 最亮的BEADS訊號，其CV<6
- 紅色雷射Primary Channel (APC) 最亮的BEADS訊號，其CV<6

LJ Chart (long-term tracing)

108TPDA04014

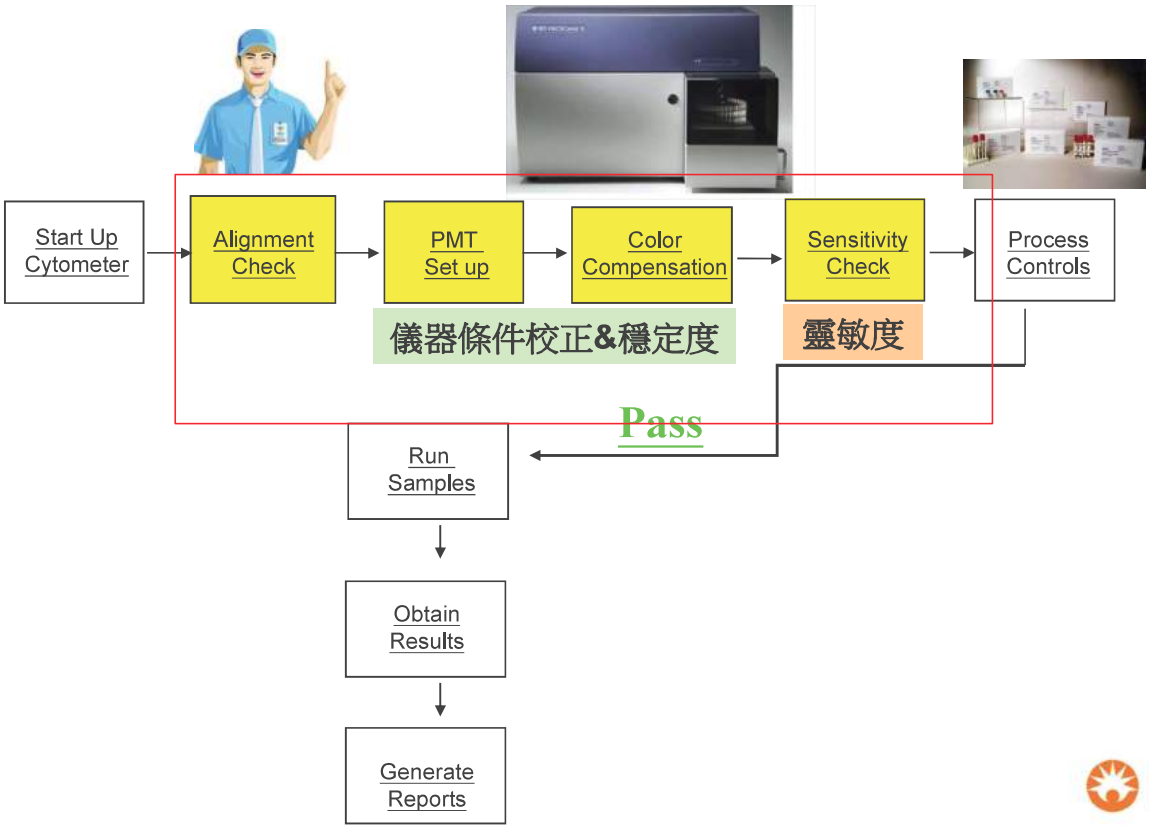
- 以最近的30/60 筆螢光電壓紀錄及雷射電流進行統計，得到平均螢光電壓、平均螢光電流及標準差(SD)統計數值及標準差(SD)分布。

Levey-Jennings Report for Cytometer Setup



臨床實驗室檢驗工作流程

108TPDA04014



QC Fail的原因

108TPDA04014

Fail 原因	Fail 顯示	處理方式
儀器管路潔淨度不佳	FSC,SSC Fail	執行儀器管路清洗程序
校正微珠螢光衰減(不建議re-use)	螢光偵測器 Fail	重新配製校正標準品
儀器流動室及管路內氣泡干擾	FSC/SSC/螢光偵測器 Fail	執行"De-gas Flow Cell"及"Prime after tank refill"功能數次排除氣泡
儀器偵測器效能減低,光學路徑偏移,雷射性能衰退,液流不穩定…	FSC/SSC/螢光偵測器 fail	聯絡工程師進行儀器檢測及保養維修。

Questions ?

流式細胞儀 的IQ與OQ

Tony Liu 劉聖德
Marketing Manager
BD Biosciences
tony.liu@bd.com

Why have an IQ, OQ, and PQ?

- 流程驗證 - 建立文檔證據，證明流程始終如一地生產符合其規格和預期用途的產品
- IQ, OQ及PQ是流程驗證的必需組件。
- 如果使用得當，將驗證儀器效能。
- IVD產品、潛在藥物或分選細胞用於治療或測試目的皆需要IQ, OQ及PQ。

What is the Value to the Customer?

108TPDA04014

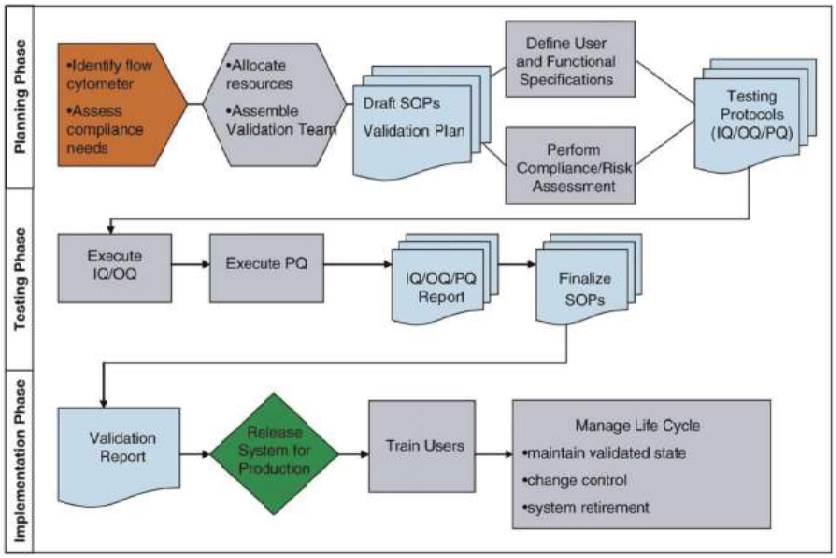
- 驗證儀器效能
- 提供支持如何驗證儀器的文檔
- 供應商提供批准的驗證流程
- 正在進行的OQ提供儀器保養維護的依據

BD 89

Validation of Flow Cytometric Testing during drug development

108TPDA04014

Instrument 3Q



BD FACSCanto II System Installation Qualification

642480 Rev. 04

BD FACSCanto II System Operational Qualification

642481 Rev. 04

C.L. Green et al. / Journal of Immunological Methods 363 (2011) 104–119

BD 90

Installation Qualification (IQ)

108TPDA04014

Establishes that the instrument is received as designed and specified, and that it is properly installed in an environment that is suitable for the operation of the instrument. The vendor typically provides this protocol.

Environment :包含儀器擺放之空間大小、用電需求、環境溫溼度

BD 91

642480 Rev. 04

108TPDA04014

BD FACSCanto II System
Installation Qualification

Customer System ID*: _____

*Only if assigned by customer

BD 92

Approval of Installation Qualification Protocol

108TPDA04014

The following management representatives agree to the implementation of this IQ protocol as stated. Testing is completed by a BD Biosciences Field Service Engineer.

Customer

Name _____

Title _____

Signature _____ Date _____

Name _____

Title _____

Signature _____ Date _____

Institution _____

This Installation Qualification is retrospective. The instrument was installed on a previous date. ❑Yes ❑No

If yes and the installation date is known, specify the date of installation.

_____

BD 93

裝機工程師的能力認證

108TPDA04014

Certification Training

The following BD Field Service Engineer has completed certification training on _____(date) for documenting the Installation and Operational Qualification for the BD FACSCanto™ II system.

Name _____

Signature _____ Date _____

The BD Field Service Engineer is authorized to execute the IQ protocol, review test results, and add comments.

BD Field Service Engineer

Name _____

Signature _____ Date _____

Initials _____

The Customer is authorized to review test results and add comments.

Customer

Name _____

Title _____

Signature _____ Date _____

BD 94

測試設備校驗

108TPDA04014

Calibrated Testing Equipment

Multimeter

Date Calibrated _____

Calibration Expiration Date _____

Manufacturer _____

Catalog No. or Part No. _____

Serial Number _____

Attach a copy of the Calibration Certificate ❑Yes ❑No

Digital Sling Psychrometer

Date Calibrated _____

Calibration Expiration Date _____

Manufacturer _____

Catalog No. or Part No. _____

Serial Number _____

Attach a copy of the Calibration Certificate ❑Yes ❑No

BD 95

Scope

108TPDA04014

This IQ protocol is limited to the BD FACSCanto II flow cytometer, BD FACSDiva software, BD FACSCanto clinical software, BD FACS™ Loader, and the BD™ High Throughput Sampler (HTS). BD FACSCanto II testing includes BD FACSDiva and BD FACSCanto clinical software products.
This protocol addresses design and service specifications developed by BD Biosciences

BD FACSCanto II, IVD

BD 96

Space Guidelines

Verify that the workspace has at least the following dimensions:

Components	Dimensions w x d x h	Pass / Fail
BD FACSCanto II system and table	183 x 81 x 69 cm 72 x 32 x 27 in	
Fluidics Cart	79 x 61 x 64 cm 31 x 24 x 25 in	
Workstation	21 x 47 x 49 cm or 8 x 19 x 19 in	
• Single monitor and keyboard	46 x 47 x 49 cm or 18 x 19 x 19 in	
• Dual monitors and keyboard (optional)	92 x 47 x 49 cm or 36 x 19 x 19 in	
• Barcode scanner (optional)	15 x 23 x 38 cm or 6 x 9 x 15 in	

Environmental Guidelines

Verify the following environmental conditions:

Condition	Specification	Actual	Pass / Fail
Temperature *(as measured by sling psychrometer)*	16 – 30°C 61 – 86°F		
Non-condensing relative humidity	20 – 80% relative at 16 – 30°C 61 – 86°F		

Electrical Requirements

Condition	Specification	Actual	Pass / Fail
BD FACSCanto II power supply and circuit protection[a] *(as measured by multimeter)*	Dedicated power circuit Japan: 50/60 Hz, 100 VAC (±10 %), 20 A North America, Canada, Mexico, Central and South America: 60 Hz, 115 VAC (±10%), 20 A Europe: 50 Hz, 220 VAC (±10 %), 10 A Australia: 50 Hz, 230 VAC (±10 %), 10 A United Kingdom: 50 Hz, 245 VAC (±10 %), 10 A		
Computer power supply and circuit protection *(as measured by multimeter)* (as determined by visual inspection)	Dedicated power supply 90 – 127 VAC 15 A 200 – 240 VAC 10 A		
Electrical safety testing *(outside US only)*	As mandated by country legislation		
External power transformer voltage[b] *(as measured by multimeter)*	Dedicated power supply 100 – 127 VAC		

a. Local regulations may dictate alternative specifications.
b. For facilities outside the US, an electrical transformer may be required to provide the correct input voltage.

Instrument and Options

108TPDA04014

Instrument	
Model	
Cat. No.	
Serial No.	
Manufacturing Date	
Transformer Serial No. *(as required by individual countries)*	

Option	Cat. No.	Serial No.	Yes/No
BD FACS™ Loader	342065		❑ Yes ❑ No
BD™ HTS	640009		❑ Yes ❑ No
8-Color Violet Laser upgrade for BD FACSCanto II system (4-2-2)	641889		❑ Yes ❑ No
8-Color PMT upgrade for BD FACSCanto II system (5-3)	641890		❑ Yes ❑ No

BD 99

Workstation Installation Checklist

Workstation	Model or Version	Serial No.	Power On
Computer			❑ Yes ❑ No
Monitor			❑ Yes ❑ No
Monitor			❑ Yes ❑ No
Printer			❑ Yes ❑ No
Barcode Scanner			❑ Yes ❑ No

Software Installation Checklist

108TPDA04014

Software	Version No.	Serial No.
Operating System		
BD FACSDiva software		
BD FACSCanto clinical software		
Microsoft® Office		

The BD FACSCanto II acquisition system is used for data acquisition and analysis. BD FACSDiva or BD FACSCanto clinical software can be used with the BD FACSCanto II acquisition system.

BD 100

檢查所有物件是否完好 ? 是否能供電 ?

108TPDA04014

1 **Install the BD FACSCanto II cytometer with fluidics cart.**

Inspect for damage. Power up the cytometer. Fill fluid reservoirs, prime system, and remove air from the sheath filter.

The BD FACSCanto II cytometer was found to be free of damage, and installed by the BD Field Service Engineer.

Yes _____ No _____ Previously Installed _____

2 **Unpack and install the BD FACSCanto II workstation.**

Remove all packing materials. Inspect for damage. Connect the CPU to the keyboard, monitor, peripherals, and to external power. Start the workstation and verify powerup.

The BD FACSCanto II workstation was unpacked, found to be free of damage, and installed by the BD Field Service Engineer.

Yes _____ No _____ Previously Installed _____

3 **Is the BD FACS Loader Option a part of the system to be installed?**

Yes _____ No _____ Previously Installed _____

If yes, remove all packing materials. Inspect for damage. Connect the Loader option to the BD FACSCanto II flow cytometer. Start the module and verify powerup.

The BD FACS Loader option was unpacked, found to be free of damage, and installed by the BD Field Service Engineer.

Yes _____ No _____ NA _____

4 **Is the BD HTS option a part of the system to be installed?**

Yes _____ No _____ Previously Installed _____

If yes, remove all packing materials. Inspect for damage. Connect the BD HTS option to the BD FACSCanto II flow cytometer. Start the module and verify powerup.

The BD HTS option was unpacked, found to be free of damage, and installed by the BD Field Service Engineer.

Yes _____ No _____ NA _____

5 **Is the 8-color Violet Laser option (4-2-2) a part of the system to be installed?**

Yes _____ No _____ Previously Installed _____

If yes, remove all packing materials. Inspect for damage. Install the Violet Laser option onto the BD FACSCanto II flow cytometer. Start the instrument and verify laser powerup.

The Violet Laser option was unpacked, found to be free of damage, and installed by the BD Field Service Engineer.

Yes _____ No _____ NA _____

6 **Is the 8-color PMT option (5-3) a part of the system to be installed?**

Yes _____ No _____ Previously Installed _____

If yes, remove all packing materials. Inspect for damage. Install the PMT option onto the BD FACSCanto II flow cytometer. Start the instrument and verify laser powerup.

The PMT option was unpacked, found to be free of damage, and installed by the BD Field Service Engineer.

Yes _____ No _____ NA _____

101

Declarations of Installation Qualification

108TPDA04014

BD FACSCanto II System

Serial Number_____

Equipment Location_____

The results documented within the Installation Qualification have been reviewed by the undersigned, and have been found to satisfy all installation requirements. Approval by signature is a declaration that the indicated equipment is installed correctly, with ____ Exception Reports attached, dated_____.

BD Field Service Engineer

Name_____

Signature_____Date_____

Customer

Name_____

Title_____

Signature_____Date_____

102

Operational Qualification (OQ)

108TPDA04014

The process of demonstrating that an instrument will **function according to the manufacturers specifications.** This can be provided by the vendor, but is sometimes completed by the user.

642481 Rev. 04

108TPDA04014

BD FACSCanto II System
Operational Qualification

Customer System ID*:

*Only if assigned by customer

測試使用的設備校驗

108TPDA04014

Multimeter

Date Calibrated _____

Calibration Expiration Date _____

Manufacturer _____

Catalog No. or Part No. _____

Serial Number _____

Attach a copy of the Calibration Certificate ❑Yes ❑No

Laser Power Meter

Date Calibrated _____

Calibration Expiration Date _____

Manufacturer _____

Catalog No. or Part No. _____

Serial Number _____

Attach a copy of the Calibration Certificate ❑Yes ❑No

Pressure Gauge

Date Calibrated _____

Calibration Expiration Date _____

Manufacturer _____

Catalog No. or Part No. _____

Serial Number _____

Attach a copy of the Calibration Certificate ❑Yes ❑No

BD 105

測試使用的試劑

108TPDA04014

The following test reagents are required for the instrument operational qualification.

Reagents Used	Cat. No. or Part No.	Lot No.	Date Used	Expiration Date
BD™ FACSClean solution	340345			
BD FACSFlow™ sheath fluid	342003			
BD FACS™ 7-color setup beads	335775			
BD FACS™ sheath solution with surfactant	336524			
BD FACS™ shutdown solution	334224			
Red reference beads for 488 nm laser	347240			
Blue reference beads for red laser	347241			
CAB beads	641320			
CS&T beads	641319			

BD 106

Instrument Operational Qualification Checklist

108TPDA04014

Instrument

Instrument	Serial No.
BD FACSCanto II cytometer	
BD FACS Loader	
BD HTS Option	
BD FACSDiva workstation	

Software

Specification	Result (Pass/Fail)
Microsoft® Windows® operating system executes successfully with no error messages.	
BD FACSDiva software executes with the Inspector, Browser, and Worksheet windows on the desktop.	
BD FACSDiva software connects to the instrument successfully with no error messages.	
BD FACSDiva software successfully saves data to a floppy disk, CD, or external USB drive.	
BD FACSDiva software successfully prints data on a supported printer.	

