



Silmälääkepakkauspullojen eheystestaus metyleenisini-immersiotestillä: menetelmän validointi

Saara Puranen

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2022

Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

PURANEN, SAARA:

Silmälääkepakkauspullojen eheystestaus metyleenisini-immersiotestillä: menetelmän validointi

Opinnäytetyö 49 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Toukokuu 2022

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida silmälääkepakkauspullojen eheystestauksessa käytettävä metyleenisini-immersiotesti. Tarkoituksena oli suorittaa validointitestejä, määrittää valitut validointiparametrit suoritettujen testien perusteella ja todentaa testimenetelmän toimivuus sille osoitetussa käyttötarkoituksessa. Työn toimeksiantaja oli Tampereella toimiva NextPharma Oy, joka valmistaa silmälääketuotteita. Validoinnin suunnittelun ja toteutuksen keskeisenä ohjeistuksena toimi lääketeollisuuden toimintaa ohjaava Good Manufacturing Practice -periaate, jolla tarkoitetaan hyviä tuotantotapoja.

Validointitesteissä haluttiin määrittää seuraavat validointiparametrit: tarkkuus, täsmällisyys, havaitsemisraja, spesifisyys ja häiriöalttius. Menetelmän validointi sisälsi 15 validointitestiä. Validointitesteissä analysoitiin yhteensä 1148 silmälääkepakkauspulloa.

Työn lopputuloksena syntyi validointisuunnitelma ja -raportti. Suoritettujen validointitestien perusteella voidaan todeta, että menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa. Se tunnistaa vuotavat silmälääkepakkauspullot, joissa vuotokoko ylittää määritetyn havaitsemisrajan, vuotamattomista pakkauksista. Validointitesteistä saatujen tulosten perusteella havaitsemisrajaksi määritettiin 25 µm. Havaitsemisrajan tarkempi tutkiminen vaatisi lisää testejä suuremmilla näytemäärillä.

Metyleenisini-immersiotestin testiparametrit ovat aika, paine ja pintajännitys. Tässä työssä arvioitiin testiajan vaikutusta testituloksiin. Jatkossa olisi hyödyllistä tutkia myös paineen ja pintajännityksen vaikutusta tuloksiin. Tällaisilla testeillä saataisiin tarkempaa tietoa esimerkiksi menetelmän häiriöalttiudesta.

Tässä työssä testattujen näytteiden tiedot ovat luottamuksellisia, eikä niitä julkaista tässä raportissa. Näytteet on koodattu kirjaimilla.

Asiasanat: menetelmän validointi, tiiveystestimenetelmät, metyleenisini-immersiotesti

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme of Laboratory Engineering

PURANEN SAARA:

Container Closure Integrity Testing of Pharmaceutical Ophthalmic Bottles by Methylene Blue Dye Ingress: Validation of Method

Bachelor's thesis 49 pages, appendices 3 pages
May 2022

The objective of this thesis work was to perform the method validation of methylene blue dye ingress test for pharmaceutical ophthalmic bottles. The methylene blue dye ingress test method is for testing the container closure integrity. The purpose of the thesis was to perform method validation tests to determine the selected validation parameters and to verify the functionality of the test method for its intended use. The client was NextPharma Oy located in Tampere who produces pharmaceutical ophthalmic products. The main guideline for planning and performing the validation was Good Manufacturing Practice, a principle that gives guidelines to pharmaceutical industry.

The validation parameters selected for this validation were accuracy, precision, specificity, detection limit and robustness. The method validation included 15 validation tests. 1148 pharmaceutical ophthalmic bottles were analysed in the validation tests.

As a result of this thesis, a validation plan and report were written. According to the test results, it can be considered that the method is suitable for its intended use. The test method identifies correctly the pharmaceutical ophthalmic bottles that leak above the determined detection limit from those that do not leak. Based on the validation test results the detection limit was determined to 25 µm. A closer examination of the detection limit would require more tests with a larger number of samples.

The test parameters of the methylene dye ingress test are time, pressure, and surface tension. The effect of test time on the test results was evaluated in this thesis work. It would be useful to test the effect of pressure and surface tension on the results in the future. These tests would give more information about the robustness of the test method.

The sample material data is confidential. The samples are presented as letters of the alphabet in this report.

Key words: method validation, container closure integrity tests, methylene blue dye ingress test

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	LÄÄKETEOLLISUUDEN OHJAUS JA VALVONTA	9
	2.1 Hyvät tuotantotavat	9
	2.2 Farmakopeat	10
	2.3 Tiiveystestausta koskevat ohjeistukset ja säädökset	10
3	LÄÄKEPAKKAUKSET	12
	3.1 Lääkepakkauksen tehtävät	12
	3.2 Primaari- ja sekundaaripakkaukset	12
	3.3 Pakkausmateriaalit	13
4	TIIVEYSTESTIMENETELMÄT LÄÄKEPAKKAUKSIEN EHEYSTESTAAMISEEN	15
	4.1 Vuoto pakkauksessa	15
	4.2 Tiiveystestimenetelmä ja sen valinta	15
	4.3 Kvantitatiiviset ja kvalitatiiviset menetelmät	16
	4.4 Deterministiset ja probabilistiset menetelmät	16
	4.5 Muita luokitteluja	17
5	METYLEENISINI-IMMERSIOTESTI	18
	5.1 Metyleenisini-immersiotestin toimintaperiaate	18
	5.2 Metyleenisini-immersiotestin vahvuudet ja heikkoudet	20
6	VALIDOINTI	22
	6.1 Validointi osana laadun- ja riskinhallintaprosessia	22
	6.2 Kvalitatiivisen menetelmän validointi	22
	6.3 Validointiparametrit	23
	6.3.1 Tarkkuus	24
	6.3.2 Täsmällisyys	25
	6.3.3 Havaitsemisraja	25
	6.3.4 Spesifisyys	26
	6.3.5 Häiriöalttius	26
7	TYÖN KOKEELLINEN OSA	27
	7.1 Testauslaitteisto	27
	7.2 Näytemateriaali	28
	7.3 Testimenetelmän kuvaus ja testin suorittaminen	28
	7.4 Validoinnin suorittaminen	29
8	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	31
	8.1 Tarkkuus	31
	8.2 Täsmällisyys	35

8.3 Havaitsemisraja.....	36
8.4 Spesifisyys	38
8.5 Häiriöalttius	39
9 POHDINTA	41
LÄHTEET.....	44
LIITTEET	47
Liite 1. Suunnitelma suoritettavista menetelmänvalidointitesteistä	47
Liite 2. Validointitestien ajopäiväkirja	49

LYHENTEET JA TERMIT

EMA	The European Medicines Agency, Euroopan lääkevirasto
FDA	U.S. Food & Drug Administration, Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
GMP	Good Manufacturing Practice, hyvä tuotantotapa
USP	United States Pharmacopeial Convention
VMP	Validation Master Plan, validoinnin yleissuunnitelma
WFI	Water for Injection, puhtaudeltaan erittäin korkealaatuinen vesi

1 JOHDANTO

Lääkepakkausten tiiveystestaus on keskeinen osa lääkepakkausten laadunvalvontaa. Lääkepakkausten tulee olla eheitä, pitää pakkausten sisältö steriilinä ja estää mikrobikontaminaatio. Lääkepakkauksien eheyttä voidaan arvioida tiiveystestimenetelmillä. Tiiveystestimenetelmällä tarkoitetaan testimenetelmää, jolla voidaan luotettavasti havaita pakkauksen rikkoutuminen ja vuoto. (The United States Pharmacopeial Convention 2016a, 5.)

Silmälääkevalmisteella tarkoitetaan lääketuotteita, joilla hoidetaan silmävaivoja ja -sairauksia. Silmälääkkeellä voidaan lievittää vaivaa tai hoitaa oireita. Koska silmän rakenne ja toiminta ovat erityisen herkkiä, on tärkeää, että silmälääkevalmiste on turvallinen käyttää. (Bandyopadhyay, Coffey & Shower 2010, 254.)

Tämän opinnäytetyön aiheena oli tiiveystestimenetelmän validointi silmälääkepakkauspullojen eheystestaukseen. Opinnäytetyön toimeksiantaja oli NextPharma Oy. NextPharma on globaalisti toimiva lääketieteellisuuden yritys, jolla on toimipisteitä Isossa-Britanniassa, Saksassa, Ranskassa sekä Suomessa Tampereella. Tampereen tehtaalla valmistetaan silmälääkevalmisteita. (NextPharma 2022a; NextPharma 2022b.)

Metyleenisini-immersiotesti on tiiveystestimenetelmä, joka on ollut NextPharman Tampereen tehtaalla käytössä pakkausten eheystestauksessa, mutta jota ei ole validoitu aiemmin. Nyt validoinnilla haluttiin selvittää testimenetelmän suorituskykyä ja varmistua sen toimivuudesta. Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida metyleenisini-immersiotesti valituille silmälääkepakkauspulloille. Tarkoituksena oli suorittaa validointitestejä, määrittää valitut validointiparametrit suoritettujen testien perusteella ja todentaa testimenetelmän toimivuus sille osoitetussa käyttötarkoituksessa. Lisäksi työn tarkoitus oli perehtyä lääketieteellisuuden ohjaukseen ja sääntelyyn, tiiveystestimenetelmiin ja lääkepakkauksiin. Lainsäädännön ja ohjauksen teema on laaja, ja tässä työssä aihetta on käsitelty työn lähtökohdista käsin. Validointiparametrit valittiin tiiveystestimenetelmien validointia koskevan ohjeistuksen mukaan. Menetelmän validoinnissa huomioitiin sitä koskevat viranomaismääräykset.

Lääketeollisuuden näkökulmasta validointi kytkeytyy tiiviisti kvalifiointiin: validoinnissa käytettyjen laitteiden toiminta tulee arvioida ja varmentaa. Kvalifioinnin tarkoituksena on tarkastaa, että henkilöstö, tilat, laitteet ja materiaalit toimivat odotetulla tavalla ja tulokset ovat asianmukaiset. (Fimea 2020, 6,8; USP 2016b, 7.)

Metyleenisini-immersiotestimenetelmän ja käytetyn laitteiston asianmukainen toiminta varmennettiin ja dokumentoitiin protokollan mukaisesti ennen menetelmän validointia. Kvalifioinnin osuutta ei kuitenkaan käsitellä tämän opinnäytetyön kirjallisessa osuudessa. Opinnäytetyön toiminnallisen osuuden tuloksena kirjoitettiin validointisuunnitelma ja -raportti. Metyleenisini-immersiotestin validoinnissa käytettyjen näytteiden tiedot ovat luottamuksellisia, eikä niitä ole julkaistu tässä raportissa. Näytteet on koodattu kirjaimilla.

2 LÄÄKETEOLLISUUDEN OHJAUS JA VALVONTA

2.1 Hyvät tuotantotavat

Lääketeollisuuden toimintaan liittyy viranomaismääräyksiä ja -ohjausta, joiden tarkoituksena on taata potilasturvallisuuden toteutuminen. Keskeisenä toiminta-ohjeena on Good Manufacturing Practice (GMP), joka viittaa hyviin tuotantotapoihin lääketuotteiden valmistuksessa ja jolla varmistetaan, että lääketuotteet vastaavat niille asetettuja vaatimuksia. GMP määrittää muun muassa lääketeollisuuden laadunhallintajärjestelmää. (The European Medicines Agency 2022.)

