Микробиологический анализ методом мембранной фильтрации

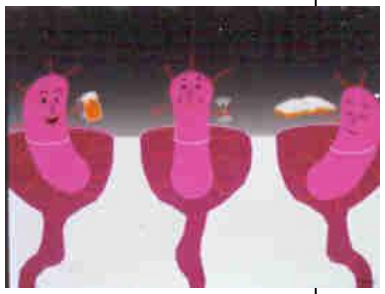
Алексей Ельфимов, к.б.н.,
Merck Life Sciences, BioMonitoring

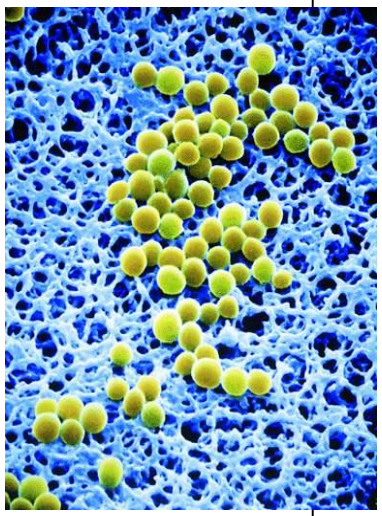
The life science business of Merck operates
as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

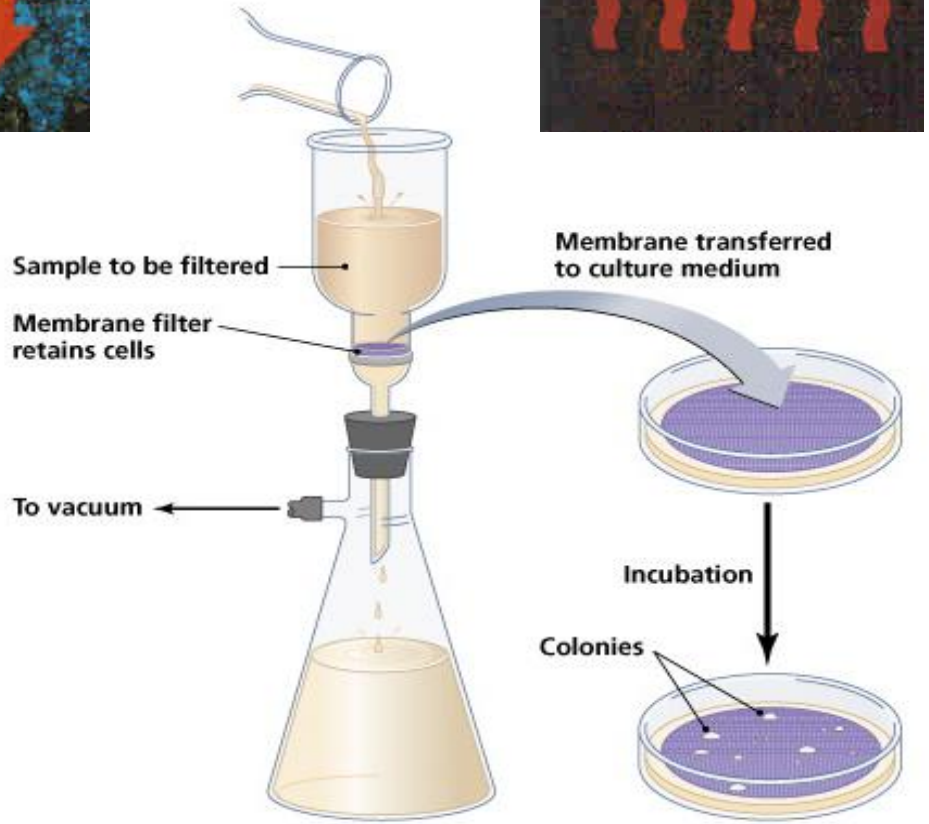
Millipore®

Preparation, Separation,
Filtration & Testing Products

Метод мембранной фильтрации







Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Метод мембранной фильтрации

От Millipore к Merck Millipore…

1980

2020

Мембранная фильтрация: выбор фильтра

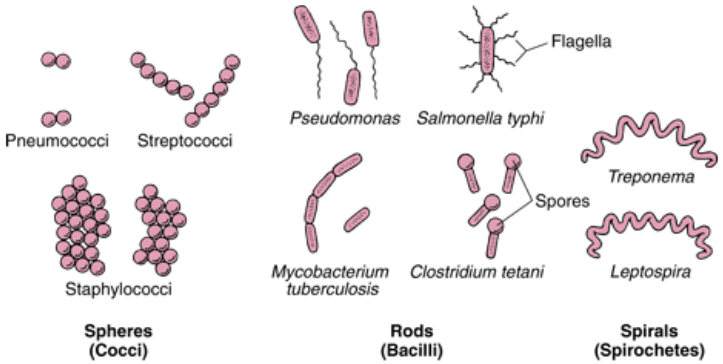
Удержание и Извлечение

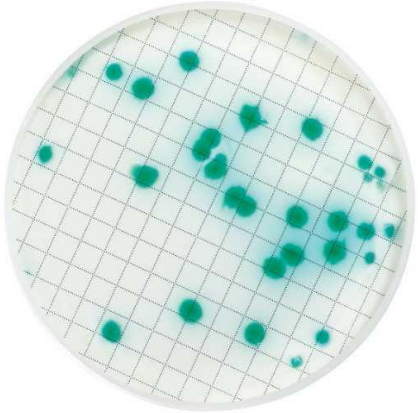
Удержание (Retention)

- Способность фильтра задерживать все микроорганизмы на поверхности мембраны

Извлечение (Recovery)

