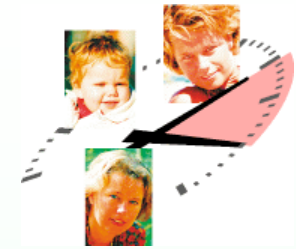


GYNEMED

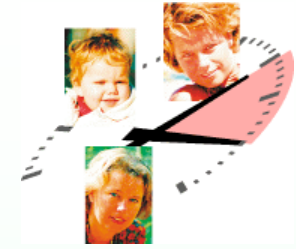
Medizinprodukte GmbH & Co. KG



## Qualitätskontrolle – Globale Standards

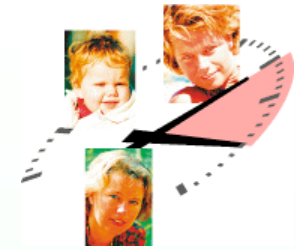
5. Jahrestagung der Österreichischen IVF-Gesellschaft  
Deutschlandsberg, 4. - 7. Oktober 2007

Dr. Fabian Sell



## Qualitätskontrolle – Globale Standards

- Rechtliche Standards (EU, USA, Japan)
- Konsequenz der rechtlichen Rahmenbedingungen
- Stufen der Konformitätsbewertungsverfahren und Klassifizierung
- QM-Kontrolle: Endotoxine und Pfeilschwanzkrebse
- QM-Kontrolle: Pyrogene und Kaninchen
- QM-Kontrolle: Zytotoxizität und Fibroblasten
- QM-Kontrolle: Embryotoxine und Mäuseembryos



## Rechtliche Standards (A, D, EU)

- Nationales MPR setzt europ. Richtlinien (90/385, 93/42, 98/79, 2000/70/EG) um:
  - der “europäischer“ Teil regelt die Schritte des Herstellers bis zum Inverkehrbringen
  - der „nationale“ Teil regelt die Marktüberwachung
- Im Vordergrund der Zulassung von MP steht die Frage nach Sicherheit, tech. u. med. Leistung sowie Eignung für die Zweckbestimmung
- Darüber hinaus liegt der Zulassung der Nachweis von produkt-spezifischen Standards für Herstellung und Einhaltung von definierten Qualitätsstandards zugrunde



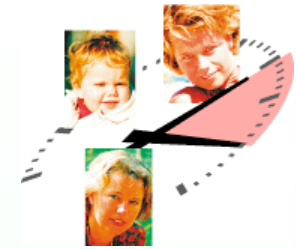
## Rechtliche Standards (A, D, EU)

- Zweckbestimmung - Risikofestlegung (13419) - Klassifizierung
- 18 Klassifizierungsregeln (Anhang IX der 93/42), 13 Definitionen  
Anwendungen (5)
- Basis für Klassifizierung dient ein modulartig aufgebautes  
Konformitätsbewertungsverfahren, bestehend z.B. aus:
  - technischen Normen z.B. EMV aber auch „*Dräger-Norm*“
  - qualitätsorientierten Normen z.B. DIN EN ISO 13485 u EN 45000
  - Regelungen, welche die CE-Kennzeichnung betreffen
- Zuständig für die Durchführung der Zulassung sind die „benannten  
Stellen – notified bodies“ (vs. Zertifizierer)
- Abschließend belegt die CE-Kennzeichnung die Übereinstimmung  
(Konformität) des MP mit den zutreffenden Richtlinien



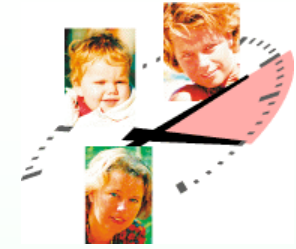
## Rechtliche Standards (USA)

- FDA – '76 Medical Device Amendments '97 zur FDA Modernization Act (FDAMA)
- MP Definition: Geräte die im med. Alltag Verwendung finden
- FDA regelt:
  - Marktzulassung von neuen Medizinprodukten
  - Zzgl. Überwachung der Hersteller bezgl. der FDA-Vorgaben
  - Zzgl. Marktbeobachtungssystem zur Sammlung ggf. Rückruf
- CDRH regelt rechtlichen u. administrativen Belange von:
  - Erstzulassungen von Geräten
  - Entwicklung von (tech.) Herstellungs- und Leistungsstandards (QS.)
  - Bewertung von Kontrollberichten über Fehlfunkt. u. Nbwkg.