Specification	Result (Pass/Fail)
Microsoft® Windows® operating system executes successfully with no error messages.	
BD FACSCanto clinical software executes with the Inspector, Browser, and Worksheet windows on the desktop.	
BD FACSCanto clinical software connects to the instrument successfully with no error messages.	
BD FACSCanto clinical software successfully saves data to a floppy disk, CD, or external USB drive.	
BD FACSCanto clinical software successfully prints data on a supported printer.	

BD 107

Fluidic System Operational Checklist (流體系統測試)

108TPDA04014

Verify Fluidics Startup Procedure

Select the Fluidics Startup procedure in BD FACSDiva software.

Parameter	Specification	Result (Pass/Fail)
Fluidics Startup	System is primed with sheath fluid when the option is selected in the software.	

Verify Fluidics Shutdown Procedure

Selecting the Fluidics Shutdown Procedure in BD FACSDiva software results in successful execution and completion of the shutdown procedure.

Parameter	Specification	Result (Pass/Fail)
Fluidics Shutdown	System is primed with water when the option is selected in the software.	

Startup Inspection Checklist

Inspect the fluidic components and sensors for damage when the instrument is turned on. Make repairs or replacements when necessary.

Specification	Result (Pass/Fail)
Check for leaks.	
Inspect all quick-disconnects for damage or leaks. Replace O-rings if necessary.	
Check sheath fluid for bubbles.	
Sheath and waste level detectors are operational.	

BD 108

Fluidic System Operational Checklist (流體系統測試)

108TPDA04014

Air Pressure

This test verifies that the fluidics cart air pressure is within specifications. Express units in pounds per square inch (psi) or millibar (mb). Use calibrated pressure gauge to validate the fluidics cart gauge or to measure auxiliary air pressure.

Specification	Actual	Result (Pass/Fail)
Fluidic Cart Air Pressure = 70 ± 5 psi or 4,826 ± 345 mb		
Auxiliary air pressure[a] = >70 psi or 4,826 mb		

a. Auxiliary air must be free of oil, water, and debris.

Sample Flow Rate

Determine the Medium sample flow rate by measuring the volume of fluid consumed in five minutes. Measure the Low and High sample flow rates using the differential event rate of beads.

Specification	Actual	Result (Pass/Fail)
Low sample flow rate is 10 µL/min (±1.0 µL) (as measured by bead count differential)		
Medium sample flow rate is 60 µL/min (±6.0 µL) (volume displaced as measured by pipette)		
High sample flow rate is 120 µL/min (±12.0 µL) (as measured by bead count differential)		
Sheath flow rate is 18 mL/min Running for 5 minutes is 90 mL ± 2.5 mL		

BD 109

Optical System Operational Checklist (光學系統測試)

108TPDA04014

Verify that basic optical characteristics of the flow cytometer are within specifications. After a warmup period of at least 20 minutes, use the laser power meter to measure laser power in milliwatts (mW). All measurements are taken at the optical plate as the laser beam exits the optical fiber.

Primary Laser - 488 nm

Model: _____

Power Specification	Actual	Result (Pass/Fail)
>14 mW		

Comments:

If there are no comments, enter NA.

Secondary Laser - 633 nm

Model: _____

Power Specification	Actual	Result (Pass/Fail)
>12 mW		

Comments:

If there are no comments, enter NA.

Tertiary Laser - 405 nm

Model: _____

Power Specification	Actual	Result (Pass/Fail)
>25 mW		

Comments:

If there are no comments, enter NA.

BD 110

Optical Precision

108TPDA04014

Primary、Secondary and Tertiary Precision

Use the Nile Red beads、Blue beads or CAB beads to confirm that all primary (blue)、secondary (Red) and Tertiary (Violet) lasers parameters meet CV specifications for the bead lot consumed. Precision, expressed as a coefficient of variation, is the relative standard deviation of a signal produced by identical cells or particles. Run the beads at a Low flow rate. Verify that CVs or rCVs are within limits and attach printouts to this document.

CAB Beads:

Parameter (488-nm excitation)	Specification (%rCV)	Actual	Result (Pass/Fail)
FSC 150k-A			
SSC 150k-A			
FITC 50k-A			
PE 50k-A			
PerCP 50k-A			
PE-Cy 50k-A			
PE-Cy7 50k-A			
PE-Texas Red 50k-A			

Attach a copy of the bead lot specification.

Yes _____No _____

CAB Beads:

Parameter (633-nm excitation)	Specification (%rCV)	Actual	Result (Pass/Fail)
APC 50k-A			
APC-Cy7 50k-A			
Alexa Fluor® 700 50k-A			

Attach a copy of the bead lot specification.

Yes _____No _____

CAB Beads:

Parameter (405-nm excitation)	Specification (%rCV)	Actual	Result (Pass/Fail)
Pacific Blue™ 50k-A			
AmCyan 50k-A			

若有裝置Loader, 需再以loader檢測一次

BD

111

Optical Precision-Fluorescence Sensitivity

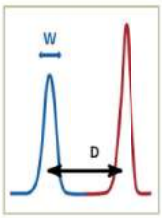
108TPDA04014

The BD FACS 7-color setup beads are used to measure the sensitivity of each fluorescence detector. The sensitivity measurements and specifications are fluorophore specific, and measure how well the instrument resolves dimly stained particles. This measurement is available for FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy™5.5, APC, PE-Cy7, and APC-Cy7 detectors. Verify that results are within specification limits and attach printouts to this document.

Detector	Stain Index Specification	Actual	Result (Pass/Fail)
FITC			
PE			
PerCP			
PerCP-Cy5.5			
APC			
PE-Cy7			
APC-Cy7			

Brightness of various fluorochrome conjugates

Bright= good resolution sensitivity



$$\text{Stain Index} = \frac{D}{W}$$

$$\text{stain index} = \frac{(\text{positive population median} - \text{negative population median})}{2 \times \text{negative population rSD}}$$

BD

112

Digital PMT Voltage Control (電子訊號轉換數位訊號測試)

108TPDA04014

Measure the PMT voltage response by monitoring the range of light scatter and fluorescence signal intensity of the red, blue, and/or CAB reference beads. Parameter labels are identified by the instrument configuration.

Laser	Specification		Result (Pass/Fail)
Blue	FSC	PMTs generate current proportional to the fluoresced and scattered light signals. When displaying the output as a histogram, changing the channel voltage moves the mean population of the histogram to a different channel.	
	SSC		
	FITC		
	PE		
	PerCP		
	PE-Cy™7		
	PE-Texas Red [a]		
Red	APC		
	APC-Cy7		
	Alexa Fluor® 700 [a]		
Violet	Pacific Blue™ [b]		
	AmCyan [b]		

a. Present in 5-3 optical configurations only.
b. Present in 4-2-2 optical configurations only.

BD 113

CST Performance Check

108TPDA04014

Customer runs CST.

Yes _____ No _____

Perform Baseline Run

Specification	Result (Pass/Fail)
Instrument completes a baseline run without warnings.	

Perform Performance Check

Specification	Result (Pass/Fail)
Instrument passes the performance check.	

BD 114

Attachment Log-將測試結果印出，附加於報告中

108TPDA04014

No.	Attachment	No. of pages
1	Attach a printout verifying that the primary precision with Red Nile, Blue, or CAB beads generated the required signal CV as specified in "Primary Precision" on page 10.	
2	Attach a printout verifying that the secondary precision with Red Nile, Blue, or CAB beads generated the required signal CV as specified in "Secondary Precision" on page 11.	
3	Attach a printout verifying that the tertiary precision with Red Nile, Blue, or CAB beads generated the required signal CV as specified in "Tertiary Precision" on page 11.	
4	Attach a printout verifying the optical precision while using the loader or HTS.	
5	Training certificate	
6	Test equipment certificate	
7	Reagent certificate	
8	Exception Report on page A-1	
9	Declarations of Operational Qualification on page B-1	

BD 115

Exception Report

108TPDA04014

BD FACSCanto II Flow Cytometer

Date: _____

Model: _____

Serial Number: _____

Equipment Location: _____

Reported by: _____

Description of Exception_____Date _____

_____

_____

_____

Recommended Solution for Exception Date

_____

_____

_____

Exception Resolved Date

_____

_____

_____

BD Field Service Engineer

Name_____

Signature_____Date _____

Customer

Name_____

Title_____

Signature_____Date _____

BD 116

Declarations of Operational Qualification

108TPDA04014

BD FACSCanto II System

Serial Number _____

Equipment Location _____

The results documented within the Operational Qualification have been reviewed by the undersigned, and satisfy all operational requirements. Approval by signature is a declaration that the indicated equipment is operating properly, with ____ Exception Reports attached, dated_____.

BD Field Service Engineer

Name_____

Signature_____Date _____

Customer

Name_____

Title_____

Signature_____Date _____

BD 117

108TPDA04014

Performance Qualification (PQ)

A process of demonstrating that an instrument consistently performs according to a specification appropriate for its routine use. As this is assay-specific, the user completes it.

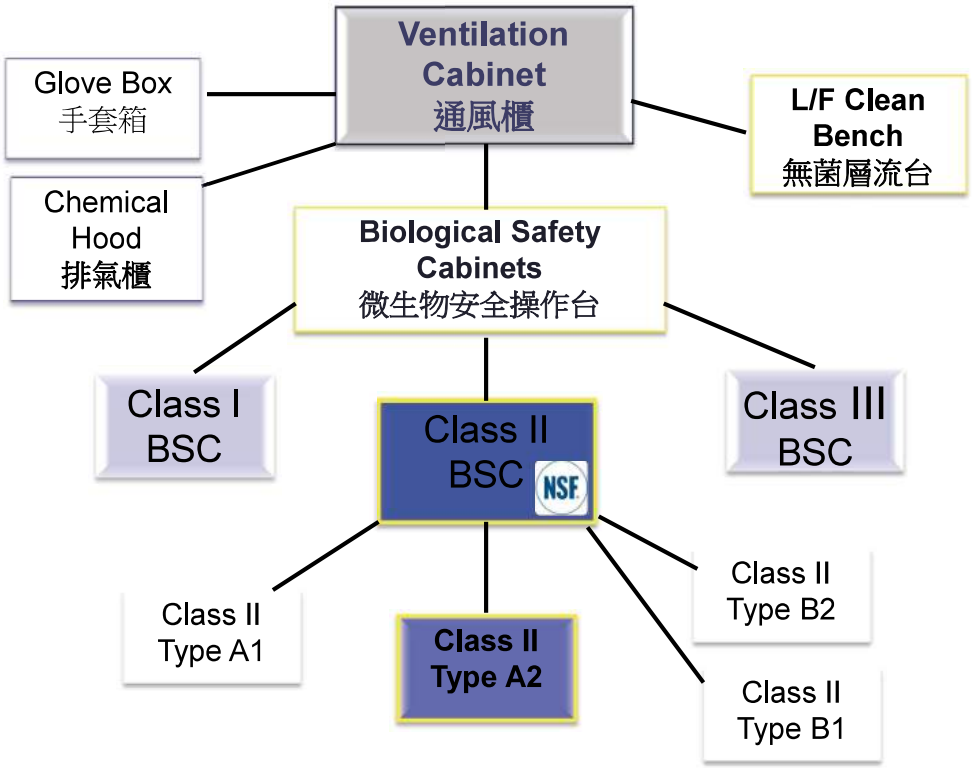
BD 118

Questions ?

National Sanitation Foundation International Standard 49
生物安全櫃及檢測法規

賴羿君
造鑫企業有限公司

市面上的空氣通風櫃分類

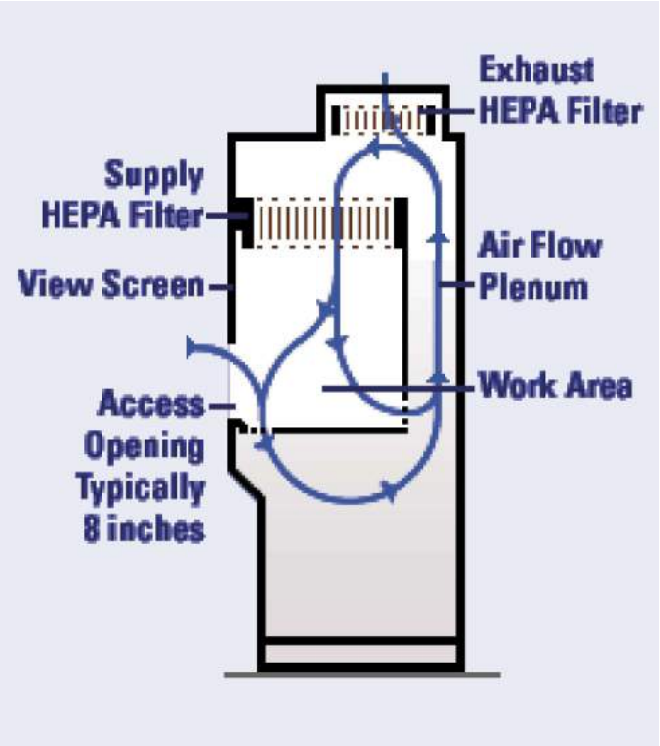


通風櫃分類及保護形式

	Personnel	Product	Environmental
Chemical Fume Hoods 化學排氣櫃 *(Protection From Vapors And Gasses)*	✓		
Laminar Flow Clean Benches 無菌層流台 *(Protection From Particulates)*		✓	
Class I Biological Safety Cabinets *(Protection from Particulates)*	✓		✓
Class II & III Biological Safety Cabinets *(Protection From Particulates; Exhausted Outside: Protection from Particulates and Vapors)*	✓	✓	✓

BD Cell Sorters inside BSC

無菌操作台及生物安全櫃 結構示意圖

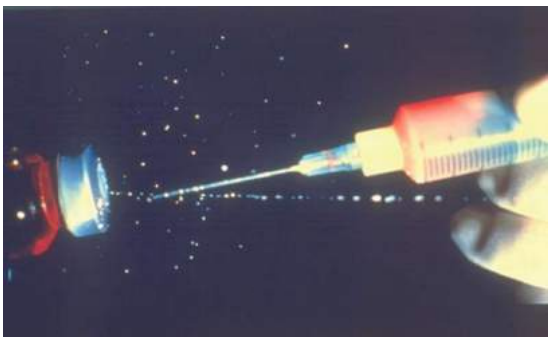


- 前方拉門式開口
- 空氣吸入/進氣
- 下吹氣流經高效率過濾網(HEPA)保護產品
- 排氣經高效率過濾網(HEPA) 保護環境

無菌操作台 (Laminar Flow)

- 早期仿生物安全櫃的概念
- 結構相符，但不明設計原理
- 2003年SARS發生後，CDC對於全台所有操作危害性等級機台執行檢測，發現風速均無法達到*人員防護*標準，進行全面撤換
- 加重無菌操作台及生物安全櫃區別

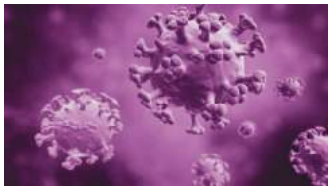
Aerosols



- Aerosols are colloids of liquid or solid particles suspended in a gas, i.e. air.
- Virtually all laboratory activities give rise to aerosols of some magnitude.
- Aerosols are known to spread infectious agents throughout the laboratory and sometimes, building
- There is clearly a need to control aerosols

Top 4 Things You May Not Know About Biological Safety Cabinets

- **1.** At the beginning of the 20th century, German scientist Robert Koch constructed the first 'bio-containment' cabinet after discovering that germs could float in air. Despite various leaks and design flaws, this system allowed Koch to work safely with anthrax, tuberculosis and cholera.
- **2.** Despite these early rudimentary biological safety cabinets, scientists continued to die of infections acquired in the laboratory. The incidence of laboratory-acquired infections grew at an alarming rate, with as many as 2,456 infections and 164 deaths by 1940. Particularly common lab-acquired diseases included tuberculosis, Q-fever and the bubonic plague.
- **3.** During the 1940s, the high-efficiency particulate air (HEPA) filter was developed by the body which later became the Atomic Energy Commission.
- **4.** The first clean air work station was developed by the Baker Company in 1951.



-Lab Managers Magazine

Primary Containment

- Primary containment is the immediate removal of aerosols at the site of their generation and limitation of spread by contact.
- Biological Safety Cabinets were developed to provide primary containment.

架構

- 生物安全櫃國際標準簡介
- 生物安全櫃等級定義
- 生物安全櫃驗證法規

生物安全櫃國際標準簡介

生物安全櫃標準規範

EN 12469
AS 2252

- Class I
- **Class II**
- Class III

NSF 49

- **Class II**
  - Type A1
  - Type A2
  - Type B1
  - Type B2
- Class I
- Class III

NATIONAL SANITATION FOUNDATION/AMERICAN NATIONAL STANDARD INSTITUTE 49

NSF International Standard/ American National Standard 49

The purpose of this Standard is to establish minimum requirements for materials, design, construction, and performance of Biosafety Cabinetry that are designed to protect personnel, product, and the environment. This Standard details requirements for performance testing as well as field certification testing.