- Способность удержанных микроорганизмов к росту
- Материал фильтра должен быть проницаем для питательных веществ
- Необходимые условия – питание, температура, время
- Способность клеток к делению





Мембранная фильтрация: выбор фильтра

Мембранные фильтры Мерк

1. Диаметр пор **0.45μ** (+ 0.22μ, 0.7μ, 0.8μ, 1.2μ). Диаметр фильтра 47 и 50 мм
2. Удерживают 100% находящихся в образце микроорганизмов
3. Не содержат компонентов, токсичных для микроорганизмов
4. Предварительно простерилизованы и индивидуально упакованы
5. Имеют нанесенную сетку для облегчения подсчета колоний
6. **Высокая пористость**

Стерильные, индивидуально упакованные, белые, черные и зелёные мембраны, с сеткой **(S-Pak)**

Стерильные, упакованные в ленту белые и черные мембраны с сеткой для **EZ-Pak** диспенсера (сенсорный, электрический от аккумулятора)

Мембранная фильтрация – гребенка EZ-Fit Manifold

Универсальная – быстрозаменяемые адапторы для работы со всеми типами воронок
1-, 3- и 6-местная

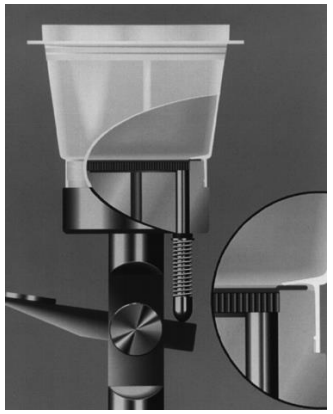
Многоразовые воронки

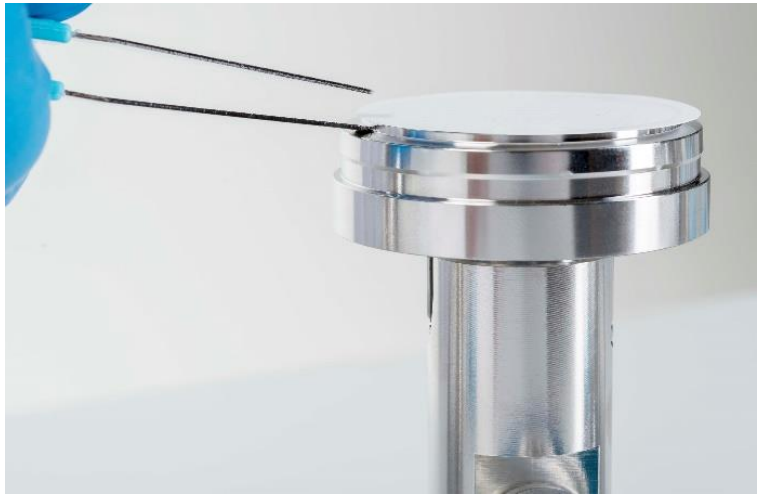
Microfil

Фильтроэлементы EZFFU

Мембранная фильтрация: система Microfil

Новое поколение





Новая конструкция основания

Наличие выступа позволяет легко снять фильтр с основания и не касаться фильтрующей поверхности.

Фильтроэлементы EZ-Fit

EZFF Unit

Фильтроэлементы EZ-Fit

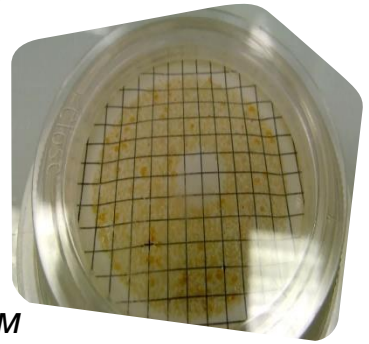
Основные особенности

Комфорт в работе
• Уникальная эргономика

Прозрачный пластик

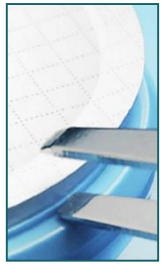
Работа одной рукой

Достоверный результат
• Оптимальный дизайн для получения колоний



Плотный контакт мембраны с агаром

Защищённый результат
• Низкий риск контаминации



Защитный выступ

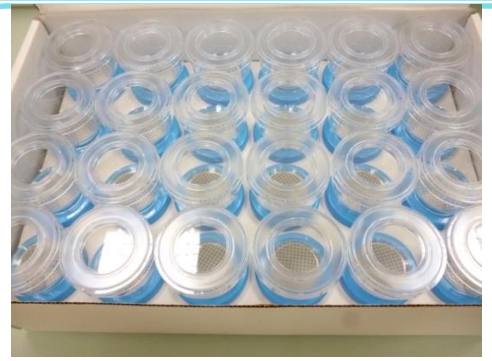
Универсальность
• Используется с плотными и жидкими средами

Millipore®

Фильтроэлементы EZ-Fit

- Белая и чёрная мембрана 0.22, 0.45 и 0.8мкм
- Мембрана HA (целлюлоза) и HV (ПВДФ)
- Воронки 100мл и 250мл
- Индивидуальная упаковка, по 3шт. и балк

