

Nadzór nad materiałami stosowanymi w badaniach mikrobiologicznych (cz. I)

Podłoża hodowlane

Jadwiga Marczevska, Krystyna Mysłowska*

Badania oceny jakości mikrobiologicznej produktów leczniczych przeprowadzane w laboratorium kontroli jakości muszą być wykonywane metodami opisanymi w farmakopeach lub innymi uznanymi za równorzędne [1]. Ocena jakości mikrobiologicznej może dotyczyć badania jałowości, czystości mikrobiologicznej i/lub oceny aktywności ciwdrobnoustrojowej.

Badania jałowości wykonuje się w celu wykazania nieobecności drobnoustrojów w badanej próbce. Badania czystości mikrobiologicznej – aby ocenić zawartość ilościową i/lub jakościową bakterii mezofilnych i grzybów, a także potwierdzić lub wykluczyć obecność określonych drobnoustrojów. Badania te wykonuje się aby ocenić parametry jakości mikrobiologicznej i potwierdzić ich zgodność z wymaganiami opracowanej, zatwierdzonej specyfikacji.

Ze względu na fakt, że badania wykonane są na określonej próbce, a uzyskane wyniki odnoszą się do całej serii badanego produktu leczniczego, surowca czy też całej serii materiałów opakowaniowych, wytwórca ma obowiązek stosowania w trakcie wytwarzania przechowywania i dystrybucji produktów far-

maceutycznych zasad Dobrej Praktyki Wytwarzania, które gwarantują jednorodność wytwarzanej serii produktu [1].

Do wytwarzania produktów farmaceutycznych powinny być stosować materiały wyjściowe, w tym woda i materiały opakowaniowe, o zalecanej jakości mikrobiologicznej. Wytwarzanie powinno być prowadzone w warunkach kontrolowanych zapewniających jakość mikrobiologiczną odpowiednią dla wytwarzanego produktu [2]. Obecność niektórych drobnoustrojów w niejałowych produktach leczniczych może mieć potencjalny wpływ na obniżenie lub zniesienie działania leczniczego produktu.

Aby zapewnić wiarygodność uzyskanych wyników badań, analiza mikrobiologiczna musi być przeprowadzana w warunkach zabezpieczających badaną próbę przed przypadkowym zanieczyszczeniem.

Warunki pracy, w jakich są przeprowadzane badania w laboratorium, należy regularnie kontrolować monitorując jakość mikrobiologiczną pomieszczeń i personelu oraz we właściwy sposób nadzorować stosowane materiały i sprzęt. Nadzór nad właściwą jakością materiałów używa-

nych do przeprowadzenia analizy mikrobiologicznej dotyczy: pożywek, buforów i innych rozcieńczalników, szczepów z kolekcji i szczepów środowiskowych tzw. „In house”, wzorców oraz szkła. Sposób postępowania z materiałami należy udokumentować w procedurach nadzoru.

Właściwe przygotowanie pożywki hodowlanej jest jednym z najważniejszych etapów badania mikrobiologicznego i ma zasadniczy wpływ na wiarygodność uzyskanych wyników we testach mikrobiologicznych.

Podłoże hodowlane o odpowiednio skomponowanych składnikach naturalnych i/lub syntetycznych, w postaci płynnej, półpłynnej lub stałej, służy do namnażania, utrzymania przy życiu, przechowywania, identyfikacji, izolacji i określania rodzajów drobnoustrojów.

Jakość pożywek hodowlanych musi być zgodna z odpowiednimi kryteriami jakości i gwarantować uzyskiwanie stałych i powtarzalnych wyników. Pożywki należy dobierać odpowiednio do określonego celu badania. Farmakopea Polska (FP) [1] klasyfikuje pożywki ze względu na ich postać: stałe i płynne, ze względu na właściwości wybiórcze oraz

możliwość identyfikacji określonych drobnoustrojów.

Zgodnie z normą ISO/TS 11133 – 1 w badaniach mikrobiologicznych wykorzystywane są różne rodzaje pożywek, definiowane jako: pożywki płynne, stałe, ochronne, namnażające, regenerujące, selektywne, służące do izolacji, identyfikacji, oznaczania liczby drobnoustrojów oraz różnicujące [3]. Pożywki płynne tzw. Buliony i pożywki stałe agarowe można sporządzać z pojedynczych składników według wskazań farmakopei lub wykorzystywać po uwodnieniu gotowe pożywki, kupowane w postaci suchych proszków. Można też stosować pożywki gotowe do bezpośredniego zastosowania, zakupione od kwalifikowanych dostawców.