Euroopan komissio vastaa Euroopan unionin GMP-ohjeistuksesta. Sen tarkoituksena on koota yhteen lääketeollisuutta koskevat toimintaperiaatteet GMP-opaassaan (Guide to Good Manufacturing Practice of Medicinal Product, Eudralex vol 4). Euroopan unionin alueella GMP-periaatteet pohjaavat seuraaville oikeusperiaatteille, jotka ovat säädös N:o 1252/2014 ja direktiivi 2003/94/EY koskien ihmisille tarkoitettujen vaikuttavien aineiden ja lääkkeiden soveltamista, direktiivi 91/412/ETY koskien eläimille tarkoitettuja lääkkeitä ja lääkedirektiivi 2001/83/EY sekä eläinlääkedirektiivi 2001/82/EY. (Euroopan komissio n.d.; EMA 2022.)

Euroopan komissio valvoo EU-lainsäädännön täytäntöönpanoa ja sen soveltamista. Euroopan lääkevirasto EMA (engl. The European Medicines Agency) toimii yhdessä Euroopan komission kanssa komission alaisuudessa. Se vastaa lääkevalmisteiden tieteellisestä arvioinnista, valvonnasta ja turvallisuusseurannasta. Suomessa lääketeollisuuden toimintaa ohjaa ja valvoo lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea. Fimean keskeinen tehtävä on lupa- ja valvontatehtävät, ja se toimii osana eurooppalaista lääkevalvontaa. (EMA 2016; Fimea 2022a.)

Globaalisti keskeinen viranomaistoimija on Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA (U.S. Food & Drug Administration). FDA toimii valvovana viranomaisena Yhdysvalloissa. Se vastaa sääntelystä, joka koskee elintarvikkeita, lääkevalmisteita, ravintolisiä ja rokotteita. (U.S. Food & Drug Administration 2022.)

2.2 Farmakopeat

Lääketeollisuuden ja lääkevalvontaviranomaisten toimintaa ohjaavat farmakopeat. Farmakopea on normikokoelma, joka sisältää tiedot sitovista laatuvaatimuksista lääkeaineille, apuaineille ja lääkevalmisteille. Farmakopeoita on käytössä useita. Yleisesti käytössä olevat farmakopeat ovat Yhdysvaltain ja Euroopan farmakopeat. (Hagen-Frederiksen 2014; Salo & Sinivuo 2013, 19.)

Euroopan farmakopeaa (Ph. Eur.) julkaisee Euroopan neuvosto (EN). Julkaisua toimittaa European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Suomessa kansallisena farmakopeaviranomaisena toimii Fimea. Yhdysvaltain farmakopean julkaisemisesta vastaa United States Pharmacopeial Convention (USP). (Fimea 2022b; Salo ym. 2013, 19; USP 2015.)

2.3 Tiiveystestausta koskevat ohjeistukset ja säädökset

Euroopan komission GMP-ohjeistuksen liitteessä 1 (Annex 1: Manufacture of Sterile Products) määritetään, että pakkaukset tulee sulkea validoidulla menetelmällä. Lasi- ja muoviampullien tulee olla 100 prosenttisen tiiviitä. Muissa pakkauksissa tulee tiiveyden testaamiseen käyttää asianmukaisia menetelmiä. Tämän liitteen ohjeistukseen on tulossa mahdollisia täsmennyksiä liitteen päivityksen myötä. (Euroopan komissio 2008, 15; Euroopan komissio 2020, 22.)

FDA:n mukaan tiiveystestimenetelmän tulee olla asianmukaisesti validoitu. Tiiveystestimenetelmä voidaan valita fysikaalis-kemiallisten tai mikrobiologisten testien joukosta. FDA:n mukaan tuotteen eheys tulee todentaa soveltuvalla menetelmällä. FDA ei kuitenkaan määritä tarkemmin, mitä menetelmää tulisi käyttää. (FDA 2004, 18; FDA 2008, 3–5.)

USP:n ohjekokoelma (<1207> Package Integrity Evaluation – Sterile Products) tarjoaa tietoa tiiveystestimenetelmistä, testimenetelmän valinnasta sekä menetelmien validoinnista. Sen tarkoitus on toimia oppaana pakkausten eheyden arvioimisessa. Ohjekokoelma koostuu neljästä osasta. Ohjekokoelman mukaan

tiivestestimenetelmän valintaan vaikuttavat muun muassa testattavan pakkauksen rakenne, materiaalia ja pakkauksen sisältämä lääketuote. Tästä syystä ei ole olemassa yhtä kaikille pakkauksille sopivaa menetelmää. (USP 2016a, 1.)

3 LÄÄKEPAKKAUKSET

3.1 Lääkepakkauksen tehtävät

Lääkepakkaus voidaan määrittää kokoelmaksi komponentteja, jotka suojaavat lääketuotetta. Lääkepakkaukselle on määritetty useita vaatimuksia ja tehtäviä. Lääkepakkauksen tulee pitää lääkeaine sisällään: lääkepakkaus ei saa vuotaa, sen tulee kestää käsittelyä eikä se saa reagoida siihen pakatun lääkeaineen kanssa. Lääkepakkauksen tulee suojata lääketuotetta ulkoisilta tekijöiltä, kuten valolta, kosteudelta, hapelta ja biologiselta kontaminaatiolta. Lääkepakkauksen tulee olla helppokäyttöinen, jolloin yksi annos on helppo annostella pakkauksesta. (Zadbuke, Shahi, Gulecha, Padalkar & Thube 2013; White 2012, 10; Fimea 2022c.)

Lääkepakkauksen tulee tarjota tarvittavat tiedot lääketuotteen turvalliseen käyttöön, kuten vaikuttavat ainesosat, varoitukset sekä annostelutiedot. Lääkepakkaukseen merkitään lääkevalmisteen nimi, vahvuus ja lääkemuoto. Pakkauksessa on kerrottuna myös lääkevalmisteen vaikuttava aine, sen määrä valmis-teessa ja apuaineet, joilla voi olla vaikutusta käyttäjään. Lisäksi lääkepakkaukseen merkitään lääkkeen yksilöivät turvamerkinnät, joilla varmistetaan, ettei lääke ole väärennös. Tällaisia merkintöjä ovat tuotekoodi, sarjanumero, eränumero ja 2D-viivakoodi. Myös myyntiluvan haltijan nimi ja osoite sekä myyntiluvan numero ilmoitetaan pakkauksessa. (Fimea 2022c.)

3.2 Primaari- ja sekundaaripakkaukset

Lääkepakkaukset jaetaan primaari- ja sekundaaripakkauksiin (ulko- ja sisäpakkauksiin). Primaarilla pakkauksella tarkoitetaan pakkausta, joka on suorassa kontaktissa lääketuotteeseen. Sekundaaripakkauksella taas tarkoitetaan primaari-pakkausta suojaavaa pakkausta. Lisäksi puhutaan tertiäarisestä pakkauksesta, jolla tarkoitetaan lääkepakkausten kuljettamiseen tarkoitettua pakkausta. (USP 2016a, 1; Zadbuke ym. 2013.)

Lääketuote pakataan sen asettamien vaatimusten perusteella. Esimerkiksi ilmatiiviit pakkaukset suojaavat tuotetta ympäristöltä, jolloin pakkauksia voidaan avata, ja ne pysyvät ilmatiiviinä uudelleensulkemisen jälkeen. Valonkestävät pakkaukset taas suojaavat sisältöä valolta ja erityisesti UV-säteilyltä. Tällaisia ovat esimerkiksi ruskeasta lasista valmistetut pakkaukset. Lääketuote voidaan myös pakata kerta-annospakkauksiin, kuten lasiampulleihin tai useita annoksia sisältävään pakkaukseen. (Nasa 2014, 347–350; White 2012, 11–12.)

3.3 Pakkausmateriaalit

Pakkausmateriaalin tulee olla käyttäjälleen turvallinen, eikä siitä saa esimerkiksi liueta lääketuotteeseen kemikaaleja. Lääkepakkauksissa käytettäville materiaaleille on asetettu muun muassa seuraavat vaatimukset:

- Pakkausmateriaalin tulee kestää käsittelyä, eikä se saa hajota esimerkiksi kuljetuksessa.
- Pakkauksessa käytetty materiaali ei saa reagoida sen sisältävän lääketuotteen kanssa.
- Pakkauksen muodon tulee olla sellainen, että lääketuotetta on helppo käyttää.
- Materiaali ei saa olla soveltuva kasvualusta homeille.
- Pakkauksen eri osissa käytetyt materiaalit eivät saa reagoida keskenään.

Silmälääkevalmiste voidaan pakata esimerkiksi voideputkeen tai tippapulloon, josta annostellaan tuote silmään (Nasa 2014, 346; Bandyopadhyay ym. 2010, 271).

Taulukossa 1 on esitelty lääkepakkauksia käytettyjä materiaaleja sekä niiden käyttötarkoituksia.

TAULUKKO 1. Primaari- ja sekundaaripakkauksissa käytettyjä materiaaleja ja esimerkkejä niiden käytöstä (Nasa 2014, 346, muokattu).

Materi- aali	Pakkaus- tyyppi	Käyttötarkoitus
Lasi	Primaari	Ampullit, injektiopullot
Muovi	Primaari	Ampullit, injektiopullot, infuusionestepakkaukset, tip- papullot, sulkimet
	Sekundaari	Pakkauskääre
Metalli	Primaari	Voideputket, läpipainopakkaukset
Kumi	Primaari	Sulkimet
Pahvi	Sekundaari	Pakkauslaatikko
Paperi	Sekundaari	Tarrat, potilasohjeet

Lääketuotteiden pakkausmateriaaleina voidaan käyttää lasia, metallia, muovia ja kumia, jotka ovat keskeisimmät käytössä olevat materiaalit. Lasi valmistetaan si-
likasta, johon on yhdistetty metallioksidea, kalkkikiveä ja lasimurskaa. Lasin
hyöty pakkausmateriaalina on se, että materiaali kestää korkean lämpötilan ja
paineen steriloinnin aikana. Toisaalta lasi hajoaa helposti esimerkiksi iskujen vai-
kutuksesta. Yleisimmät muovipakkauksissa käytetyt materiaalit ovat polyetyleni,
polypropyleeni, polyvinyylikloridi, polyamidi, polystyreeni ja polykarbonaatti.
Näistä erityisesti polypropyleeniä käytetään paljon pakkausmateriaalina. Muo-
vien hyöty on niiden kestävyys. Suurimpana haittana voidaan pitää materiaalin
läpäisevyyttä. Esimerkiksi ilmakehän kaasut, höyryt ja nesteet voivat kulkeutua
muovipakkaukseen. Metallisten pakkausten valmistukseen käytetään alumiinia,
tinaa ja lyijyä. Metallipakkaukset kestävät hyvin käyttöä materiaalin vahvuuden
ansiosta. Haittana on, että pakkauksesta voi liueta metallihiukkasia tuotteeseen.
(Nasa 2014, 351–359.)

Kumia käytetään lääkepakkausten sulkimiin, kuten korkkeihin. Yleisesti käytössä
olevia kumimateriaaleja ovat butyylikumi, nitrilikumi ja silikonikumi. Näistä butyy-
likumi on erittäin käytetty materiaali sen edullisuuden vuoksi. (Nasa 2014, 364.)

4 TIIVEYSTESTIMENETELMÄT LÄÄKEPAKKAUKSIEN EHEYSTESTAAMISEEN

4.1 Vuoto pakkauksessa

Vuotokohta (engl. leak) määritetään pakkauksessa olevana tahattomana kanavana, josta materiaali pääsee liikkumaan pakkauksesta sisään sekä ulos. Vuoto (engl. leakage) taas voidaan määrittää massan liikkeeksi vuotokohdan läpi. Massa voi olla olomuodoltaan kaasua, nesteettä tai kiinteää ainetta. Tyypillisesti vuotokohdat ovat muodoltaan ja rakenteeltaan tuntemattomia. (Kirsch 2006, 370.)