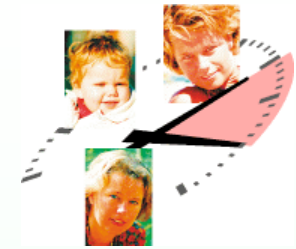
## Rechtliche Standards (USA)

- Sicher: der wahrscheinliche Nutzen des MP für die Gesundheit im Rahmen des beabsichtigten Gebrauchs jedes wahrscheinliche Risiko überwiegt
- Wirksam: MP erfüllt eine sinnvolle Zweckbestimmung verlässlich
- Zulassung über Premarket Notification 510(k) (Klasse I u. II) oder Premarket Approval (III)
- Klassifizierung ergibt sich über den Grad „menschliches Leben zu erhalten resp. zu unterstützen



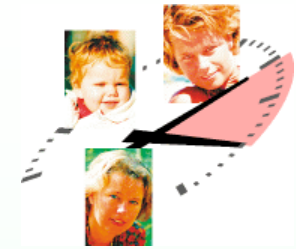
## Rechtliche Standards (Japan)

- In Japan regelt das Pharmaceutical Affairs Law die MP-Zulassung
- Die Klassifizierung unterscheidet zwischen: Me-too, veränderten MPs sowie neuen MPs sowie einer ergänzenden Einteilung nach Risikoklassen
- Klasse 1: Kyoka Zulassung: Reguliert GMP bzw. GCP
- Klasse 2 u. 3: Shonin Zulassung: enthält Produktsicherheitsvalidierungen und Wirksamkeitsstudien



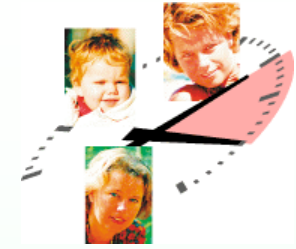
## Rechtliche Standards (Japan)

- MP der Klassen I u. II können auch von benannten Stellen betreut werden,
- MP der Klasse III können nur vom MHW betreut werden, GCP Studien sind hierfür noch Voraussetzung:
  - CE-Zulassungsstudien reichen nicht aus, da GCP nicht vorgeschrieben ist
  - FDA-Zulassungsstudien reichen oft aus, da GCP hier vorgeschrieben ist
    - Bsp. Elektro-mag. Verträglichkeitsmessungen hinsichtlich Spannung und Frequenz)
- Hersteller haben die Kosten japanischer Audits zu tragen



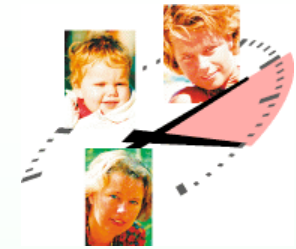
## Konsequenz der rechtlichen Rahmenbedingungen

- Alle Rechtssysteme verknüpfen die Zulassung mit einer Einteilung nach Risikostufen, die Klassifizierungsprozeduren sind unterschiedlich
- Das amerikan. und das japan. System zielen v.a. auf den Verbraucherschutz ab, das europ. ebenfalls auf den EU-Handel
- Die EU beschränkt sich auf den Nachweis von Sicherheit und tech. Leistungsfähigkeit, die FDA Sicherheit, Wirksamkeit und Nutzen
- Produkte hoher Klassifizierung: In USA und Japan Wirksamkeitsnachweis durch Vergleichstudien erforderlich
- Mittelasien orientiert sich am europ. Recht, resp. CE Kennzeichnung



## Vier Stufen der Sicherheitsbewertung medizinischer Produkte

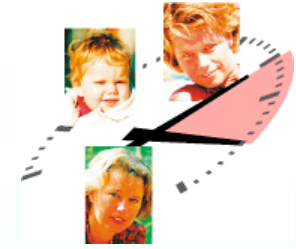
1. Charakterisierung und Sichtung von Rohmaterialien
2. Bewertung der Biokompatibilität der Materialien gemäß Richtlinien der FDA, der ISO und der European Pharmacopoeia.
3. Validierung Produktionsprozesse und der Produkte
4. Routineprüfungen



# Vier Stufen der Sicherheitsbewertung medizinischer Produkte (1)

## 1. Charakterisierung und Sichtung von Rohmaterialien:

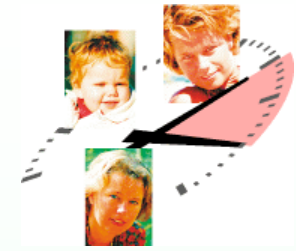
- Chemische Charakterisierung
- Physikalische Charakterisierung
- Biologische Charakterisierung
  - Zytotoxizität
  - In-Vitro Hämolyse