- Индивиду-альная упаковка
- Без заглушки

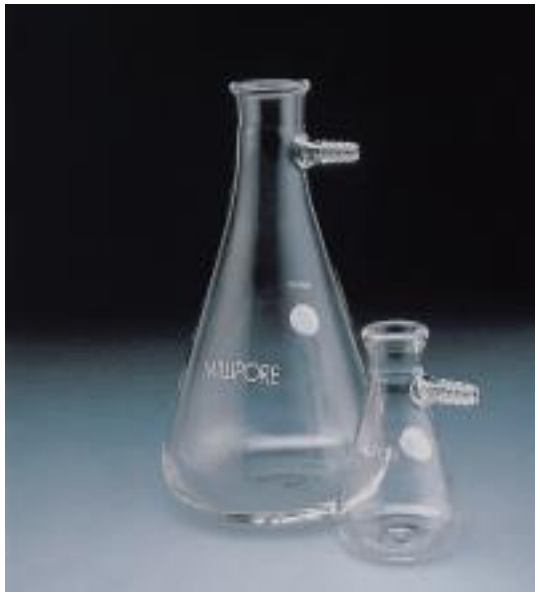


- Заглушка
- Крышка

Мембранная фильтрация
Дополнительное оборудование

Вакуумный мини-насос

Высокопроизводительные вакуумно-нагнетательные насосы



Колбы Бунзена

Мембранная фильтрация

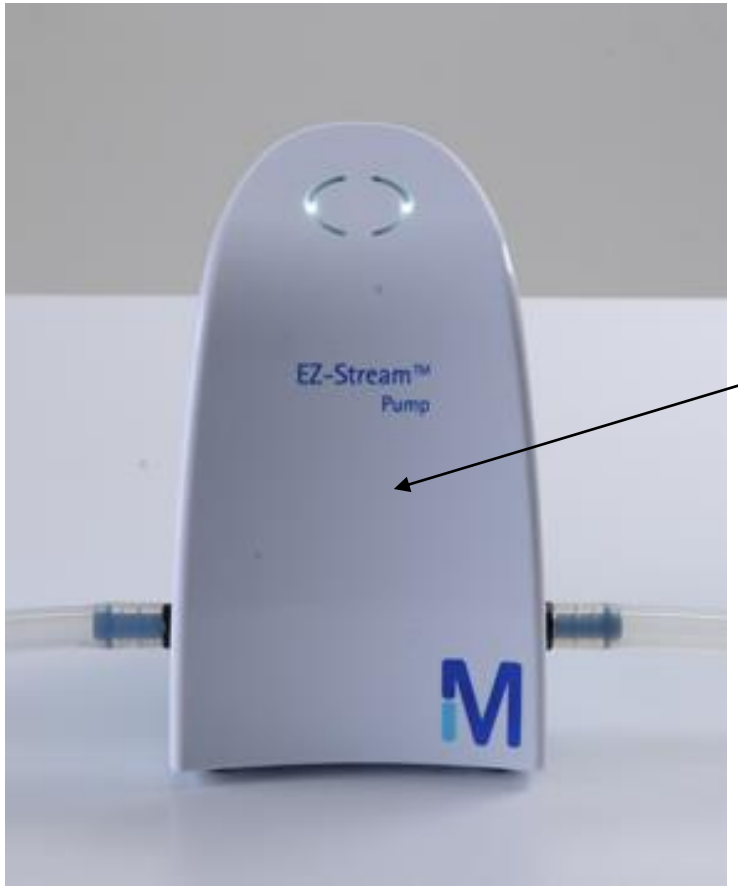
Традиционная схема

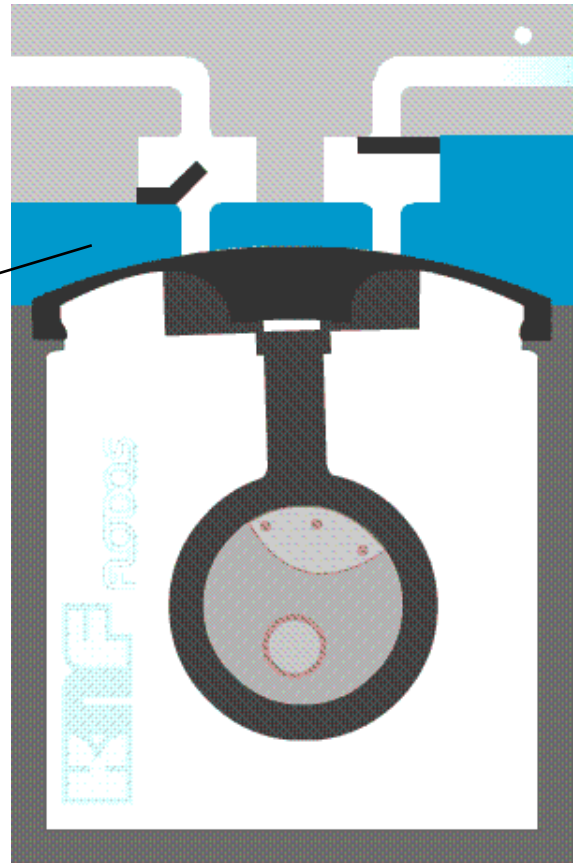
Много компонентов, сложность манипуляций

- Вес и уровень шума насоса
- Непрямое соединение с гребенкой
- Использование приемной емкости для сбора фильтрата
- Необходимость частых остановок процесса фильтрации для слива фильтрата из колбы:
  - расход времени
  - тяжесть колбы и соблюдение осторожности при манипуляциях
  - необходимость дезинфекции колбы

Мембранная фильтрация

Вакуумный насос EZ-Stream





- Пульсирующая диафрагма из PTFE

вакуумный насос EZ-stream

Прямое соединение упрощает операции

Прямое соединение

Отсутствие промежуточных колб - фильтрат направляется сразу в слив:

- Экономия времени
- Требует меньше рабочего места
- Упрощает манипуляции с оборудованием
- Дезинфекция/автоклавирование