Vuodon voimakkuutta voidaan mitata kvantitatiivisesti, ja sen SI-standardin mukainen yksikkö on pascalkuutiometriä per sekunti ($\text{Pa} \cdot \text{m}^3 / \text{s}$). Vuoto voidaan myös määrittää esimerkiksi todennäköisyytenä, jolla mikro-organismit pääsevät pakkaukseen. (Kirsch 2006, 370; Guazzo 2010a, 364.)

4.2 Tiiveystestimenetelmä ja sen valinta

Tiiveystestimenetelmällä tarkoitetaan testiä, jolla voidaan luotettavasti havaita pakkauksen rikkoutuminen ja jonka tarkoitus on todentaa lääkepakkausten eheys. Tiiveyteen vaikuttavat muun muassa pakkaukseen käytetyt komponentit ja materiaalit sekä pakkauksen rakenteen monimutkaisuus. Useimmissa pakkaustyypeissä esiintyy erittäin alhaista mutta havaittavaa kaasuvuotoa pakkausosan ja sulkimen välissä, ja tästä syystä ei ole mahdollista vaatia täysin vuotamattomia pakkauksia. (USP 2016a, 3, 5; USP 2016b, 1; Duncan 2019, 38.)

Pakkauksen eheydellä tarkoitetaan pakkauksen kykyä estää tuotteen pääsy ulos pakkauksesta, estää mikro-organismien pääsy pakkauksen sisään sekä rajoittaa haitallisten kaasujen ja aineiden sisäänkäyntiä. Pakkauksen eheyden on tarkoitus varmistaa, että tuote vastaa sille asetettuja turvallisuusstandardeja. (USP 2016a, 5.)

Käytettävä tiiveystestimenetelmä valitaan testattavan pakkauksen ja tuotteen mukaan. Valintaan vaikuttavat muun muassa pakkauksen materiaali ja rakenne sekä tuotteen koostumus. Kaikki menetelmät eivät sovellu kaikille pakkaustyypeille. Lisäksi menetelmän valinnassa tulee huomioida tuotteen koko elinkaari. (Kirsh 2006, 375; USP 2016a, 3.)

Myös se, mitä tiiveystestimenetelmällä halutaan tutkia, vaikuttaa menetelmän valintaan. Kaikkien tiiveystestimenetelmien tarkoitus on havaita mahdollinen vuoto. Tämän lisäksi voidaan haluta tutkia vuotokohdan sijaintia sekä määrittää vuotoonopeus, nesteen sisään- ja ulostulon mahdollisuus sekä mikrobien sisään-pääsyn mahdollisuus. Esimerkiksi mahdollisimman pieni havaitsemisraja ei saisi olla ainoa kriteeri menetelmän valintaan, vaan käytettävä testimenetelmä tulisi valita huomioiden menetelmälle soveltuva käyttötarkoitus. (USP 2016a, 5–6.)

4.3 Kvantitatiiviset ja kvalitatiiviset menetelmät

Kvantitatiivisella testimenetelmällä tarkoitetaan menetelmää, jonka tuottamia tuloksia voidaan vertailla objektiivisesti. Testimenetelmälle voidaan esimerkiksi määrittää selkeä havaitsemisraja ja lineaarinen alue. Kvalitatiivisten testimenetelmien tuottamat tulokset taas sisältävät enemmän subjektiivista tulkintaa, ja ne ovat alttiimpia virheille. Tästä syystä kvantitatiivista testimenetelmää tulisi suosia. Lisäksi kvalitatiivisten menetelmien tueksi suositellaan esimerkiksi spektrometrisen menetelmän käyttöä. (USP 2016a, 6.)

4.4 Deterministiset ja probabilistiset menetelmät

Deterministinen tiiveystestimenetelmä perustuu ilmiöihin, jotka seuraavat ennustettavia tapahtumaketjuja. Vuoto voidaan mitata fysikaalis-kemiallisilla menetelmillä, joita voidaan valvoa ja jotka ovat helposti hallittavissa. Mittauksen tuloksena saadaan kvantitatiivista tietoa. Probabilistisella menetelmällä tarkoitetaan todennäköisyyteen pohjaavaan menetelmää. Se perustuu sarjaan peräkkäisiä tai samanaikaisia tapahtumia, joihin jokaiseen liittyy epävarmuustekijöitä. Menetelmä tuottaa kvalitatiivisia tuloksia. Probabilistiset menetelmät vaativat tarkkaa

testiolosuhteiden valvontaa. Lisäksi testattavat näytemäärät ovat suuria, jotta epävarmuuden vaikutus testituloksiin jäisi mahdollisimman pieneksi. (USP 2016b, 5.)

4.5 Muita luokitteluja

Edellä esitettyjen luokittelujen lisäksi tiiveystestimenetelmät voidaan jakaa fysikaalis-kemiallisiin ja mikrobiologisiin menetelmiin. Fysikaalis-kemiallisissa tiiveystestimenetelmissä käytetään fysikaalisia ja kemiallisia analyysimenetelmiä. Fysikaalis-kemiallisiin tiiveystestimenetelmiin kuuluu sekä deterministisiä että probabilistisia menetelmiä. Mikrobiologisissa menetelmissä käytetään mikroorganismeja eheyden arvioimiseen. Mikrobiologiset menetelmät ovat probabilistisia menetelmiä. (USP 2016b, 5.)

Tiiveystestimenetelmät voidaan jakaa myös tuhoamattomiin ja tuhoaviin menetelmiin. Tuhoamattomissa menetelmissä näyte ei vahingoitu. Tuhoavissa menetelmissä näyte tuhoutuu tai altistuu kontaminaatioille, eikä näytettä voida enää käyttää. Kaupalliseen tarkoitukseen tai kliiniseen tutkimukseen varatuille näytteille voidaan suorittaa testejä vain tuhoamattomilla tiiveystestimenetelmillä. (USP 2016b, 7.)

Tiiveystestimenetelmät voidaan vielä jakaa off-line - ja on-line -menetelmiin. Off-line-menetelmissä testataan satunnaista, tuote-erästä eroteltua näyte-erää valmistuksen ulkopuolella. On-line-testaus on yhdistetty tuotteen valmistusprosessiin. (USP 2016b, 7.)

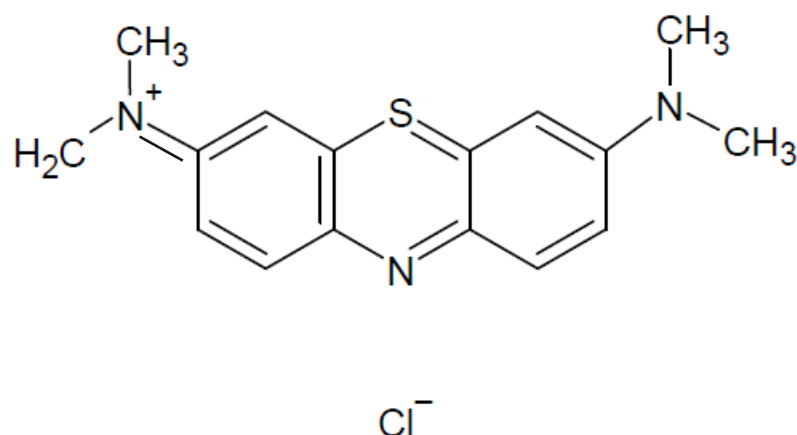
5 METYLEENISINI-IMMERSIOTESTI

5.1 Metyleenisini-immersiotestin toimintaperiaate

Metyleenisini-immersiotesti on merkkiaineen käyttöön perustuva testimenetelmä. Merkkiaineen lisäksi menetelmä perustuu paine-erojen hyödyntämiseen. Merkkiaine voi olla väriaine tai kemiallinen, kuten metalli-ioneja tai radionuklideja sisältävä merkkiaine. Merkkiainemenetelmä soveltuu ei-huukoille, jäykille sekä joustaville materiaaleille. (Kirsh 2006, 375; USP 2016c,13.)

Menetelmää, jossa merkkiaineena käytetään väriainetta, kutsutaan värjäysmenetelmäksi. Värjäysmenetelmässä havainnoidaan väriaineen pääsyä pakkaukseen upotustestin avulla, jossa näytteet upotetaan väriainetta sisältävään liuokseen ja altistetaan paineolosuhteiden vaihtelulle. Vaihtoehtoisesti näytteet voivat itsessään sisältää väriainetta ja ne upotetaan kirkkaaseen liuokseen. Testin pituus voi olla minuuteista tunteihin. Väriaineen kulkeutumista voidaan havainnoida joko kvantitatiivisesti kemiallisella analyysillä, esimerkiksi UV-Vis-spektrofotometrillä, tai kvalitatiivisesti visuaalisella tarkastelulla. Menetelmällä saadaan havaittua vain suhteellinen vuotokoko. Väriaineen käytön vuoksi menetelmässä testatut näytteet tuhoutuvat. (Kirsh 2006, 375; Guazzo 2010a, 366–367.)

Metyleenisini-immersiotestissä käytettävä väriaine on metyleenisininen ($C_{16}H_{18}ClN_3S$). Metyleenisininen on orgaaninen ja aromaattinen yhdiste, joka on kiinteässä muodossa väriltään tummanvihreä. Metyleenisinistä käytetään yleisesti erilaisissa värjäyksissä ja mikrobiologissa laboratorioissa. Metyleenisinin kemiallinen rakenne on esitetty kuviossa 1. (PubChem 2022; Thermo Fisher Scientific 2022.)



KUVIO 1. Metyleenisinisen kemiallinen rakenne.

Metyleenisini-immersiotestin testiparametrit ovat aika, paine ja pintajännitys. Aika, jonka näytteet ovat upotettuina liuokseen, vaikuttaa testitulokseen. Pitkä upotusaika mahdollistaa sen, että suurempi määrä väriliuosta pääsee mahdollisten vuotokohtien läpi testattavaan pakkaukseen. Myös testissä käytettyjen paineerojen suuruus vaikuttaa testitulokseen. Mitä suurempaa paineenvaihtelua käytetään, sen paremmin väriliuos kulkeutuu vuotoreitin kautta pakkaukseen. Lisäksi liuoksen pintajännitys vaikuttaa pakkauksen vuotokohtien havaitsemiseen. Mitä pienempi liuoksen pintajännitys on, sitä pienempiä vuotokohtia on mahdollista havaita. Metyleeni-immersiotestiä voidaan muokata käyttötärpeen mukaan vaihtelemalla testiparametrien arvoja. Tuloksia tarkastellaan visuaalisesti. Näyte läpäisee testin, mikäli näytepullon sisällä oleva neste on kirkasta. Jos nesteessä on sinistä väriä, näyte ei läpäise testiä. (Booth 2016; USP 2016c,13–14.)