Przygotowanie pożywek w laboratorium

Do sporządzania pożywek w laboratorium należy stosować wodę oczyszczoną otrzymaną w procesie odwróconej osmozy, destylacji, wymiany jonowej z wody przeznaczonej do stosowania przez ludzi, której parametry odpowiada wymaganiom ustalonym przez organ upoważniony. Woda ta powinna mieć jakość mikrobiologiczną określaną



Tabela 1. Zła jakość przygotowanych podłoży. Błędy i przyczyny ich powstawania podczas przygotowywania podłoży mikrobiologicznych [wg 13]

Błędy	Prawdopodobne przyczyny błędów
Miękki agar	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieodpowiednie warunki lokalowo – środowiskowe zbyt wysoka temperatura przechowywania podłoża 2. Źle dobrane warunki sterylizacji i rozpuszczania podłoża 3. Zbyt niskie pH spowodowane hydrolizą kwasów 4. Niedokładne odważenie poszczególnych składników podłoża 5. Niedokładne wymieszanie składników podłoża 6. Niedokładne rozpuszczenie agaru 7. Nieodpowiednia jakość agaru
Nieprawidłowe pH	<ol style="list-style-type: none"> 1. Brudne szkło 2. Zanieczyszczona woda 3. Przekroczona temperatura sterylizacji i/lub rozpuszczania 4. Pomiar pH wykonywany w nieodpowiedniej temperaturze 5. Nieprawidłowa praca pH-metru, nieodpowiednia jakość buforów 6. Zmiana uwodnienia podłoża
Nieprawidłowy kolor	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zanieczyszczona woda 2. Brudne szkło 3. Przekroczona temperatura sterylizacji i/lub rozpuszczania 4. Nieprawidłowe pH
Ciemnienie podłoża	<ol style="list-style-type: none"> 1. Przegrzanie podłoża 2. Zmiana uwodnienia podłoża
Obecność strąków	<ol style="list-style-type: none"> 1. Przekroczona temperatura sterylizacji i/lub rozpuszczania 2. Zmiana uwodnienia podłoża 3. Zanieczyszczona woda i/lub szkło
Toksyczność	<ol style="list-style-type: none"> 1. Przekroczona temperatura grzania podczas sterylizacji i/lub rozpuszczania (spalenie)
Ubogi wzrost	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zmiana uwodnienia podłoża, degradacja podłoża 2. Zanieczyszczona woda i/lub szkło 3. Niedokładne odważenie poszczególnych składników podłoża 4. Niedokładne wymieszanie składników podłoża 5. Przegrzanie podłoża
Niska selektywność	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zanieczyszczona woda i/lub szkło 2. Niedokładne odważenie poszczególnych składników podłoża 3. Niedokładne wymieszanie składników podłoża 4. Degradacja podłoża 5. Zmiana warunków ogrzewania podłoża

przez limit interwencji na poziomie 100 cfu/1ml (ang. colony forming unit). Poziom limitu należy określić w badaniu z użyciem sączków membranowych o wielkości porów nie większych niż 0,45 µm i podłoża agarowego R2A stosowanego do wzrostu bakterii przy niskiej temperaturze, stymulującego wzrost bakterii poddanych stresowi. Innymi parametrami charakteryzującymi jakość wody stosowanej do przygotowania pożywek jest całkowita zawartość wę-

gla i przewodność właściwa o wymaganych wartościach w zależności od temperatury [3]. Zaleca się regularne przeprowadzanie badań mikrobiologicznych wody, sprawdzając zanieczyszczenie, zgodnie z normami [4,5].

Seria pożywki określana jest jako jedna naważka podłoża suchego, przygotowanego w jednym pojemniku, a następnie rozdozowana do odpowiednich pojemników, jałowiona w jednym cyklu sterylizacyjnym. Identyfikacja

serii pożywki ma znaczenie krytyczne. Muszą być prowadzone zapisy dotyczące sporządzania serii pożywek. Zapisy powinny umożliwić identyfikację osoby odpowiedzialnej za przygotowanie podłoża [3, 6]. Przy sporządzaniu pożywek z pojedynczych składników należy przestrzegać dokładnie receptury i pamiętać o dokumentowaniu wszystkich użytych składników jak również zapewnieniu ich identyfikowalności (kod i nr serii) oraz ilości i rodzaju

pojemników użytych do dozowania. Pojemniki zawierające podłoża muszą być odpowiednio oznakowane zgodnie z wymaganiami Dobrej Praktyki Wytwarzania. Etykiety powinny zawierać nazwę podłoża, numer serii/partii, datę sporządzenia i terminem ważności, a w przypadku sterylizacji muszą zawierać informacje umożliwiające identyfikację cyklu sterylizacji. Przed zwolnieniem pożywek do badań należy sprawdzić dokładność wykonanych czynności i ich zapisów, a także danych dotyczących warunków procesu sterylizacji [6]. Dokumentacja wytwarzania serii pożywek powinna umożliwić odtworzenie przebiegu całego procesu w celu oceny poprawności przygotowania pożywki do użycia. W tabeli 1 przedstawiono przykłady błędów i ich prawdopodobne przyczyny jakie mogą się pojawić przy sporządzaniu podłoży.

