

Question:

A firm has multiple media fill failures. They conducted their media fills using TSB (tryptic soy broth) prepared by filtration through a 0.2 micron sterilizing filter. Investigation did not show any obvious causes. What could be the source of contamination?

배지 충전 시험이 여러 차례 실패로 끝난 회사가 있다. TSB를 0.2 미크론 제균 필터로 여과한 것을 배지 충전 시험에 사용했다. 조사를 해도 뚜렷한 원인을 찾지 못했다. 오염의 출처가 어디라고 생각할 수 있는가?

Answer:

A firm had multiple media fill failures. The media fill runs, simulating the filling process during production, were conducted inside an isolator. The firm used TSB (nonsterile bulk powder) from a commercial source and prepared the sterile solution by filtering through a 0.2 micron sterilizing filter. An investigation was launched to trace the source of contamination. The investigation was not successful in isolating or recovering the contaminating organism using conventional microbiological techniques, including the use of selective (e.g., blood agar) and nonselective (e.g., TSB and tryptic soy agar) media, and examination under a microscope. The contaminant was eventually identified to be *Acholeplasma laidlawii* by using 16S rRNA gene sequence. The firm subsequently conducted studies to confirm the presence of *Acholeplasma laidlawii* in the lot of TSB used. Therefore, it was not a contaminant from the process, but from the media source.

배지 충전 시험이 여러 차례 실패로 끝난 회사가 있다. 배지 충전 시험은 실제 생산 과정의 충전 공정을 시뮬레이션하여 아이솔레이터 내부에서 실시했다. 이 회사는 TSB(비무균 벌크 파우더)를 구입하여 0.2 미크론 제균 필터로 여과해 무균 용액을 만들어 사용했다. 오염 원인을 밝히기 위한 조사를 시작했다. 하지만 현미경 검사, 선택 배지(예, blood agar)와 비선택 배지(예, TSB, TSA) 사용 등 통상적인 미생물학적 기법으로는 오염 미생물을 분리하거나 회수하는데 성공하지 못했다. 결국 16S rRNA 유전자 서열 분석 방법으로 오염 미생물이 *Acholeplasma laidlawii*임을 밝혀냈다. 다음에 이 회사는 조사를 계속 진행하여 배지 충전 시험에 사용한 TSB 로트에 *Acholeplasma laidlawii*가 존재함을 확인했다. 결국 공정이 아니라 배지 자체가 오염원이었던 것이다.

Acholeplasma laidlawii belongs to an order of *Mycoplasma*. *Mycoplasma* contain only a cell

membrane and have no cell wall. They are not susceptible to beta-lactams and do not take up Gram stain. Individual organisms are pleomorphic (assume various shapes from cocci to rods to filaments), varying in size from 0.2 to 0.3 microns or smaller. It has been shown that *Acholeplasma laidlawii* is capable of penetrating a 0.2 micron filter, but is retained by a 0.1 micron filter (see Sundaram, Eisenhuth, et al. 1999). *Acholeplasma laidlawii* is known to be associated with animal-derived material, and microbiological media is often from animal sources. Environmental monitoring of *Mycoplasma* requires selective media (PPLO broth or agar).

*Acholeplasma laidlawii*는 마이코플라즈마 목에 속하는 미생물이다. 마이코플라즈마는 세포막만 갖고 있으며 세포벽이 없다. 베타락탐 감수성이 없으며 그람 염색도 되지 않는다. 다형성(구균, 간균, 필라멘트균 등 형태가 다양함)이며 크기도 0.2~0.3 미크론이거나 그보다 더 작다. *Acholeplasma laidlawii*는 0.2 미크론 필터를 통과할 수 있지만, 0.1 미크론 필터는 통과하지 못한다(Sundaram Eisenhuth, et al., 1999). *Acholeplasma laidlawii*는 동물 유래 물질과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 미생물 배지 역시 동물 유래 물질을 사용한다. 마이코플라즈마의 환경 모니터링을 위해서는 선택 배지(PPLO 브로스 또는 아가)가 필요하다.

대책(Resolution):

For now, this firm has decided to filter prepared TSB, for use in media fills, through a 0.1 micron filter (note: we do not expect or require firms to routinely use 0.1 micron filters for media preparation). In the future, the firm will use sterile, irradiated TSB when it becomes available from a commercial supplier. (Firm's autoclave is too small to permit processing of TSB for media fills, so this was not a viable option.) The firm will continue monitoring for *Mycoplasma* and has revalidated their cleaning procedure to verify its removal. In this case, a thorough investigation by the firm led to a determination of the cause of the failure and an appropriate corrective action.

이제 이 회사는 배지 충전 시험에 사용할 TSB를 조제한 다음에 0.1 미크론 필터로 여과하기로 했다(주: FDA는 0.1 미크론 필터를 사용하여 배지를 만들도록 요구하거나 기대하지 않는다). 앞으로 이 회사는 가능한 상황이 되면 무균 방사선 조사 TSB를 구입하여 사용할 계획이다. (이 회사의 오토클레이브는 배지 충전 시험용 TSB를 처리하기에 너무 작아, 오토클레이브는 가능한 방법이 아니었다.) 이 회사는 마이코플라즈마 모니터링을 계속할 계획이며, 마이코플라즈마 제거 여부를 확인하기 위해 세척 절차를 재밸리데이션했다. 이 경우에 이 회사가 완벽한 조사를 실시했기 때문에 문제의 원인을 파악하고 적절한 시정 조치를 취할 수 있었다.

References:

- 21 CFR 211.113: Control of microbiological contamination
- 21 CFR 211.72: Filters
- 21 CFR 211.84(d)(6): Testing and approval or rejection of components, drug product container, and closures
- Sundaram, S, J Eisenhuth, G Howard, and H Brandwein, 1999, Application of Membrane Filtration for Removal of Diminutive Bioburden Organisms in Pharmaceutical Products and Processes, PDA J Pharm Sci Technol, 53(4):186–201
- Kong, F, G James, S Gordon, A Zekynski, and GL Gilbert, 2001, Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture, Appl Environ Microbiol, 67(7):3195–3200
- Murray, P, E Baron, M Pfaller, F Tenover, and R Tenover, 1995, Manual of Clinical Microbiology, 6th ed., Washington, DC: ASM Press

Date: 5/18/2005