## Vier Stufen der Sicherheitsbewertung medizinischer Produkte (2)

2. Bewertung der Biokompatibilität der verwendeten Materialien gemäß Richtlinien der FDA, der ISO und der European Pharmacopoeia inkl. Feststellen der:

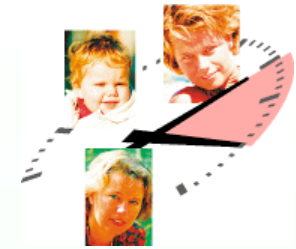
- Zytotoxizität
- Sensibilisierung (systemisch, d.h. Einfluß auf das komplette Immunsystem des Meerschweinchens)
- Intrakutane Reaktionen (lokal begrenzte Reaktion)
- Akute systemische Toxizität



## Vier Stufen der Sicherheitsbewertung medizinischer Produkte (3)

### 3. Validierung des Produktionsprozesse u. Endprodukte:

- Kontrolle des Fertigungsumfeldes
- Kontrolle des Fertigungsprozesses
- Sterilität des Produktes ggf. des Fertigungsumfeldes
- Endprodukt - Qualifikation



## Vier Stufen der Sicherheitsbewertung medizinischer Produkte (4a)

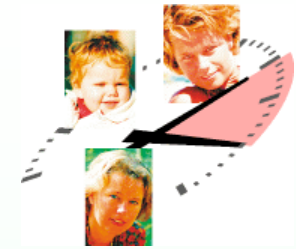
### 4. Routineprüfungen:

#### 1. Freigabeprüfungen

Untersuchungen zur Produktfreigabe für das Inverkehrbringen:

- Endotoxine,
- Pyrogenität,
- Sterilität,
- mikrobieller Grenztest,
- Zytotoxizität resp. Embryotoxizität)

#### 2. Periodische Audituntersuchungen



## Vier Stufen der Sicherheitsbewertung medizinischer Produkte (4b)

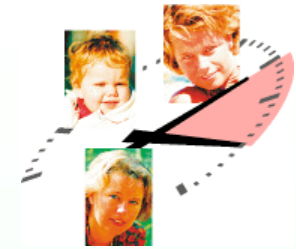
### 4. Routineprüfungen:

1. Freigabeprüfungen
2. Periodische Audituntersuchungen

Untersuchungen von Rohmaterial und Endprodukten zur

- zur Sicherung der Qualität der Produktion
- zur Sicherung der individuellen Spezifikation von Materialien und Endprodukten.

(Endotoxine, Pyrogenität, Zytotoxizität, In Vitro-Hämolyse bei Kontaktprodukten, EO-Rückstandsuntersuchungen, Biobelastung u.a.)



## QM-Kontrolle

### LAL-Test zum Endotoxinnachweis (1)

Bakterielle Endotoxine bleiben trotz Sterilisationsprozesse vielfach chemisch aktiv und können auf (Ei-) Zellen toxisch wirken.

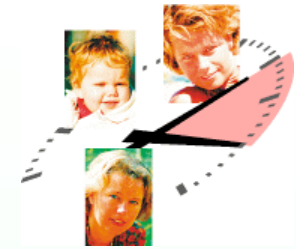
#### Biologisches Prinzip des LAL:

Entdeckt F. Bang, 1960: Bakterielle Endotoxine lösen im Pfeilschwanzkrebs, *Limulus polyphemus*, eine intravasculäre Koagulation aus, die sich in einer Trübungs- und Gelierungsreaktion zeigt.

Das Testsubstrat (Limulus-Amöbocyt-Lysat kurz: LAL) wird aus gereinigten Amöbocysten des *Limulus polyphemus* gewonnen.

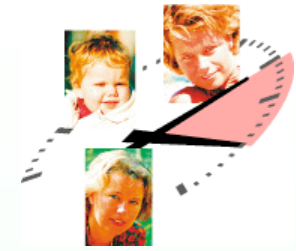
GYNEMED

Medizinprodukte GmbH & Co. KG



# Limulus polyphemus





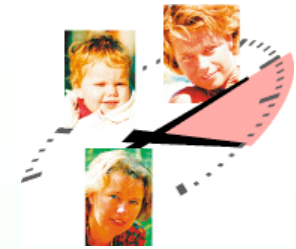
## QM-Kontrolle

### LAL-Test zum Endotoxinnachweis (2)

#### Methodik:

Das Medizinprodukt wird vor dem Test standardisiert extrahiert und mit dem LAL inkubiert.