(Foreword NSF/ANSI 49-2010a)

NSF 49 International

- NSF = National Sanitation Foundation
- NSF 49 first adopted in 1976, only pertaining to Class II BSC, with information on Class I and Class III BSC
- Conducts tests on BSC to ensure the products meet minimum standards for cabinet classifications devised by NSF

NSF 49 International

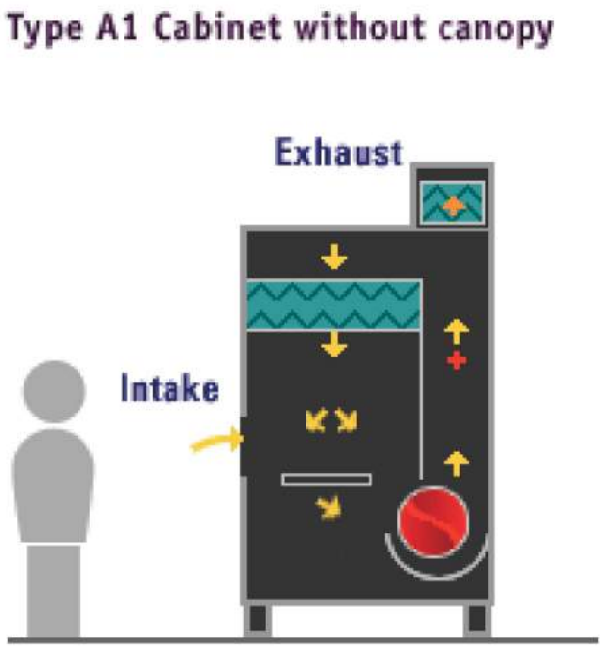
- NSF Standards are reviewed every 5 years
- Tests are conducted on cabinets submitted to NSF
- Products which meet these standards are certified by NSF
- Tests on cabinets are repeated every 5 years

NSF 49 Class II Classification
等級定義

NSF Classification, Adopted 2002	Previous NSF Classification	General Description
Class II, Type A1	Class II, Type A	70% air recirculated; 30% exhausted from a common plenum to the room; 75 FPM intake; biological contaminated positive pressure plenum
Class II, Type A2	Class II, Type A/B3	70% air recirculated; 30% exhausted from a common plenum to the room; 100 FPM intake; biologically contaminated plenum under negative pressure or surrounded by negative pressure
Class II, Type A2	Class II, Type B3	70% air recirculated; 30% exhausted from a common plenum to a facility exhaust system; 100 FPM intake; biologically contaminated plenum under negative pressure or surrounded by negative pressure
Class II, Type B1	Class II, Type B1	40% air recirculated; 60% exhausted from cabinet; pulled through dedicated exhaust duct into facility exhaust system; 100 FPM* intake
Class II, Type B2	Class II, Type B2	0% air recirculated; 100% exhausted from cabinet; pulled through dedicated exhaust duct into facility exhaust system; 100 FPM** intake; all ducts and plenums under negative pressure

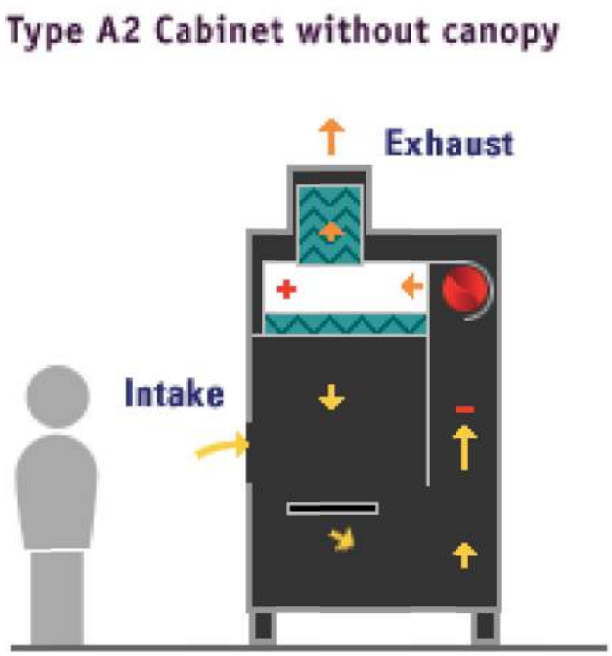
** All biologically contaminated plenums are negative to the room or surrounded by negative pressure plenums.*
*** All contaminated ducts are under negative pressure or surrounded by directly exhausted negative pressure ducts or plenums.*

Class II Type A1 Airflow Schematic



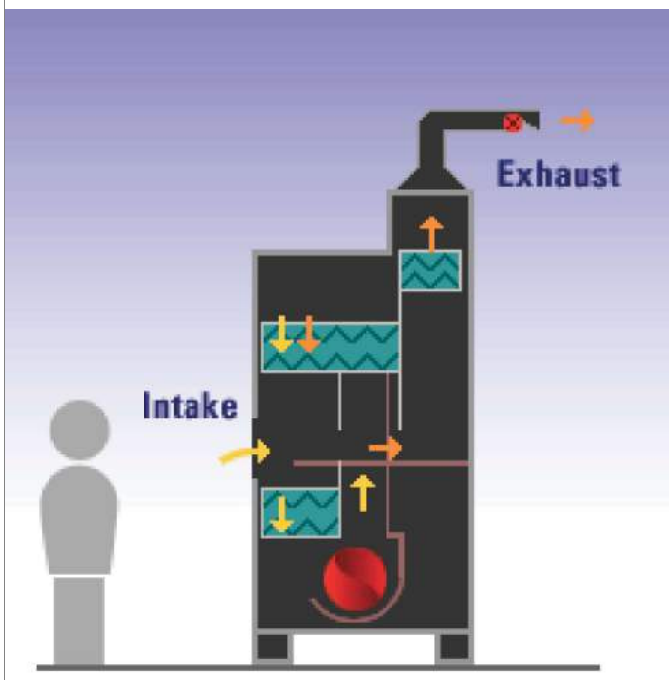
- 最低進氣風速在 75 fpm.
- 空氣混合進氣與HEPA過濾空氣進入同一個風道
- 正壓風道,風道內含污染空氣.
  - *2008 年後, 修改為正壓被負壓包覆*
- 排氣經過HEPA過濾後直接排置室內做空氣循環
- *此款操作台不適用於有毒性揮發實驗或是放射性實驗*

Class II Type A2 Airflow Schematic



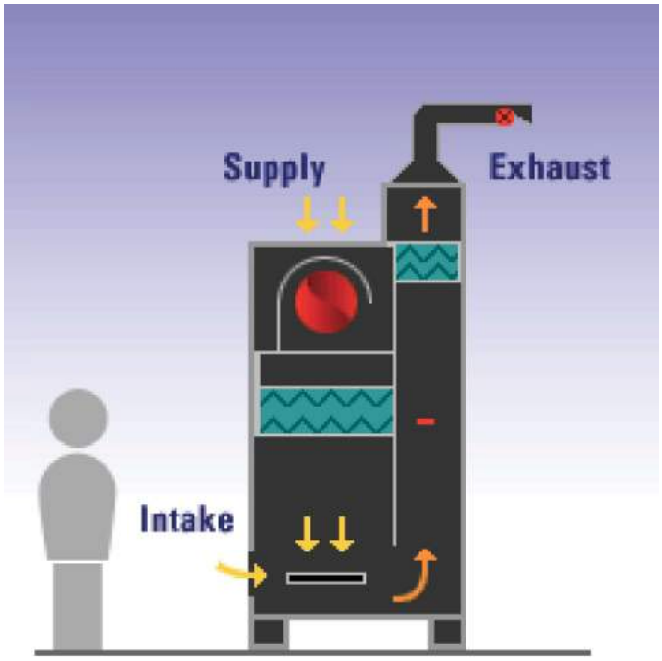
- 最低進氣風速 100 fpm.
- 空氣混合進氣與HEPA過濾空氣進入同一個風道
- 所有有污染性風道或是區域皆為負壓或是負壓環繞
- 排氣通過濾網過濾後可排至室內或是接管排氣
- *適運用於微生物實驗具微量毒性揮發或是放射性實驗。在此狀況下，需將排氣接管排至室外*

Class II Type B1 Airflow Schematic



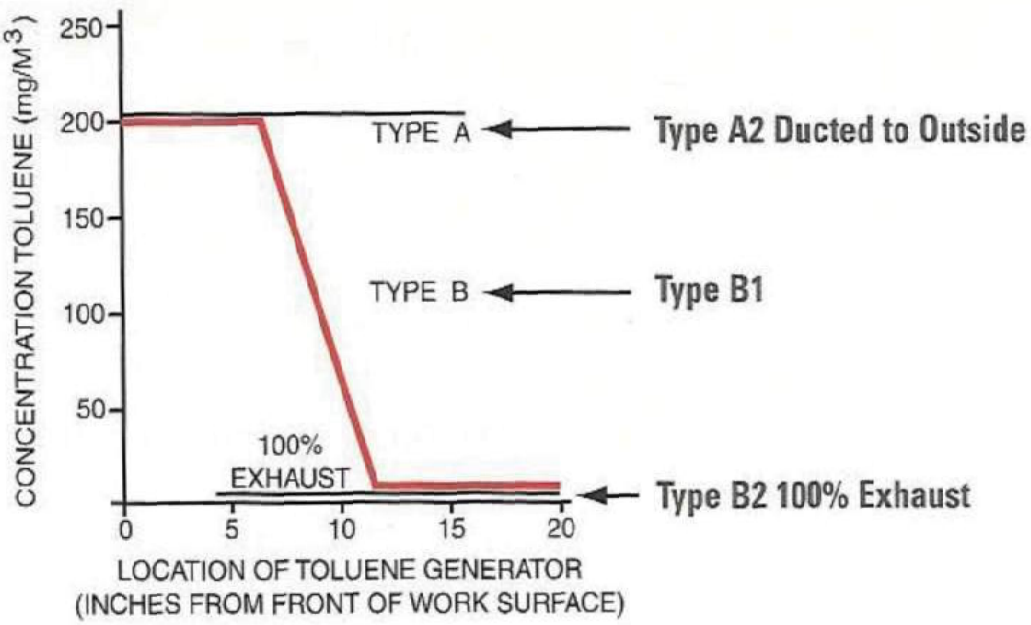
- 最低進氣風速 100 fpm.
- 下吹氣流均經過HEPA 過濾，部分再繼續循環
- 空氣混合進氣與部分下吹氣流，進入獨立排氣風道，在經過排氣濾網過濾後均排至室外
- 所有有污染性風道或是區域皆為負壓或是負壓環繞
- *適用於微生物實驗具少量毒性揮發氣體或是放射性氣體(但是.....)*

Class II Type B2 Airflow Schematic



- 最低進氣風速 100 fpm.
- 下吹氣流皆由室內抽取，均經過HEPA 過濾
- 所有有污染性風道或是區域皆為負壓或是負壓環繞
- 進氣與下吹氣流均至獨立風道,經過排氣濾網過濾後排至室外
- *適用於微生物實驗具毒性揮發氣體或是放射性氣體*

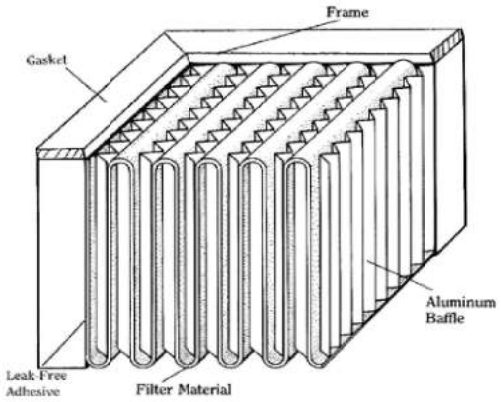
Vapor Handling of Class II Cabinets



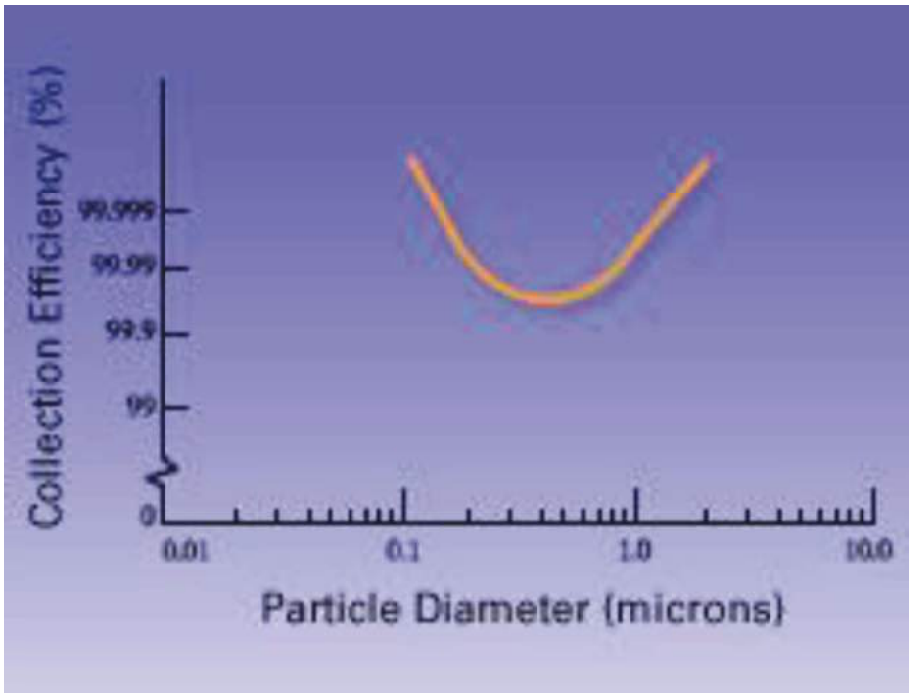
HEPA Filter Definition : NSF

拋棄式延長/褶狀型態:

- 移除顆粒效率最少要在 99.97%, 以顆粒直徑 0.3 micrometer (空調用)
- 生物安全櫃均為99.99%效率 at 0.3 micrometer



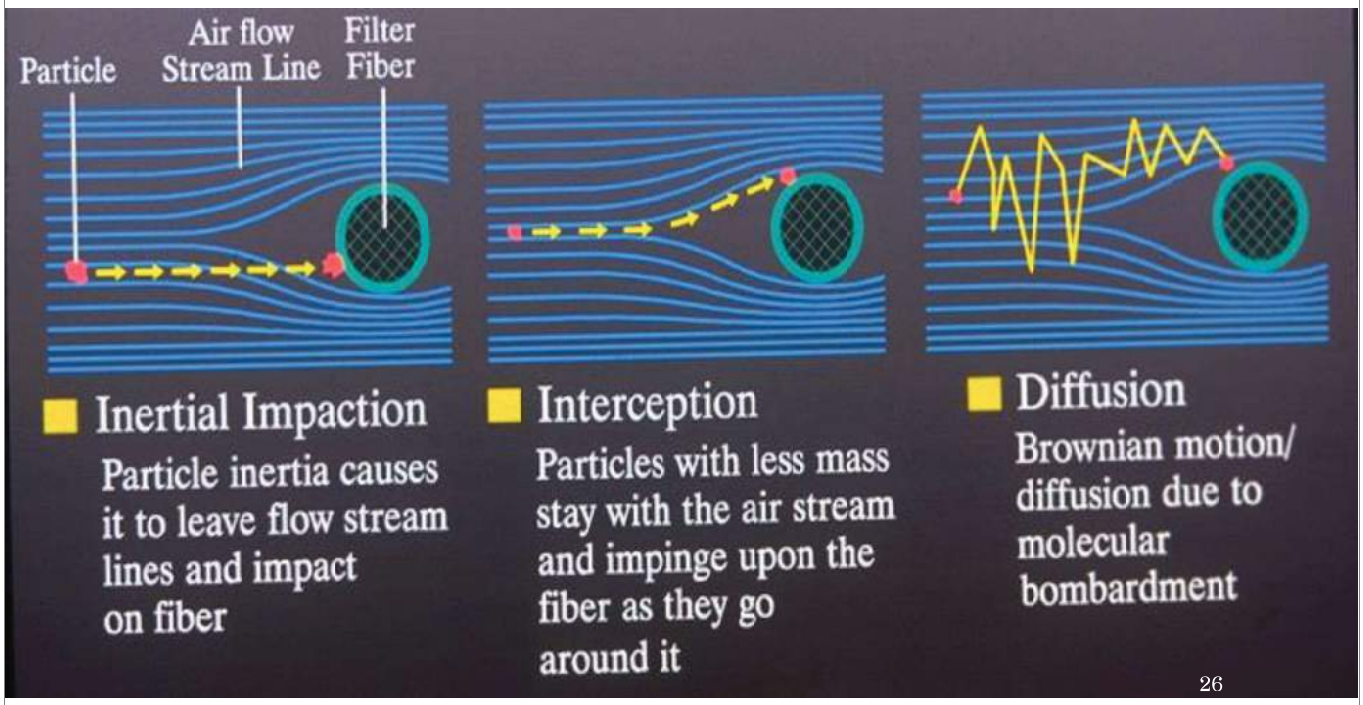
Theoretical HEPA Filter Collection Efficiency