Menetelmän toimivuutta arvioidaan positiivisten kontrollinäytteiden avulla. Positiivinen kontrolli on näyte, jossa on tarkoituksellinen vuoto, eikä se läpäise testiä. Jotta testiä voidaan pitää luotettavana, positiivisten kontrollien tulisi saada hylätty tulos. Havaitsemisrajaa voidaan määrittää positiivisilla kontrollinäytteillä, joissa vuotokohdan koko on tunnettu. Reikä voidaan valmistaa pulloon laserporaamalla. Positiivisina kontrollinäytteinä voidaan käyttää tuotannossa hylättyjä pakkauksia. Tällaisia on kuitenkin harvoin saatavilla riittäviä määriä. Tästä syystä positiiviset kontrollinäytteet valmistetaan usein itse. Ehjään pakkaukseen voidaan tehdä

reikä esimerkiksi neulalla, jonka halkaisija tunnetaan. Negatiiviset kontrollinäytteet ovat pakkauksia, jotka eivät vuoda. Negatiivisia ja positiivisia kontrollinäytteitä käytetään menetelmän kehittämiseen sekä validointiin. Kontrollinäytteiden tulee edustaa ominaisuuksiltaan tyypillisiä pakkauksia. (International Organization for Standardization 1995; Li 2013; USP 2016b, 10).

5.2 Metyleenisini-immersiotestin vahvuudet ja heikkoudet

Metyleenisini-immersiotestiä on käytetty jo 1970-luvulta lähtien, ja se on edelleen laajasti käytössä oleva tiiveystestimenetelmä. Metyleenisini-immersiotestin käyttöä on kritisoitu, koska menetelmä on kvalitatiivinen, ja siksi sille on vaikeaa määrittää yleisiä validointiparametreja. Lisäksi menetelmällä ei ole mahdollista tunnistaa pieniä vuotokohtia tai vuotoja. Metyleenisini-immersiotestin vahvuuksia ovat sen yksinkertainen toteutus ja toimintaperiaatteen helppo ymmärrettävyys. Lisäksi pitkä käyttöhistoria tekee menetelmästä toimintavarman. (Booth 2016; Stauffer 2020; Wuchner, One, Riesop, Moyles, Huang, Corcoran, Schmidt, Jakobs, Anderl, Milroy, Politi, Lance, Fadden, Hansen, Shirasaki, Tubbs, Menard, Huon & Nissar 2020.)

Menetelmän heikkous on tulosten luotettavuus. Visuaalinen tulostentarkastelu sisältää suuren inhimillisen virheen riskin. Tästä syystä on tärkeää, että tarkastelu tehdään huolellisesti. Valaistuksen tulee olla hyvä ja taustaväriin soveltuva visuaaliselle tarkastelulle. Lisäksi väriaine voi hävitä näkyvistä testin jälkeen tai imeytyä pakkausmateriaaliin. Näin ollen näytteen antamaa tulosta voi olla vaikeaa tulkita. Muita huomioitavia tekijöitä ovat näytteen tarkastelukulma sekä tarkastamisen suorittavan henkilön vireystila. Erityisesti tähän tulee kiinnittää huomioita pitämällä riittävästi taukoja. Lisäksi testeissä tulisi käyttää negatiivisia kontrollinäytteitä, joihin testattuja näytteitä voidaan verrata. USP suosittelee UV-Vis-spektrofotometrin käyttöä tulosten tarkastelussa. (Guazzo 2010a, 366–367; USP 2016c,14.)

Väriaineliuoksen effuusiota on haastavaa ennustaa tai kontrolloida. Erityisen vaikeaa tämä on pienien vuotojen kohdalla, jolloin esimerkiksi värjäävän merkkiai-

neen konsentraatio testatussa tuotteessa voi jäädä matalaksi. Testin onnistumiseen vaikuttavat myös esimerkiksi pakkauksen materiaali ja rakenne, vuotokohdan rakenne ja väriaineliuoksen pintajännitys. (USP 2016c,13.)

6 VALIDOINTI

6.1 Validointi osana laadun- ja riskinhallintaprosessia

Validoinnin avulla varmistetaan, että menetelmä tai laite soveltuu sille määritellyyn käyttötarkoitukseen. Lisäksi arvioidaan menetelmän tai laitteen suorituskykyä. Validointia edeltää validoinnin suunnittelu, jossa määritellään validoinnin kohde, tavoite, käytettävät näytteet, validointiin osallistuvat henkilöt ja vastuut, aikataulu, validoinnin laajuus ja määritettävät parametrit sekä käytettävät laitteet ja tilat. Validointisuunnitelmassa menetelmän validoinnille asetetaan hyväksymiskriteerit. (Hägg 2016, 9–14.)

Euroopan komission GMP-ohjeistuksen liitteessä 15 (Annex 15: Qualification and Validation) kuvataan periaatteet validoinnille. Validointi kuvataan osana laadun- ja riskinhallintaprosessia. Validoinnissa tulee huomioida koko lääketuotteen elinkaari. Tämä tarkoittaa sitä, että kaikki laitteistot, tilat ja prosessit, jotka liittyvät tuotteen elinkaareen, tulee huomioida validoinnin suunnittelussa, toteutuksessa ja dokumentoinnissa. Euroopan komission ohjeistuksen mukaan validointeja tulee suorittaa vain tehtävään pätevöitynyt henkilö hyväksytyjen protokollien mukaisesti. Validointia ohjaa validoinnin yleissuunnitelma (VMP), jossa määritellään validointia koskevat keskeiset käytännöt. (Euroopan komissio 2015, 2.)

6.2 Kvalitatiivisen menetelmän validointi

Kvalitatiiviselle menetelmälle on tyypillistä, että analyysin tulokset ovat binaarisia. Tulos voi olla muodoltaan ”kyllä” tai ”ei”. Keskeisin ero kvantitatiiviseen menetelmään on se, ettei kvalitatiivisella menetelmällä voida määritellä tarkkoja arvoja. (Trullols, Ruisánchez & Rius 2004, 138.)

Kuten kvantitatiivisten menetelmien validoinnissa, myös kvalitatiivisten menetelmien validoinnissa tavoite on varmistaa, että menetelmä soveltuu tarkoitukseensa. Kvalitatiivisen menetelmän suorituskykyä voidaan arvioida erilaisten laa-

tuparametrien avulla. Laatuparametrien sisältö voi vaihdella verrattuna kvantitatiivisen menetelmän mukaisiin validoinnissa käytettäviin laatuparametreihin. Taulukossa 2 on esitelty esimerkkejä laatuparametreista kvantitatiivisille ja kvalitatiivisille menetelmille.

TAULUKKO 2. Esimerkkejä laatuparametreista kvantitatiiviselle ja kvalitatiiviselle menetelmälle (Trullols ym. 2004, 141, muokattu).

Kvantitatiivinen menetelmä	Kvalitatiivinen menetelmä
Tarkkuus ja täsmällisyys	Väärien positiivisten ja negatiivisten aste
Epävarmuus	Herkkyys ja spesifisyys
Herkkyys ja spesifisyys	Selektiivisyys
Selektiivisyys	Havaitsemisraja
Lineaarisuus	Katkaisuraja (engl. cut-off limit)
Havaitsemisraja	Epäluotettavuusalue
Häiriökestävyys	Häiriökestävyys

Keskeisiä tapoja arvioida kvalitatiivisen menetelmän suorituskkyä on tarkastella väärien negatiivisten ja väärien positiivisten tulosten määriä ja suhteita laske-
malla saaduille tuloksille väärien positiivisten ja väärien negatiivisten asteet ja
herkkyys- ja spesifisyysasteet. (Trullols ym. 2004, 140, 141.)

6.3 Validointiparametrit

Validoinnin laajuus ja määritettävät parametrit valitaan validoinnin tarkoituksen mukaan. Esimerkiksi itsekehityt sisäiset menetelmät vaativat laajemman validoinnin kuin standardimenetelmät. Myös tiiveystestimenetelmien validoinnin kohdalla tarkasteltavat validointiparametrit valitaan validoinnin laajuuden mukaan. USP on ohjeistuksessaan antanut suosituksen niistä validointiparametreista, joita tiiveystestimenetelmän validoinnissa olisi suositeltavaa tarkastella ja jotka voidaan valita validoitavan menetelmän mukaan. (Hägg 2016, 11; USP 2016b, 6–7.)

6.3.1 Tarkkuus

Tarkkuudella tarkoitetaan mitatun arvon ja todellisen arvon yhtäpitävyyttä. Tiiveystestimenetelmien kohdalla tarkkuus mittaa menetelmän kykyä erotella oikein pakkaukset, joissa vuotokohdan koko on yli havaitsemisrajan ja pakkaukset, joissa vuotokohdan koko jää alle havaitsemisrajan. Tämä tarkoittaa menetelmän kykyä erottaa vuotavat pakkaukset vuotamattomista. (Hägg 2016, 31; USP 2016b, 7.)

Menetelmän tarkkuutta voidaan tarkastella väärin positiivisten ja väärin negatiivisten asteilla. Väärin positiivisten asteella tarkoitetaan todennäköisyyttä, jolla menetelmä antaa positiivisen tuloksen näytteelle, joka on tunnetusti negatiivinen. Väärin positiivisten aste voidaan laskea seuraavalla kaavalla 1:

$$\text{Väärin positiivisten aste} = \frac{vp}{on + vp}, \quad (1)$$

jossa vp on väärin positiivisten näytteiden lukumäärä ja on oikeiden negatiivisten näytteiden lukumäärä. Vastaavasti väärin negatiivisten aste tarkoittaa todennäköisyyttä, jolla menetelmä antaa negatiivisen tuloksen positiiviseksi tunnetulle näytteelle. Väärin negatiivisten aste voidaan laskea seuraavalla kaavalla 2:

$$\text{Väärin negatiivisten aste} = \frac{vn}{op + vn}, \quad (2)$$

jossa vn on väärin negatiivisten näytteiden lukumäärä ja op oikeiden positiivisten näytteiden lukumäärä. Vääriä positiivisia ja vääriä negatiivisia näytteitä tulisi esiintyä mahdollisimman vähän, ja väärin positiivisten että väärin negatiivisten aste tulisi olla lähellä nollaa. (Trullols ym. 2004, 141.)

6.3.2 Täsmällisyys

Täsmällisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä tuottaa luotettavia ja toistettavia tuloksia. Tiiveystestimenetelmien kohdalla täsmällisyyttä voidaan arvioida toistettavuudella ja uusittavuudella. Toistettavuutta voidaan arvioida toistamalla testiä samanlaisena samanlaisille näytteille sekä toistamalla testiä niin, että testin suorittaa eri henkilö eri päivinä mahdollisesti eri laitteistoilla. Uusittavuuden kohdalla testi suoritetaan eri laboratorioissa. (Hägg 2016, 32; USP 2016b, 8.)

6.3.3 Havaitsemisraja

Havaitsemisraja on pienin pitoisuus tutkittavaa yhdistettä, mikrobia tai muuta biologista tekijää, joka menetelmällä voidaan luotettavasti todeta. Tiiveystestimenetelmien tapauksessa havaitsemisrajalla tarkoitetaan pienintä vuotoa, jonka menetelmä pystyy luotettavasti havaitsemaan. (Hägg 2016, 20; USP 2016b, 6.)

Havaitsemisrajaa voidaan tarkastella kvalitatiivisessa testimenetelmässä herkkyysasteella, joka voidaan määrittää menetelmän kyvyksi tunnistaa positiivinen näyte positiiviseksi. Herkkyysaste voidaan laskea kaavan 3 mukaisesti:

$$\begin{aligned} \text{Herkkyysaste} &= \frac{\text{testatut positiiviset näytteet}}{\text{tunnettujen positiivisten lkm}} \\ &= \frac{op}{op + vn}, \end{aligned} \tag{3}$$

jossa *op* on oikeat positiiviset näytteet ja *vn* väärät negatiiviset näytteet. Tuloksen tulisi olla lähellä arvoa 1, joka kertoo hyvästä herkkyydestä. Tällöin testissä ei ole esiintynyt positiivisia näytteitä, jotka olisivat antaneet negatiivisen tuloksen. (Trulols ym. 2004, 141.)