Rys. 1 przedstawia przykładowy formularz protokołu sporządzania pożywek [7].

Laboratorium powinno opracować sposób zapisu sporządzania pożywek odpowiedni do jego potrzeb. Pożywki wymagające sterylizacji powinny być poddane temu procesowi tak szybko jak to możliwe, najlepiej w ciągu dwóch godzin. Przed sterylizacją należy sprawdzić sposób zamknięcia pojemników np. czy wszystkie korki są luźno osadzone. Po zakończeniu cyklu sterylizacji pojemniki i materiały należy wyjąć i odstawić do schłodzenia. Po schłodzeniu, a przed zmagazynowaniem pojemników, sprawdzić czy wszystkie zamknięcia są szczelne a

Protokół sporządzania pożywek				
Protokół sporządzania pożywek				
Pożywka:..... Data:..... Technik:.....				
Całkowita sporządzona objętość:				
Dozowanie do:.....(ilość):..... (rodzaj):.....				
pH przed sterylizacją:.....pH po sterylizacji:.....pehametr:.....				
Temperatura pożywki:.....Termometr:.....				
Sterylizacja:.....(tak/nie) Cykl sterylizacji:.....Autoklaw:.....				
Waga:.....				
Składnik	Ilość (g albo ml)	Producent	Nr partii	Termin ważności
Sprawdził/Dnia:.....				
Protokół żywności				
Próba wykonana:.....(tak/nie)				
Data badania:.....Technik:.....				
Mikroorganizm(y):.....				
Gęstość zawiesiny:.....				
Nr kolekcji mikroorganizmu(ów)/ Nr pasażu /Termin ważności:.....				
Protokół(y) przygotowania mikroorganizmu(ów):.....				
Inkubator:.....Warunki inkubacji:.....				
Wyniki odczytano na:.....Technik:.....				
Spostrzeżenia:.....				
Sprawdził/Dnia:.....				
Uwaga: Jeżeli do próby rozwoju hodowli użyto więcej niż jednego mikroorganizmu, sporządzić osobne protokoły rozwoju hodowli.				

Rys.1. Protokół sporządzania pożywki (przykład) [wg 6]

korki mikrobiologiczne we właściwy sposób osadzone. Niektóre pożywki po sterylizacji lub bezpośrednio przed użyciem wymagają suplementacji. Dodawane substancje uzupełniające muszą być jałowe, po odpowiednio przeprowadzonej sterylizacji np. w autoklawie lub przez filtrację. Jakość tych substancji powinna być zgodna ze specyfikacją. Zaleca się, aby pożywki do których zostały dodane niestabilne suplementy, były użyte w dniu kiedy zostały przygotowane. Można wykorzystać takie podłoże

w innym czasie, o ile w laboratorium w badaniach walidacyjnych został potwierdzony dłuższy okres trwałości. Data trwałości/przydatności podłoży powinna być ustalona w badaniach walidacyjnych dla wszystkich pożywek przeznaczonych do przechowywania. Pożywki przed zastosowaniem powinny być sprawdzane w zakresie np.: zmiany zabarwienia, odwodnienia, wzrostu drobnoustrojów. Pożywki wykazujące takie zmiany nie powinny być stosowane. W laboratorium powinny być opracowane

procedury opisujące sposób postępowania gwarantujący brak wpływu na żywność, właściwości wybiórcze, czy też identyfikacyjne przygotowanych agarowych podłoży. Pożywki agarowe należy upłynniać w łaźni wodnej lub parze bieżącej. Pożywki sterylizowane w autoklawie należy upłynniać w jak najkrótszym, ustalonym czasie i nie należy ich ponownie zestalać i po raz kolejny upłynniać. Upłynnione, schłodzone do temperatury 47° – 50°C powinny być wykorzystane w ciągu 4 – 8 godzin.