Компактность

Снижен уровень шума

Соответствие ISO 8199 по уровню вакуума (около 700 мбар)

Простота дез.обработки

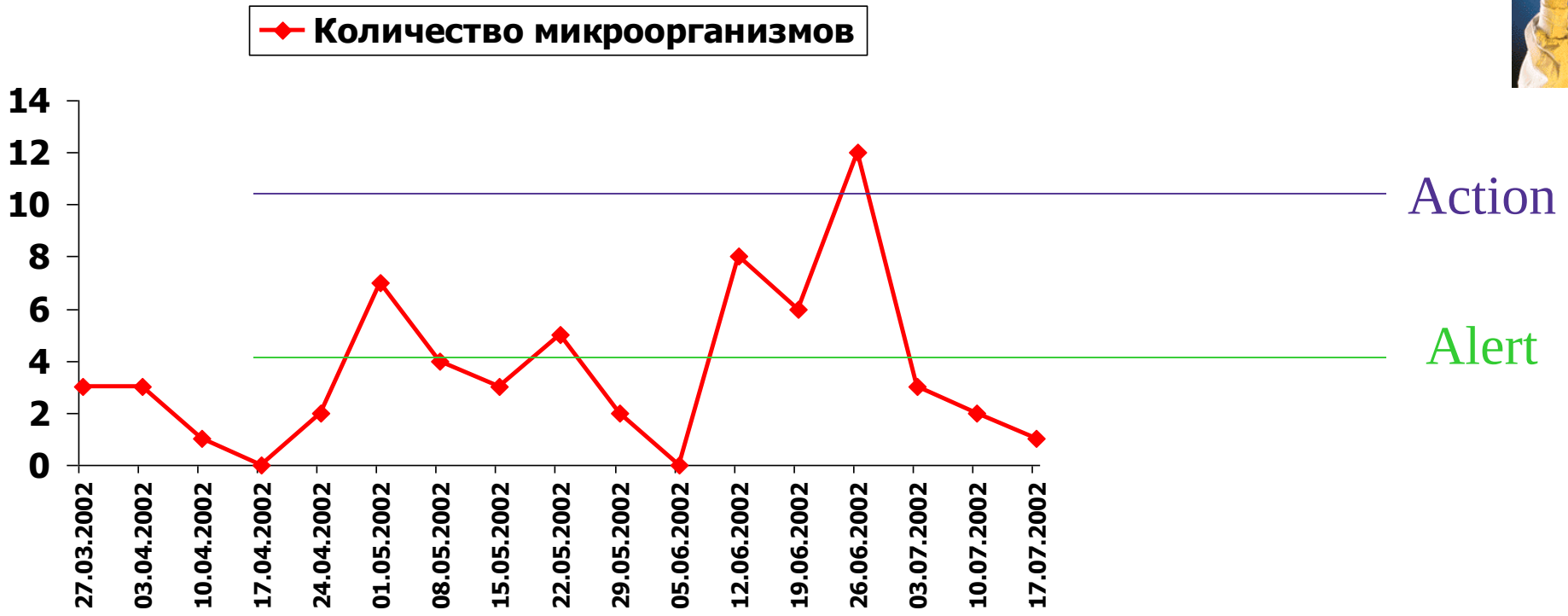
Не требует сложного сервисного обслуживания

Метод мембранной фильтрации

EZ Family

Микробиологический мониторинг

Интерпретация результатов



Пример: вода для инъекций – не более 10 КОЕ на 100 мл

выход показателей за пределы допустимых

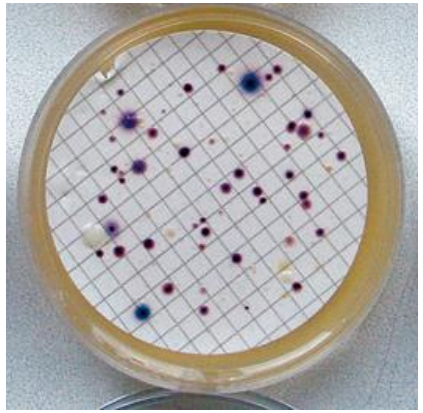
Насколько достоверны результаты?

ложные положительные результаты

Корректный результат

Образец

Мембранная фильтрация



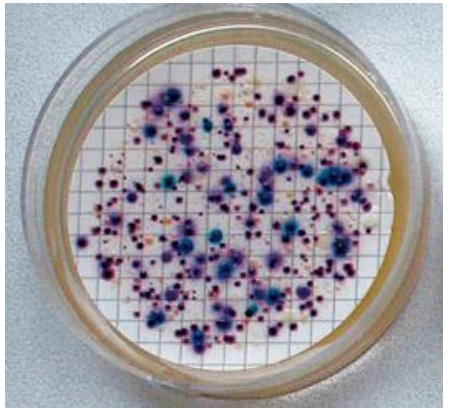
Ложный результат

Образец

Мембранная фильтрация

Contamination

Contamination

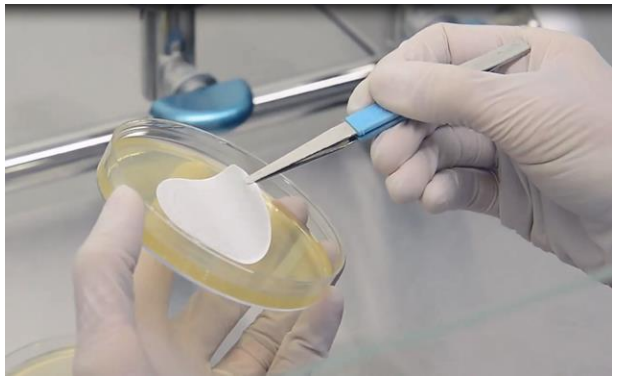


ложный положительный результат - причины ?