6.3.4 Spesifisyys

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä erotella tarkasti vuotavat ja vuotamattomat pakkaukset toisistaan häiritsevista tekijöistä huolimatta. Spesifisyyttä voidaan tarkastella spesifisyysasteen avulla. Spesifisyysaste voidaan määrittää todennäköisyydeksi, jolla menetelmä tunnistaa tunnetun negatiivisen näytteen negatiiviseksi. Spesifisyydelle voidaan laskea spesifisyysaste seuraavalla kaavalla 4:

$$\begin{aligned} \text{Spesifisyysaste} &= \frac{\text{testatut negatiiviset näytteet}}{\text{tunnettujen negatiivisten lkm}} \\ &= \frac{on}{on + vp}, \end{aligned} \quad (4)$$

jossa *on* on oikeiden negatiivisten lukumäärä ja *vp* väärin positiivisten lukumäärä. Tuloksen tulisi olla lähellä arvoa 1, joka kertoo hyvästä spesifisyydestä. (Trullols ym. 2004, 142; USP 2016b, 8.)

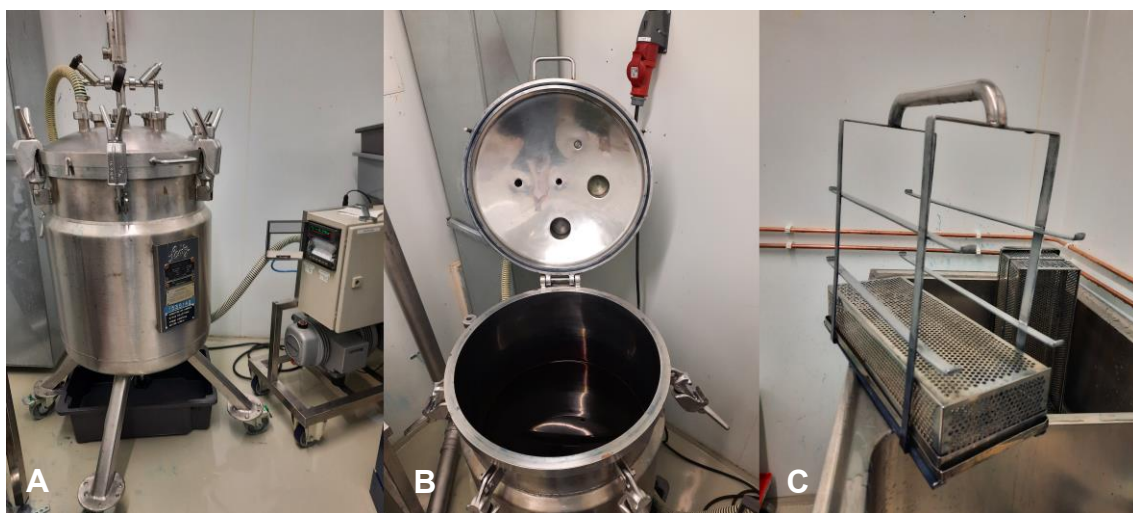
6.3.5 Häiriöalttius

Häiriöalttiudella voidaan kuvata menetelmän kykyä torjua pienien testiolosuhteissa tapahtuvien muutosten vaikutusta testituloksiin. Tiiveystestimenetelmien tapauksessa häiriöalttius tarkoittaa menetelmän kykyä erotella tarkasti vuotavat pakkaukset vuotamattomista huolimatta pienistä, tarkoituksellisista muutoksista testiparametreissa. Häiriöalttiuden tarkastelua varten määritetään kriittiset testiparametrit, joiden muutoksilla on vaikutusta tuloksiin. Häiriöalttiutta arvioidaan suorittamalla testiä muutetuilla testiparametreilla. (Hägg 2016, 22; USP 2016b, 9.)

7 TYÖN KOKEELLINEN OSA

7.1 Testauslaitteisto

Validointitesteissä käytetty metyleenisii-immersiotestauslaitteisto koostui painesäiliöstä ja eheystestauslaitteesta, jossa oli alipainepumppu sekä piirturi (kuva 1). Painesäiliö näkyy kuvassa 1A vasemmalla. Oikealla kuvassa on eheystestauslaite, alipainepumppu sekä laitteessa oleva piirturi. Piirturi piirtää ajetun ohjelman perusteella käyrän tulostepaperille, josta voidaan todentaa paineenvaihtelut.



KUVA 1. Eheystestauslaitteisto, A: Painesäiliö ja siihen yhdistetty alipainepumppu sekä piirturi, B: Metyleenisiniliuos painesäiliössä, C: Näyteteline ja -kasetti.

Kuvassa 1B on painesäiliö ja siellä oleva metyleenisiniliuos ylhäältä päin kuvattuna. Kuvassa 1C näkyy metyleenisini-liuokseen upotettava näyteteline, jossa on näytekasetti. Telineeseen voidaan asettaa kolme näytteillä täytettyä näytekasettia. Kolmeen näytekasettiin mahtuu yhteensä noin 300 silmälääkepakkauspulloa.

Metyleenisiniliuos valmistettiin liuottamalla kiinteää metyleenisinistä vesijohtoveteen. Valmistetun liuoksen pitoisuus oli 0,5 % (w/v). Validointitestien suorittamisen aikana testien välillä metyleenisiniliuokseen lisättiin vettä, jolloin sen pitoisuus ei enää ollut alkuperäinen 0,5 %. Veden lisääminen liuokseen on normaali

käytäntö, sillä liuosta poistuu painesäiliöstä aina näytetelineen mukana, ja testauksen aikana upotetun telineen tulisi olla metyleenisiniliuoksen peittämänä. Veden lisääminen metyleenisiniliuokseen ei vaikuttanut validointitestien tuloksiin.

7.2 Näytemateriaali

Menetelmän validoinnissa testattaviksi näytteiksi valittiin kuusi silmälääkepakauspullotyyppiä. Näytepullot sisälsivät WFI-vettä (engl. water for injection). Näytteet yksilöitiin kirjaimilla A, B, C, D, E ja F.

Validoinnissa testattiin kahdenlaisia positiivisia kontrollinäytteitä. Ensiksi testattiin positiivisia kontrollinäytteitä, jotka valmisteltiin kiertämällä pullon korkkia ensin auki ja sitten takaisin lähes kiinni. Toiseksi testattiin kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä, joihin teetettiin reikä laserporaustekniikalla. Kvantitatiivisiksi positiivisiksi kontrolleiksi valittiin kolme näytteinä käytetyistä pullotyypeistä. Positiivisia kontrolleja teetettiin kolmella eri reikäkoolla, jotka olivat 12,5 µm, 25 µm ja 50 µm. Reikäkoot valittiin jo olemassa olevan tiedon perusteella.

7.3 Testimenetelmän kuvaus ja testin suorittaminen

Testiohjelman ja laitteiston toiminta varmistettiin ennen validoinnin aloittamista kvalifointiprotokollan mukaisesti, ja ne todettiin toimiviksi. Lisäksi ohjelman kestoa tarkasteltiin validointitestien suorituksen aikana mittaamalla testin kestoa sekuntikellolla. Testiohjelma on kuvattu taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Testiohjelman vaiheiden kuvaus.

<i>t</i> min	Vaiheen kuvaus
0	Ohjelma alkaa
1	Ensimmäinen vakuumisykli alkaa, paine käy pulsseittain 0,4 barin ja 0,2 barin alipaineen välillä
11	Paine palautuu normaaliin ilmanpaineeseen
12	Toinen vakuumisykli alkaa, 0,4 barin ja 0,2 barin alipaineen välillä
22	Paine palautuu normaaliin ilmanpaineeseen
23	Ohjelma loppuu

Testiohjelma alkoi kestoltaan yhden minuutin viiveellä, jota seurasi ensimmäinen 10 minuutin vakuumisykli. Syklin jälkeen seurasi minuutin pituinen tauko, jonka aikana paine nousi normaaliin ilmanpaineeseen. Tämän jälkeen alkoi toinen 10 minuutin vakuumisykli. Ohjelma päättyi yhden minuutin viiveeseen. Koko ohjelman pituus oli 23 minuuttia. Vakuumisyklin aikana paine kävi pulsseittain 0,4 barin ja 0,2 barin alipaineen välillä, kunnes syklin loppuksi paine nousi normaaliin ilmanpaineeseen. Pulssien määrä vaihteli testien välillä. Sillä ei kuitenkaan ollut vaikutusta testituloksiin.

Metyleenisini-immersiotestin suoritus aloitettiin laittamalla näytteet telineeseen asetettaviin näytekasetteihin. Teline upotettiin painesäiliöön, jossa oli metyleenisiniliuos. Säiliö suljettiin ja laitteen ohjauspaneelista käynnistettiin ohjelma. Testin jälkeen painesäiliö avattiin ja näytetelineet nostettiin huuhdeltavaksi. Huolellisen huuhtelun jälkeen näytteitä tarkasteltiin hyvässä valaistuksessa. Näyte läpäisi testin, mikäli näytepullon sisällä oleva neste oli kirkasta. Positiivisten kontrollinäytteiden ei tullut läpäistä testiä, vaan niiden tuli sisältää sinistä nestettä.

7.4 Validoinnin suorittaminen

Menetelmän validointi suunniteltiin ja tulokset raportoitiin GMP-ohjeistusten mukaisesti. Keskeisinä ohjeistuksina käytettiin Euroopan komission GMP-ohjeen liitteitä 1 (Annex 1: Manufacture of Sterile Products) ja 15 (Annex 15: Qualification and Validation). Lisäksi suunnitteluun käytettiin USP:n ohjekokoelmaa (<1207>

Package Integrity Evaluation – Sterile Products). Menetelmän validoinnille määriteltiin hyväksymiskriteeriksi valittujen validointiparametrien määrittäminen. Validointiparametreiksi valittiin tarkkuus, täsmällisyys, havaitsemisraja, spesifisyys ja häiriöalttius.

Validointitestejä suunniteltiin yhteensä 15 (liite 1). Testit suunniteltiin niin, että analysoitujen näytteiden määrä olisi riittävä luotettavien tulosten saamiseksi ja tarkasteltavat validointiparametrit voitaisiin määrittää saatujen tulosten perusteella. Validointitesteissä 1 ja 2 haluttiin kartoittaa menetelmän tarkkuutta ja katsoa, tuleeko testeissä vääriä negatiivisia tai vääriä positiivisia tuloksia. Validointitesteissä 3–5 haluttiin testata kvantitatiivisia kontrollinäytteitä havaitsemisrajan määrittämiseksi. Validointitesteissä 6–10 tarkasteltiin menetelmän täsmällisyyttä toistettavuuden avulla. Validointitestissä 11 testattiin menetelmän maksimitäytösmäärää. Samalla tarkasteltiin menetelmän spesifisyyttä ja häiriöalttiutta, kuten myös validointitesteissä 12–15, joissa puolitettiin testiaika ajamalla kahden vakuumisyklin sijasta vain yksi sykli. Validointitesteissä 12–15 tarkasteltiin myös menetelmän täsmällisyyttä.

Validointitestit suoritettiin liitteessä 2 esitetyn ajopäiväkirjan mukaan. Validoinnissa analysoitiin yhteensä 1148 silmälääkepakkauspulloa, joista 930 analysoitiin negatiivisina kontrollinäytteinä ja 90 positiivisina kontrollinäytteinä validointitestissä 2. Lisäksi analysoitiin 128 kvantitatiivista positiivista kontrollinäytettä.