Przechowywanie pożywek

Pożywki należy przechowywać w warunkach zapobiegających wystąpieniu jakichkolwiek modyfikacji ich składu, chroniąc przede wszystkim przed światłem i odwodnieniem. Jeśli to konieczne pożywki należy przechowywać w lodówce w temperaturze 5°C ± 3°C. Zaleca się aby nie przechowywać płytek z rozlaną pożywką dłużej niż 2 – 4 tygodni. Okres ten można przedłużyć umieszczając płytki w workach foliowych z zabezpieczeniem chroniącym przed kondensacją wody. Pożywki w butelkach lub probówkach mogą być przechowywane przez okres od 3 – 6 miesięcy o ile nie ma wyników badań dla przechowywania w innych warunkach. Pożywki, które przed zastosowaniem są suplementowane powinny być zużyte tego samego dnia o ile laboratorium nie posiada wyników badań potwierdzających ich dłuższą przydatność [3].

Okres przydatności podłoży wykorzystywanych w laboratorium powinien być określony na podstawie wyników badań trwałości, co pozwoli na określenie rzeczywistego okresu trwałości dla podłoży wykorzystywanych w danym laboratorium.

W laboratorium musi funkcjonować system kontroli materiałów do badań, który gwarantuje, że tylko materiały z ważnym terminem ważności są wykorzystywane do badań. Zaleca się aby stosując pożywki i inne materiały postępować zgodnie z zasadą fi – fo (ang. first in – first out) „pierwsze weszło, pierwsze wyszło”.



Kontrola jakości podłoży hodowlanych

Kontrola jakości podłoży jest wykonywana przez producenta oraz użytkownika w odpowiednim zakresie zależnym od rodzaju podłoża i sposobu jego przygotowania. Kontrola producenta dotyczy oceny i doboru odpowiednich surowców oraz badania jakości produktu finalnego i opracowania certyfikatu jakości potwierdzającego jakość podłoża zgodną z opracowaną specyfikacją. Kontrola pożywek w laboratorium mikrobiologicznym ma na celu weryfikację parametrów charakteryzujących pożywkę stosowaną w laboratorium. Pożywki hodowlane stosowane w laboratorium mikrobiologicznym mogą być stosowane w formie gotowej do użycia, w postaci proszków wymagających jedynie rozpuszczenia i sterylizacji albo przygotowane z pojedynczych składników.

Zgodnie z FP [1] należy badać każdą serię gotowego podłoża i każdą serię podłoża przygotowanego z odwodnionego podłoża lub z pojedynczych składników. W innych publikacjach [3, 6] znajdziemy zapis, że w przypadku, kiedy producent pożywek gotowych do użycia posiada uznany system jakości, potwierdzony certyfikatem (np. zarejestrowany system zgodny z ISO 9000) wówczas może być wykorzystywana zasada „oczekiwania stałej jakości” dostaw i laboratorium nie musi przeprowadzać pełnej kontroli zakupionej pożywki. Nadzór nad tymi podłożami dotyczy wówczas stosowania danego produk-

tu odpowiednio do przeznaczenia, właściwego przechowywania i przestrzegania terminów ważności zgodnie z zaleceniami producenta. Wyjątek stanowią pożywki gotowe wymagające suplementacji. Te podłoża muszą być kontrolowane w taki sam sposób jak pożywki sporządzane z suchych proszków lub pojedynczych składników [8]. W chwili otrzymania pożywki należy sprawdzić nazwę pożywki, stan opakowania, numer serii, warunki przechowywania i termin ważności. Użytkownik podłoża powinien uzyskać od producenta gotowych pożywek informacje dotyczące: nazwy pożywki i jej składu, numeru serii, wartości pH przed użyciem, warunków przechowywania i terminu trwałości, opisu zasad bezpiecznego postępowania z pożywką jak również otrzymać certyfikat potwierdzający przeprowadzenie kontroli i uzyskanie odpowiedniej jakości badanych parametrów. Kontrola pożywek sporządzonych w laboratorium z granulatów lub pojedynczych składników dotyczy prawidłowości jej wykonania zgodnie z określoną procedurą. Każda seria pożywki wykonanej w laboratorium na drodze uwodnienia suchych gotowych pożywek w postaci proszku lub granulatu, powinna być skontrolowana. Dla pożywek sporządzonych z pojedynczych składników wymagane są badania zarówno jakościowe jak i ilościowe [3]. Zakres badań kontroli jakości pożywek oraz kryteria ich oceny zostały opisane w FP [1] i innych dokumentach norma-

tywnych [9-11] oraz piśmiennictwie [12].

Prawidłowa kontrola pożywek powinna obejmować parametry jakościowe o charakterze ogólnym takie jak:

- konsystencja;
- wilgotność pożywek agarowych;
- przejrzystość;
- wygląd zewnętrzny: zabarwienie, jednorodność;
- objętości rozlanej pożywki;
- pH;
- właściwości mikrobiologiczne tj.: jałowość, cechy hodowlane o charakterze szczegółowym (żyźność, selektywność, specyficzność czy też zdolność do oceny wrażliwości drobnoustrojów na leki) [10].