Многоразовые воронки:

- Эффективность стерилизации?
- Квалификация процесса стерилизации?

Контаминация из окружающей среды

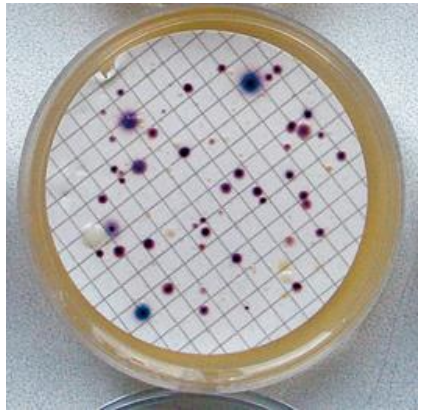


ложные отрицательные результаты

Корректный результат

Образец

Мембранная фильтрация

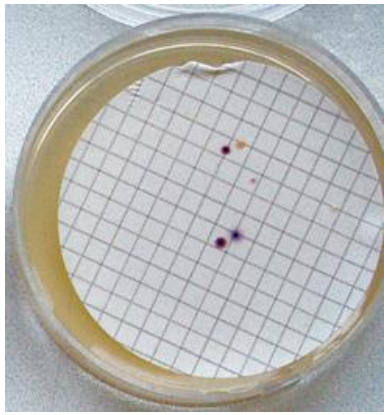


Ложный результат

Образец:

Антимикробные компоненты

Мембранная фильтрация



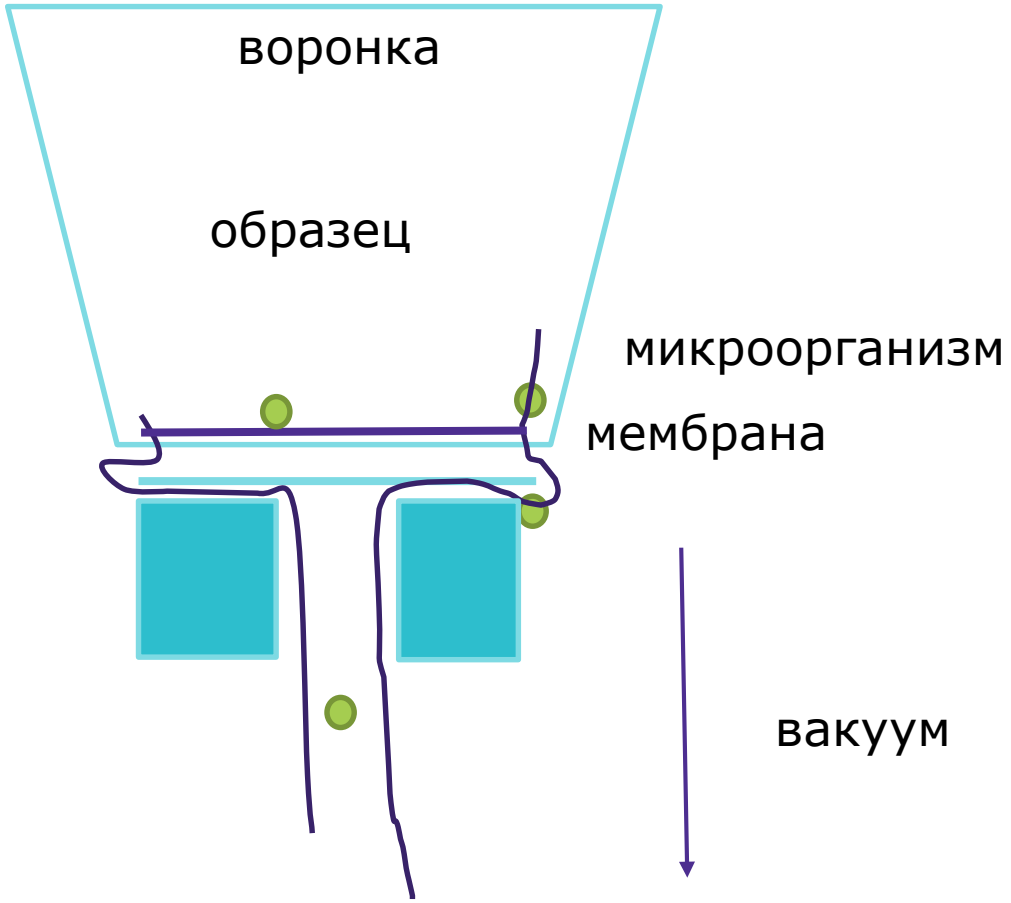
ложный отрицательный результат - причины ?

Ингибирующие вещества в образце : антибиотик или консервант

Следствие : угнетение роста микроорганизмов, меньше колоний

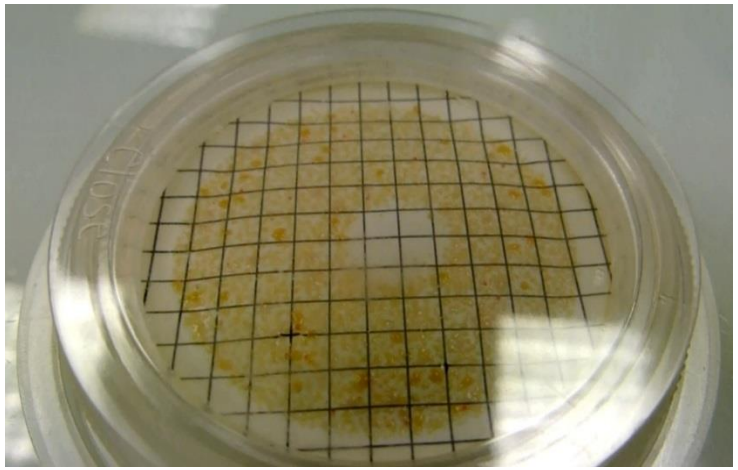
ложный отрицательный результат - причины ?

