

# Przydatność farmakopealnych metod mikrobiologicznych w aspekcie badań czystości mikrobiologicznej produktów leczniczych niejałowych – PROTOKÓŁ i RAPORT

Krystyna Mysłowska, Katarzyna Bucala-Śladowska\*

W poprzednim numerze LAB (4/2016) przedstawiliśmy artykuł dotyczący wykonania badania przydatności metody badania czystości mikrobiologicznej preparatów niejałowych.

Artykuł miał postać SOP, do której dołączono 3 załączniki:

1. Przygotowanie mianowanych zawiesin oraz rozcieńczeń szczepów wzorcowych;
2. Schemat badania przydatności dla metody ilościowej;
3. Schemat badania przydatności dla metody jakościowej.

Pozostałe załączniki :

4. Protokół z wykonania badania przydatności metody;
  5. Raport;
- przedstawiamy w tym numerze na kolejnych stronach. Wykonanie badania przydatności metod mikrobiologicznych pozwala uzyskiwać wiarygodne i powtarzalne

wyniki, zmniejsza liczbę wyników OOS i jest ważnym elementem zapewnienia jakości badań.

\* *Mgr Krystyna Mysłowska, mgr Katarzyna Bucala-Śladowska – Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dr. Jana Bobra, Kraków*



**Polskie Centrum Akredytacji**  
15 lat działalności

**PROTOKÓŁ BADANIA PRZYDATNOŚCI FARMAKOPEALNEJ METODY  
BADANIA CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ**

**PREPARAT:**                    **Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/**

**PRODUCENT:**                **Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne - Nazwa**

**DATA SPORZĄDZENIA PROTOKOŁU:**

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 1 z 9

### Spis treści

1. Opis preparatu
2. Uwagi odnośnie postępowania
  - 2.1. Przydatność metody ilościowej
  - 2.2. Przydatność metod jakościowych
  - 2.3. Kryteria akceptacji
3. Osoby odpowiedzialne
4. Zastosowane podłoża i rozpuszczalniki
5. Zastosowane szkło i materiały pomocnicze
6. Zastosowane urządzenia
7. Zastosowane szczepy wzorcowe
8. Badanie przydatności metod ilościowych
  - 8.1. Analiza 1
  - 8.2. Analiza 2
  - 8.3. Analiza 3
  - 8.4. Warunki inkubacji
  - 8.5. Wnioski
9. Badanie przydatności metod jakościowych
  - 9.1. Analiza 4
  - 9.2. Analiza 5
  - 9.3. Analiza 6
  - 9.4. Warunki inkubacji
  - 9.5. Wnioski
10. Podsumowanie badania przydatności metod ilościowych i jakościowych
11. Dane surowe
  - 11.1. Analiza 1
  - 11.2. Analiza 2
  - 11.3. Analiza 3
  - 11.4. Analiza 4
  - 11.5. Analiza 5
  - 11.6. Analiza 6

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 2 z 9

## 1. Opis preparatu

**PREPARAT:** Nazwa preparatu, postać, zawartość substancji czynnej

**NUMER SERII:** seria 1, seria 2, seria 3

**WYTWÓRCA:** Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne - Nazwa

**SUBSTANCJA CZYNNNA / SKŁAD:**

Nazwa substancji czynnej

**FORMA (wymagania czystości mikrobiologicznej wg farmakopei):**

FP X – preparat doustny niezawierający wody

**BADANIE WYKONANO METODĄ:**

Bezpośredniego posiewu

## 2. Uwagi odnośnie postępowania

**2.1. Przydatność metody ilościowej:**

**2.2. Przydatność metod jakościowych:**

W punktach tych opisujemy poszczególne etapy prowadzonych badań: wykorzystane szczepy wzorcowe, przygotowanie mianowanych zawiesin, wykonanie naważek i rozcieńczeń – zgodnie z procedurą PRZYDATNOŚĆ METODY FARMAKOPEALNEJ W ASPEKCIE BADAŃ CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW LECZNICZYCH NIEJAŁOWYCH

**2.3. Kryteria akceptacji:**

**2.3.1. Przydatność metody ilościowej:**

**2.3.2. Przydatność metody jakościowej:**

Kryteria akceptacji ustalane są zgodnie z procedurą PRZYDATNOŚĆ METODY FARMAKOPEALNEJ W ASPEKCIE BADAŃ CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW LECZNICZYCH NIEJAŁOWYCH

## 3. Osoby odpowiedzialne za przeprowadzenie badania przydatności farmakopealnej metody badania czystości mikrobiologicznej

- Za przygotowanie protokołu (imię i nazwisko, podpis) .....
- Za sprawdzenie protokołu (imię i nazwisko, podpis) .....
- Za zatwierdzenie protokołu (imię i nazwisko, podpis) .....