Bei positivem Befund findet biologische Enzymreaktion zwischen dem Limulus-Amöbocyt-Lysat und dem Prüfsubstrat statt, die sich in einer Trübung oder Gelierung zeigt.



## QM-Kontrolle

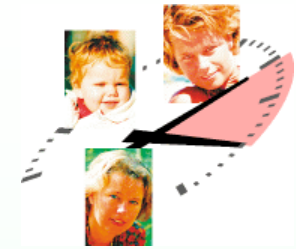
### LAL-Test zum Endotoxinnachweis (3a)

#### Qualitative Nachweismethode - LAL Gelierungsmethode:

LAL-Reagenz und die Prüflösung werden zu gleichen Teilen gemischt und über 60 min. bei 37 °C im Thermoblock inkubiert.

#### Ergebnis:

Die Anwesenheit von bakteriell bedingtem Endotoxin zeigt sich in einer gerinnungsbedingten Gelbildung (Gel-Clot).



## QM-Kontrolle

### LAL-Test zum Endotoxinnachweis (3b)

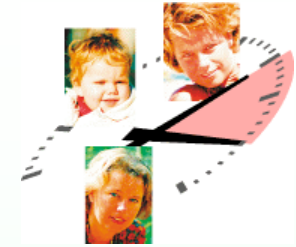
Quantitative Nachweismethode - kinetisch-turbidimetrische Methode:

Die benötigte Zeit zum Erreichen einer bestimmten Trübung ist proportional abhängig vom Endotoxingehalt der Probe.

Die Messung der Trübung in inkubationsfähigen Mikrotiterplatten wird mit der EDV verbunden und gegen Standards verglichen.

Ergebnis:

In Anlehnung an eine Standardkurve wird der Endotoxingehalt bestimmt.



## QM-Kontrolle

### Kaninchentest zum Pyrogennachweis (1)

Pyrogene - sowohl materieller als auch bakterielle Herkunft - werden im Kaninchentest nachgewiesen. Seit Etablierung des LAL-Tests wird der Kaninchentest nur noch zum Ausschluss materieller Pyrogene in Medizinprodukten eingesetzt.

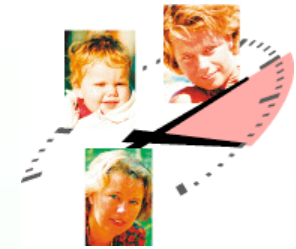
Es ist der einzige zugelassene In-vivo Test zum Nachweis materieller Pyrogene.

#### Prinzip:

Kaninchen reagieren auf intravenös appliziertes Pyrogen mit einem Anstieg der Körpertemperatur.

#### Allg. Methodik:

Das Medizinprodukt wird vor dem Test standardisiert in einer 0.9% NaCl Lösung extrahiert und anschließend intravenös injiziert.



## QM-Kontrolle

### Kaninchentest zum Pyrogennachweis (2)

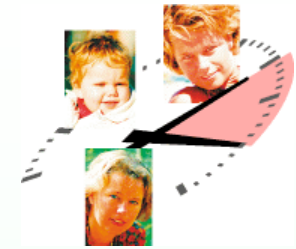
#### Spez. Methodik:

Drei Kaninchen mit einem Gewicht  $> 1,5\text{kg}$  erhalten eine Dosis von  $10\text{ml/kg KG}$  des Extraktes in die große Ohrvene, wobei die Körpertemperatur der Tiere vor der Injektion zwischen  $38,8^\circ\text{C}$  und  $39,8^\circ\text{C}$  liegen muss. Anschließend erfolgt alle 30 min die Messung der Körpertemperatur (mind. für 3 Stunden).

#### Ergebnis:

Zeigt kein Kaninchen einen Anstieg der Körpertemperatur um  $0,5^\circ\text{C}$ , so gilt das Material als pyrogenfrei.

Ein Anstieg der Körpertemperatur um mehr als  $0,5^\circ\text{C}$  deutet auf eine Anwesenheit von Pyrogenen hin. Es sollte sich dann ein LAL-Test anschließen, um Pyrogene bakterieller Herkunft auszuschließen.



# QM-Kontrolle

## Fibroblastentest auf Zytotoxizität (1)

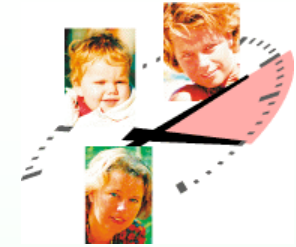
Sowohl Rohmaterialien als auch Verbundmaterialien in Medizinprodukten haben zytotoxisches Potential. In diesem Test wird das zu untersuchende Material in-vitro mit Fibroblastenkulturen inkubiert, um eine mögliche Zytotoxizität auszuschließen.