Sterylność pożywek

Brak zanieczyszczenia jest kluczowym parametrem jakości podłoża mikrobiologicznego. Kontrolę jałowości należy przeprowadzać zarówno dla pożywek przygotowanych w laboratorium, jak i dla pożywek komercyjnych, gotowych do użycia lub sporządzonych z gotowych suchych proszków. Prawidłowa ocena jałowości podłoża zapewnia ograniczenie możliwości uzyskania wyniku fałszywie dodatniego hodowli drobnoustrojów, powstałego na skutek zanieczyszczenia mikrobiologicznego pożywki, przed jej zastosowaniem do badań. W laboratorium powinno być przeprowadzone badanie sterylności każdej partii pożywek. Zgodnie z zaleceniami normy [10] odpowiednia liczba pojemników z pożywką, z każdej partii powinna być badana pod kątem zanieczyszczeń mikrobiolo-

gicznych. Norma jednak nie określa liczby pojemników pożywki, jakie powinny być kontrolowane. Można przyjąć iż należy badać np. jedną płytkę/butelkę lub 1% płytek/butelek z początku i końca partii wytworzonej, inkubując pożywkę co najmniej 18 godzin, w temperaturze 37°C lub w temperaturze w jakiej pożywka jest stosowana w badaniach [12].

Kontrola sterylności może być wykonana przed jak i w trakcie badania. Przed badaniami część badanej serii pożywki należy umieścić w ciepłarnie w warunkach takich, w jakich później będzie prowadzona hodowla i obserwować wzrost drobnoustrojów. Kontrola przeprowadzana w trakcie badania jest traktowana jako kontrola ujemna z zastrzeżeniem, że proces sterylizacji został zwalidowany.

Kontrola wzrostu drobnoustrojów

Kontrola wzrostu drobnoustrojów jest równie ważna jak próba sterylności podłoża. Jeżeli na danej pożywce nie jesteśmy w stanie wspomóc czy przyspieszyć wzrostu mikroorganizmów, w wymaganych warunkach próby, to ewentualne mikroorganizmy nie będą w stanie tworzyć kolonii czy zmętnienia, co prowadzi do fałszywej próby ujemnej. Dokonując oceny wzrostu drobnoustrojów na określonym podłożu należy zwrócić uwagę czy wzrost drobnoustrojów jest dostatecznie szybki i obfity, czy podłoże jest selektywne tzn., że można zaobserwować preferencyjny wzrost drobnoustrojów

Tabela 2. Przygotowanie i stosowanie drobnoustrojów testowych wg FP IX (20011)[1]

Drobnoustrój	Przygotowanie szczepu testowego	Warunki wzrostu		Przydatność metody liczenia w obecności produktu	
		Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych	Ogólna liczba drożdży i pleśni	Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych	Ogólna liczba drożdży i pleśni
<i>Staphylococcus aureus</i> jak: ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi lub bulion z hydrolizatem kazeiny i soi 30-35°C 18-24 h	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi oraz bulion z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 3 dni	-	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi/ NPL bulion z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 3 dni	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> jak: ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi lub bulion z hydrolizatem kazeiny i soi 30-35°C 18-24 h	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi oraz bulion z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 3 dni	-	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi/ NPL bulion z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 3 dni	-
<i>Bacillus subtilis</i> jak: ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi lub bulion z hydrolizatem kazeiny i soi 30-35°C 18-24 -h	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi oraz bulion z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 3 dni	-	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi/ NPL bulion z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 3 dni	-
<i>Candida albicans</i> jak: ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Agar Saboraud z dekstrozą lub bulion Saboraud z dekstrozą 20-25°C 2-3 dni	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 5 dni	Agar Saboraud z dekstrozą ≤ 100 CFU 20-25°C ≤ 5 dni	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 5 dni NPL: nie stosuje się	Agar Saboraud z dekstrozą ≤ 100 CFU 20-25°C ≤ 5 dni
<i>Aspergillus brasiliensis</i> jak: ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Agar Saboraud z dekstrozą lub agar ziemniaczany z dekstrozą 20-25°C 5-7 dni lub dopóki nie zostanie osiągnięta dobra sporulacja	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 5 dni	Agar Saboraud z dekstrozą ≤ 100 CFU 20-25°C ≤ 5 dni	Agar z hydrolizatem kazeiny i soi ≤ 100 CFU 30-35°C ≤ 5 dni NPL: nie stosuje się	Agar Saboraud z dekstrozą ≤ 100 CFU 20-25°C ≤ 5 dni

poszukiwanych w stosunku do flory towarzyszącej i poszukiwane drobnoustroje charakteryzują się typową, łatwą do odróżnienia morfologią.