## 4. Zastosowane podłoża i rozpuszczalniki

NAZWA	Producent / numer serii - do analizy 1	Producent / numer serii - do analizy 2	Producent / numer serii - do analizy 3	Producent / numer serii - do analizy 4	Producent / numer serii - do analizy 5	Producent / numer serii - do analizy 6
Agar z hydrolizatem kazeiny i soi						
Agar Sabouraud z dekstrozą						
Bulion z hydrolizatem kazeiny i soi						
Bulion Mac Conkeya						
Agar z Mac Conkeya						
Zbuforowany roztwór chlorku sodu o pH 7						

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 3 z 9

### 5. Zastosowane szkło i materiały pomocnicze

NAZWA	Producent / numer serii - do analizy 1	Producent / numer serii - do analizy 2	Producent / numer serii - do analizy 3	Producent / numer serii - do analizy 4	Producent / numer serii - do analizy 5	Producent / numer serii - do analizy 6
Kolba płaskodenna o pojemności 200 ml						
Probówki o pojemności 20 ml z plastikowymi korkami						
Jednorazowe sterylne pipety o pojemności 10 ml pojedynczo pakowane						
Głaszczki jednorazowe, sterylne						
Końcówki do pipety automatycznej						
Ezy jednorazowe, sterylne						

### 6. Zastosowane urządzenia

NAZWA	PRODUCENT	NUMER WEWNĘTRZNY W SPISIE AKP*	NUMER SERII / NUMER FABRYCZNY
Autoklaw laboratoryjny			
Steryliizator na suche gorące powietrze			
Szafa z nawiewem laminarnym			
Densytometr			
Waga laboratoryjna			
System klimatyzacji wraz z czystymi pomieszczeniami			
Wytrząsarka laboratoryjna			
Lodówka			
Cieplarka (30-35°C)			
Cieplarka (20-25°C)			
Cieplarka (43-45°C)			
Wytrząsarka z łaźnią wodną			

\* APARATURA KONTROLNO-POMIAROWA

### 7. Zastosowane szczepy wzorcowe

NAZWA	NUMER KOLEKCJI	OZNACZENIE PASAŻU					
		Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Analiza 4	Analiza 5	Analiza 6
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538						
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027						
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739						
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231						
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404						

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 4 z 9

## 8. Badanie przydatności metod ilościowych

### 8.1. ANALIZA 1

**Preparat:** Nazwa preparatu/ postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 1

**Data wykonania analizy:**

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU WZORCOWEGO	KONTROLA UJEMNA (rozpuszczalnik bez produktu i zawiesiny szczepu)	KONTROLA DODATNIA (rozpuszczalnik bez produktu + zawiesina szczepu testowego)	PRÓBA WŁAŚCIWA (rozcieńczalnik z produktem + zawiesina szczepu)		X	X < 2 – brak zahamowania wzrostu TAK/NIE	KONTROLA PRODUKTU (rozcieńczalnik z produktem, bez zawiesiny szczepu)	KONTROLA REFERENCYJNA (kontrola gęstości zawiesiny szczepu)		ODZYSK (%)	> 50 % oraz < 200% TAK/NIE
			Zawartość substancji w próbce	WYNIK				rozc. 10 <sup>-5</sup>	rozc. 10 <sup>-6</sup>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10	72	1 g	41	1,8	TAK	<10	85	8	57	TAK
			0,1 g	57	1,3	TAK				79	TAK
			0,01 g	61	1,2	TAK				85	TAK
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		54	1 g	30	1,8	TAK		63	7	56	TAK
			0,1 g	37	1,5	TAK				69	TAK
			0,01 g	39	1,4	TAK				72	TAK
<i>Bacillus subtilis</i>		67	1 g	42	1,6	TAK		75	8	63	TAK
			0,1 g	45	1,5	TAK				67	TAK
			0,01 g	50	1,3	TAK				75	TAK
<i>Candida albicans</i>		42	1 g	35	1,2	TAK		51	4	83	TAK
			0,1 g	39	1,1	TAK				93	TAK
			0,01 g	40	1,1	TAK				95	TAK
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	35	1 g	27	1,3	TAK	44	3	77	TAK		
		0,1 g	30	1,2	TAK			86	TAK		
		0,01 g	32	1,1	TAK			91	TAK		