### Prinzip:

Fibroblastenkulturen reagieren auf zytotoxische Spuren mit einer Veränderung des Zellbildes.

### Methoden:

- ISO Elutions-Methode
- Agarose-Overlay-Methode



## QM-Kontrolle

### Fibroblastentest auf Zytotoxizität (2)

#### ISO Elutions-Methode:

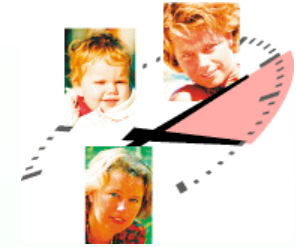
Testmaterialien werden standardisiert extrahiert (MEM, 0.9% NaCl, PW; Flüssigkeitsmenge in Abhängigkeit der Oberfläche; Inkubationstemperaturen; Dauer der Inkubation).

Zellkulturen der L-929 Mausfibroblasten (ATCC CCL1, NCTC Clone 929 of strain L).

Extrakt und Mausfibroblasten werden über 48 Std. in MEM bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### Ergebnis:

Eine mikroskopische Beurteilung des Zellbildes nach USP Richtlinien beschreibt den Grad der Zytotoxizität. (Score 0 = keine - 4 = starke Zytotoxizität.).



## QM-Kontrolle

### Fibroblastentest auf Zytotoxizität (3)

Agarose-Overlay Methode wird bei MP eingesetzt,

- die nicht extrahiert werden können, da sie sich unter diesem Verfahren verändern oder auflösen (z.B. Klebstoffe, Hyaluronsäure)
- deren Probematerial die erforderliche Mindestgröße oder das Mindestgewicht zur Extraktion nicht erreicht ( 4 gr. oder eine Oberfläche von mind. 60 cm<sup>2</sup> ).

#### Methodik:

Das zu überprüfende Material wird mit einer mit MEM Medium getränkter Agaroseschicht bedeckt. Die Fibroblasten werden über diese Schicht gelegt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 24 h bebrütet.



## QM-Kontrolle

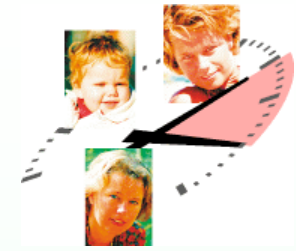
### Fibroblastentest auf Zytotoxizität (4)

#### Ergebnis:

Eine mikroskopische Beurteilung des Zellbildes nach USP Richtlinien beschreibt den Grad der Zytotoxizität.

(Score 0 = keine - 4 = starke Zytotoxizität.).

**Der Elutionstest reagiert sensibler als der Agaroseoverlay Test.**

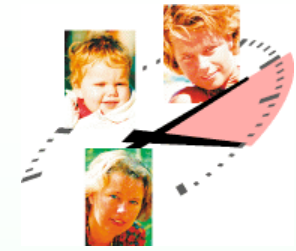


## QM-Kontrolle MEA auf Embryotoxizität (1)

Mögliche embryotoxische Rückstände in Medizin- und Laborprodukten, die in der ART eingesetzt werden, müssen laut FDA in den USA ausgeschlossen werden.

### Prinzip:

Mausembryonen zeigen toxische Belastungen durch fehlende Teilungsrate und Absterben an.



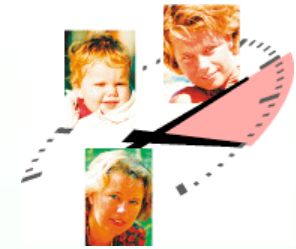
## QM-Kontrolle MEA auf Embryotoxizität (2)

### Methodik:

Kontakt des Prüfmaterials mit den Mausembryonen:

1. Direkter Kontakt der ME mit dem Prüfmaterial.
2. Standardisierte Extraktion des Prüfmaterials mit Kulturmedium und anschließende Inkubation.

Mausembryonen im Einzell- oder Zweizellstadium des Stammes B6C3F-1 X B6D2F-1 (alt. C57BL6 x CBA) werden mit dem Prüfmaterial in definiertem Medium unter Paraffinöl bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Vergleich zwischen 21 Mausembryonen in der Verumgruppe und 15 Mausembryonen der Kontrollgruppe.



