

Metodický pokyn č. 126/2009

RD 06

MIKROBIOLOGICKÉ HODNOTENIE NESTERILNÝCH LIEKOV A LÁTOK NA FARMACEUTICKÉ POUŽITIE

Microbiological evaluation non-sterile drugs and substances for pharmaceutical use

1. vydanie

<i>Vypracoval</i>	<i>Overil</i>	<i>Schválil</i>
Meno: Mgr. Tatiana Brázdilová Mgr. Viera Astalošová PharmDr. Vilma Šulavíková KL 4 Žilina	Meno: PharmDr. Katarína Kišoňová ved. OSLeKP	Meno: PharmDr. Ivana Šidlíková manažment riadenia kvality
Dátum: 20. 10. 2009 Podpis:	Dátum: 21. 12. 2009 Podpis:	Dátum: 12. 01. 2010 Podpis:

Účinnosť od: 15. 01. 2010

Štátny ústav pre kontrolu liečiv	MP č. 126/2009	Strana 6/8 Počet príloh 5 Vydanie 1 Platí od 15.01.2010
Kapitola č.: 3 SKÚŠANIE NESTERILNÝCH PRODUKTOV		

3 SKÚŠANIE NESTERILNÝCH PRODUKTOV

Skúšanie nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie sa vykonáva podľa požiadaviek uvedených v platnom Európskom liekopise.

Tieto skúšky sú zamerané predovšetkým na zistenie, či látka alebo produkt vyhovuje stanovenej špecifikácii pre mikrobiologickú kvalitu.

3.1 Skúšky na stanovenie počtu mikroorganizmov

Skúšanie a hodnotenie nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie z hľadiska počtu mikroorganizmov sa vykonáva podľa požiadaviek uvedených v aktuálnom vydaní *Ph. Eur. čl. 2.6.12 Mikrobiologické hodnotenie nesterilných produktov: Skúšky na stanovenie mikróbov.* (viď príloha č. 3)

Skúšky umožňujú kvantitatívne stanovenie mezofilných baktérií a húb v aeróbnych podmienkach.

Skúšobné metódy:

- membránová filtrácia
- platňové metódy (metóda zalievania, metóda povrchového rozotierania)
- metóda najpravdepodobnejšieho počtu
- iné validované metódy

Výber vhodnej skúšobnej metódy určujú rôzne faktory, najmä povaha produktu a požadovaný limit mikroorganizmov.

3.2 Dôkaz špecifických mikroorganizmov

Skúšanie a hodnotenie nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie z hľadiska prítomnosti špecifických mikroorganizmov sa vykonáva podľa požiadaviek uvedených v aktuálnom vydaní *Ph. Eur. čl. 2.6.13 Mikrobiologické hodnotenie nesterilných produktov: Dôkaz špecifických mikroorganizmov a osobitného ustanovenia pre rastlinné lieky uvedeného v doplnku Ph. Eur..* (viď príloha č. 4)

Kvalitatívnymi a kvantitatívnymi skúškami sa zisťuje neprítomnosť alebo obmedzený výskyt špecifických mikroorganizmov.

3.3 Hodnotenie mikrobiologickej kvality

Hodnotenie nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie z hľadiska špecifikácie pre mikrobiologickú kvalitu sa vykonáva podľa požiadaviek uvedených v aktuálnom vydaní *Ph. Eur. čl. 5.1.4 Mikrobiologická kvalita nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie.* (viď príloha č. 5)

Kritériá prijateľnosti pre nesterilné farmaceutické produkty založené na celkovom počte aeróbnych mikróbov (TAMC) a celkovom počte húb (TYMC) sú uvedené v tabuľkách (viď prílohy č. 1, 2). Zoznam špecifických mikroorganizmov uvedený v tabuľke (viď príloha č. 1) je otvorený, môže byť potrebné vykonať skúšky aj na iné ako uvedené mikroorganizmy podľa povahy skúšaného produktu. Kritériá sú založené na individuálnych alebo, v prípade opakovaných skúšok, priemerných výsledkoch.