### 8.2. ANALIZA 2

**Preparat:** Nazwa preparatu /zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 2

**Data wykonania analizy:**

### 8.3. ANALIZA 3

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 3

**Data wykonania analizy:**

### 8.4. WARUNKI INKUBACJI

Bakterie – agar z hydrolizatem kazeiny i soi przez 3 dni w temp. 30-35°C, grzyby – agar Sabouraud z dekstrozą przez 5 dni w temp. 20-25°C

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 5 z 9

### 8.5. WNIOSKI

Badanie przydatności ilościowej metody badania czystości mikrobiologicznej PREPARATU X wykazało, że produkt ten nie powoduje działania hamującego wzrost drobnoustrojów, odzysk każdego z użytych szczepów wzorcowych z roztworu badanego produktu obliczony dla każdego z niezależnych powtórzeń w porównaniu z kontrolą jest większy niż 50%.

## 9. Badanie przydatności metod jakościowych

### 9.1. ANALIZA 4

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 1

**Data wykonania analizy:**

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU WZORCOWEGO	KONTROLA UJEMNA (podłoża bez produktu i zawiesiny szczepu)	KONTROLA DODATNIA (podłoża bez produktu + zawiesina szczepu testowego)	PRÓBA WŁAŚCIWA (podłoża z produktem + zawiesina szczepu)	KONTROLA PRODUKTU (podłoża z produktem, bez zawiesiny szczepu)	KONTROLA REFERENCYJNA (kontrola gęstości zawiesiny szczepu)		WYNIK ZGODNY/NIEZGODNY
					rozc. 10 <sup>-5</sup>	rozc. 10 <sup>-6</sup>	
<i>Escherichia coli</i>	brak wzrostu	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)	brak wzrostu	44	5	ZGODNY

### 9.2. ANALIZA 5

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 2

**Data wykonania analizy:**

### 9.3. ANALIZA 6

**Preparat:** Nazwa preparatu/zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 3

**Data wykonania analizy:**

### 9.4. WARUNKI INKUBACJI

<i>Escherichia coli</i>	Bulion z hydrolizatem kazeiny i soi - inkubacja 24 h w temperaturze 30 <sup>o</sup> – 35 <sup>o</sup> C	Bulion Mac Conkey'a inkubacja 24 h w temperaturze 43 <sup>o</sup> – 45 <sup>o</sup> C	Agar Mac Conkey'a inkubacja 24 h w temperaturze 30 <sup>o</sup> – 35 <sup>o</sup> C
-------------------------	---	---	---

### 9.5. WNIOSKI

Badanie przydatności jakościowej metody badania czystości mikrobiologicznej PREPARATU X wykazało, że produkt ten nie powoduje działania hamującego wzrostu drobnoustrojów.

Z zaszczepionych podłoży płynnych wyizolowano szczep testowy na odpowiednich podłożach wybiórczych zarówno dla kontroli dodatniej jak i próby właściwej. Uzyskano zgodność wyglądu kolonii na podłożach oraz zgodność obrazu mikroskopowego pomiędzy próbą właściwą a kontrolą dodatnią.

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 6 z 9

## 10. Podsumowanie badania przydatności metod ilościowych i jakościowych

Przydatność metod badania czystości mikrobiologicznej metodą bezpośredniego posiewu PREPARATU X w postaci tabletek została przeprowadzona trzykrotnie na trzech różnych seriach preparatu.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż preparat nie wykazuje działania hamującego wzrostu drobnoustrojów, odzysk każdego z użytych szczepów wzorcowych z roztworu badanego produktu obliczony dla każdego z niezależnych powtórzeń w porównaniu z kontrolą jest większy niż 50%.