8 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

8.1 Tarkkuus

Menetelmän tarkkuutta arvioitiin analysoimalla kaikkia kuutta näytetyyppeä, positiivisia kontrollinäytteitä ja kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä. Tarkkuutta arvioitiin väärin negatiivisten ja väärin positiivisten asteella. Väärin positiivisten aste laskettiin kaavalla 1. Seuraavassa on laskettu väärin positiivisten aste validointitestille 1.

$$\text{Väärin positiivisten aste} = \frac{0}{90 + 0} = 0,00.$$

Väärin positiivisten aste määritettiin validointitesteille 1 ja 6–15, joissa analysoitiin negatiivisia kontrollinäytteitä.

Väärin negatiivisten aste määritettiin validointitesteille 2–15, joissa analysoitiin positiivisia kontrollinäytteitä ja kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä. Väärin negatiivisten aste laskettiin kaavalla 2. Seuraavassa on laskettu väärin negatiivisten aste validointitestille 2.

$$\text{Väärin negatiivisten aste} = \frac{5}{85 + 5} = 0,056 \approx 0,06.$$

Taulukkoon 4 on koottu validointitestien tulokset väärin negatiivisten ja väärin positiivisten asteiden osalta.

TAULUKKO 4. Väärien negatiivisten ja väärien positiivisten asteet validointitesteille.

Testi	Väärä negatiivinen tulos lkm	Väärien negatiivisten aste	Väärä positiivinen tulos lkm	Väärien positiivisten aste
1	-	-	0	0,00
2	5	0,06	-	-
3	2	0,07	-	-
4	1	0,03	-	-
5	6	0,20	-	-
6	0	0,00	0	0,00
7	0	0,00	0	0,00
8	0	0,00	0	0,00
9	0	0,00	0	0,00
10	0	0,00	0	0,00
11	0	0,00	0	0,00
12	0	0,00	0	0,00
13	0	0,00	0	0,00
14	0	0,00	0	0,00
15	0	0,00	0	0,00

Väärien positiivisten aste oli kaikissa validointitesteissä, joille arvo määritettiin, 0,00. Testeissä 2–5, joissa analysoitiin vain positiivisia kontrollinäytteitä, väärien negatiivisten aste oli 0,03–0,20. Laserporattujen reikien kohdalla huomattiin, että kaikki laserporauksella tehdyt reiät eivät vuotaneet. Tämä näkyy erityisesti testin 5 tuloksissa, jossa väärien negatiivisten aste on korkein. Validointitesteissä 6–15, joissa analysoitiin sekä negatiivisia kontrollinäytteitä että kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä, ei esiintynyt vääriä positiivisia eikä vääriä negatiivisia tuloksia. Tämä kertoo testimenetelmän hyvästä tarkkuudesta.

Taulukossa 5 on esitetty kvantitatiivisten positiivisten kontrollien tulokset näytekohtaisesti. Taulukossa on myös analysoitujen näytteiden määrät näytetyypin mukaan.

TAULUKKO 5. Kvantitatiivisten positiivisten kontrollien tulokset näytekohtaisesti.

Näyte	Reiän koko	Oikea positiivinen tulos lkm	Väärä negatiivinen tulos lkm	Näytteet yhteensä lkm
A	12,5 µm	8	2	10
A	25 µm	9	1	10
A	50 µm	5	5	10
D	12,5 µm	10	0	10
D	25 µm	10	0	10
D	50 µm	10	0	10
E	12,5 µm	20	0	20
E	25 µm	38	0	38
E	50 µm	9	1	10

Eniten vuotamattomia pulloja havaittiin näytepullo A:n kohdalla. Erityisesti näytepullo A, jossa oli 50 µm:n reikä, ei vuotanut odotetusti. Väärien negatiivisten määrä oli puolet testatuista pulloista. Tähän vaikutti näytteenä käytetyn pakkauspullon pintaominaisuudet, jolloin reiän poraaminen ei onnistunut odotetusti.

Taulukossa 6 on esitetty väärien negatiivisten aste validointitesteissä analysoiduille kvantitatiivisille positiivisille kontrollinäytteille poratun reiän koon mukaan. Lisäksi taulukossa on esitetty oikeiden positiivisten ja väärien negatiivisten näytteiden lukumäärät.

TAULUKKO 6. Väärien negatiivisten aste validointitesteissä analysoiduille kvantitatiivisille positiivisille kontrolleille.

Reiän koko	Näytteet yhteensä	Oikea positiivinen tulos lkm	Väärä negatiivinen tulos lkm	Väärien negatiivisten aste
12,5 µm	40	38	2	0,05
25 µm	58	57	1	0,02
50 µm	30	24	6	0,20

Tulosten perusteella vähiten vääriä negatiivisia tuloksia esiintyi kvantitatiivisissa kontrollinäytteissä, joissa oli 25 µm:n reikä. Väärien negatiivisten aste näille näytteille oli 0,02. Eniten vääriä negatiivisia tuloksia esiintyi kontrollinäytteissä, joissa oli 50 µm:n reikä. Väärien positiivisten aste näille näytteille oli 0,20.

Taulukossa 7 on esitetty validointitestissä 2 analysoitujen positiivisten kontrollinäytteiden näytekohtaiset tulokset.

TAULUKKO 7. Tulokset validointitestissä 2 analysoiduille positiivisille kontrollinäytteille.

Näyte	Oikea positiivinen tulos lkm	Väärä negatiivinen tulos lkm	Näytteet yhteensä lkm
A	15	0	15
B	15	0	15
C	15	0	15
D	14	1	15
E	11	4	15
F	15	0	15

Eniten vääriä negatiivisia tuloksia esiintyi näytteen E kohdalla, jossa vuotamattomia pulloja oli yhteensä neljä. Näytteen D kohdalla testattujen näytepullojen joukossa oli yksi vuotamaton pullo.

Taulukossa 8 on esitetty validointitesteissä negatiivisina kontrollinäytteinä analysoidut näytteet ja niiden lukumäärät näytekohtaisesti.

TAULUKKO 8. Tulokset validointitesteissä analysoiduille negatiivisille kontrollinäytteille.

Näyte	Väärä positiivinen tulos lkm	Oikea negatiivinen tulos lkm	Näytteet yhteensä lkm
A	0	105	105
B	0	105	105
C	0	105	105
D	0	255	255
E	0	255	255
F	0	105	105

Validointitesteissä analysoitiin yhteensä 930 näytettä negatiivisina kontrollinäytteinä. Eniten analysoitiin näytteitä D ja E, sillä niitä käytettiin validointitestissä 11 maksimikuorman testaamisessa. Tulosten perusteella voidaan todeta, että validointitesteissä analysoiduissa näytteissä ei esiintynyt vääriä positiivisia tuloksia, ja kaikki näytteet läpäisivät testin.

8.2 Täsmällisyys

Menetelmän täsmällisyyttä arvioitiin analysoimalla kaikkia näytetyyppejä ja kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä. Täsmällisyyttä arvioitiin erityisesti validointitesteissä 6–10 mutta myös testeissä 12–15. Täsmällisyyttä ja toistettavuutta arvioitiin toistamalla testiä samanlaisena, samoilla näytetyypeillä ja näytemäärillä lyhyen ajan sisällä niin, että testejä suoritti kaksi eri henkilöä (taulukko 9).

TAULUKKO 9. Validointitestien 6–10 ja 12–15 tulokset.

Testi	Suorittaja	Näytteet lkm	Väärä positiivinen tulos lkm	Positiiviset kontrollinäytteet lkm	Väärä negatiivinen tulos lkm
6	1	60	0	4	0
7	1	60	0	4	0
8	1	60	0	4	0
9	2	60	0	4	0
10	2	60	0	4	0
12	1	60	0	4	0
13	1	60	0	4	0
14	2	60	0	4	0
15	2	60	0	4	0

Testien välisissä tuloksissa ei havaittu eroja. Testattujen näytetyyppien välillä ei havaittu tulosten välillä eroja. Eri suorittajalla ei ollut vaikutusta testituloksiin. Kuten taulukossa 9 on esitetty, testeissä 6–10 eikä 12–15 ei esiintynyt vääriä negatiivisia eikä vääriä positiivisia tuloksia. Tämä tarkoittaa, että menetelmä tunnisti vuotavat näytteet vuotamattomista.

8.3 Havaitsemisraja

Menetelmän havaitsemisrajaa arvioitiin tarkastelemalla kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä. Havaitsemisrajaa arvioitiin laskemalla herkkyysaste testeille, joissa käytettiin kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä. Herkkyysaste laskettiin kaavalla 3. Seuraavassa on laskettu herkkyysaste testille 3.

$$\text{Herkkyysaste} = \frac{28}{28 + 2} = 0,933 \approx 0,93.$$

Taulukossa 10 on esitetty testikohtaisesti analysoidut kvantitatiiviset positiiviset kontrollinäytteet ja niiden lukumäärät. Jokaiselle näytetyypille on laskettu herkkyysaste. Lisäksi herkkyysaste laskettiin testikohtaisesti.

TAULUKKO 10. Analysoidut kvantitatiiviset positiiviset kontrollinäytteet ja niille lasketut herkkyysasteet testikohtaisesti.

Testi	Näyte	Herkkyysaste (näyte)	Herkkyysaste (testi)
3	Näyte A 12,5 µm	0,80	0,93
	Näyte D 12,5 µm	1,00	
	Näyte E 12,5 µm	1,00	
4	Näyte A 25 µm	0,90	0,97
	Näyte D 25 µm	1,00	
	Näyte E 25 µm	1,00	
5	Näyte A 50 µm	0,50	0,80
	Näyte D 50 µm	1,00	
	Näyte E 50 µm	0,90	
6	Näyte E 12,5 µm	1,00	1,00
	Näyte E 25 µm	1,00	
7	Näyte E 12,5 µm	1,00	1,00
	Näyte E 25 µm	1,00	
8	Näyte E 12,5 µm	1,00	1,00
	Näyte E 25 µm	1,00	
9	Näyte E 12,5 µm	1,00	1,00
	Näyte E 25 µm	1,00	
10	Näyte E 12,5 µm	1,00	1,00
	Näyte E 25 µm	1,00	
11	Näyte E 25 µm	1,00	1,00
12	Näyte E 25 µm	1,00	1,00
13	Näyte E 25 µm	1,00	1,00
14	Näyte E 25 µm	1,00	1,00
15	Näyte E 25 µm	1,00	1,00

Validointitesteissä 3–5 testattiin vain kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä. Testikohtainen herkkyysaste vaihteli näissä testeissä välillä 0,80–0,97. Herkkyysaste oli 0,80 testissä 5, jossa testattiin 50 µm:n reikiä. Testissä 4, jossa testattiin 25 µm:n reikiä, herkkyysaste oli 0,97. Tässä testissä esiintyi yksi vuotamaton pullo. Testeissä 6–15 käytettiin kvantitatiivisia positiivisia kontrollinäytteitä todentamaan testien toimivuutta. Näissä kaikissa testeissä herkkyysaste oli 1,00.

Näytekohtainen herkkyysaste vaihteli välillä 0,50–1,00 testeissä 3–5. Eniten testattu näyte oli E, jonka herkkyysaste vaihteli välillä 0,90–1,00. Paras herkkyysaste oli näytteellä D, jolle lasketut herkkyysasteet olivat kaikissa tarkasteluissa testeissä 1,00. Huonoin herkkyysaste oli näytteellä A, jonka herkkyysaste vaihteli testeissä 0,50 ja 0,90 välillä. Kuten jo luvussa 8.1 todettiin, laser-reiityksen onnistumiseen vaikuttaa rei'itettävä materiaali. Tästä syystä näytteeseen A tehdyt reiitykset eivät toimineet toivotulla tavalla.