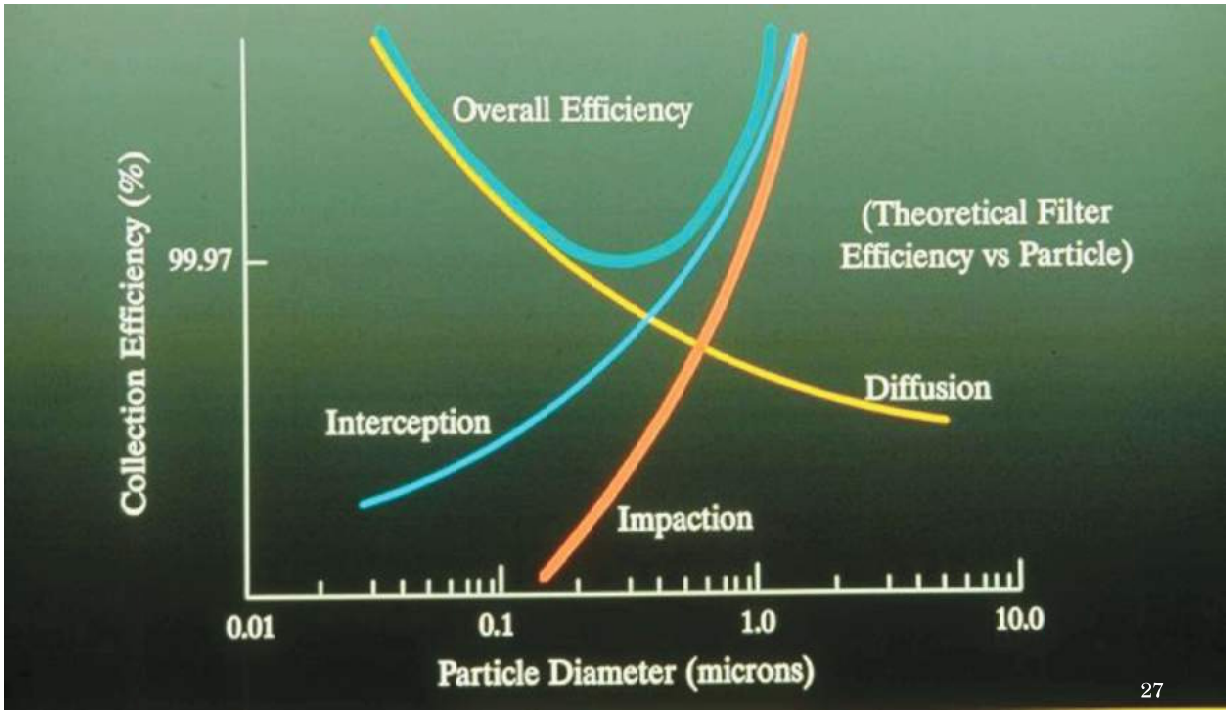
高效率濾網的捕集理論

- Inertial Impaction (惰性碰撞)
- Interception (攔截)
- Diffusion (擴散)

Air Filtration Theory
Particle Collection Mechanisms



Relative Effect of Particle Collection Mechanisms



高效率過濾網

不 可

過濾氣體和蒸發氣體

高效率網僅能過濾有實體的顆粒

微生物安全櫃檢測

賴羿君
NSF Certifier

NSF 49 Annex 解說

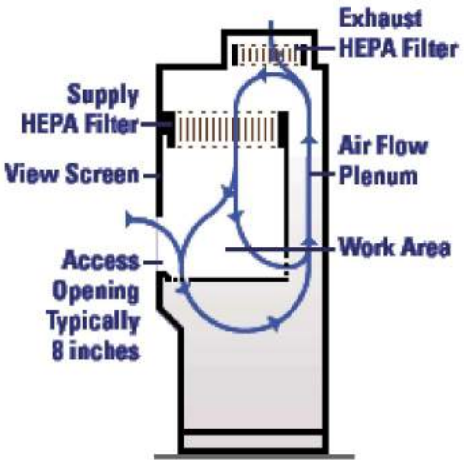
- Annex A - Performance Tests
  - These tests are intended for the qualification of a new cabinet model by the testing organization.
- Annex F – Field Tests
  - These tests define the methods and acceptance criteria that are appropriately applied for determining qualification for field certification of all Class II biological safety cabinets.

- 在執行測試時首先要遵循NSF 49所訂制的檢測的步驟。
- Annex A 指定原製造廠 ” how and where”。
- NSF 49 依據Annex A方式檢測, 通過後給予認證標籤
- 製造廠在提供特定的指示給現場執行測試時遵循.
- Annex F 提供現場測試的 general instruction, 另參見機器上的data plate。

為什麼生物安全櫃需要做確效?

Influences Effecting BSC Operation

- HVAC
- Building Exhaust System
- Supply Air
- People



Contamination from People

- Hair
- Skin flakes
- Clothing fibers
- Dirt
- Skin oils
- Cosmetics
- Lotions
- Fragrance
- Tobacco smoke

Activity-generated Particulate Contamination

Activity	Particles Generated (0.3μ particles/ft^3 air)
No movement	100,000
Movement of hands, arms, neck and head	500,000
Movement of hands, arms, neck and feet	1,000,000
Sitting down or getting up	2,500,000
Walking at 2 mph Walking at 3.5 mph Walking at 5 mph	5,000,000 7,500,000 10,000,000

生物安全櫃檢測意義

Field Certification is the method by which proper BSC operation is verified over time, to be sure that product, personnel, and environmental protection are maintained.

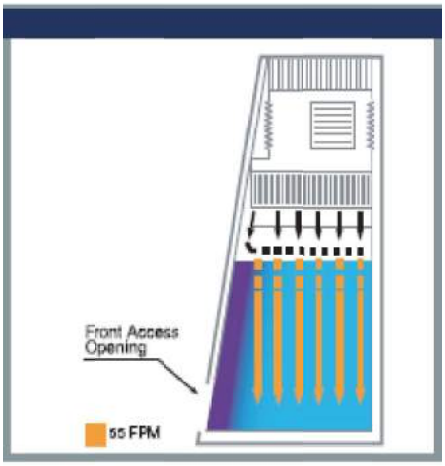
建議測試頻率 (Test Frequency)

- 新機安裝定位時
- 定位後每壹年
- 搬遷/移動後
- 維修後
  - HEPA 更換後
  - 更換風車馬達後

微生物安全操作台測試項目

- 進氣氣流量/風速 測試
- 下吹氣流風速測試
- HEPA 洩漏測試
- 煙霧測試
- 照度測試
- 振動測試
- 噪音測試
- 櫃體壓力洩漏測試 (適用於Type A1 only)
- 現場評估測試 (拉門警報, 排氣警報等)

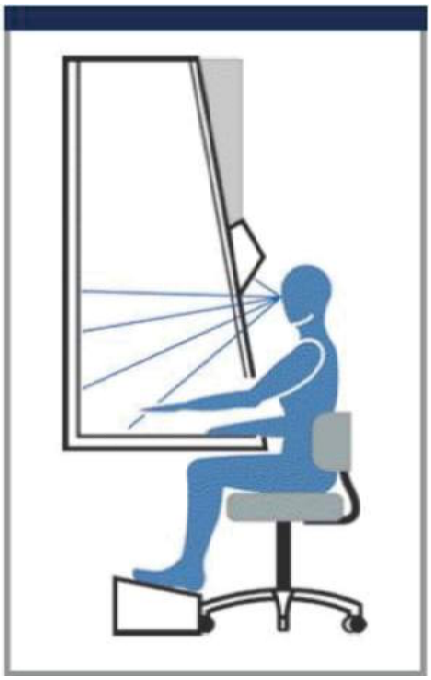
Tests Directly Related to Containment



- HEPA 洩漏測試
- 進氣氣流量/風速 測試
- 下吹氣流風速測試
- 煙霧測試

- 櫃體壓力洩漏測試 (適用於Type A1 only)
- 現場評估測試 (拉門警報, 排氣警報等)

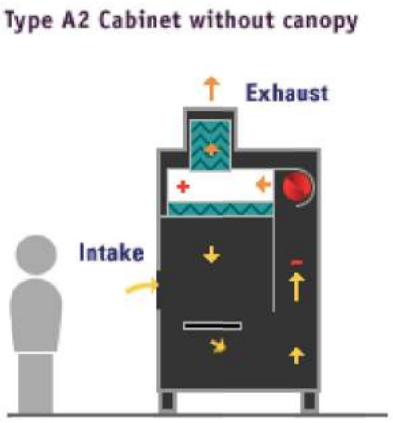
Tests Related to Worker Comfort and Safety



- 日光燈照度測試
- 振動測試
- 噪音測試
- 紫外燈強度測試*
- 漏電及用電安全測試

測試概念

- HEPA 洩漏測試
  - 檢查主過濾網及排氣過濾網是否有破損
  - 檢查墊圈與框邊是否有達到密封
- 風速測試
  - 進氣與下吹氣流的協調, 形成保護層
  - 一但其中之一有所變動, 便會影響氣流保護層, 破壞人員, 產品, 或是環境保護



測試概念

- 煙霧測試
  - 觀察煙流方向, 同時確認是否層流
- 照度測試
  - 以人員操作的舒適性為出發點, 測試操作台面的亮度
- 振動測試
  - 以人員操作的舒適性為出發點, 測試機器本身的振動然後與背景振動比對
- 噪音測試
  - 以人員操作的舒適性為出發點, 測試機器得噪音然後與環境(背景)噪音比對

賴羿君 Certifier 資格

- **Class II Biosafety Cabinet Field Certifier**
  - **Certificate Number: 3M680-03**
  - **Date of Initial Accreditation: 05/23/06**
  - **Expiration Date: 05/23/21**

謝謝聆聽!

賴羿君

聯絡資料:

- 造鑫企業有限公司 產品經理
- **NSF Certifier**
  - **Tel: 02-2825-0661 ext. 221**
  - **Email: alice.lai@tsaohsin.com.tw**

再生醫療(ATMP)GMP評鑑符合性管理制度之推動與趨勢研析

ATMP常用藥典檢驗方法及其確認與OOS處理

主講人：蕭學英

ATMP常用藥典檢驗方法及其確認與OOS處理

大綱：

一. ATMP(Advanced therapy medicinal products)

常用藥典檢驗方法簡介－微生物學之安全性檢驗：

1. 無菌試驗 Sterility Tests
2. 黴漿菌檢驗 Mycoplasma
3. 內毒素檢驗 Bacterial Endotoxin Test

二、ATMP常用藥典檢驗方法之確認

三、 OOS處理

GMP for ATMPs
(Advanced therapy medicinal products)

- 歐盟新興醫療法規(EU‘s Regulation on advanced therapies)認為，一些新興治療產品將生物材料（如組織或細胞）與化學元素（如金屬植入物或聚合物支架）結合在一起。這些組合產品需要適應法規要求。
- 歐盟委員會(EC)於2017年11月通過了針對新興治療藥品（ATMP）的優良製造規範（GMP）指南。該指南提供了一個適應ATMP特定特徵的特定GMP架構。
- 新的歐盟新興醫療產品GMP於2018年5月22日開始運作，對大多數GMP領域採取相對標準的方法。該指南支持更加基於風險考量的方法，並專注於關鍵品質屬性監控。
- 在學術或醫院環境中的開發和製造，如何確保臨床/非製藥人員在非GMP環境中應用GMP標準並能對製造過程保持監督。

產品品質與製造管控

- 為何需要執行產品品管檢測?
  - ✓確保病患安全和滿足產品品質要求
- “For each batch of drug product purporting to be sterile and/or pyrogen free, there shall be appropriate laboratory testing to determine conformance to such requirements” 21CFR211.167 (a) Applies to any drug product claiming to be sterile and non-pyrogenic.

Quality Control for ATMPs

- Good Quality Control Laboratory Practice
- Documentation
- Sampling
- Testing
- On-going stability programme
- Technical transfer of testing methods

Quality Control for ATMPs

- 品質管制涉及取樣、規格和測試以及確保進行必要相關的測試、文件紀錄和放行程序。當品質滿意時，原料才會被放行使用，產品也才會放行用於供應銷售。
- 品質管制不僅限於實驗室的操作，所有可能涉及產品品質的決策也必須參與。
- 品質管制與生產的獨立性被認為是品質管制運行的基礎。
- 必須有足夠的資源來確保所有品質管制安排得到有效和可靠的執行。
- 成品評估應包括所有相關因素，包括生產條件、在製品測試結果、製造（包括包裝）文件審查、成品規格符合性和最終成品包裝檢驗。

優良的品質管制實驗室規範

- 符合法規之優良品管實驗室規範。
- 實驗室場所和設備應符合品質管控區域的一般和特定要求。
- 實驗室設備不應在高風險區域之間定期移動，以避免意外交叉污染。特別是微生物實驗室，應盡量減少交叉污染的風險。
- 實驗室人員、場所和設備應適合於製造的性質和規模所規定的任務。
- 外部“合同分析”實驗室的使用可由於特殊原因而被接受，這應在品質管制記錄中說明。

產品品質與製造管控

一. 遵循法規	GTP、 PIC/S GMP等	
二. 製造原料	1. 細胞 2. 試劑 3. 賦形劑	來源說明、品管檢驗和檢驗成績書COA。 微生物測試：無菌試驗、內毒素、黴漿菌、體外與體內病毒測試與外來物質等測試。
三. 細胞產品製造與製程管控	1. 細胞之製備 2. 關鍵製程與管控 3. 製程確效 4. 儀器設備	1.製程描述與流程圖。 2.管控方法與允收標準。 3.製程確效計劃書與結果。 4.3Q合格之所有製程使用儀器設備。
四. 細胞產品特性分析 五、最終產品之放行測試	1.鑑別 2.微生物測試 3. 純度 4.細胞存活率,等等..	1.組織相容性標記及基因多型性分析 2. a. 無菌測試 b. 黴漿菌 c. 外來病原測試 3. a. 熱原性/內毒素 b. 製程不純物 c.細胞不純物 *放行測試之分析方法應執行方法確效。
六、批次分析結果	製程耐變性和一致性	至少三個確效批次的分析結果來證實
七、參考細胞標準品	參考細胞標準品具一定效價、品質和安定性。	
八、容器密封系統	細胞治療產品之合適性評估測試。	
九、安定性試驗	1. 製程中產品 2. 最終產品	a.完整性 b.無菌性 c.活性
參照 ：人類細胞治療產品查驗登記審查基準，USP<1046> CELLULAR AND TISSUE-BASED PRODUCTS		

Final Product Release Testing / Product Safety Testing

Release Test		Test Method	Criteria
Parenteral	Cellular Products		
Sterility	Sterility	USP <71> 中華藥典 生物藥品檢驗基準	Negative
n/a	Mycoplasma	USP<63>	Negative; not detected
Endotoxin	Endotoxin	USP <85>	< 5 EU/Kg 0.2 EU/Kg intrathecal
Particulate Matter		USP	

Reference: USP<1>, USP<1046>CELLULAR AND TISSUE-BASED PRODUCTS

微生物學品管檢驗

- 傳統微生物學檢驗是基於微生物生長的方法。
- 藥典方法需要評估以確定其應用於特定產品時的適用性，並且此類評估將基於產品特性進行。
- 在相關的藥典檢驗章節中提供了證明該方法適用性的程序（驗證;抑制/增強verification; inhibition/enhancement）。
- 當這些驗證過的適用性方法或程序包含在法規文件中並且產品獲得批准時，它們將應用在產品放行和安定性等相關測試。

- Reference: USP<1223>

無菌試驗
Sterility Tests

無菌試驗

無菌試驗的局限性	細胞、組織產品特性
• 無法檢測病毒或黴漿菌。 • 是破壞的檢測，不能整批測試。 • 培養期長達14天。 • 僅有兩種讓細菌、真菌和酵母菌生長的培養基。 • 無菌檢查有重大統計限制。 – 樣本數量不具統計意義。 – 須根據微生物的生長能力。 • 合格結果僅表示在試驗條件下檢測樣品中未發現污染微生物。	• 原材料：為人體活細胞或組織物，非無菌也無法滅菌。 • 中間產品、最終產品：無法過濾不易過濾滅菌。 • 細胞可能存在病毒或黴漿菌。 • 架貯期短。 • 產量少。 • 產量少以至於不易執行方法適宜性檢驗。

*須應用適合的產品驗證過程或經**確效合格的無菌製程**來保證產品無菌。

無菌試驗

法規：生物藥品檢驗基準/中華藥典

TFDA /FDA /EP /USP /PIC/s GMP

無菌試驗要求：

- 無菌環境
- 操作人員
- 培養基 進行滅菌和驗收(Growth Promotion Test)使用程序。
- 試驗方法－方法適宜性(Method Suitability)試驗。
- 檢驗樣品的最低數量。
- 無菌緩衝液
- 驗證試驗：抑菌及抑黴菌作用
- 結果觀察與說明

無菌試驗

The Growth Promotion Test & the Method Suitability

	Test Microorganisms	Incubation
I. Fluid Thioglycollate : as a minimum 1 Aerobic + 1 Anaerobic		
Aerobic bacteria	Pseudomonas aeruginosa	At 32.5˚C ± 2.5˚C for NMT 3 days
	Staphylococcus aureus	
	Bacillus subtilis	
Anaerobic bacterium	Clostridium Sporogenes	
II. Soybean-Casein Digest Medium : as a minimum 1 Fungi + 1		
Fungi	Aspergillus Niger	At 22.5˚C +/- 2.5˚C for NMT 5 days
	Candida albicans	
Bacteria-aerobic	Bacillus subtilis	At 32.5˚C ± 2.5˚C for NMT 3 days
*not more than 100 cfu，**參照USP<71>，中華藥典，生物藥品檢驗基準		

The Method Suitability

Membrane Filtration & Direct Inoculation

- 何時須執行方法適用性驗證?
  a. 必須對新產品進行無菌試驗時進行;
  b. 每當試驗的實驗條件發生改變時。
- 驗證目的：抑細菌及抑真菌作用是否仍存在。
- 產品在測試條件下不具有抗微生物活性，或者這種活性已被滿意地消除。
- 方法適用性驗證可以與待檢產品的無菌測試同時執行，但須都合格才可同時放行。

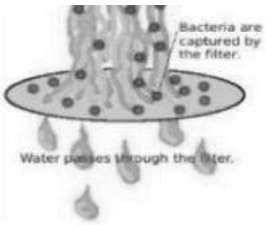
無菌試驗－藥典方法

直接接種法:

- 檢品體積不大於培養基體積的10%。
- 培養基最低需要量。

濾膜過濾法:

- 直徑47 mm孔徑0.45 μm之微孔濾膜。
- 將緩衝液和水溶液檢品通過微孔濾膜。
- 以100 mL的緩衝液清洗濾膜。不得超過100 mL 5次。
- 將濾膜放入培養基。
- 按照規定條件培養。



Number of Articles to Be Tested

Minimum Quantity to be Used for Each Medium	
Quantity per Container	**Minimum Quantity to be Used**
Less than 1 mL	The whole contents of each container
1-40 mL	Half the contents of each container, but not less than 1 mL

Minimum Number of Articles to be Tested in Relation to the Number of Articles in the Batch	
Number of Items in the Batch	**Minimum Number of Items to be Tested for Each Medium**
Not more than 100 containers	10% or 4 containers, whichever is the greater
100 - 500 containers	1 0 containers

Reference: USP<71>

無菌試驗 - 結果詮釋

- 如果在培養14天後培養基不易觀察微生物生長時，移轉1 mL以上到新鮮培養基內然後培養不得少於4天。沒有微生物生長則產品無菌實驗合格。
- 產品有微生物生長但無法證明測驗是無效的，則無菌實驗檢查不合格。

➢ 只有能證明測試無效原因與測試的產品無關時才可重複執行。

藥典限制準則，只有一個或多個下列的條件：

a. 無菌試驗的環境微生物監測數據，顯示出錯。

b. 試驗程序的調查問卷，顯示出錯。

c. 在陰性對照組發現微生物生長。

d. 分離試驗生長出的微生物，鑑定後確定菌種可歸咎於來自進行無菌試驗程序的物質和/或技術。

注：當情況a，b或c提出，應中止培養測試。

Sterility Tests

適用於細胞或組織產品：

Guidance for FDA Reviewers and Sponsors:

Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy investigational New Drug Applications (INDs):

- In-process sterility testing on a sample taken 48 to 72 hours before final harvest or after the last refeeding of the culture.
- A rapid microbial detection test such as a Gram stain or other procedure on the final formulated product
- the release criteria for sterility would be based on a **negative** result of the Gram stain and a **no-growth** result from the 48- to 72-hour **in-process sterility test**.

