

Groth Promotion Test

- Kontrola jakości podłoży do badania czystości mikrobiologicznej produktów kosmetycznych i farmaceutycznych

Ocena działania podłoży hodowlanych stosowanych w badaniach biologicznych, jest jednym z ważniejszych elementów wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości w laboratorium. Pozwala potwierdzić przydatność podłoży stosowanych w metodach do wykrywania i oznaczania liczby drobnoustrojów w produktach. Zasady przeprowadzania kontroli żywności podłoży (GPT) opisane są w Farmakopea w rozdziale 2.6.12. oraz 2.6.13. Badanie powinno być wykonywane dla każdej nowej serii podłoża gotowego, podłoża przygotowywanego z produktu suchego, podłoża komponowanego z pojedynczych składników.

Dorota Merlak, Marcin Achciński
Argenta Sp. z o.o. Sp. k.



Aby wykonać badanie niezbędnym jest posiadanie przez laboratorium prawidłowo dobranych, oraz właściwie przechowywanych i przygotowywanych szczepów testowych.

Podstawowe zasady postępowania można zebrać w kilku punktach:

- Podłoże powinno być badane za pomocą szczepów wymienionych w Farmakopea.
- Mikroorganizmy powinny pochodzić z Referencyjnych Kolekcji, nie więcej niż z piątego pasażu uzyskanego z hodowli referencyjnej (również zwanej oryginalną serią siewną).
- Porcja podłoża sprawdzanej serii musi być zaszczerpiona małą liczbą komórek mikroorganizmów.
- Dla każdego szczepu stosowana jest osobna porcja sprawdzanego podłoża.
- Badanie wykonuje się w 2 powtórzeniach.
- Nową serię podłoża można uznać za dopuszczoną do stosowania, gdy wzrost na podłożu nowej serii jest porównywalny do wzrostu uzyskanego w serii poprzednio zaaprobowanej przez laboratorium.

Badanie zdolności wzrostowych podłoży (GPT), różni się nieznacznie w zależności od celu ich stosowania. Poniżej zamieszczono skrócony opis zasad przeprowadzania GPT dla poszczególnych metod badawczych. W celu uzyskania szczegółowego opisu metody należy odnieść się do odpowiedniego rozdziału Farmakopea.

GPT dla podłoży stosowanych w Badaniu Czystości Mikrobiologicznej Produktów Niejałowych – Badania ilościowe

Podłoża stosowane w badaniach ilościowych to Agar z hydrolizatem kazeiny i soi (TSA), Agar Sabouraud z dekstrozą (SDA) oraz Bulion z hydrolizatem kazeiny i soi (TSB).

Celem badania jest uzyskanie potwierdzenia cech odżywczych podłoża z nowej serii, poprzez sprawdzenie wzrostu małej liczby mikroorganizmów.

Szczepy testowe niezbędne do badania to *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 lub odpowiadające im mikroorganizmy pochodzące z innych uznanych kolekcji NCIMB, CIP, NBRC (dla bakterii) i NCPF, IPI, NCPF (dla Candida) oraz IMI,IP, NBRC (dla pleśni).

Do przygotowania zawiesiny roboczej szczepów testowych stosuje się świeżo uzyskane hodowle oraz rozcieńczalnik taki jak zbuforowany roztwór chlorku sodu z peptonem o pH 7,0 lub bufor fosforanowy o pH 7,2 z dodatkiem 0,05% polisorbatu 80 dla zawiesiny spor *Aspergillus brasiliensis*. Czas przechowywania zawiesiny testowej w temp 2-8°C powinien być zwalidowany.

Dla każdej serii badanej, kontrolę ujemną stanowi nieposiana płytka nowej serii oraz płytka posiana samym rozcieńczalnikiem inokulum, co pozwala stwierdzić, że stosowane odczynniki są sterylne.

Porcje/płytki badanego podłoża nowej serii i serii uprzednio zatwierdzonej zaszczerpane są osobno dla każdego szczepu inokulum testowym o gęstości nie większej niż 100jtk. W przypadku badania bulionu dodatkowo, inokulum posiewane jest na dwie płytki z agarem nieselektywnym uprzednio zatwierdzonej serii, co pozwala na określenie jego dokładnej gęstości.

Warunki inkubacji podaje Farmakopea w tabeli 2.6.12-1. Podłoża TSA i TSB inkubuje się w temperaturze 30 - 35 °C, w czasie do 3 dni dla bakterii, natomiast do 5 dni w przypadku grzybów.