Неплотное соединение воронки с основанием – «проскок» микроорганизмов

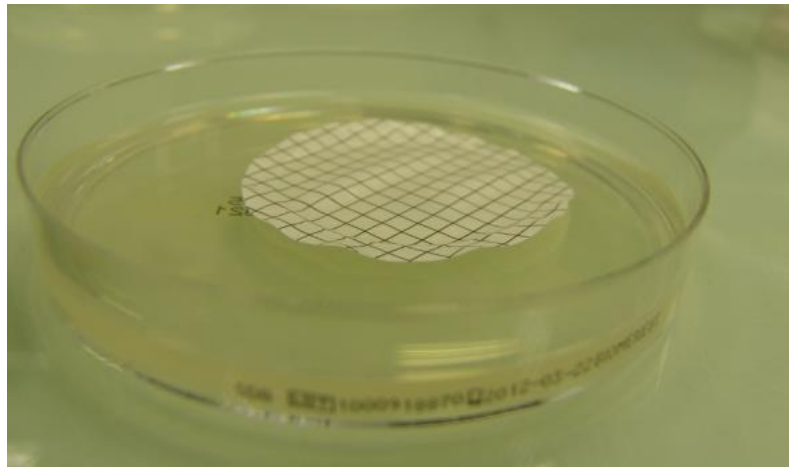


ложный отрицательный результат - причины ?

Неплотный контакт мембраны с поверхностью агара



воздушные пузыри



«волны»

= питательные вещества не попадают к м/о = нет роста

ложный отрицательный результат - причины ?

Ростовые свойства питательной среды:

MILLIFLEX® PRE-FILLED MEDIA CASSETTES

Catalogue Number : MXSMCTS48
Medium Abbreviation : TRYPTIC SOY
Lot Number :
Expiration Date :

Product Description

Each cassette is a plastic 3 piece assembly containing approximately 10ml of Tryptic Soy Agar.

Composition of the Medium

Formula in grams per liter of purified water :

Peptone from Casein	15.0 g
Peptone from Soymeal	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Agar	15.0 g

This medium is recommended for a variety of microorganisms.
Storage conditions: 2 - 8°C

Good Manufacturing Practices

This product was manufactured in a Millipore facility which adheres to Good Manufacturing Practices.

ISO® 9001 Quality Standard

This product was manufactured in a Millipore facility whose Quality Management System is approved by an accredited registering body to ISO 9001 Quality System Standard.

Pharmacopoeia

This product was manufactured, tested and released according to European and US Pharmacopoeia recommendations.

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released according to the following specifications :

100 % Inspection

Visual control of appearance and medium level of each cassette.

Statistical Controls

* Packaging integrity
* Conformity of labelling and packaging
* Use test of the cassette.

Biological Tests

Sterility

Representative samples were subjected to sterility test by direct incubation of the pre-filled cassettes.

Fertility / Growth Promotion

Fertility tests were conducted by direct inoculation of the media. All the samples provided good growth and typical colony morphology when challenged with approximately 10 - 100 CFU per cassette.

Batch record

The lot of cassettes has a complete documentation which includes product description, test protocol, test specification and results.

Lot Analysis

This product was designed and manufactured to meet the following specifications.

Criteria	Specifications	Results
Appearance of the media	light amber, slightly opalescent	Conforms
pH	7.3 +/- 0.2	Conforms
Weight of Agar	Min : 10.0 g Max : 12.0 g	Conforms
Sterility Assurance Level	≤1 % contamination evident after 7 days at 20-25°C and 30-35°C	Conforms
Growth promotion test		
Staphylococcus aureus ATCC® 6538	Good growth after 24 h at 30-35°C	Conforms
Bacillus subtilis ATCC® 6633	Good growth after 24h at 30-35°C	Conforms
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 9027	Good growth after 24h at 30-35°C	Conforms
Escherichia coli ATCC® 8739	Good growth after 24h at 30-35°C	Conforms
Candida albicans ATCC® 10231	Good growth after 48h at 20-25°C	Conforms
Aspergillus niger ATCC® 16404	Good growth after 5 days at 20-25°C	Conforms

According to the above results, the product complies with Millipore's acceptance criteria and is released.

B. Weber

Brigitte Weber
Quality Assurance Manager

PF06952, Rev.
Millipore and Millifle are registered trademarks of Millipore Corporation.
ISO is a registered trademark of the International Organization for Standardization or an affiliated company.
ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

Микробиологический анализ

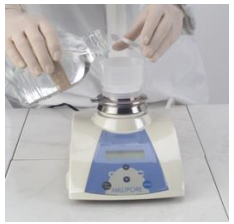
Критические параметры

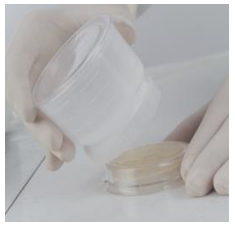
- Уменьшение риска ложного отрицательного результата
  - Воспроизводимый и чувствительный метод
  - Контроль качества материалов
  - Валидация метода
- Уменьшение риска ложного положительного результата
  - Отбор проб, соблюдение правил асептики, санитизация
  - Валидация метода
- Простота в использовании
- Уменьшение времени тестирования
  - Быстрое получение результата позволяет обнаружить проблему до выхода системы из строя
  - Сокращение расходов времени и средств на проведение анализа