W trakcie badania przydatności metod jakościowych z zaszczepionych podłoży płynnych wyizolowano szczep testowy *Escherichia coli* na odpowiednich podłożach wybiórczych zarówno dla kontroli dodatniej jak i próby właściwej. Uzyskano zgodność wyglądu kolonii na podłożach oraz zgodność obrazu mikroskopowego pomiędzy próbą właściwą a kontrolą dodatnią.

Na podstawie powyższych wyników analizy przydatności metod ilościowych i jakościowych można uznać, że metoda bezpośredniego posiewu jest odpowiednia do rutynowej kontroli czystości mikrobiologicznej PREPARATU X w postaci tabletek o zawartości substancji czynnej (nazwa, ilość w 1 tabletkę).

## 11. Dane surowe

### 11.1. ANALIZA 1

Preparat: Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

Numer serii: seria 1

#### 11.1.1. KONTROLA UJEMNA (rozpuszczalnik bez produktu i zawiesiny szczepu)

Płytko nr 1	Płytko nr 2	Średnia
<10	<10	<10

#### 11.1.2. KONTROLA DODATNIA (rozpuszczalnik bez produktu + zawiesina szczepu wzorcowego)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	Płytko nr 1	Płytko nr 2	Średnia ilość cfu w 1 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	80	64	72
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61	47	54
<i>Bacillus subtilis</i>	73	61	67
<i>Candida albicans</i>	47	37	42
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	31	39	35

#### 11.1.3. PRÓBA WŁAŚCIWA (rozpuszczalnik z produktem + zawiesina szczepu)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	ZAWARTOŚĆ SUBSTANCJI W PRÓBCE								
	1 g			0,1 g			0,01 g		
	Płytko nr 1	Płytko nr 2	Średnia	Płytko nr 1	Płytko nr 2	Średnia	Płytko nr 1	Płytko nr 2	Średnia
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	47	41	61	53	57	69	53	61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	35	30	35	39	37	41	37	39
<i>Bacillus subtilis</i>	45	39	42	53	37	45	45	55	50
<i>Candida albicans</i>	33	37	35	44	34	39	33	47	40
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	31	23	27	31	29	30	35	29	32

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 7 z 9



#### 11.1.4. KONTROLA PRODUKTU (rozpuszczalnik z produktem bez zawiesiny szczepu)

ZAWARTOŚĆ SUBSTANCJI W PRÓBCE									WYNIK
1 g			0,1 g			0,01 g			
Płytką nr 1	Płytką nr 2	Średnia	Płytką nr 1	Płytką nr 2	Średnia	Płytką nr 1	Płytką nr 2	Średnia	
<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

#### 11.1.5. KONTROLA REFERENCYJNA (kontrola gęstości zawiesiny szczepu)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	ROZCIĘCZENIE					
	10 <sup>-5</sup>			10 <sup>-6</sup>		
	Płytką nr 1	Płytką nr 2	Średnia	Płytką nr 1	Płytką nr 2	Średnia
<i>Staphylococcus aureus</i>	93	77	85	9	7	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71	55	63	5	9	7
<i>Bacillus subtilis</i>	82	68	75	8	8	8
<i>Candida albicans</i>	55	47	51	3	5	4
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	39	49	44	2	4	3

#### 11.2. ANALIZA 2

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 2

#### 11.3. ANALIZA 3

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 3

#### 11.4. ANALIZA 4

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 1

#### 11.4.1. KONTROLA UJEMNA (podłoża bez produktu i zawiesiny szczepu)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	PODŁOŻE	OCENA		WYNIK
		PRÓBA nr 1	PRÓBA nr 2	
<i>Escherichia coli</i>	Agar Mac Conkey'a	Brak wzrostu	Brak wzrostu	Brak wzrostu

#### 11.4.2. KONTROLA DODATNIA (podłoża bez produktu + zawiesina szczepu wzorcowego)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	PODŁOŻE	OCENA		WYNIK
		PRÓBA nr 1	PRÓBA nr 2	
<i>Escherichia coli</i>	Agar Mac Conkey'a	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)