Podłoża SDA inkubuje się w temperaturze 20-25 °C w czasie do 5 dni. Kontrole ujemne powinny być inkubowane w tych

samych warunkach co podłoża zaszczerpane i nie powinny wykazywać wzrostu. Jeśli kontrolą ujemną jest podłoże w postaci bulionu, to brak wzrostu powinien być potwierdzony posiewem na agarze nieselektywnym.

Kryteria akceptacji

Dla podłoży stałych, uzyskany wzrost nie może być większy niż 100 jtk na porcję pożywki. Średnia liczba komórek uzyskana na podłożach nowej serii nie może być więcej niż 2 razy mniejsza/większa niż średnia liczba wyrosłych drobnoustrojów na serii uprzednio zatwierdzonej (tzw. faktor 2).

Dla podłoży bulionowych wizualnie porównywany jest wzrost nowej serii i zaaprobowanej, a kryteria akceptacji to: podobne zmętnienie w probówkach obu serii oraz wzrost poniżej 100jtk na podłożu agarowym posianym inokulum testowym. Farmakopea nie definiuje precyzyjnie określenia „podobny”, zatem przyjmuje się, że porównanie wizualne jest wystarczające.

GPT dla podłoży stosowanych w Badaniu Czystości Mikrobiologicznej Produktów Niejałowych – Badanie obecności określonych drobnoustrojów

Celem badania jest sprawdzenie, poprzez posiew małej liczby mikroorganizmów, czy podłoża nowej serii działają prawidłowo pod kątem żywności, właściwości wybiórczych i różnicujących.

Do badania żywności i oceny specyficzności (właściwości różnicujących) podłoży stałych i bulionów stosuje się inokulum o gęstości $\leq 100jtk$, do określenia właściwości wybiórczych gęstość inokulum wynosi minimum 100jtk.

Stosowane są szczepy: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC8739, *Salmonella enterica subsp. enterica* serowar Typhimurium ATCC14028 lub Abony NTCC 6017 *Candida albicans* ATCC 10231, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 lub odpowiadające im szczepy z innych kolekcji referencyjnych. Dobór szczepów zależy od przeznaczenia podłoża i obejmuje szczep dodatni lub szczep dodatni oraz ujemny dla podłoży różnicująco-selektywnych.

Do przygotowania zawiesiny roboczej szczepów testowych stosuje się świeżo uzyskane hodowle oraz rozcieńczalniki takie jak zbuforowany roztwór chlorku sodu z peptonem o pH 7,0 lub bufor fosforanowy o pH 7,2. Gotowe inokulum może być przechowywane do 24 godzin w temperaturze 2-8°C. W przypadku *Clostridium sporogenes* może być stosowana zawiesina spor przechowywana przez zwalidowany okres czasu. Dla każdej serii badanej, kontrolę ujemną stanowi nieposiana płytka nowej serii oraz płytka posiana samym rozcieńczalnikiem inokulum, co pozwala stwierdzić, że stosowane odczynniki są sterylne. Kontrole ujemne inkubuje się w tych samych warunkach co próbki właściwe. Podobnie jak w badaniach ilościowych w przypadku braku wzrostu ujemnej kontroli bulionowej, wynik powinien

reklama



NAJBOGATSZA KOLEKCJA GOTOWYCH DO UŻYCIA PREPARATÓW SZCZEPÓW KONTROLNYCH

Proste przygotowanie, wiarygodne wyniki

- Kontrola jakości podłoży
- Badanie skuteczności konserwacji
- Kontrola i walidacja metod mikrobiologicznych
- Szkolenia i podnoszenie kwalifikacji personelu



My rozwijamy Mikrobiologów

ARGENTA
profesjonalna mikrobiologia

kosmetyków

Argenta
Spółka z ograniczoną odpowiedzialnością Sp. k.
ul. Polska 114, 60-401 Poznań

tel. +48 61 / 847 46 37, 848 30 58, 843 26 19
fax. +48 61 / 848 34 77, 843 26 20
www.argenta.com.pl, email: argenta@argenta.com.pl

TOP 10
10 ważnych zasad prawidłowego wykonania badania GPT

Wykonanie badań kontrolnych podłoży samo w sobie nie jest bardzo skomplikowane, jednak może dawać błędne wyniki gdy laboratorium nie dotrzymuje zasad w najważniejszych punktach procedury:

- 1. Badanie prowadzimy równolegle.** Gęstość stosowanego inokulum określamy zawsze poprzez jego posiew na podłożu nieselektywnym z uprzednio uznanej partii. Badanie wykonujemy w dwóch lub nawet w trzech powtórzeniach. Badanie prowadzimy równolegle dla nowej i uprzednio zatwierdzonej serii, co eliminuje wszystkie zmienne oprócz podłoża.
- 2. Jeśli jest to konieczne podajemy ilość inokulum** tak, aby zapewnić odpowiednią liczbę kolonii na porcję podłoża. Np. zamiast 0,1ml możemy posiać 0,2ml zawiesiny drobnoustrojów. Wynika to z nieznacznego hamującego właściwości podłoża hamującego-różnicującego również w stosunku do mikroorganizmu docelowego. Aby stwierdzić czy inokulum powinno być podwojone, podłoża hamującego-różnicującego można badać równolegle z podłożem nieselektywnym np. TSA. Jeśli stwierdzimy brak wzros-

tu kolonii na podłożu selektywnym i mniej niż 50 kolonii na TSA, inokulum może zostać podwojone. Nie musimy obawiać się o uzyskanie współczynnika 2, gdy przeprowadzamy GPT dla podłoży różnicujące –selektywnych, ponieważ Farmakopea mówi tylko o porównywalnych wynikach. Cetrymid agar jest bardzo hamujący, dobrze jest więc stosować do jego kontroli świeżo uzyskaną hodowlę z preparatu np. KWIK-STIK™ PLUS, który pochodzi z 2 pa-saży od macierzystej serii siewnej.

3. Jako kontrolę dla podłoży bulionowych stosujemy agar nieselektywny. Oceniając nową serię podłoża płynnego badamy równolegle: nową serię i serię uprzednio uznaną oraz agar nieselektywny. Agar nieselektywny niezbędny jest do określenia gęstości inokulum.

4. Używamy systematycznie kalibrowanych pipet.

5. Preparaty ogrzewamy. Jeśli korzystamy z ilościowych preparatów szczepów testowych, przed ich użyciem zawsze doprowadzamy tabletkę liofilizatu do temperatury pokojowej przed wyjęciem jej z folki. Zajmuje to około 30 minut. Gdy używamy np. zestawów EZ-Accu Shot nie otwieramy opakowania pojedynczego zestawu przed ogrzaniem, ponieważ powoduje to kondensację wody w folce.

6. Do uwadniania liofilizatów szczepów testowych stosujemy odpowiednie płyny uwadnia-

jące. *Pseudomonas aeruginosa* wymaga innego płynu niż pozostałe mikroorganizmy.

7. Mieszymy, mieszamy i jeszcze raz mieszamy. Mieszanie jest najważniejsze dla uzyskania homogenego inokulum.

8. Zawsze stosujemy właściwe dla danego szczepu warunki hodowli

Pseudomonas aeruginosa i *Bacillus cereus* do wzrostu potrzebują tlenu. Przy ich hodowli w bulionach, pozostawiamy wolną przestrzeń nad słupkiem podłoża i lekko odkręcamy korek probówki. Przy hodowli *Clostridium sporogenes* zawsze stosujemy wskaźnik warunków beztlenowych. Sprawdzamy temperaturę w cieplarkach dwa razy w ciągu dnia. Sprawdzamy cieplarki i kalibrujemy termometry zgodnie z programem nadzoru nad wyposażeniem.

9. Odpowiednio ogrzewamy podłoża przy metodach zalewowych. Podłoże może być przetrzymywane w łaźni wodnej po upłynięciu, nie dłużej niż 3 godziny. Wysterylizowany, zestalony agar może być upłyniony tylko raz.

10. Dokładamy wszelkich starań, aby zapewnić wykrywanie wszystkich mikroorganizmów w naszym produkcie. Niektóre mikroorganizmy mogą występować w produkcji, tzw. *objectionable organisms*, nie są ujęte w Farmakopea i mogą wymagać specjalnych podłoży. Do kontroli podłoży mogą zostać wykorzystane własne izolaty.

być potwierdzony poprzez posiew na nieselektywnie podłożu agarowe. Ponieważ badanie żywności i właściwości hamujących wykonywane są w tym samym czasie, kontrola ujemna może być wspólna dla obu kierunków kontroli.

Procedura opiera się na tych samych zasadach co kontrola podłoży do badań ilościowych:

równolegle bada się nową serię i uprzednio zatwierdzone. Podłoża posiewa się w dwóch powtórzeniach dla każdego szczepu osobno. Jeśli podłoże jest płynne lub hamujące- różnicujące, jednocześnie tą samą zawiesiną szczepu posiewa się dwie płytki z agarem nieselektywnym, co pozwala na dokładne określenie gęstości stosowanego inokulum.

Warunki inkubacji powinny być takie same jak w badaniu właściwym dla określonego kierunku.