Мембранная фильтрация

Система Milliflex - Milli"flexible"

- Одноразовые стерильные воронки специальной конструкции с впаянным фильтром и кассеты со средой для инкубации мембраны на агаре
- Насос Миллифлекс с легко санитизируемыми поверхностями и процедурой внутренней дезобработки
- Конструкция системы предусматривает минимальный контакт со стерильными материалами и максимально уменьшает риск контаминации из внешней среды





1987

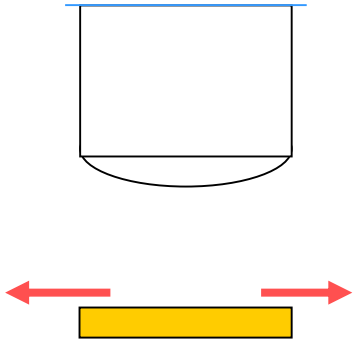
Millipore®

система Milliflex

Основные особенности

Идеальный контакт мембраны в поверхностью питательной среды

- выпуклая форма мембраны
- плотное прилегание мембраны без образования пузырьков



Отсутствие манипуляций с мембраной при ее переносе

- уменьшение риска ложного положительного результата

Невозможность протечек

- мембрана припаяна к воронке

20 cm² эффективной площади фильтрации (против **10cm²** для фильтров **47 mm**)

- уменьшение общего времени фильтрации
- более равномерное распределение колоний и снижение биологической конкуренции

Система Milliflex Oasis® - 2020

Разработана с учётом 3-х главных проблем пользователей:

1. Эффективность работы лаборатории — **Improved productivity**
2. Интерпретация результатов OOS — **Result reliability**
3. Инспекционные проверки — **Regulatory compliance**

Система Milliflex Basis®

MERCK

Система, разработанная для современных лабораторий QC

Производительность - надёжность результата – соответствие нормативам:

1. Более быстрая процедура теста	*Экономия около 30 дней за год и до +30% выигрыш во времени*
2. Повышенная надёжность результатов	*Многочисленные особенности конструкции, снижающие риски ложных результатов*
3. Соответствие нормативам	*Улучшенная прослеживаемость данных с 2D кодами на каждой упаковке/воронке/чашке*

96 новых особенностей конструкции системы – существенное повышение уровня безопасности и эффективности процедуры микробиологического анализа

Millipore®

Milliflex Oasis®

MERCK

Насос

- Насос Milliflex Oasis® состоит из источника вакуума и двух оснований для установки фильтрующих элементов.
- Небольшие размеры и вес, а также лёгкость дезобработки поверхностей насоса делают его идеальным для работы в ламинаре или боксе безопасности.
- Эргономичный дизайн и возможность масштабирования (модульная конструкция) позволяют существенно повысить производительность лаборатории
- Отсутствие необходимости автоклавировать оборудование значительно уменьшает временны́е затраты на подготовку насоса к работе.

Millipore®

Milliflex basis®

MERCK

Насос

Простая установка: Калибровка не требуется, подключите быстрыми соединениями электрический кабель и сливную трубку, протрите гладкую поверхность насоса и – всё готово для работы.

Эргономичность: низкий профиль насоса (платформа для установки фильтрующих головок находится на высоте 70мм) облегчают работу с образцами, особенно большого объёма.

Отсутствие рисков перекрёстной контаминации: Обратный клапан, расположенный в съемной фильтрующей головке, предотвращает возможное загрязнение мембраны из внутреннего канала. Ключевые части головки легко доступны для очистки.

Millipore®

Milliflex Oasis®

Насос

Высокая производительность: возможность подключения 3-х насосов (с использованием одного источника питания и соединительных кабелей) и выполнения 6 одновременных фильтраций

Дезобработка насоса: очистку внутренних каналов насоса проводят с использованием набора для санитизации, фильтрационные головки можно (но не обязательно) автоклавировать в стандартных режимах

Валидация: готовый протокол валидации, проведение IQ/OQ на месте инженерами Мерк

Milliflex Oasis®

MERCK

Фильтроэлементы

Использование воронок Milliflex Oasis® упрощает ваш рабочий процесс и уменьшает время фильтрации благодаря новой конструкции дренажа. Впаянная мембрана исключает применение пинцета при её переносе на агар и обеспечивает плотный контакт мембраны с поверхностью среды. Каждый фильтроэлемент 100% проверен на целостность для повышения надёжности при использовании.

Millipore®

Milliflex Oasis®

MERCK

Фильтроэлементы (воронки)

Экономия рабочей поверхности в ламинаре: Воронки упакованы в защитный пластиковый мешок по 8 штук на лотке, который можно разделить на две части и поставить их друг на друга для экономии рабочего пространства.

Защита мембраны: Встроенная в фильтроэлемент подложка защищает мембрану от вторичной контаминации.

Защита образца: откидная крышка на воронке защищает образец во время фильтрациии и уменьшает количество необходимых манипуляций.

Millipore®

Milliflex Oasis®

MERCK

Фильтроэлементы

Точный объём образца: прозрачный гидрофобный материал воронки и хорошо видимые индикаторы уровня обеспечивает фильтрацию нужного объема образца.

Аккуратный бесконтактный перенос мембраны на агар: для переноса впаянного фильтра на агар не требуется пинцет, а выпуклая после фильтрации форма мембраны обеспечивает плотный контакт с поверхностью среды без воздушных пузырей и складок.