SELECTION OF AVAILABLE TECHNOLOGIES WITH POTENTIAL FOR USE AS A **RAPID STERILITY TEST**

The Expert Panel selected the following six analytical platforms, listed alphabetically, as candidates for compendial rapid sterility testing:

- Adenosine triphosphate bioluminescence ATP生物發光
- Flow cytometry流式細胞計數
- Isothermal microcalorimetry等溫微量熱儀
- Nucleic acid amplification核酸擴增
- Respiration呼吸
- Solid phase cytometry固相細胞計數

Reference: USP

DETAILED DESCRIPTIONS OF THE MOST CHALLENGING **URS** for **RAPID STERILITY TEST**

- Ability to detect a wide range of microorganisms, i.e., specificity
- Limit of detection
- Time to result
- Improved patient safety
- Sample quantity i.e., minimum number of articles tested and quantity per container tested
- Sample preparation
- Aseptic test material handling, i.e., open vs. closed systems

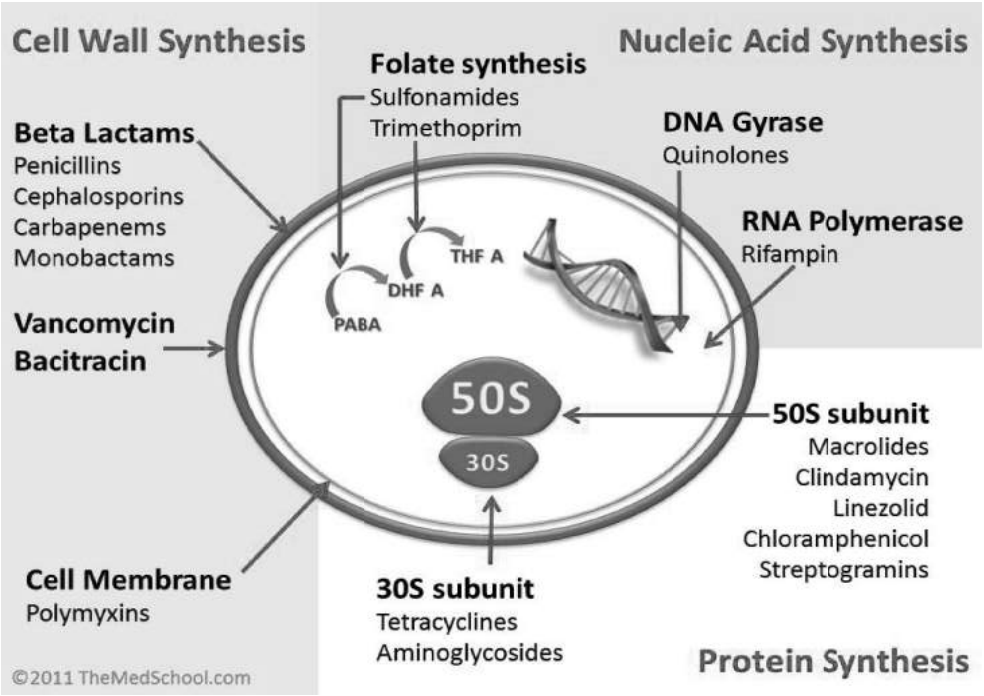
Reference: USP

黴漿菌(Mycoplasma)檢驗

細胞醫療產品之黴漿菌(Mycoplasma)汙染

- 黴漿菌(Mycoplasma)無細胞壁結構、介於獨立生活和細胞內寄生之間的最小的原核微生物，體積極小，一般介於0.15~0.3 μm，無法用0.22 μm 過濾膜移除。
- 黴漿菌會造成細胞許多損害，包括染色體異常、破壞核酸合成、影響細胞代謝、改變細胞膜特性、誘發細胞凋亡等。並且被汙染時不會導致培養基混濁，因此常易被忽略。
- 黴漿菌的污染可導致細胞產量減少並影響產品的品質，如果其存在最終的產品中，會直接影響病患的安全。
- 細胞培養中很常見的汙染源，主要汙染源來自實驗室操作人員。
- 屬於高敏感性及高挑剔性的微生物，目前仍無一種培養基配 方可適用於所有種類之黴漿菌生長。

抗生素消滅細菌的原理



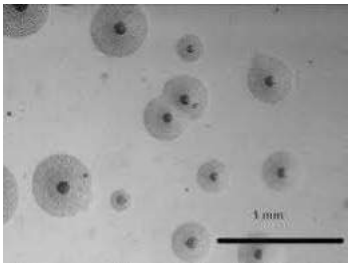
黴漿菌檢驗

黴漿菌檢測	特點	檢驗方法
培養基培養法 (Culture)	• 需耗時28天，半衰期短產品不適用 • 最直接與靈敏 • 易產生汙染，且有些黴漿菌不易培養。	USP<63>
指示細胞培養法 (Indicator, Hoechst DNA stain)	• 需時5天以上 • 檢出靈敏度達100 CFU/mL • 藍螢光點或絲狀點	USP<63>
聚合酶鏈鎖反應法 (PCR NTA-base)	• 需時一至二天 • 檢出靈敏度達10 CFU/mL • 假陽性、假陰性率高於培養方法 • 無法分辨活的黴漿菌和死的黴漿菌 • 無法全面涵蓋 • 需經過敏感度、專一性及耐變性等確效評估	須執行方法確效
參考：USP, TFDA-生物藥品檢驗基準或中華藥典		

黴漿菌檢驗- 藥典方法

培養基培養法 (Culture Method)

- 每次測試包括兩種已知的支原體菌株作為陽性對照(Positive control) 。
- 陽性對照菌種 從分離出來不得超出15代.
- 固體培養基培養條件-密封容器在微需氧條件下溫度36±1℃ 中培養（含有<0.5%氧氣和/或氮氣含有5%-10%二氧化碳）。
- 進行適宜性試驗，證明產品不存在抑制物質。
- 接種不少於10mL的檢品至100mL液體培養基，
- 每2-4天接種0.2mL至一個固體培養基上。
- 液體培養基培養20-21天，固體培養基14天。
- 在培養結束時檢查固體培養基。



- 如果沒有發生典型的支原體菌落(Typical fried egg)的生長，陽性對照至少一個生長和陰性對照無生長，則該產品符合該測試。

黴漿菌檢驗 - 藥典方法

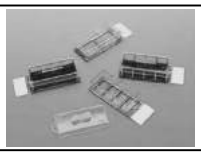
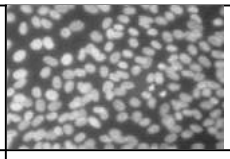
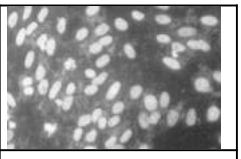
指示細胞培養法 (Indicator, Hoechst DNA stain)

- 用螢光染料結合細胞培養物的DNA染色，通過其在細胞表面上的特徵微粒或絲狀熒光來檢測。
- 進行陽性對照試驗，證明血清不存在抑制作用。
- 接種不超過100 cfu合適的M. hyorhinis和M.orara參考菌株，測試待使用細胞Vero cells的有效性。
- 將1mL待檢品接種到細胞培養容器中在36±1 ℃下培養至少3天。
- 蓋玻片放在chambered slides上進行低密度繼代培養細胞，3-5天后細胞匯集達到50%。
- 用pH7.4的磷酸鹽緩衝鹽水沖洗細胞並加入固定液fixing solution (acetic acid : methanol, 1:3)。再用無菌純淨水清洗細胞。
- 加DNA染色劑(bisbenzimide working solution)靜置10分鐘後沖洗。
- 用glycerol and Phosphate-Citrate Buffer Solution pH 5.5蓋上蓋玻片。

黴漿菌檢驗 - 藥典方法

- 通過螢光fluorescence檢測（ bisbenzimide染色，用330nm / 380nm激發濾光片和LP 440nm屏障濾光片），放大400倍或更高倍。
- 顯微鏡鏡檢測試培養物、陰性和陽性對照的微觀外觀，檢查支原體核外螢光。在指示細胞的細胞質上或細胞間隙中產生針尖或細絲。
- 解釋結果：

	show fluorescence typical of Mycoplasmas	
Positive controls	+	-
Negative controls	_	+
Product Sample	_	+
Results	The product to be examined **complies** with the test	The test is **invalid**

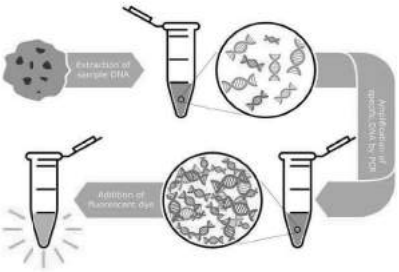
			
Vero cells	chambered slides	Negative controls	Positive controls

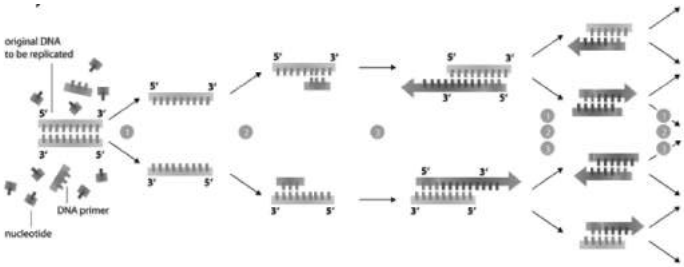
黴漿菌檢驗 - PCR

聚合酶鏈鎖反應法

Polymerase Chain Reaction - PCR

1. 96℃高溫下使雙股DNA打開
2. 在約68℃下讓引子與DNA配對 primers來自16S-23S rRNA序列
3. 在72℃ DNA延伸 (P=聚合酶).
4. 第一循環完成，做出的兩段雙股DNA可當作下一個循環模板，這樣倍增DNA片段。
5. 進行瓊脂凝膠電泳分析，依DNA band之有無及片段大小來分析結果。





A simplified scheme of PCR analysis
https://www.romerlabs.com/knowledge-center

內毒素檢驗
Bacterial Endotoxin Test

內毒素和外毒素之熱原

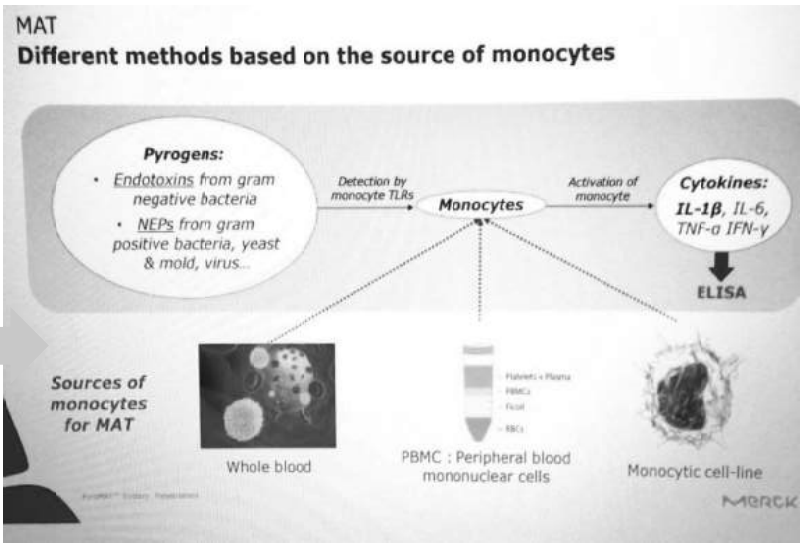
- 熱原是一種發熱的分子。細菌產生內毒素和外毒素的熱原。內毒素存在於革蘭氏陰性細菌的細胞壁中，外毒素是一些細菌在內部產生並分泌到外部的分子。當細菌溶解時釋放內毒素和外毒素。內毒素以脂多醣（LPS）形式存在。
- 熱原的挑戰進入與血液接觸時，宿主先天免疫防禦機制引起單核細胞/巨噬細胞產生前列腺素和促炎性細胞因子。
- 啟動的促炎信號傳導途徑可引起發熱，導致嚴重的炎症，器官衰竭甚至死亡。

熱原檢驗與內毒素檢驗

Pyrogen Rabbit Pyrogen (USP 151)	Bacterial Endotoxin LAL (USP 85)	Pyrogen monocyte activation (EP2.6.30)
• 特異性：可檢測內毒素和非毒素熱原（NEPs） • 國際法規中傳統方法 • 可測量效果	• 簡單易行 • 方法的靈敏度高（從0.03至0.001 EU / mL） • 成本低	• 基於人體對熱原的反應 • 檢測內毒素和非內毒素熱原。 • 易於執行 • 比兔子測試敏感 • 測量效果（單核細胞活化）
• 靈敏度較低（0.5 EU/mL） • 不是定量法 • 穩健性差：兔子對壓力可能會影響結果 • 動物模型：兔子的免疫反應可能與人類不同。 • 許多類型藥品無法測試：化療藥物、免疫製劑、細胞製劑（血液和幹細胞） • 動物消耗：需要大量動物	• 僅限內毒素檢測 • 僅測量內毒素含量不反映人體的炎症反應效果。 • 試驗易受干擾：pH、離子強度、酶活性、低內毒素回收等。 • 某些產品無法測試：血液製品、細胞產品、蛋白質、脂類等。 • 動物消耗死亡率高	

熱原檢驗

USP <151> (Pyrogen test 熱原試驗) mentions that : "A validated, equivalent in vitro pyrogen or bacterial endotoxin test may be used in place of the in vivo rabbit pyrogen test,where appropriate."



MAT (monocyte activation test 單核細胞活化試驗) was mentioned by FDA guidance for industry in 2012 as an alternative method for Pyrogen Detection

內毒素檢驗

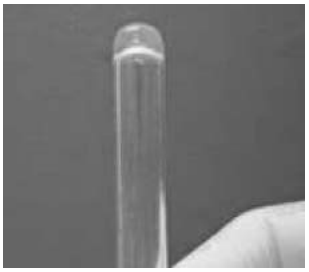
Recognized LAL (鱟Limulus Amebocyte Lysate)methodologies in the pharmacopeia:

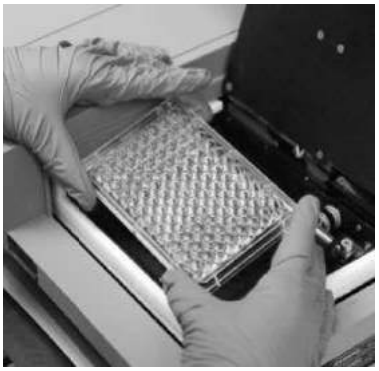
- Gel clot (limit) test 凝膠（限量）試驗
- Chromogenic endpoint test 呈色終點測試
- (Turbidimetric endpoint test) 比濁終點測試
- Kinetic chromogenic test 動力呈色試驗
- Kinetic turbidimetric test 動力濁度測試

USP <85>：
當結果有疑問或爭議時，最終是以凝膠限量測試(Gel-clot limit test)來判定，除非在測試產品的專論中另有說明。

內毒素檢驗

- Gel clot (limit) test & Chromogenic test
- Incubate the reaction mixture at 37 ± 1 ° for 60 ± 2 minutes, avoiding vibration.