Nazwa preparatu, zawartość substancji czynnej

Strona 8 z 9

#### 11.4.3. PRÓBA WŁAŚCIWA (podłoża z produktem + zawiesina szczepu)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	PODŁOŻE	OCENA		WYNIK
		PRÓBA nr 1	PRÓBA nr 2	
<i>Escherichia coli</i>	Agar Mac Conkey'a	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)	Ocena makroskopowa – na agarze Mac Conkey'a różowe kolonie otoczone czerwoną strefą Ocena mikroskopowa – PG (-)

#### 11.4.4. KONTROLA PRODUKTU (podłoża z produktem bez zawiesiny szczepu)

PODŁOŻE	OCENA		WYNIK
	PRÓBA nr 1	PRÓBA nr 2	
Agar Mac Conkey'a	Brak wzrostu	Brak wzrostu	Brak wzrostu

#### 11.4.5. KONTROLA REFERENCYJNA (kontrola gęstości zawiesiny szczepu)

ZAWIESINA DROBNOUSTROJU TESTOWEGO	ROZCIĘCZENIE					
	10 <sup>-5</sup>			10 <sup>-6</sup>		
	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Średnia	Płytki nr 1	Płytki nr 2	Średnia
<i>Escherichia coli</i>	39	49	44	6	4	5

#### 11.5. ANALIZA 5

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 2

#### 11.6. ANALIZA 6

**Preparat:** Nazwa preparatu /postać, zawartość substancji czynnej/

**Numer serii:** seria 3

**RAPORT BADANIA PRZYDATNOŚCI FARMAKOPEALNEJ METODY  
BADANIA CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ**

**PREPARAT:**                    **Nazwa preparatu – postać, zawartość substancji czynnej**

**PRODUCENT:**                **Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne – Nazwa firmy**

**DATA SPORZĄDZENIA RAPORTU:**

## 1. Opis preparatu

**PREPARAT:** Nazwa preparatu – postać, zawartość substancji czynnej

**NUMER SERII:** seria 1, seria 2, seria 3

**WYTWÓRCA:** Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne - Nazwa

**SUBSTANCJA CZYNNNA / SKŁAD:**

Nazwa substancji czynnej

**FORMA (wymagania czystości mikrobiologicznej wg farmakopei):**

FP X – preparat doustny niezawierający wody

**BADANIE WYKONANO METODĄ:**

Bezpośredniego posiewu

## 2. Podsumowanie badania przydatności metod ilościowych i jakościowych

Przydatność metod badania czystości mikrobiologicznej metodą bezpośredniego posiewu PREPARATU X w postaci tabletek została przeprowadzona trzykrotnie na trzech różnych seriach preparatu.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż preparat nie wykazuje działania hamującego wzrostu drobnoustrojów. Odzysk każdego z użytych szczepów wzorcowych z roztworu badanego produktu obliczony dla każdego z niezależnych powtórzeń w porównaniu z kontrolą jest większy niż 50%.

W trakcie badania przydatności metod jakościowych z zaszczepionych podłoży płynnych wyizolowano szczep testowy *Escherichia coli* na odpowiednich podłożach wybiórczych zarówno dla kontroli dodatniej jak i próby właściwej. Uzyskano zgodność wyglądu kolonii na podłożach oraz zgodność obrazu mikroskopowego pomiędzy próbą właściwą a kontrolą dodatnią.

Na podstawie powyższych wyników analizy przydatności metod ilościowych i jakościowych można uznać, że metoda bezpośredniego posiewu jest odpowiednia do rutynowej kontroli czystości mikrobiologicznej PREPARATU X w postaci tabletek o zawartości substancji czynnej (nazwa, ilość w 1 tabletcie).

## 3. Osoby odpowiedzialne za przeprowadzenie badania przydatności farmakopealnej metody badania czystości mikrobiologicznej

- Za przygotowanie protokołu (imię i nazwisko, podpis) .....
- Za sprawdzenie protokołu (imię i nazwisko, podpis) .....
- Za zatwierdzenie protokołu (imię i nazwisko, podpis) .....