Легко отделяемая воронка: просто сожмите воронку, чтобы отделить её от основания с мембраной (не нужно ломать пластик), а крышку используйте, чтобы закрыть чашку со средой и фильтром для переноса в инкубатор.

Millipore®

Milliflex Oasis®

MERCK

Кассеты (чашки) с питательной средой

Безошибочный выбор чашки со средой: чашки с тремя средами (R2A, TSA, SDA) имеют цветовую кодировку, что позволяет легко контролировать использование нужной среды на каждом этапе тестирования.

Запирающаяся сборка: чашки собираются в запираемую стопку, что обеспечивает безопасную транспортировку. Пустой лоток от воронок может быть использован также в качестве поддона для инкубации.

Отсутствие риска случайного открытия: Крышка при закрывании защёлкивается.

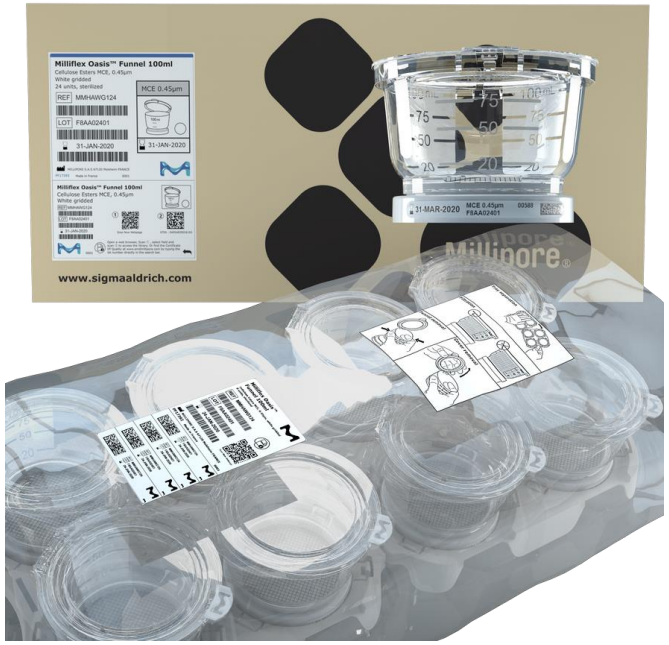
Длительный срок годности и уменьшенная конденсация: Неоткрытые чашки остаются герметичными, в отличие от обычных чашек Петри, что снижает конденсацию и обезвоживание в течение длительного времени хранения.

Millipore®

Milliflex Oasis®

MERCK

Прослеживаемость данных



Прослеживаемость от А до Я: идентификация и 2D штрих-код на первичной упаковке, вторичной упаковке и на каждой отдельной единице продукции.

Цветовая кодировка, чтобы избежать ошибок: на каждой коробке и на каждом изделии.

Индивидуальное ID: каждый фильтроэлемент и чашка со средой имеют уникальный идентификационный номер, который вы можете «привязать» к вашему образцу.

2D штрих-код для доступа к документации: в соответствии с фармацевтическим стандартом GS1 обеспечивается доступ к ключевой документации, в том числе сертификатам качества продукции

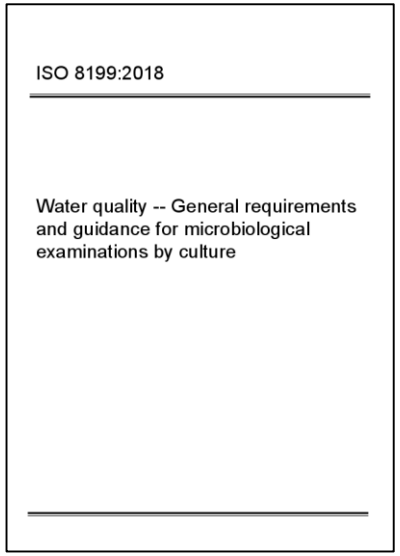
Millipore®

Milliflex Oasis®

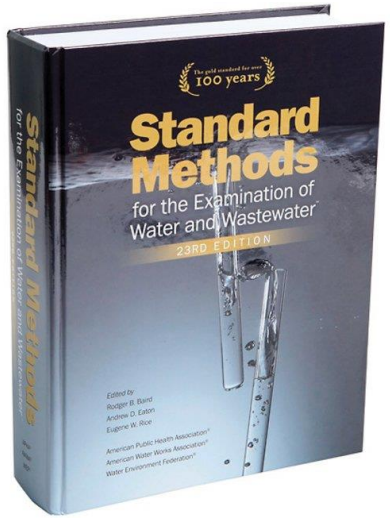
MERCK

Соответствие международным нормативным требованиям

- Процедура тестирования с Milliflex Oasis® полностью соответствует официальному методу мембранной фильтрации (Pharmacopoeia, ISO, Standard Methods,…)
- Функции прослеживаемости данных соответствуют USP <1117> для документации и лабораторных записей. Они помогают сократить время подготовки к проверкам и расследованиям.
- Сниженный риск вторичного загрязнения также рекомендуется в USP <61> EP 2.6.12, JP 4.05 часть 1.
- Специальная PVDF мембрана, используемая для образцов, содержащих антимикробные вещества, соответствует USP <1227>.
- Воронка объемом 250 мл предназначена для образцов WFI согласно EP 0169 и USP <1231>.


ISO 8199:2018

Water quality -- General requirements and guidance for microbiological examinations by culture



Millipore®

Milliflex basis®

Экспресс-метод с Milliflex® Quantum

Millipore®

СПАСИБО !

ООО «Мерк»:

115054, Москва, ул.Валовая, 35

Тел: (495) – 937 33 04

Факс: (495) – 937 33 05

e-mail: mm.russia@merckgroup.com