Wykonując badanie kontroli wzrostu drobnoustrojów należy ocenić żywność, selektywność oraz specyficzność cech biochemicznych i fizjologicznych. Do oceny żywności i selektywności podłoży należy wykorzystywać metody ilościowe i półilościowe, zaś do

oceny specyficzności metody jakościowe [1, 9].

Kontrola żywności pozwala na ocenę właściwości odżywczych pożywki wpływających na wzrost drobnoustrojów. Na podstawie wyników badań żywności można stwierdzić czy pożywka zawiera wszystkie składniki niezbędne do wzrost drobnoustrojów, we właściwych stężeniach. Wyniki badań selektywności (wybiórczości) pozwalają na ocenę zdolności pożywki do

hamowania wzrostu określonych grup drobnoustrojów, co pozwala hodować określone, wybrane grupy drobnoustrojów. Selektywność pożywek jest związana z obecnością w jej składzie składników, które wybiórczo hamują wzrost jednych drobnoustrojów nie wpływając na możliwość jednoczesnego wzrostu innych drobnoustrojów. Specyficzność pożywki pozwala na właściwe różnicowanie drobnoustrojów poprzez

ich makroskopową ocenę np.: wielkość i kolor kolonii, obecność hemolizy. Metody kontroli żywności i właściwości wybiórczych podłoży stosowanych do oceny jakości mikrobiologicznej produktów leczniczych są opisane w odpowiednich monografiach FP [1]. Przy ocenie podłoży wykorzystywanych w kontroli wytwarzania produktów leczniczych zaleca się wykonywanie testu oceny wzrostu przy użyciu szczepu o gęstości, określonej jako



Tabela 3. Żyzność, właściwości wybiórcze i identyfikacyjne podłoża wg FP IX (2011) [1]

	Podłoże	Właściwości	Szczepy testowe
Badanie właściwości bakterii Gram-ujemnych tolerujących żółć	Bulion Mossela wzbogacony dla pałeczek jelitowych	Ułatwia wzrost	<i>E.coli</i> <i>P.aeruginosa</i>
		Hamuje	<i>S.aureus</i>
	Agar z fioletem krystalicznym, czerwienią obojętną żółcią i glukozą	Ułatwia wzrost + identyfikacja	<i>E.coli</i> <i>P.aeruginosa</i>
Badanie obecności <i>E.coli</i>	Bulion MacConkeya	Ułatwia wzrost	<i>E.coli</i>
		Hamuje	<i>S.aureus</i>
	Agar MacConkeya	Ułatwia wzrost + identyfikacja	<i>E.coli</i>
Badanie obecności <i>Salmonella</i>	Bulion Rappaporta Vassiliadis wzbogacony dla <i>Salmonella</i>	Ułatwia wzrost	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar typhimurium lub <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar abony
		Hamuje	<i>S.aureus</i>
	Agar z ksylozą, lizyną, deoksycholanem	Ułatwia wzrost + identyfikacja	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar typhimurium lub <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar abony
Badanie obecności <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar z cetrymidem	Ułatwia wzrost	<i>P.aeruginosa</i>
		Hamuje	<i>E.coli</i>
Badanie obecności <i>Staphylococcus aureus</i>	Agar z mannitolem i chlorkiem sodu	Ułatwia wzrost + identyfikacja	<i>S.aureus</i>
		Hamuje	<i>E.coli</i>
Badanie obecności drobnoustrojów z rodzaju <i>Clostridium</i>	Podłoże wzbogacone dla drobnoustrojów z rodzaju <i>Clostridium</i>	Ułatwia wzrost	<i>Cl.sporogenes</i>
	Agar Columbia	Ułatwia wzrost	<i>Cl.sporogenes</i>
Badanie obecności <i>Candida albicans</i>	Bulion Saboraud z dekstrozą	Ułatwia wzrost	<i>C.albicans</i>
	Agar Saboraud z dekstrozą	Ułatwia wzrost + identyfikacja	<i>C.albicans</i>

„poniżej 100 cfu” (zdolnych do życia mikroorganizmów) [1]. W badaniach kontroli wzrostu drobnoustrojów rodzaj stosowanego mikroorganizmu i warunki inkubacji zależne są od rodzaju pożywki i próby, jaka ma być przeprowadzona. Prawidłowe przeprowadzenie kontroli parametrów wzrostu drobnoustrojów tj. żyzności, selektywności i specyficzności wymaga aby stosować odpowiednio dobrany zestaw szczepów kontrolnych przygotowanych na bazie szczepów referencyjnych.