Taulukossa 11 on esitetty lasketut herkkyysasteet kvantitatiivisille positiivisille kontrollinäytteille laserporatun reiän koon mukaan.

TAULUKKO 11. Kvantitatiiviset positiiviset kontrollinäytteet poratun reiän koon mukaan ja niille lasketut herkkyysasteet.

Näyte	Näytteet yhteensä lkm	Oikea positiivinen tulos lkm	Väärä positiivinen tulos lkm	Herkkyysaste
12,5 µm	40	38	2	0,95
25 µm	58	57	1	0,98
50 µm	30	24	6	0,80

Herkkyysasteet vaihtelivat 0,80 ja 0,98 välillä. Paras herkkyysaste oli positiivisilla kontrollinäytteillä, joissa oli 25 µm:n reikä, huonoin taas kontrollinäytteillä 50 µm:n kokoisella reiällä. Testitulosten perusteella voitiin havaitsemisraja määrittää 25 µm:iin herkkyysasteen tarkastelun perusteella.

8.4 Spesifisyys

Spesifisyyttä arvioitiin vaihtelemalla testin suorittajaa sekä testattavien näytteiden määrää. Menetelmän spesifisyyttä arvioitiin spesifisyysasteella, joka laskettiin kaavalla 4. Seuraavassa on esitetty spesifisyysasteen laskeminen testille 1:

$$\text{Spesifisyysaste} = \frac{90}{90 + 0} = 1,00.$$

Taulukossa 12 on esitetty spesifisyysasteet testeille 1 ja 6–15. Näytteiden lukumäärässä ei ole huomioitu analysoituja positiivisia kontrollinäytteitä.

TAULUKKO 12. Testikohtaiset spesifisyysasteet.

Testi	Näytteiden lukumäärä	Spesifisyysaste
1	90	1,00
6	60	1,00
7	60	1,00
8	60	1,00
9	60	1,00
10	60	1,00
11	300	1,00
12	60	1,00
13	60	1,00
14	60	1,00
15	60	1,00

Kun verrataan validointitestien 1 ja 6–10 tuloksia testien 11–15 tuloksiin, voidaan todeta, että spesifisyysaste on kaikissa 1,00. Näin ollen testeissä ei ole havaittu vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia. Testit 11–13 suoritti eri henkilö kuin testit 14–15. Näidenkään testien tulosten välillä ei havaittu eroja. Testissä 11 analysoitu maksimikuorma ei vaikuttanut heikentävästi tuloksiin. Testimenetelmä tunnisti vuotavat pakkauspullot vuotamattomista.

8.5 Häiriöalttius

Menetelmän häiriöalttiutta testattiin puolittamalla testiaika 23 minuutista 11 minuuttiin testiajan ollessa yksi testimenetelmän kannalta kriittinen testiparametri. Taulukossa 13 on esitetty testien 6–10 ja 12–15 tulokset, jotta voidaan verrata testiajan vaikutusta tuloksiin. Näissä kaikissa testeissä analysoitiin sama määrä näytteitä.

TAULUKKO 13. Testien 6–10 ja 12–15 tulokset.

Testi	Ajetut syklit lkm	Näytteet lkm	Väärä positiivinen tulos lkm	Positiiviset kontrollinäytteet lkm	Väärä negatiivinen tulos lkm
6	2	60	0	4	0
7	2	60	0	4	0
8	2	60	0	4	0
9	2	60	0	4	0
10	2	60	0	4	0
12	1	60	0	4	0
13	1	60	0	4	0
14	1	60	0	4	0
15	1	60	0	4	0

Validointitestien 12–15 tulosten välillä ei havaittu eroja testeihin, joissa ajettiin kaksi tyhjiösykliä. Eroja ei myöskään havaittu testien välillä, jotka suoritti eri henkilö. Testeissä ei esiintynyt vääriä positiivisia tai negatiivisia näytteitä.

9 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli validoida metyleenisini-immersiotesti valittujen silmälääkepakkauspullojen eheyden testaamiseen. Tarkoituksena oli suorittaa menetelmänvalidointitestejä, joiden perusteella arvioitiin menetelmän suorituskkyä. Menetelmän validoinnille määritellyn hyväksymiskriteerin mukaan menetelmälle tuli pystyä määrittämään valitut validointiparametrit. Työlle asetetut tavoitteet saavutettiin.

Validointitesteissä näytteinä käytettiin kuutta erilaista silmälääkepakkauspulloa, joille menetelmä haluttiin validoida. Validointitesteissä analysoitiin yhteensä 1148 silmälääkepakkauspulloa. Testitulosten perusteella analysoitujen pullojen välillä ei havaittu eroja yksittäisissä testeissä eikä testien välillä. USP:n mukaan probabilistisen tiiveystestimenetelmän kohdalla tulee huomioida riittävä näytemäärä, jotta menetelmän avulla voidaan saada luotettavia tuloksia. Analysoitujen silmälääkepakkauspullojen määrää voidaan pitää tulosten luotettavuuden arvioimisen kannalta riittävänä. (USP 2016b, 5.)

Havaitsemisrajan määrittämiseksi analysoitiin 128 kvantitatiivista positiivista kontrollinäytettä, joihin oli tehty reikä laserporaamalla. Kaikki kvantitatiiviset positiiviset kontrollinäytteet eivät vuotaneet. Laserporaustekniikan heikkoudeksi osoittautui se, että reiän tekeminen pakkauksen pintaan ei täysin onnistunut. Tämä saattoi johtua pakkausmateriaalista. Lisäksi pakkausmateriaali saattoi palautua poraamisen jälkeen. Positiivisia kontrollinäytteitä, joissa oli 25 µm:n reikä, analysoitiin yhteensä 58. Näistä yksi näyte ei vuotanut. Havaitsemisrajaksi määritettiin 25 µm tulosten perusteella. Validointitesteistä saatujen tulosten perusteella menetelmää voidaan pitää soveltuvana sille määritettyyn käyttötarkoitukseensa. Se tunnistaa vuotavat silmälääkepakkauspullot, joissa vuotokoko ylittää määritetyn havaitsemisrajan, vuotamattomista pakkauksista. Testattujen näytteiden määrä voidaan pitää riittävänä luotettavien tulosten saamiseksi. Jos havaitsemisrajaa haluttaisiin tutkia tarkemmin, se vaatisi lisää testejä suuremmilla näytemäärillä.

Metyleenisini-immersiotestin testiparametrit ovat aika, paine ja pintajännitys. Tässä työssä arvioitiin testiohjelman keston vaikutusta testituloksiin. Testiajan puolittaminen ei vaikuttanut saatuihin tuloksiin. Saaduissa tuloksissa ei havaittu eroja niihin testeihin, joissa testiaikaa ei ollut puolitettu. Jatkossa olisi hyödyllistä tutkia myös paineen ja pintajännityksen vaikutusta testituloksiin. Tällaisilla testeillä saataisiin tarkempaa tietoa esimerkiksi menetelmän häiriöalttiudesta. Lisäksi menetelmän suorituskkyä voisi arvioida esimerkiksi tuotannosta löytyneiden vuotavien pakkausten avulla. Käytännössä pakkauksissa esiintyvät vuodot ovat harvoin selkeitä reikiä pakkauksen kyljessä. Esimerkiksi silmälääkepakkaus-pullossa esiintyvät tyyppiviat ovat löysä korkki, puuttuva tai huonosti kiinnittynyt tiputin sekä viallinen tiputin tai korkki (USP 2016b, 11). Tämän työn puitteissa tällaisia tarkasteluita ei ollut aikataulun vuoksi mahdollista toteuttaa.

Positiivisten kontrollinäytteiden merkitys on testin kannalta suuri, sillä testimenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisilla kontrollinäytteillä. Validointitesteissä kävi ilmi, että nyt käytössä olevat positiiviset kontrollit, joista testin suorittaja kiertää korkkia ensin auki ja sitten kiinni ennen testiä, eivät toimineet 100 prosenttisesti varmuudella. Tästä syystä positiiviset kontrollinäytteet tullaan jatkossa valmistelevaan niin, että pakkauksen kylkeen tehdään neulalla reikä. Tämä on myös USP:n mukaan yleisesti käytetty menetelmä positiivisten kontrollien valmisteluun (USP 2016b, 10).

Kvalitatiivisen testimenetelmän validointiin liittyi haasteita. Testi oli yksinkertainen suorittaa, mutta sen tarjoamat tulokset antoivat vain tiedon siitä, oliko pakkaus vuotava vai ei. Tulosten luotettavuuden arvioimiseen tuli kiinnittää erityisestä huomiota. Lisäksi näytteiden visuaaliseen tarkastamiseen liittyi epävarmuutta siitä, tuleeko mahdollinen vuoto havaituksi. Guazzo on esityksessään havainnollistanut, kuinka havainto riippuu havainnon tekijästä. Hänen esittämissään tuloksissa havainto siitä, oliko pakkauksessa vuotoa vai ei, vaihteli sen perusteella, kuka havainnon teki: samasta pakkauksesta saattoi tulla erilaisia tulkintoja. (Guazzo 2010b, 20–23.)

Visuaaliseen tarkastamiseen perustuva tulosten arviointi sisältää suuren inhimillisen virheen riskin, sillä tuloksen tulkinta pohjaa yksilön arvioon. Arvioon voi vaikuttaa arvioijan vireystila ja näön tarkkuus, mutta myös arvioitavien näytteiden

määrä. Jos näytteitä on paljon, olisi arviota suorittavan henkilön syytä tauottaa työskentelyä. Tulosten luotettavuudessa ja niiden arvioinnissa korostuu myös perehdytyksen ja ohjeistuksen merkitys. Ohjeistuksen tulee olla selkeä ja yksiselitteinen.

Metyleenisini-immersiotestin hyötyjä ovat sen edullisuus sekä suorittamisen helpous ja suhteellinen nopeus. Testimenetelmällä on kuitenkin suuria haasteita vastata nykypäivän vaatimuksiin, joita tiiveystestimenetelmälle asetetaan. Eheystestauksessa tulisi suosia kvantitatiivisia ja deterministisiä testimenetelmiä. Toisaalta menetelmän puolustukseksi on esitetty sen pitkää käyttöhistoriaa lääketeollisuudessa, ja tästä näkökulmasta sitä voidaan pitää tarkoitukseensa sopivana. Menetelmää on kehitetty, ja testauksesta saatuja tuloksia on arvioitu useiden vuosikymmenten ajan. Sen toimintavarmuus on usein parempi kuin useiden determinististen menetelmien. On myös hyvä huomioida, että yleisesti ottaen metyleenisini-immersiotestiä käytetään muiden tiiveystestimenetelmien rinnalla, jolloin sen voidaan katsoa sopivan käyttötarkoitukseensa ja täyttävän sille asetetut vaatimukset. (Stauffer 2020; Wuchner ym. 2021.)

LÄHTEET

Bandyopadhyay, P., Coffey, M. J. & Shower, M. 2010. Development of ophthalmic formulations. 254–286. Teoksessa Sandeep, N., Ludwig, J. D. (toim.) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications. Volume 1: Formulation and Packaging. 3. painos. Lontoo: Informa Healthcare.

Booth, C. 2016. Understanding Container Closure Integrity Testing. American Pharmaceutical Review. Viitattu 20.2.2022. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/239498-Understanding-Container-Closure-Integrity-Testing/>.

Duncan, D. 2019. Container Closure Integrity Testing of Finished Sterile Injectable Product. Pharmaceutical Technology. Volume 31, Issue 9, 38–41.