## QM-Kontrolle MEA auf Embryotoxizität (3)

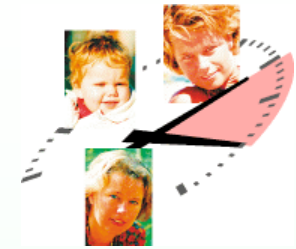
### Ergebnisse:

#### Einzell MEA:

Der Test gilt als bestanden, wenn sich 80% der ME der Verum- und der Kontrollgruppe innerhalb von 96 Std. bis zur komplett geschlüpften Blastozyste entwickelt haben.

#### Zweizell MEA:

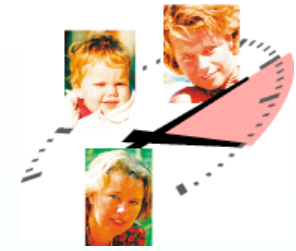
Der Test gilt als bestanden, wenn sich 80% der ME der Verum- und Kontrollgruppe innerhalb von 72 Std. bis zur komplett geschlüpften Blastozyste entwickelt haben.



## Vorgaben zur Kennzeichnung durch die FDA

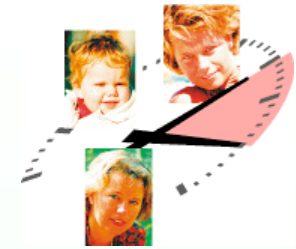
### **Class II Devices** Pflichtvorgaben:

- MEA Information (Einzell o. Zweizell), auf Label zu dokumentieren.
- Endotoxin Tests (LAL oder Rabbit Pyrogenicity)
- Sterilisation Validation (SAL  $10^{-6}$ , Medium  $10^{-3}$ ) auf Label mit Methode und Ergebnis dokumentiert.
- Water Quality
- Design Specifications
- Labeling (Gebrauchsanweisung, MEA, Sterilisation mit Methode und SAL Werten, Endotoxintestergebnis).
- Biocompatibility Testing



## Take home message

- Der LAL-Test ist bislang hinsichtlich seiner Aussagekraft unterschätzt,
- Der MEA-Test hingegen überschätzt worden.
  
- Herzlichen Dank für Ihr Interesse

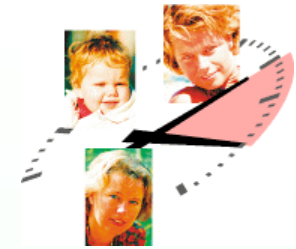


## QM-Kontrolle

### LAL-Test zum Endotoxinnachweis

#### Referenzen:

- U.S. Pharmacopeia, 23<sup>rd</sup> Revision, Bakterien-Endotoxin-Test.  
1970 ergab eine vergleichende Studie, daß dieser LAL Test empfindlicher als der bis dahin geläufige Kaninchentest ist und standardisierbar ist.
- Richtlinie der U.S. Food and Drug Administration (FDA).  
Dort verbindliche Beschreibung allg. Endotoxin-Obergrenzen:  
Eluate von Medizinprodukten: 0,5 EU/ml  
Vergleich: Parenterale AM: 5 EU pro kg Dosis  
Med. Instrumente im Kontakt mit Liquor: 0,06 EU /ml
- DAB 10, 3ter Nachtrag 1994.
- European Pharmacopoeia 3<sup>rd</sup> Edition- Supplement 1999, Abschnitt 2.16.14.

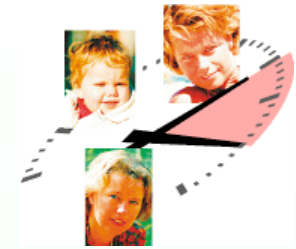


# QM-Kontrolle

## Kaninchentest zum Pyrogennachweis

### Referenzen:

- FDA (GLP Regulations, 21 CFR 58)
- ISO 10993-11
- US Pharmacopeia

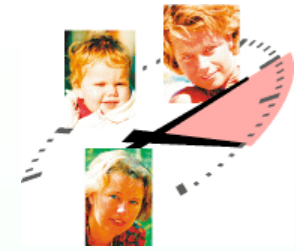


# QM-Kontrolle

## Fibroblastentest auf Zytotoxizität

### Referenzen:

- FDA Good Laboratory Practice (GLP) Regulations 21 CFR 28
- International Organisation of Standardisation: Biological Evaluation Medical Devices, Part 5, 10993-5
- United States Pharmacopeia(USP)



# QM-Kontrolle MEA auf Embryotoxizität

## Referenzen:

- FDA IVF-Art 510/k.
- International Organisation of Standardisation.
- EN 45001.