Bacterial Endotoxin Limits

- Calculation (for Pharmaceuticals)

  Endotoxin Limit = (K / D) Potency

  K= max. allowable endotoxin exposure 5 EU/Kg/Hour

  D= max. human dose

  Potency = drug concentration

  Example: Endotoxin limit calculation

  Dose: 2 units/kg Potency: 100 units/mL

  (5 EU/Kg / 2 units/Kg) 100 units/mL =250 EU/mL
- Maximum Valid Dilution (MVD) = Endotoxin Limit/ λ

  Example:

  Lysate Sensitivity=0.06 EU/mL Endotoxin limit = 3.0 EU/mL

  3.0/0.06=50 λ is equal to Label claim for gel clot lysate

Bacterial Endotoxin Limits

REAGENTS AND TEST SOLUTIONS

1. Amoebocyte Lysate
2. Water for Bacterial Endotoxins Test (BET)
3. Pyrogen Free (Lysate- Reagent-Water)
4. Reference Standard Endotoxin (RSE)
5. Control Standard Endotoxin Solutions (CSE)
   (E.coli O55:B5; E.coli O113:H10).

A. Test for Confirmation of Labeled Lysate Sensitivity
   確認試劑標示及操作人員
B. Test for Interfering Factors –
   I/E Test (inhibition and enhancement抑制/促進測試)
   先期測試證明樣品無干擾物質的存在，測試三批。
C. Routine Test

Gel Clot – Confirmation of Label Claim

- The result must be within a two-fold dilution of the label claim (i.e. between 0.5λ and 2λ)
- **Example:**
  - Sensitivity=0.06 EU/mL
  - (Log0.06+ Log0.06 + Log0.06 + Log0.06)/4= **0.06** EU/mL
  - The antilog of the results gives 0.06 EU/mL
  - Permitted range 0.03 to 0.12 EU/mL
  - Result: Reagents /meets the requirements

Replicate	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	N.C.
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-

內毒素檢驗

Solution	Endotoxin Concentration/ Solution to Which Endotoxin Is Added	Number of Replicates
A:Sample solution (Unspiked)	None/Diluted Sample Solution	2
B: Positive Control	2λ/Diluted Sample Solution	2
C: Positive Control	2λ/Water for BET	2
D: Negative Control	None/Water for BET	2

判定：

- 若Unspiked Samples不凝集，則表示這批產品其Endotoxin 含量未超過限制。
- 若Unspiked Samples凝集，則這批 產品須進行再測試 (Retest)。

內毒素檢驗的替代方法

- 美國食品和藥物管理局（FDA）-
  2018年11月8日已批准使用重組因子C （ rFC ,Recombinant Factor C ）測定內毒素檢測的第一種藥物。已被用於禮來藥廠（ Eli Lilly）的Emgality™（galcanezumab）的內毒素檢測，這是美國批准的第一種藥物。使用這種方法代替傳統LAL的方法（鱟Limulus Amebocyte Lysate）。
- 重組因子C進行內毒素檢測，是使用從馬蹄蟹血液中獲得的裂解物作為其主要成分。使用重組產物將大大降低對物種的壓力，有助於確保馬蹄蟹物種的可持續性。
- rFC檢測方法已被收錄到歐洲藥典指導原則（5.1.10節）作為LAL檢驗的有效替代方法。
- 某些產品無法測試：血液製品細胞產物、蛋白質、脂質、氫氧化鋁佐劑（常見於疫苗）。

二、ATMP常用藥典檢驗方法之確認

藥典檢驗方法之確效

- USP<1225> Validation of Compendial Procedures

  藥典程序之確效：

  “分析程序的確效，是通過實驗室研究確定程序的性能特性滿足預期分析應用的要求的過程。”

- ICH

  “驗證分析程序的主要目的是證明該程序適合其預期目的。“

- USP<1226> Verification of Compendial Procedures

  “首次在實驗室中使用品質分析程序時，不需要驗證這些程序，但應在實際使用條件下建立適用性的書面驗證，此要求在在美國21 CFR 211中確定。” 194（a）（2）現行的“優良製造規範GMP”條例，其中規定“所有使用的測試方法的適用性應在實際使用條件下進行驗證”。

藥典檢驗方法之確效

- FDA的藥品品質控制實驗室檢查指南：

  “USP的方法是被認為經過確效，如果是經批准ANDA的一部分，則認為它們已經過確效”。“對於藥典方法，必須證明該方法在實際使用條件下有效”，即必須證明該方法適用於實際使用條件。

Validation and Verification

關於分析方法何時應該進行確效(Validation)以及何時應該驗證(Verification)存著一些困擾。

- 對於確效(Validation)和驗證(Verification) ，必須記住該分析方法的基本目的。
- 如果該方法來自藥典(pharmacopeia)，並且旨在用於證明藥典藥品符合專論 (monograph)要求，該方法被認為是有效的(Validated)。
- 但是有必要驗證 (Verify)該產品是否適合於該方法測試。
- 如果該分析方法不是來自藥典，是為了滿足專論(monograph)要求，則必須提供有效的確效(Validated)，結果與藥典方法獲得的結果需相同。

Validation & Qualification

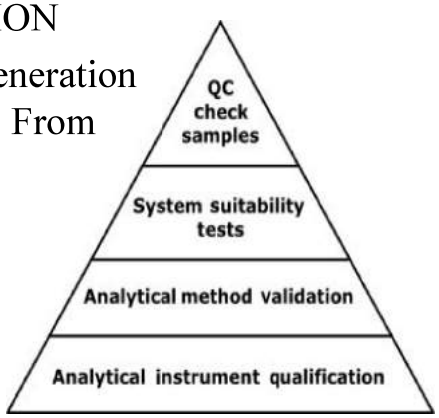
- 法規指導：ICH 、 FDA指導文件和USP章節<1225>的確效原則和藥典藥品的微生物回收確效<1227>。
- 確效活動：包括風險評估、培訓和人員資格認證、設備和設施3Q資格驗證、分析方法確效、滅菌確效、製程確效和清潔確效。
- 製程確效Process validation：安全性safety、一致性consistency、穩健性robustness、和最終產品品質。
- 無菌製程確效 使用微生物培養基進行，證明生產無微生物污染的產品。
- 分析方法確效 用於評估分析程序。
- 應考慮到細胞或組織療法的來源細胞和組織中的生物學變異的可變性，應確保關鍵製程和終點放行測試都符合規格。
- 應建立合格人員QP培訓計劃。
- 並進行組織和產品的運輸確效。

Quality Data

USP<1058>

ANALYTICAL INSTRUMENT QUALIFICATION

- "...four critical components involved in the generation of reliable and consistent data (quality data)." From most to least critical, the components were
  - quality-control check samples,
  - system suitability tests,
  - analytical methods validation, and
  - analytical instrument qualification.
- System-suitability tests to be the same as verification.



微生物檢驗方法

Microbiology Method	Preparatory Tests		Routine tests		
Microbial Examination of Non-Sterile Products	Growth/ Inhibitory	Suitability	Blank	Positive/ Negative	
Bioburden	Growth/ Inhibitory	Suitability	Blank	Positive/ Negative	
Environmental Monitoring	Growth		Blank	Negative	
Media Fill	Growth		Blank	Positive/ Negative	
Sterility Testing	Growth	Suitability	Blank	Positive/ Negative	Stasis* test
Bacterial Endotoxin Testing	Lysate Sensitivity**	I/E test***	Blank	Positive/ Negative	Spiked/ Unspiked
Mycoplasma	Vero cells	Suitability	Blank	Positive/ Negative	

*Stasis: Bacteriostasis/Fungistasis Test，**Labeled Lysate Sensitivity，
***I/E: Inhibition and Enhancement Test

VALIDATION OF MICROBIAL RECOVERY FROM PHARMACOPEIAL ARTICLES

- 確效(Validation)研究必須證明兩個標準：
  - 中和劑功效：中和的方法在抑制產品中抗微生物物質是有效。
  - 中和劑無毒性：不會損害活微生物的回收。
- 三種常用於中和抗微生物物質方法：化學抑制、稀釋和過濾洗滌。
- 平板計數法70%回收：瓊脂培養基上和通過膜過濾的回收。
- 微生物生長法：液體培養基中微生物大量生長的回收。
- 通過比較三個不同測試組之間的回收率，驗證方案可滿足方法確效研究的兩個標準：
  - 中和測試組：中和後的樣品加入挑戰試驗菌種(<100 cfu)。
  - 緩衝液對照組：緩衝液中加入挑戰試驗菌種(<100 cfu)。
  - 接種生長對照組：僅加入挑戰試驗菌種(<100 cfu)

Reference: USP<1227>Validation of Microbial Recovery From Pharmacopeial Articles

VALIDATION OF MICROBIAL RECOVERY FROM PHARMACOPEIAL ARTICLES

確認試驗之項目		試驗特定條件					確認項目的比對		
		培養基	清洗液	濾膜	檢品	菌液	**中和功效**	**無毒性**	**回收率**
培養基空白試驗Blank		●							
陰性對照Negative Control		●	●						
實驗環境的監測		●							
1	測試組：檢品微生物回收 microbial recovery	●	●	●	●	●	●		●
2	緩衝液對照組：無檢品 Buffer solution control group	●	●	●		●	●	●	
3	接種生長對照組 the viability group (inoculum control)	●				●		●	●
說明	**中和功效**：比對後確認檢驗方法對於檢品中抑菌力的中和功效。 **中和之毒性**：比對確認檢驗方法或檢驗程序對微生物生長無毒性未減 少微生物的存在 **回收率**：比對後確認檢品和檢驗方法對於微生物回收無抑制作用存在(>70%)。								
	Reference: USP37 <61>, <62> &<1227>								

替代測試方法
Alternative Test Methodologies

- 放行規格：細胞為主的醫療產品，最終放行規格須經Sterility、Mycoplasma, 和 Endotoxin測試。 (FDA)
- 測試的限制：測試所需的樣本體積大小、測試所需時間長短或超過產品的有效期限。
- 測試方法的調整：最終產品必需符合的放行標準，大多數測試程序及基本方法會因為產品而有特別差異，測試方法可以進行適度調整，以滿足細胞產品的特定特徵和應用。
- USP<1223> Validation of Alternative Microbiological Methods

替代測試方法
Alternative Test Methodologies

- USP一般通告6.30：

  “如果它們在準確性、靈敏度、精確度、選擇性或對自動化或計算機化數據減少的適應性方面或在其他特殊情況下提供優勢，則可以使用替代方法。這些替代方法應經過確效驗證.....並且必須顯示出相同或更好的結果.....“

- 2011年，FDA CDER發布了*A Regulators View of Rapid Microbiology Methods* 並指出，

  “雖然解決每個確效參數很重要，但用戶可能沒有必要自己完成所有工作。對於某些驗證參數，*Rapid Microbiology Methods* 供應商更容易執行確效實驗 “。

檢驗方法驗證標準
Method Validation Criteria

驗證標準 Validation Parameter	定量方法 Qualitative	定性方法 Quantitative
準確度 Accuracy	是	否
精度 Precision	是	否
特異性 Specificity	是	是
檢測限 Limit of Detection	是	是
量化限制 Limit of Quantification	是	否
線性 Linearity	是	否
範圍 Operational (dynamic) range	是	否
堅固 Robustness	是	是
重複性Repeatability	是	是
堅固耐用 Ruggedness	是	是
等效/比較測試 Equivalency	是	是

快速微生物學方法的實施

- USP / EP / JP調和的無菌試驗和快速固相細胞計數方法進行比較，該方法在水溶液中接種低濃度下存活微生物的檢測限。
- 評估了7種藥典指定微生物，包括產孢梭菌、大腸桿菌、銅綠假單胞菌、金黃色葡萄球菌、枯草芽孢桿菌、黑曲霉和白色念珠菌，以及革蘭氏陽性厭氧菌痤瘡丙酸桿菌。
- 使用最可能數量方法(MPN)估計具有存活力生物的數量，採用快速方法和常規無菌測試方法。計算兩種方法之間的平均差異，估計平均差異在95%周圍的可信區間。
- 在所評估的所有微生物的檢測極限方面，發覺快速方法在數值上較優於且在統計學上不差於藥典（USP / EP / JP）之無菌試驗。

Reference : European Pharmaceutical Review

IQ
- **Qualification of installation**
- **Done by supplier, Finished and fulfilled**

OQ
- **Operational Qualification**
- **Done by supplier, Finished and fulfilled**

PQ
- **Performance Qualification**
- **Done by supplier, Finished and fulfilled**

PQ 1
- **Validation with Model with microorganisms and without product.**
- **Done by supplier, Finished and fulfilled**

PQ 2-1
- **Suitability Test : product versus alternative method**
- **Done by , Ordered by the customer**

PQ 2-2
- **Comparability testing with both methods on one product**
- **Done by , After a successful PQ 2-1**

問題討論

再生醫療（ATMP）GMP評鑑符合性管理制度之推動與趨勢研析

偏離規格處理
（Out Of Specification ,OOS）

主講人：蕭學英

偏離規格處理

- “21世紀藥品CGMP”倡議，鼓勵採用現代化製造、監測和控制方法來提高過程的可預測性和效率。
- 過程分析技術（PAT）採用不同的品質保證方法，使用製程控管和製程中數據作為產品放行規範，而不是只單依靠實驗室做出批次可接受性決策。
- 這些藥品實驗室測試和放行方法是測試原料藥物、賦形劑和其他成分、製程中材料和成品藥物上進行，達到GMP規範。
- 需科學合理的執行原料藥測試、製程監測、產品放行和安定性測試、製程確效，以及從這些測試中獲得的任何OOS結果需充分調查。

FDA:Guidance for Industry

偏離規格處理, OOS

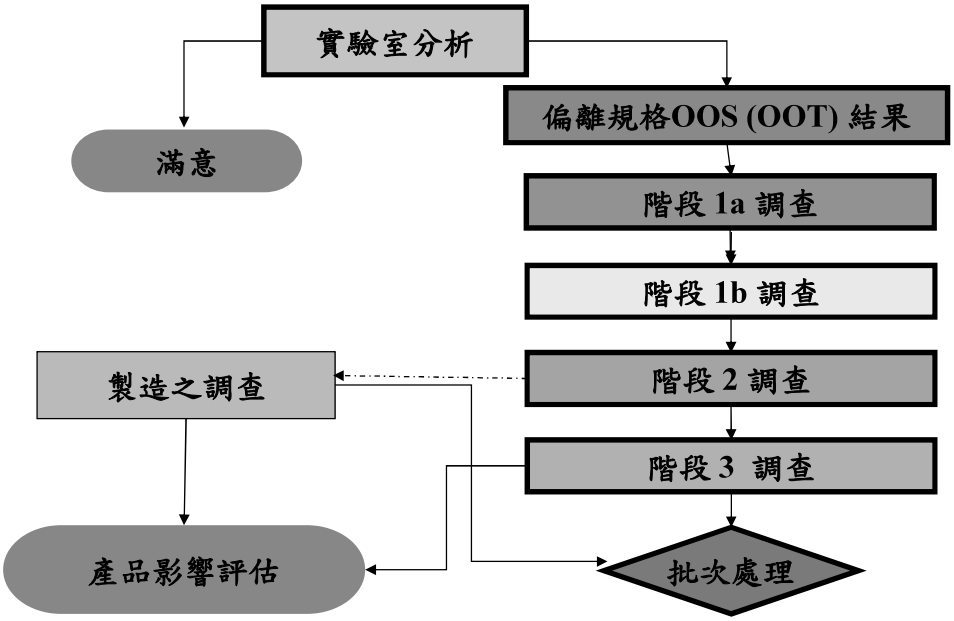
- 最初的OOS結果並不意味著該批次失敗，且必須被拒絕。 應對OOS結果進行調查，調查結果（包括重新測試結果）應解釋評估和說明，通常QC負責解釋調查結果。
- 做出有關該批次放行或拒絕的決定。
- 通常是關注於化學分析的角度。
- 對於微生物學測試的偏差(MDD Microbial Data Deviation Investigations。
- 有一些關於以下微生物學測試之數據偏差調查的指導。
  - Sterility tests
  - Microbial limits tests
  - Bacterial endotoxin test
  - Antimicrobial efficacy test.