Tabela 2 zawiera wykaz mikroorganizmów zalecanych do stosowania w testach oceny żyzności podłoża. W tabeli 3 zamieszczono właściwości wybiórcze i identyfikacyjne podłoża. Prawidłowo skomponowany zestaw szczepów kontrolnych powinien zawierać [wg 11]:

- szczep stanowiący kontrolę dodatnią, posiadający typowe cechy, dobrze rosnący na danej pożywce, wykazujący dodatni wynik testu;
- szczep stanowiący kontrolę słabo dodatnią, słabo rosnący

na badanej pożywce, wykazujący z opóźnieniem wynik testu;

- szczep stanowiący kontrolę ujemną, wykazujący częściowo lub całkowicie zahamowanie wzrostu na badanej pożywce, wykazujący ujemny wynik testu.

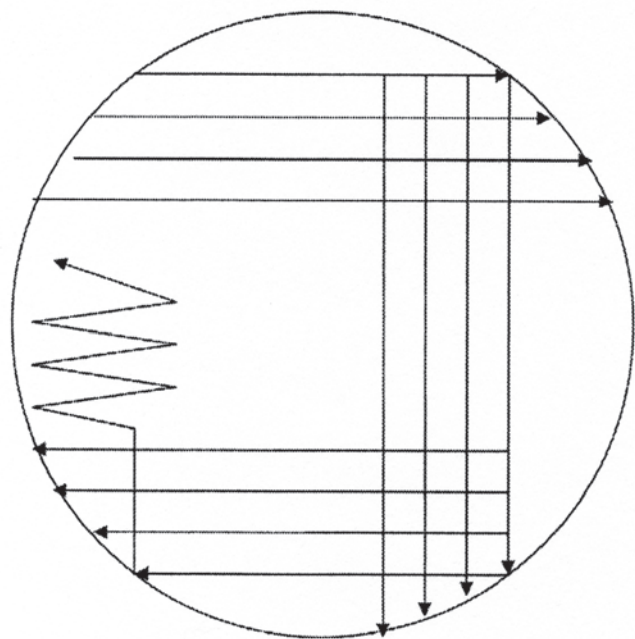
Przy ocenie selektywności podłoża należy zastosować w badaniach szczep, który daje inne reakcje biochemiczne niż szczep docelowy. Żyzność pożywek stałych wg normy EN ISO 11133 można ocenić ilościowo na podsta-

wie tzw. współczynnika żyzności (Productivity Ratio, PR), który określa stosunek całkowitej liczby kolonii wyrosłych na pożywce badanej do całkowitej liczby kolonii wyrosłych na pożywce referencyjnej, zgodnie ze wzorem:

$$PR = N_s / N_o$$

N_s – całkowita liczba cfu drobnoustrojów na pożywce badanej,
 N_o – całkowita liczba cfu drobnoustrojów na pożywce referencyjnej.

Współczynnik żyzności pożywki nieselektywnej dla drobnoustrojów dobrze rosnących powinien wynosić nie mniej niż 0,7 zaś dla pożywki selektywnej przynajmniej 0,1 [8, 9]. Inne źródła podają, że wzrost szczepu na pożywce kontrolowanej powinien wynosić co najmniej 70% wzrostu uzyskanego na pożywce referencyjnej [12]. Zgodnie z FP kryterium żyzności podłoża stałych uznaje za spełnione, w przypadku świeżo przygotowanego inoculum, gdy obserwuje się wzrost drobnoustrojów podobny do wzrostu uzyskanego wcześniej na uprzednio badanej i zatwierdzonej serii podłoża. Płynne podłoża są odpowiednie, jeżeli obserwuje się widoczny wzrost drobnoustrojów, podobny do wzrostu uzyskanego wcześniej na uprzednio badanej i zatwierdzonej serii. Gdy badanie jest wykonywane zgodnie z zaleceniami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [11] to na podłożu stałym o odpowiednich parametrach żyzności obserwujemy wzrost zlewny



Rys. 2. Schemat posiewu rysowego

drobnoustrojów dobrze rosnących. Inną metodą oceny żywności pożywek stałych jest półilościowa ekonometryczna metoda posiewu rysowego [8, 12]. W metodzie tej należy wykonać posiew drobnoustrojów, eż, o pojemności 1 μ l dokładnie wg schematu (rys. 2). Do badania używa się zawiesiny dodatniego szczepu kontrolnego o gęstości $10^3 - 10^4$ cfu w 1 μ l oraz ujemnego szczepu kontrolnego o gęstości $10^4 - 10^6$ cfu w 1 μ l. Indeks wzrostu wylicz się poprzez zsumowanie punktów przyznawanych każdej posianej linii według określonej skali [12]. Kontrolę selektywności pożywki można wykonać metodą ilościową poprzez obliczenie tzw. współczynnika selektywności (Selectivity Factor, SF), który jest różnicą najwyższego rozcieńczenia dającego wzrost co najmniej 10 kolonii na pożywce referencyjnej a najwyższym rozcieńczeniem dającym porównywalny wzrost na po-