Guazzo, D. M. 2010a. Parenteral product container closure integrity testing, 358–388. Teoksessa Sandeep, N., Ludwig, J. D. 2010. Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications. Volume 1: Formulation and Packaging. 3. painos. Lontoo: Informa Healthcare.

Guazzo, D. M. 2010b. Sterile Product Package Integrity Testing Current Practice. Common Mistakes, New Developments. Parenteral Drug Association. Viitattu 20.2.2022. <https://www.pda.org/docs/default-source/website-document-library/chapters/presentations/metro/sterile-product-package-integrity-testing.pdf>.

Euroopan komissio n.d. Eudralex – Volume 4 – Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. Viitattu 18.5.2022. https://ec.europa.eu/health/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_fi.

Euroopan komissio 2008. Eudralex Volume 4, EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1: Manufacture of Sterile Products. Brysseli.

Euroopan komissio 2015. Eudralex Volume 4, EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 15: Qualification and Validation. Brysseli.

Euroopan komissio 2022. Eudralex Volume 4, EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1: Manufacture of Sterile Products. Luonnos. https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/2020_annex1ps_sterile_medicinal_products_en.pdf

European Medicines Agency 2016. Euroopan lääkkeiden sääntelyjärjestelmä. Yhdenmukainen lähestymistapa lääkkeiden sääntelyyn Euroopan unionissa. EMA/716925/2016. https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/european-regulatory-system-medicines-european-medicines-agency-consistent-approach-medicines_fi.pdf.

European Medicines Agency 2022. Good Manufacturing Practice. Viitattu 10.4.2022. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-manufacturing-practice>.

Fimea 2020. Veripalvelutoiminta. Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskuksen määräys. Dnro FIMEA/2019/000264. <https://www.fimea.fi/documents/160140/10248328/M%C3%A4%C3%A4r%C3%A4ysluonnos.pdf/e1d674a5-ee76-04f6-143c-3a7ed301b782?t=1604916061240>.

Fimea 2022a. Tietoa Fimeasta. Viitattu 15.4.2022. <https://www.fimea.fi/tietoa-fimeasta/>.

Fimea 2022b. Euroopan farmakopea. Viitattu 15.4.2022. <https://www.fimea.fi/valvonta/lait-ja-ohjeet/euroopan-farmakopea>.

Fimea 2022c. Lääkepakkaus. Viitattu 15.4.2022. <https://www.fimea.fi/vaestolle/laaketiedon-luotettavuus/laakepakkaus>.

Hagen-Frederiksen, N. 2014. What is a Pharmacopeia? Viitattu 15.4.2022. <https://qualitymatters.usp.org/what-pharmacopeia>.

Hägg, M. (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. VTT Technical Research Centre of Finland. VTT Technology No. 276. <https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>.

International Organization for Standardization 1995. ISO 8362-5:1995 (E). Injection containers for injectables and accessories – Part 5: Freeze drying closures for injection vials. Annex C. Test method for closure/container integrity and self-sealing.

Kirsch, L. E. 2006. Package Integrity Testing, 367–381, teoksessa Denyer, S. P. & Baird, R. M. (toim.) Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical Control in Pharmaceuticals and Medical Devices.

Li, L., 2013. Container Closure Integrity Testing Method Development and Validation for Prefilled Syringes. American Pharmaceutical Review. <http://pmo90dc87.pic37.websiteonline.cn/upload/ContainerClosureIntegrityTestingMethodDevelopmentandValidationforPrefilledSyringes.pdf>.

Nasa, P. 2014. A Review on Pharmaceutical Packaging Material. World Journal of Pharmaceutical Research. Volume 3, Issue 5, 344–368.

NextPharma 2022a. Contact. Luettu 1.5.2022. <https://nextpharma.com/contact>.

NextPharma 2022b. Ophthalmics – Tampere. Viitattu 1.5.2022. <https://nextpharma.com/group/locations/tampere#c1938>.

PubChem 2022. Methylene blue. Viitattu 18.3.2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6099>.

Salo, P. & Sinivuo, K. 2013. Euroopan farmakopea – vireä viisikymppinen. 19–22. Lääketietoa Fimeasta 3/2013. https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/120450/3_13%2019-22%20Euroopan%20farmakopea%20%E2%80%93vire%C3%A4%20viisikymppinen.pdf?sequence=1.

Stauffer, O. 2020. Industry must move away from dye ingress test. Parenteral Drug Association. Viitattu 20.2.2022. <https://www.pda.org/pda-letter-portal/home/full-article/industry-must-move-away-from-dye-ingress-test>.

Thermo Fisher Scientific 2022. Methylene blue. Viitattu 22.5.2022. <https://www.fishersci.fi/shop/products/methylene-blue-high-purity-biological-stain/11443697>.

Trullols, E., Ruisánchez, I. & Rius, F. X. 2004. Validation of Qualitative Analytical Methods. Trends in analytical chemistry. Volume 23, no. 2, 137–145.

The United States Pharmacopeial Convention 2015. What is U.S. Pharmacopeia? Viitattu 15.4.2022. <https://qualitymatters.usp.org/what-us-pharmacopeia>.

The United States Pharmacopeial Convention 2016a. USP <1207> Package integrity evaluation – Sterile products. Rockville.

The United States Pharmacopeial Convention 2016b. USP <1207.1> Package integrity testing in the product life cycle – test method selection and validation. Rockville.

The United States Pharmacopeial Convention 2016c. USP <1207.2> Package integrity leak test technologies. Rockville.

U.S. Food and Drug Administration 2004. Guidance for industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice.

U.S. Food & Drug Administration 2008. Container and Closure System Integrity Testing In lieu of Sterility Testing as a Component of the Stability Protocol for Sterile Products. Guidance for Industry.

U.S. Food & Drug Administration 2022. What does FDA regulate? Viitattu 15.4.2022. <https://www.fda.gov/about-fda/fda-basics/what-does-fda-regulate>.

White, E. K. 2012. Container-Closure Integrity. Journal of Validation Technology, 10–16.

Wuchner, K., One, J., Riesop, D., Moyles, C., Huang, I., Corcoran, M., Schmidt, C., Jakobs, P., Anderl, J., Milroy, J., Politi, J., Lance, J., Fadden, S., Hansen, B., Shirasaki, M., Tubbs, T., Menard, A., Huon, C. & Nissar, A. 2020. Why industry cannot just "move away" from the dye ingress test? Parenteral Drug Association. Viitattu 20.2.2022. <https://www.pda.org/pda-letter-portal/home/full-article/why-industry-cannot-just-move-away-from-the-dye-ingress-test>.

Zadbuke, N., Shahi, S., Gulecha, B., Padalkar, A. & Thube, M. 2013. Recent Trends and Future of Pharmaceutical Packaging Technology. Journal of pharmacy & bioallied science. Volume 5, Issue 2, 98–110.

LIITTEET

Liite 1. Suunnitelma suoritettavista menetelmänvalidointitesteistä

1 (2)

Testi	Testattavat pullo	Pulloja yhteensä lkm	Testin kuvaus	Validointiparametrit
1	<ul style="list-style-type: none"> 15 kpl näytettä A 15 kpl näytettä B 15 kpl näytettä C 15 kpl näytettä D 15 kpl näytettä E 15 kpl näytettä F 	90	Testataan negatiivisia kontrollinäytteitä.	Tarkkuus
2	<ul style="list-style-type: none"> 15 kpl näytettä A 15 kpl näytettä B 15 kpl näytettä C 15 kpl näytettä D 15 kpl näytettä E 15 kpl näytettä F 	90	Testataan positiivisia kontrollinäytteitä rikotulla sinetillä.	Tarkkuus
3	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl näytettä A 12,5 µm:n reiällä 10 kpl näytettä C 12,5 µm:n reiällä 10 kpl näytettä D 12,5 µm:n reiällä 	30	Testataan rei'itettyjä positiivisia kontrollinäytteitä.	Havaitsemisraja
4	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl näytettä A 25 µm:n reiällä 10 kpl näytettä C 25 µm:n reiällä 10 kpl näytettä D 25 µm:n reiällä 	30	Testataan rei'itettyjä positiivisia kontrollinäytteitä.	Havaitsemisraja
5	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl näytettä A 50 µm:n reiällä 10 kpl näytettä C 50 µm:n reiällä 10 kpl näytettä D 50 µm:n reiällä 	30	Testataan rei'itettyjä positiivisia kontrollinäytteitä.	Havaitsemisraja
6	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 12,5 µm 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmän toistettavuutta.	Tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus
7	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 12,5 µm 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmän toistettavuutta.	Tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus
8	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 12,5 µm 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmän toistettavuutta.	Tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus
9	<ul style="list-style-type: none"> 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 12,5 µm 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmän toistettavuutta.	Tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus

2 (2)

10	<ul style="list-style-type: none"> • 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F • 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 12,5 µm • 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmän toistettavuutta.	Tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus
11	<ul style="list-style-type: none"> • 150 kpl näytettä D • 150 kpl näytettä E • 2 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	302	Maksimitäyttö	Spesifisyys
12	<ul style="list-style-type: none"> • 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F • 4 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmää ajamalla vain yksi tyhjiösykli.	Spesifisyys, häiriökestävyys
13	<ul style="list-style-type: none"> • 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F • 4 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmää ajamalla vain yksi tyhjiösykli.	Spesifisyys, häiriökestävyys
14	<ul style="list-style-type: none"> • 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F • 4 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmää ajamalla vain yksi tyhjiösykli.	Spesifisyys, häiriökestävyys
15	<ul style="list-style-type: none"> • 10 kpl jokaista näytettä A, B, C, D, E ja F • 4 kpl positiivisia kontrollinäytteitä reikäkoolla 25 µm 	64	Testataan menetelmää ajamalla vain yksi tyhjiösykli.	Spesifisyys, häiriökestävyys

Liite 2. Validointitestien ajopäiväkirja

Testi	Kuvaus	Suorittaja ¹	Päivämäärä
1	Testi negatiivisille kontrollinäytteille	1	08.04.2022
2	Testi positiivisille kontrollinäytteille	1	08.04.2022
3	Testi kvantitatiivisille positiivisille kontrollinäytteille 12,5 µm:n reiällä	1	11.04.2022
4	Testi kvantitatiivisille positiivisille kontrollinäytteille 25 µm:n reiällä	1	11.04.2022
5	Testi kvantitatiivisille positiivisille kontrollinäytteille 50 µm:n reiällä	1	11.04.2022
6	Testi tarkkuuden sekä täsmällisyyden ja toistettavuuden testaamiseen	1	11.04.2022
7	Testi tarkkuuden sekä täsmällisyyden ja toistettavuuden testaamiseen	1	11.04.2022
8	Testi tarkkuuden sekä täsmällisyyden ja toistettavuuden testaamiseen	1	12.04.2022
9	Testi tarkkuuden sekä täsmällisyyden ja toistettavuuden testaamiseen	2	14.04.2022
10	Testi tarkkuuden sekä täsmällisyyden ja toistettavuuden testaamiseen	2	14.04.2022
11	Testi maksimikuormalla spesifisyyden testaamiseen	1	12.04.2022
12	Testi spesifisyyden ja häiriöalttiuden testaamiseen	1	13.04.2022
13	Testi spesifisyyden ja häiriöalttiuden testaamiseen	1	13.04.2022
14	Testi spesifisyyden ja häiriöalttiuden testaamiseen	2	20.04.2022
15	Testi spesifisyyden ja häiriöalttiuden testaamiseen	2	20.04.2022

¹Testit suoritti kaksi eri henkilöä, jotka on merkitty taulukkoon numeroilla 1 ja 2.