108TPDA04014

偏離規格處理, OOS

- “規格是為了確認原料藥和藥品的品質，而不是為建立完整的特性，並應關注那些有助於確保原料藥和藥品安全性和有效性的特性。”（ICH，2001）
- 必須思考如何評估超出規格（OOS）的測試結果。
- 如何調查OOS測試結果，包括：
  - 實驗室人員的責任、
  - 實驗室階段的調查，
  - 可能需要的額外測試、
  - 何時擴大實驗室外的調查，
  - 以及所有測試結果的最終評估。

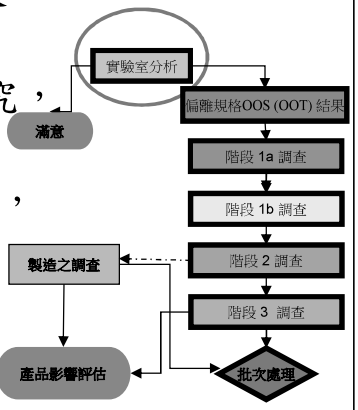
偏離規格處理流程圖
(Out Of Specification ,OOS)



實驗室分析

“超出規格（OOS）/趨勢（OOT）/非典型結果”
當發生以下情況時，必須進行調查：

- 批量放行測試和起始材料測試。
- 製程控制測試：如果數據用於批量計算/決策，如果用於檔案和分析證書。
- 市售批次成品和/或原料藥(API)的安定性研究，持續/後續安定性（無壓力測試）
- 之前放行的批次用作OOS調查中的參考樣本，顯示出OOS或可疑結果。
- 用於臨床試驗的批次。



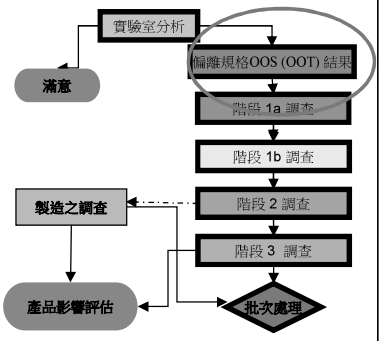
實驗室分析

- 應保留所有溶液和試劑，直到所有數據都經過第二人驗證，符合規定的驗收標準。
- 藥典對特定測試的額外附加分析具有特定標準，例如:
  - 溶離試驗(dissolution)S1、S2和S3規格;
  - 劑量單位之均勻性(Uniformity of dosage units)20個單元用於額外附加測試的規格;
  - 無菌試驗。
- 樣本測試標準通常是第一級測試，當樣本必須測試到下一級別時，因為它沒遵循正常趨勢，則應進行調查 。

偏離規格OOS / 趨勢OOT的結果

偏離規格 Out-of-Specification(OOS)的結果 -

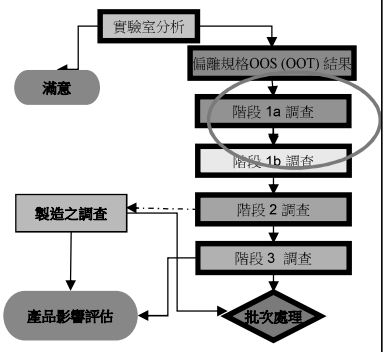
- 測試結果不符合預先既定的允收標準（例如，提交申請、藥物主文件、批准提交上市、藥典或內部驗收標準）。
- 測試結果超出在藥典和/或公司文件（即原料規格、製程中/最終產品測試等）中既定的驗收標準。



偏離規格OOS / 趨勢OOT的結果

偏離**趨勢** Out of Trend (OOT)的結果 –

- 通常安定性結果往往會不符合預期趨勢。
- 起始材料和製程中樣品的趨勢也可能產生超出趨勢的數據。
- 結果不一定是OOS，但不是典型的數據。
- 在進行製造環境的趨勢分析，例如可活性和非活性的數據（行動限制或警告限制趨勢）



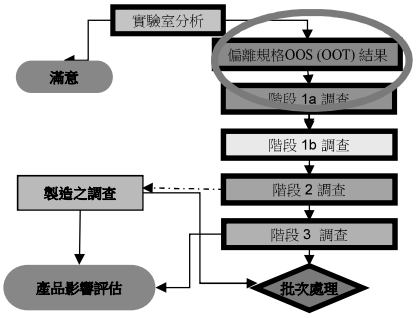
108TPDA04014

偏離規格OOS / 趨勢OOT的結果

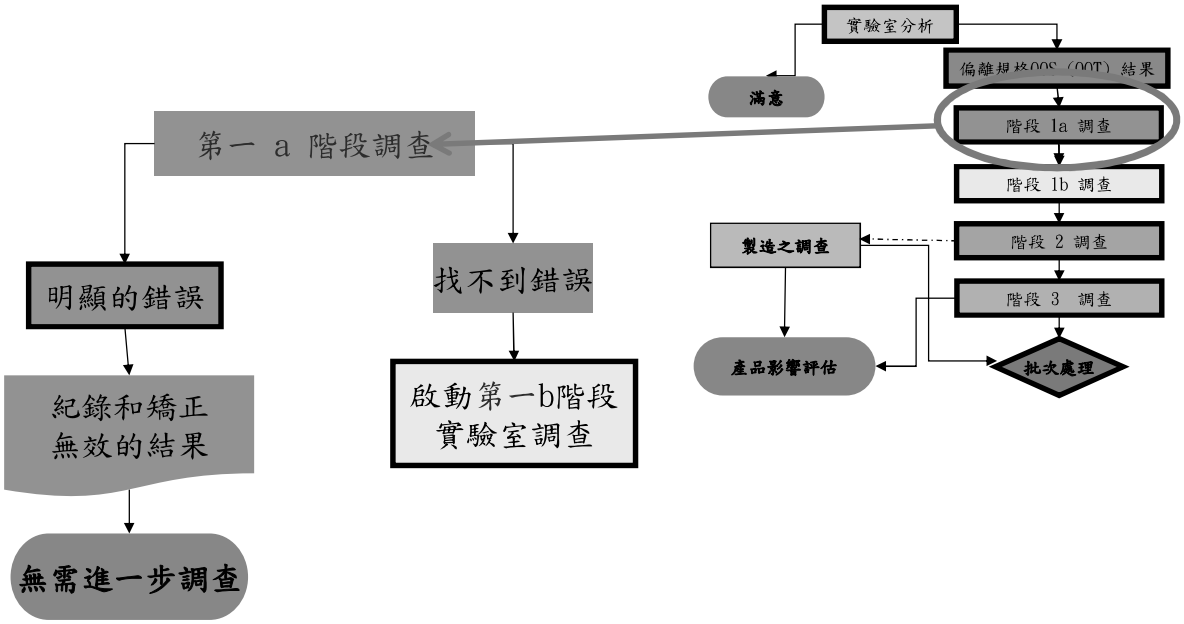
非典型/異常/異常結果

Atypical / Aberrant / Anomalous -

- 結果仍在規格範圍內，但是是意外、可疑、不規則、偏離或不正常。 例如色譜圖顯示出意外峰值，安定性測試點的意外結果等。



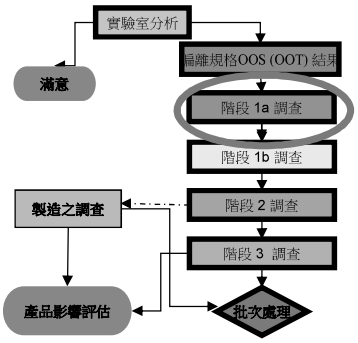
第一 a 階段調查



第一 a 階段調查 - 定義

定義：

- 第一 a 調查是為了確定是否存在由於外部環境（如電源故障）或分析人員在生成數據前檢測到明顯錯誤，例如溢出樣本將不需進行 b階段調查。
- 對於微生物分析，這可以在完成分析進行樣品審查評估之後進行。
- 即使沒有提出實驗室調查 Ib或 II，預計這些問題也會趨向於趨勢。



第一 a 階段調查 - 明顯錯誤

例如：

計算錯誤 - 分析人員和主管審查，初始和日期更正。

停電 -分析人員和主管記錄該事件，註明“電源故障;需重新分析“於所有相關分析文件。

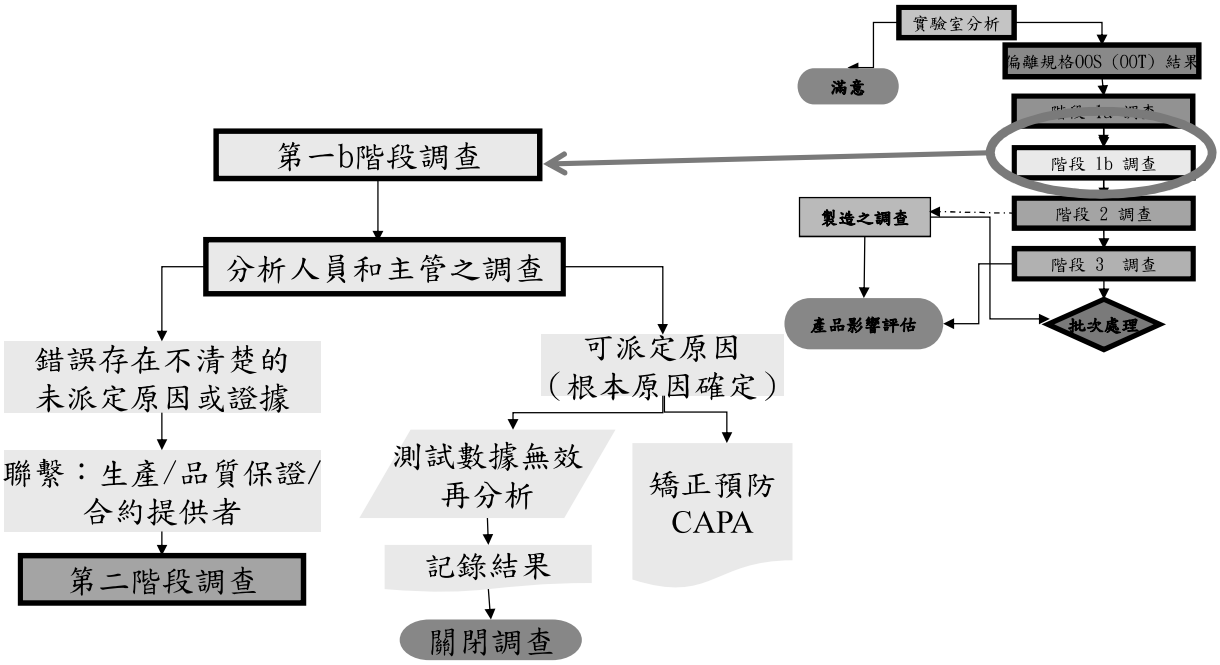
設備故障 -分析人員和主管記錄該事件，註明“設備故障;需重新分析“，並交叉參考維護記錄。

測試錯誤 - 例如，樣品溶液溢出，樣品移液不完整;分析人員必須立即記錄。對於微生物學測試，它可能是在非測試樣品區域的平板上生長，陰性或陽性對照失敗。

儀器參數不正確 - 例如，將檢測器設置在錯誤的波長，分析員和主管記錄該事件，註明“不正確的儀器參數; 需重新分析“於所有相關分析文件。

如果沒有上述情況或發現錯誤，則必須進行一、b階段調查。

第一 b 階段調查



第一 b 階段調查 -定義

規格定義–

- 測試項目的列表，參照分析程序和數字範圍或所述的其他允收標準。
- 原料藥、藥品或其他原料應符合其製造的預期用途可接受的允收標準。
- “符合規格”是指原料藥和藥品按照所列分析程序進行測試時符合允收標準。
- 規格是由製造商提出並證明是合理的關鍵品質標準，並經監管機構批准作為核准條件。

法規批准的規格 –

放行的測試規格。如果尚未建立放行規格，則內部規格將成為放行規格。

允收標準 –

接受分析程序結果的數值限制，範圍或其他合適的措施

藥物、藥品或在各個製造階段的其他原料都應符合允收範圍。

內部規格 – 法規規格也同時是行動標準。

第一 b 階段調查 -定義 繼續

無效的測試 – 當調查確定OOS或可派定原因的異常結果時，測試被視為無效。

可報告的結果 –是從原始樣本按書面批准測試方法完整執行得出最終的分析結果。

警告級別或趨勢偏移 –

- 兩個或多個連續樣本超過警告（警報alert）
- 短期內確定計數增加。
- 確認到相同的生物體。則應將結果視為行動水準偏移。

假設/調查測試 –

- 進行相關測試以幫助確認或減少可能的根本原因：例如，進一步測試樣品在過濾、超音波處理/萃取和潛在的設備故障等。
- 可探索多個假設。

矯正預防措施
Corrective and Preventive Actions (CAPA)

矯正預防 (CAPA)

- 偏差：發生偏離作業標準、參數、規格、界限值等。
- 矯正措施Corrective Actions
  針對已經發生並確認之偏差原因所採取消除的措施。
- 預防措施Preventive Actions
  針對潛在可能發生之偏差原因所採取的措施。

分析人員和主管之調查

第一、b階段調查 - 分析員和主管使用實驗室調查表進行初步調查。

- 聯繫生產/合同提供者/ 合格人員(QP) /營銷授權持有人 (MAH,Marketing authorisation holder)。
- 微生物分析一旦確定可疑結果，確實保留所有與測試失敗相關的項目，例如：其他環境監測培養皿、稀釋液、安瓿/小瓶產品、溫度數據、自動移液器、試劑 - 生長培養基。在完成調查之前，不應銷毀任何相關的環境監測培養皿。
- 分析員和主管調查應僅限於數據/設備/分析審查。
- 進行用於支持調查的假設測試計劃需記錄。假設測試可包括原始的工作儲液，但不包括其他試液。

分析人員和主管之調查 繼續

調查表是很好的指導方針，應涵蓋實驗室調查需要涵蓋的全部領域：

- 正確的測試分析方法，例如：SOP版本號。
- 採集/測試正確的樣品（檢查標籤是從正確的地方採集）。
- 保持樣品完整性，正確的容器和監管（是否存在異常事件或問題）。
- 測試前樣品容器如何儲存。
- 採用正確的取樣程序，例如取樣SOP版本號。
- 評估在測試/重新測試過程中樣品污染發生的可能性。
- 測試中使用的所有設備都在校準日期之內。
- 審查設備使用日誌。
- 分析中使用適當的標準品。
- 標準品和/或控制品按預期執行。
- 符合系統適用性條件（分析前和分析期間）。
- 使用正確和乾淨的玻璃器皿。
- 使用正確的移液器/容量瓶體積。

分析人員和主管之調查 繼續

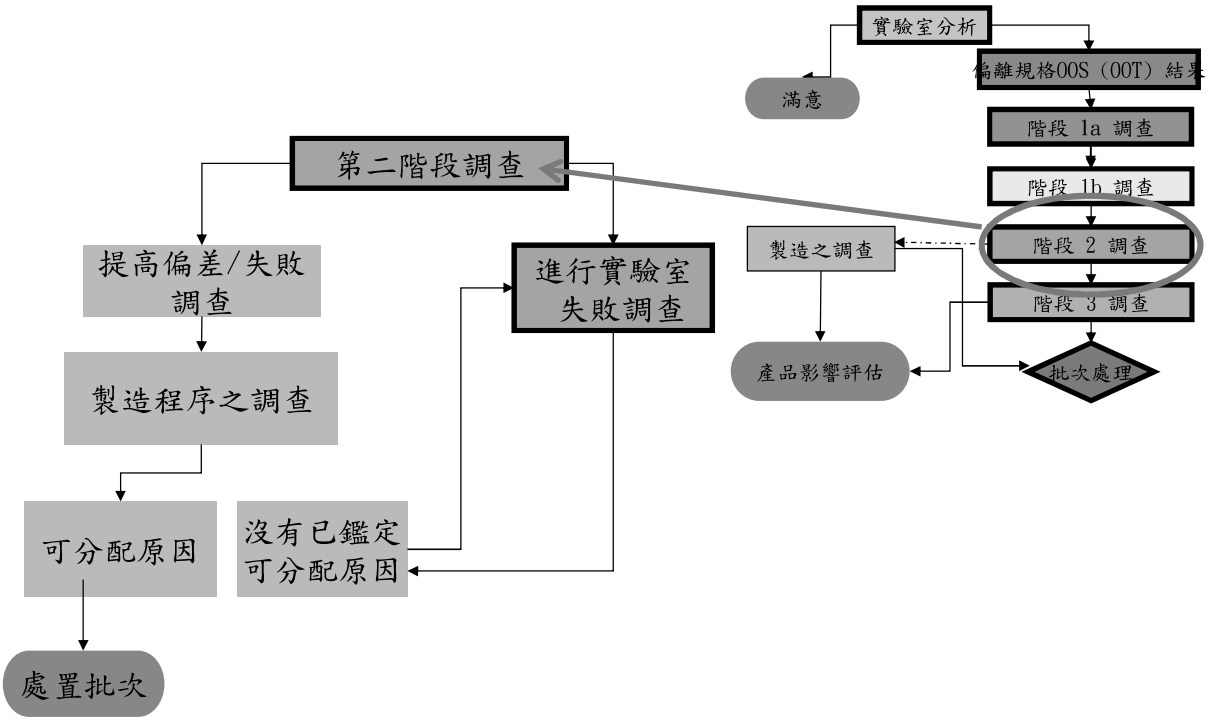
- 應用正確的規格。
- 根據程序準備的培養基/試劑。
  - 物品在有效期限。
  - 目視檢查（固體和溶液）顯示正常或異常外觀。
- 符合數據允收標準。
- 分析人員接受了該方法的培訓。
- 訪問分析員評估正確程序的知識。
- 檢查原始數據，包括色譜圖和光譜; 任何異常或可疑的峰值或數據。
- 這項測試先前的任何問題。
- 在測試時發生的其他潛在干擾測試/活動。
- 在進行測試時，該區域內的環境溫度/濕度有任何問題。
- 檢查在同一分析集中執行的其他批次的其他數據。
- 考慮在被測材料批次上獲得的任何其他OOS結果。
- 方法驗證的評定。