Kryteria akceptacji dla badania żywności podłoży hamująco-różnicujących oraz cech identyfikacyjnych

Dla podłoży stałych, uzyskany wzrost nie może być większy niż 100 jtk na porcję żywności. Średnia liczba komórek uzyskana na podłożach nowej serii powinna być porównywalna do liczby dla serii uprzednio zatwierdzonej. Przyjmuje się, że wystarczające jest uzyskanie 50% lub 70% liczby kolonii.

Dla podłoży bulionowych wizualnie porównywany jest wzrost nowej serii i uznanej, a kryteria akceptacji to: podobne zmętnienie w probówkach obu serii oraz wzrost poniżej 100 jtk na nieselektywnym podłożu agarowym posianym inokulum testowym.

Przy okazji badania żywności można wykonać również ocenę właściwości identyfikacyjnych podłoża porównując morfologię kolonii/wygląd bulionu nowej i uprzednio zatwierdzonej serii

oraz wykonując badania identyfikacyjne. Wygląd, morfologia kolonii i badania identyfikacyjne powinny dać podobne wyniki.

Kryteria akceptacji dla badania właściwości hamujących podłoży stałych i bulionów

Mikroorganizmy powinny być w tym samym stopniu zahamowane na płytkach (lub w probówkach) nowej i uprzednio uznanej serii podłoża hamującego. Na kontrolnym podłożu nieselektywnym powinno się uzyskać wynik minimum 100 kolonii.

Gotowe preparaty szczepów testowych do badań GPT

Producenci komercyjni preparatów szczepów testowych, tacy jak np. Microbiologics® oferują gotowe produkty specjalnie przeznaczone do badań GPT. Po przygotowaniu preparatu zgodnie z instrukcją, zapewniają one od 10 do 100 jtk w 0,1ml gotowej zawiesiny. W zależności od rodzaju preparatu w zestawie znajduje się folka z tabletką liofilizowanego szczepu testowego i folka z płynem do przygotowania porcji inokulum lub zbiorcze opakowanie dla tabletek i porcji płynu uwadniającego.

Przykładowe ilościowe produkty przeznaczone do GPT zestawione są w tabeli 1.

Tab. 1.
Preparaty ilościowe na przykładzie firmy Microbiologics

	EZ-Accu Shot™ Select	EZ-Accu Shot™	EZ-CFU™ One Step	EZ-CFU™
Szczepy	5 szczepów w zestawie	Wybór z 19 szczepów	Wybór z 35 szczepów	Wybór z 29 szczepów
Liczba oznaczeń	10 badań dla każdego szczepu z folki	10 z folki 50 z opakowania	19 z folki • 190 z opakowania	90+ z folki 900+ z opakowania
Liofilizowany szczep w tabletkach	1 tabletkę daje 10-100 jtk / 0.1 ml	1 tabletkę daje 10-100 jtk / 0.1 ml	2 tabletki dają 10-100 jtk / 0.1 ml	2 tabletki dają 10-100 jtk / 0.1 ml
Ożywianie	Bez inkubacji	Bez inkubacji	30min inkubacji przed posianiem	30min inkubacji przed posianiem
Rozcieńczanie	Bez rozcieńczania	Bez rozcieńczania	Bez rozcieńczania	Jedno rozcieńczenie dziesiętne
Stabilność inokulum	8 godzin	8 godzin	8 godzin	30 minut

Laboratorium mikrobiologiczne**BIO-CHIC****Certyfikat akredytacji AB 745**

AB 745



Laboratorium Mikrobiologiczne posiadające certyfikat GMP wydany przez GIF. Specjalizujące się w badaniach czystości mikrobiologicznej niejałowych produktów leczniczych, kosmetyków, suplementów diety, surowców, opakowań, wody oczyszczonej. Lider w badaniach czystości mikrobiologicznej środowiska w zakładach farmaceutycznych i kosmetycznych oraz innych o podwyższonych standardach higieny. Laboratorium wykraczające ponad obowiązujące standardy, dążące do doskonałości, zapewniające indywidualne podejście do Klienta i jego oczekiwań. Oferujące wysoko kwalifikowaną kadrę mikrobiologów otwartych na nowe pomysły i inspiracje, gwarantującą usługi na najwyższym poziomie.

KONTAKT:

BIO-CHIC Sp. z o.o.
ul. Chłodna 56/60
00-872 Warszawa
tel.: biuro 22 654 15 89, laboratorium 22 654 64 76
e-mail: biuro@bio-chic.pl, mikrobiologia@bio-chic.pl
www.bio-chic.pl



reklama