żywce kontrolnej, zgodnie ze wzorem:

$$SF = D_o - D_s$$

D_o – najwyższe rozcieńczenie dające wzrost co najmniej 10 kolonii na pożywce referencyjnej,

D_s – najwyższe rozcieńczenie dające porównywalny wzrost na pożywce badanej.

Wartość współczynnika selektywności wyrażana jest jako logarytm dziesiętny. Współczynnik selektywności dla drobnoustrojów niespecyficznych na pożywce selektywnej nie powinien być większy niż 2 [8, 9].

Na uwagę zasługuje jakościowa metoda kontroli właściwości mikrobiologicznych pożywek stałych ze względu na fakt, że można dobrać zestaw szczepów kontrolnych w taki sposób aby jednocześnie ocenić żywność, selektywność i specyficzność pożywki. Metoda polega na posiewie rysowym eż, o pojemności 1 μ l, jednego lub

kilku szczepów kontrolnych na pożywkę. Każdej posianej linii przyznawana jest odpowiednia liczba punktów odpowiadająca intensywności wzrostu szczepu kontrolnego zgodnie z ustalonymi zasadami [12]. Łatwość stosowania metody jakościowej do kontrolowania podłoża i możliwość jednoczesnej oceny trzech parametrów jakości podłoża sprawia, że jest polecana do kontrolowania pożywek gotowych do użycia. Daną partię pożywki można uznać za przydatną do określonych badań, jeśli jednocześnie zostały spełnione ogólne i mikrobiologiczne kryteria jakości. Szczepy kontrolne dają reakcje zgodne ze specyfikacją w zakresie cech ogólnych i hodowlanych [8, 10].

Piśmiennictwo

- [1] Farmakopea Polska. Wydanie IX (2011), Tom 1.
- [2] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 1 października 2008 w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania (Dz. U. Nr 184, Poz. 1143 z późniejszymi zmianami).
- [3] PKN-CEN ISO/TS 11133 – 1 Mikrobiologia żywności i pasz. Wytyczne dotyczące przygotowania i wytwarzania pożywek. Część 1: Ogólne wytyczne dotyczące kontroli jakości pożywek przygotowanych w laboratorium.
- [4] PN-EN ISO 6222:2004P Jakość wody – Oznaczanie ilościowe mikroorganizmów zdolnych do wzrostu – Określanie ogólnej liczby kolonii metodą posiewu na agarze odżywczym.
- [5] PN-EN ISO 8199:2010P Jakość wody – Ogólne wytyczne oznaczania liczby bakterii metodą hodowli.

[6] EA-04/10 Akredytacja Laboratoriów Mikrobiologicznych uzupełnienie EN ISO/IEC 17025.

[7] Lucia Clontz. Quality control systems for the microbiology laboratory. The key to successful inspections. PDA Baltimore Maryland USA 2001.

[8] Zarządzanie badaniami mikrobiologicznymi w wytwórni farmaceutycznej – zarządzanie Laboratorium mikrobiologicznym. TRANSpharmacia Education Warszawa 22-23 maja 2013. Materiały szkoleniowe.

[9] ISO/TS 11133-2:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.

[10] PN-EN 12322:2005P Wyroby medyczne do diagnostyki in vitro – Pożywki mikrobiologiczne – Kryteria oceny działania pożywek mikrobiologicznych.

[11] CLSI (NCCLS) Quality Control for commercially prepared microbiological culture media; Approved Standard –Third Edition. M22-A3 Vol. 24 No. 19 Replaces M22-A2 Vol. 16 No. 16.

[12] Marzena Strzyż, Urszula Wendt. Zapewnienie jakości i kontrola jakości pożywek mikrobiologicznych w laboratorium medycznym. Diagnostyka laboratoryjna. Journal of Laboratory Diagnostics. 2012. Vol.48, Nr 2.

[13] Elżbieta Stefaniuk. Laboratoryjna kontrola jakości podłoża mikrobiologicznych. Aktualności bioMerieux 2008;44.

* Dr Jadwiga Marczevska – jmarczevska@interia.pl; mgr Krystyna Mysłowska – krystynamyslowska@gmail.com