分析人員和主管之調查 繼續

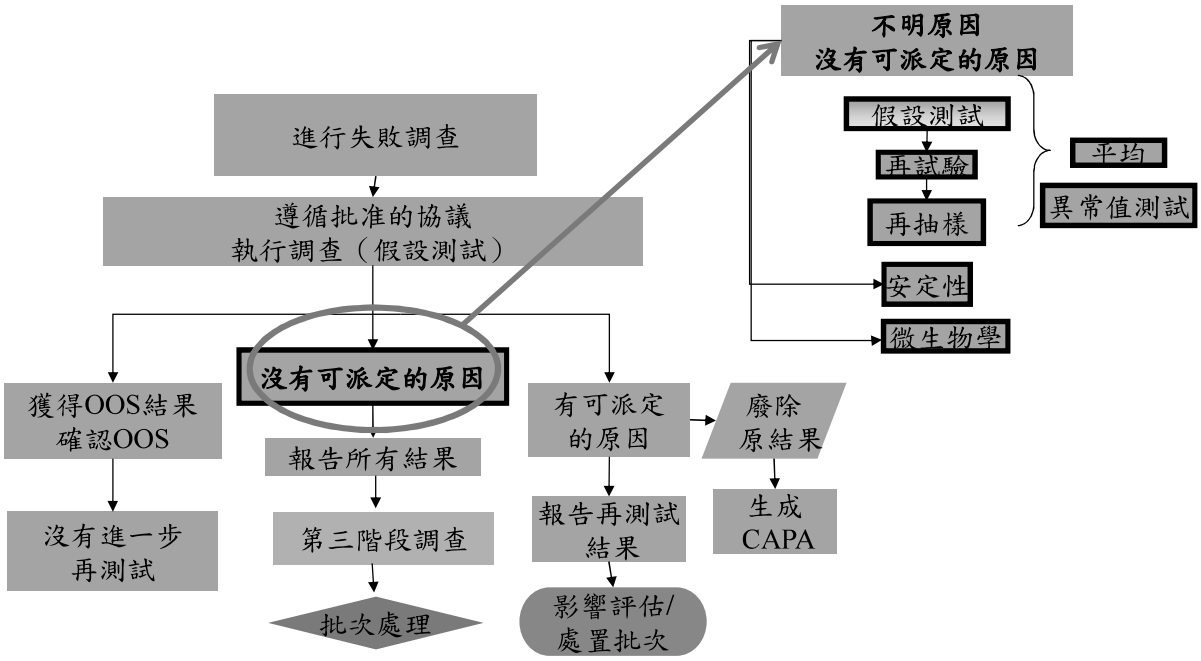
微生物分析的其他考慮因素：

- 是否按預定放置隔離物品 - 手套、濾膜等。
- 瓊脂培養基是否完整 - 即培養皿沒有裂縫。
- 是否存在其他測試（或相關測試）的交叉污染，包括環境監控。
- 陰性和陽性對照結果是否令人滿意。
- 是否使用了正確的培養基/試劑。
- 樣品是否完整不洩漏。
- 測試前樣品/培養基/試劑在使用前是否保持在正確時間內和正確存放（冷藏）。
- 培養條件是否適當。
- 在判讀時拍照以記錄樣品結果（包括培養皿、革蘭氏染色和任何可能相關的其他東西）。

第二階段調查



第二階段調查



第二階段調查

第二階段調查

- 在第一階段調查未發現實驗室可指出的錯誤時進行。
- 第二階段調查由針對假設的書面和批准指示驅動。
- **在進一步測試之前，應開始進行製造調查，以確定是否在製造上可能存在根本的原因。**
- 如果在製造現場應與生產和QA一起通知合格人員QP。
- 當執行額外測試時，要使用預先定義的再測試計劃去執行，由第二位一樣經驗豐富合格的分析員執行重新測試。
- 如果調查確定分析人員錯誤，則應調查使用相同技術的相關分析人員所執行的所有分析。

第二階段調查 - 定義

- 假設/調查測試 Hypothesis/Investigative Testing –

  進行測試是為了幫助確認或減少根本原因，即可能發生的可測試的事件： 例如，可能有關樣品過濾、超音波處理/萃取的進一步測試; 和潛在的設備故障等。
- 重新測試 Re-Test -

  如果原始樣品和材料沒有受損/或仍可用，則用來執行再次測試。
- 重新抽樣 Re-sample -

  應盡可能使用原樣品容器中的新樣品，除非原始樣品中剩餘材料不足或原始樣品證明完整性存在問題。
- 最可能的原因 Most probable cause -

  科學合理地確定，結果似乎是實驗室錯誤。

第二階段調查- 未知/ 無派定原因

假設測試 Hypothesis Testing（適用第一、a和第二階段）：

- 如果第一、a階段找不到可派定的原因，則繼續進入第二階段。
- 在開始假設測試之前，應編寫測試說明，然後由QA / Contract Giver / QA等批准。研究測試要求：
  - 必須描述完整記錄。
  - 被假設測試調查的根本原因。
  - 將測試哪些樣品。
  - 確實執行測試。
  - 如何評估數據
- 可以從原始製備重新繼續假設測試。
- 假設測試不得用於替換原始可疑的分析結果。 僅能用於確認或減少可能的原因。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

因為在製造調查或失敗分析調查中無法確定可解釋結果派定原因，所以考慮重新測試。

重新測試：

- 使用原始樣品可以是第二等分試樣，因為它是失敗的原始根源。
- 如果原始樣品不足，則必須通過QA / Contract Giver / QA等同意重新取樣並記錄在調查中。
- 測試應基於合理的科學判斷來決定，並預先批准測試計劃。
- 測試的最低數量應以科學合理的原則為基礎，並記錄在程序中。
- 關於%RSD和重複性的統計評估應與方法驗證獲得的值（準確度、精確度和中間精度accuracy, precision, and intermediate precision）相關。
- 測試的數量在統計上應該要有效 。
- 測試應由同樣經驗豐富並且合格的不同分析員執行。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

平均值：

- 平均值的有效性取決於**樣本**及其**目的**。使用平均值可以提供更準確的結果。
  例如，在微生物測定的情況下，由於微生物測試系統的先天可變性而使用平均值。
- 當測試旨在測量產品內的可變性時，例如粉末混合物/混合物均勻性或劑型含量均勻性(dosage form content uniformity)，不能使用平均值。
- 平均值具有隱藏各個測試結果之間的可變性的**缺點**。因此，通常應將所有單獨的測試結果報告個別的值。
- 在某些情況下，報告對結果可變性的統計處理。如劑型含量均勻性測試，標準偏差（或相對標準偏差RSD ）與個別單位劑量測試結果一起報告。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

平均值（繼續）：

- 在OOS調查期間進行的額外測試下，調查的原始測試結果以及在OOS調查期間獲得的再測試或重新採樣結果，採平均是不合適的，因為它會隱藏了各個結果間的變異性。 當某些結果是OOS而其他結果符合規格時，這些數據的平均值特別容易產生誤導。
- 實驗室應提供所有單獨的結果，供品質保證QA/合格人員QP進行評估和考量。
- **所有測試結果應符合規格（注意：必須製備一批，目的是提供活性成分不少於100%的標示值或確定量的內部對照）。**
- **採用平均值必須在測試方法上指定使用**。
- 考量平均值的95%可信度（CL 95%），將在使用平均時顯示變異性。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

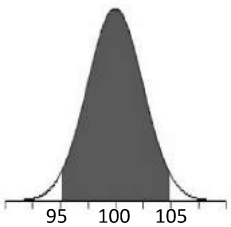
平均值（繼續）：

- 考慮使用平均值的95%可信限度（CL 95%）將顯示使用平均值時的可變性。
- 可信區間由公式計算：CL=平均值$\pm t_{95\%}$標準差/√樣本量
  - t是從表中獲得的值
  - n是樣本量

例：平均值為100，標準差為6樣本量為9的平均值的抽樣分佈是多少？

上限CL = 100 + 2.26*(6/√9) = 104.5

下限CL = 100 – 2.26*(6/√9) = 95.5



常態分佈圖

n	$t_{95\%}$
2	12.71
3	4.30
4	3.18
5	2.78
6	2.57
7	2.45
10	2.26
20	2.09
120	1.98
∞	1.96

平均值（範例）

例如：成品藥物的規格為90%至110%的測定

	最初	額外再測試		平均值	
藥品一	89%	90%	91%	90%	平均值符合規格，測試結果仍傾向於確認原始的OOS結果
藥品二	80%	85%	105%	90%	結果不能確認原始OOS結果，但顯示出高度可變性並且可能不可靠。
上述兩個例子，應該使用單獨的結果而不是平均值來評估產品的品質。					

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

再抽樣：

- 很少發生。
- 如果原始樣品的數量不足以進行進一步測試，則必須通過QA / Contract Giver / QP等同意重新取樣並記錄在實驗室調查中。
- 應使用與最初樣品相同合格的方法重新取樣。 但是，如果調查確定最初抽樣方法有誤，則應制定新的正確抽樣方法，合格取樣並記錄。
- 從批次中收集新樣本。
- 當發生原始樣品無法代表該批次或在其準備中存在記錄/可追踪的實驗室錯誤時。
- 證據顯示原樣本已是無效。
- 如果要進行重新抽樣，則必須採用合理的科學依據。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

異常值測試 Outlier test ：

- 異常值可能是來自規定測試方法的偏差或可能是樣本變異的結果， 即可能是被測試樣本中固有的變異性。
- 異常值測試結果的統計分析可以作為調查和分析的一部分。 然而，對於經驗證過的化學測試具有相對小的差異值，樣本被認為是同質的，則不能用來合理的去拒絕數據。
- 雖然OOS指南並非直接用於生物測定分析，但它可以作為調查的起點。 BP、PhEur 和USP等藥典為這些類型的分析異常值提供指導。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

微生物調查：

- 微生物調查通常難以進行，因為結果可能在進行分析後1至2週，並且可能在批次製造後數週才取得。
- 仔細評估測試條件並確定樣品/產品/製造區域的界限是非常重要。如無法確定可疑結果的界限，則很難確定一個或多個批次是否受影響。
- 實驗室和生產製造需要更深入的調查。
- 調查應明確說明假設和誰將負責鑑別的任務。
- 是否是預期類型的生物，確定可能的來源 - 是否能找到它存在的地方？
- 培養基的評定- 內部製備或購入預製備的、供應商來歷、滅菌過程。
- 使用的設備/設施 – 確效、維護和清潔狀態。
- 評估測試區域和支援區域的區域/環境變化趨勢。
- 測試環境的清潔和維護。
- 使用的消毒劑。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

微生物調查（繼續）：

- 使用適當的根本原因分析來幫助腦力激盪出所有可能性。
- 可能存在多個根本原因。
- 審查根據任何新資訊採取的決定和行動。
- 由於微生物結果的可變性，不僅限對特定批次調查而應更廣泛地審查歷史結果和趨勢。
- 應包括不尋常的事件以了解潛在的影響。
- 進行再分析的理由是什麼(樣品是否剩餘); 再測試或再取樣。
- 任何鑑定可能需要達到DNA / RNA水準（生物負載測試失敗時）。
- 需要考量所有潛在的污染源 -製程上的問題從樣品存儲到測試環境。
- 使用科學的決策/理由和基於風險的分析。
- 調查應包括與製造團隊密切合作者。
- 在調查期間去了解污染發生的地方是有幫助的。

108TPDA04014

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

微生物調查（繼續）：

- 詢問工廠關於發生現場如何清潔、檢查其完整性、磨損情況、材料適用性和維護發生現場，可能會發現可能的原因。
- 在可能的情況下直接與相關工作人員訪談，因為從化學家/微生物學家的角度來看，可能會發掘一些遺漏的訊息。
- 查看其他文件，例如受關注區域周遭內的偏差和工程通知（這適用於實驗室和製造部門）。
- 趨勢可以有物種的變動，這可能值得採取行動標準方式的調查。
- 微生物學的統計分析可以包括許多零的結果，因此回收率或類似的可能必須使用。
- 如果樣本無效則需要仔細考慮剩餘的保證水準，是否有足夠的剩餘資訊？
- 糾正行動可能適用於多個根本原因。

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

安定性Stability - OOS / OOT：

- **安定性的OOS / OOT情況應在發現可疑結果後立即升級。按照上述第一階段和第二階段的調查。對於OOS情況將要求在發現的最短時間內通知監管機構因為可能會要召回。**
- 在任何安定性測試時間點發現異常結果，有可能是下一個測試點之前的OOS，則在下一個計劃時間點之前安排額外的測試。這有助於確定採取適當行動。
- 安定性OOS應鏈結到產品召回程序。

OOT

- 為了便於快速識別潛在問題並確保數據品質，使用統計方法有利於快速檢測潛在趨勢外（OOT）的安定性數據。
- OOT警報分為三類：分析、製程管控和合規警報，以幫助確定適當的調查深度。

108TPDA04014

階段 II 調查- 未知/ 無派定原因

安定性 Stability ：

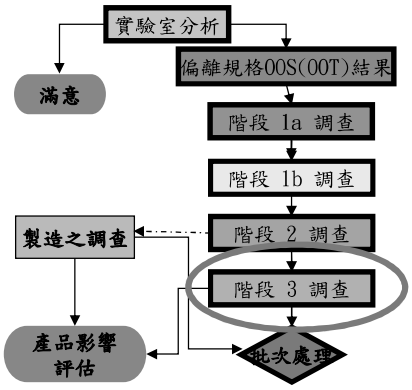
- 符合規格警報定義一個案例，顯示同一產品在同一項安定性研究（或其他研究）到期日之前發生OOT結果的潛在性或OOS結果發生的可能性。
- 安定性OOS應鏈結到產品召回程序。
- 需要歷史數據來識別OOT警報。
- 當單個結果異常但仍在規格內時，則會觀察到一個分析警報。（即超出正常分析或採樣差異以及隨時間的正常變化）

第三階段調查

如果批次被拒絕，仍然需要進行調查。

判定：

- 如果其它批次或產品受到影響。
- 確定並實施矯正預防措施(CAPA, corrective and preventative action) 。



第三階段調查

- 第三階段調查應：
  - 審查已完成的製造調查，
  - 並結合實驗室調查的可疑分析結果，
  - 和/或對可能原因進行方法確效納入所獲得結果。
- 為了總結調查，必須評估所有結果。
- 調查報告應包含所進行調查的摘要;並得出詳細的結論。
- 對於微生物調查，在適當情況下使用風險分析工具來支持所做出的決策和得出的結論。 可能無法確定實際的根本原因，因此必須給出最有可能的根本原因。

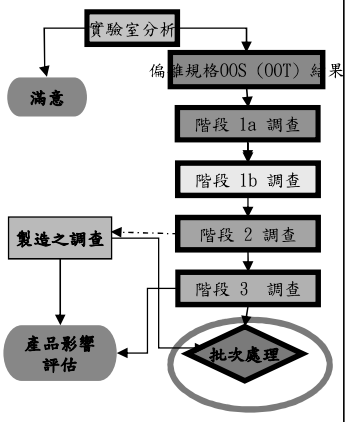
第三階段調查

- 必須確定批次的品質和處置決定。
- **一旦批次被拒絕，進一步測試以確定失敗原因是沒有限制，可以採取矯正措施。**
- **進一步測試結果，是不可逆轉原批次拒絕的決定。**
- **OOS結果對於其他批次、安定性研究、確效過程和測試程序的影響，應由品管QC和品保QA確定，並在結論中記錄，並採取適當的矯正預防措施(CAPA)。**

批次處理

結論：

- 如果在Phase I和Phase II沒有發現實驗室或計算錯誤，則沒有科學依據可以使最初OOS結果無效，同意通過重新測試結果。應報告所有通過和可疑測試的結果（在所有QC文檔和任何COA中），並且必須在批量放行決策中考慮所有數據。
- 如果調查確定最初抽樣方法不適當，則必須制定新的正確抽樣方法並記錄，並由負責的QA審查和批准。並應考量採用相同方法取樣的其他批次。



批次處理

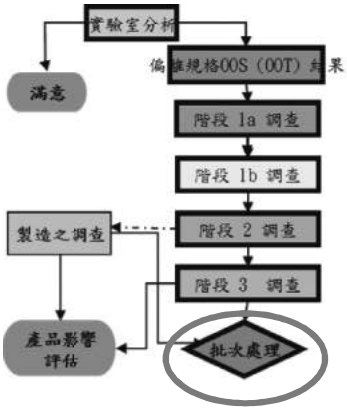
結論 (繼續)：

- 最初OOS結果**並不一定**意味著主要批次失敗，且必須**被拒絕**。應對OOS結果進行調查，並將調查結果（包括重新測試結果）進行解釋，以評估批次並做出有關放行或拒絕的決定，並完整記錄。
- 如果調查證明是由批次品質的因素引起的OOS結果（即確認OOS結果），則應將結果用於評估該批次的品質。OOS結果確認並顯示該批次不符合允收標準或規格，並導致該批次拒絕和適當處置。
- 還應該審查其他批次以評估影響情況。

批次處理

結論 (繼續)：

- 對於尚無定論的調查 – 即還在調查，即對OOS測試的結果還沒有顯示原因和還不確認OOS結果。
- 認證合格人員(Qualified Persons)在給出批次處理決策前，應充分考量OOS結果（確定最可能的原因），並且還需考慮批次具體變異的可能性。
- 最初的OOS結果無效時，只有在經過全面調查顯示OOS結果不能反映批次品質後，才能決定任何批次放行。在做出這樣的決定時，品質保證QA/合格人員QP應該謹慎行事。



This is a guidance document that details MHRA expectations

Note: This guidance is complementary to FDA Guidance For Industry Investigating Out-Of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production October 2006.

這是一份詳細說明MHRA期望的指導文件

注意：本指南是對FDA在 2006年10月藥品生產不合格（OOS）測試結果的FDA指導的補充。

*The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) is an executive agency of the Department of Health and Social Care in the United Kingdom which is responsible for ensuring that medicines and medical devices work and are acceptably safe.

參考資料

- FDA Guidance For Industry
  Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production 2006
- ICH
- The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) Guidance
  Out of Specification & Out of Trend Investigations
  2017

問題討論