Štátny ústav pre kontrolu liečiv	MP č. 126/2009	Strana 8/8 Počet príloh 5 Vydanie 1 Platí od 15.01.2010
Kapitola č.: 4, 5 ZÁVEREČNÉ USTANOVENIA, PRÍLOHY		

4 ZÁVEREČNÉ USTANOVENIA

Tento MP nadobúda účinnosť dňom 15. 01. 2010.
 Kontrolu dodržiavania a výklad tohto MP vykonáva manažment riadenia kvality.

5 PRÍLOHY

- č. 1 Tabuľka 1.: *Kritériá prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu nesterilných liekových foriem*
- č. 2 Tabuľka 2.: *Kritériá prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu nesterilných látok na farmaceutické použitie*
- č. 3 Článok Ph. Eur.: *2.6.12 Mikrobiologické hodnotenie nesterilných produktov: Skúšky na stanovenie mikróbov.*
- č. 4 Článok Ph. Eur.: *2.6.13 Mikrobiologické hodnotenie nesterilných produktov: Dôkaz špecifických mikroorganizmov a osobitné ustanovenie pre rastlinné lieky uvedené v doplnku PhEur.*
- č. 5 Článok Ph. Eur.: *5.1.4 Mikrobiologická kvalita nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie.*

Príloha č. 1

Tabuľka 1.

Kritériá prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu nesterilných liekových foriem

Miesto aplikácie	TAMC (CFU/g alebo CFU/ml)	TYMC (CFU/g alebo CFU/ml)	Špecifické mikroorganizmy
Lieky bez obsahu vody na perorálne použitie	10^3	10^2	Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml)
Lieky s obsahom vody na perorálne použitie	10^2	10^1	Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml)
Rektálne použitie	10^3	10^2	
Orálne použitie Gingiválne použitie Dermálne použitie Nazálne použitie Podanie do ucha	10^2	10^1	Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g alebo 1 ml)
Vaginálne použitie	10^2	10^1	Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Candida albicans</i> (1 g alebo 1 ml)
Transdermálne náplasti (limity pre jednu náplasť vrátane príľnavej vrstvy a ochrannej fólie)	10^2	10^1	Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 náplasť) Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 náplasť)
Inhalačné použitie (zvláštne požiadavky sa vzťahujú na kvapalné lieky na rozprašovanie)	10^2	10^1	Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť gramnegatívnych žltotolerujúcich baktérií (1 g alebo 1 ml)
Osobitné ustanovenia Ph. Eur. pre perorálne liekové formy s obsahom látok prírodného pôvodu (živočíšneho, rastlinného, minerálneho), ktorých antimikrobiálna úprava nie je technicky možná a pre ktoré kompetentná autorita povolí TAMC v pôvodnom materiáli nad 10^3 CFU na gram alebo mililiter	10^4	10^2	Najviac 10^2 CFU žltotolerujúcich gramnegatívnych baktérií (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Salmonella</i> (10 g alebo 10 ml) Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml)
Osobitné ustanovenia Ph. Eur. pre rastlinné lieky s obsahom jednej alebo viacerých rastlinných drog (celých, rozdrobených alebo práškovaných): – rastlinné lieky, ktoré sa pred použitím zalievajú vriacou vodou – rastlinné lieky, ktoré sa pred použitím nezalievajú vriacou vodou	10^7 10^5	10^5 10^4	Najviac 10^2 CFU <i>Escherichia coli</i> (pozri Dodatok) (1 g alebo 1 ml) Najviac 10^3 CFU žltotolerujúcich gramnegatívnych baktérií (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Salmonella</i> (10 g alebo 10 ml)

Príloha č. 2
Tabuľka 2.

Kritériá prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu nesterilných látok na farmaceutické použitie

	TAMC (CFU/g alebo CFU/ml)	TYMC (CFU/g alebo CFU/ml)
Látky na farmaceutické použitie	10^3	10^2

**2.6.12. MIKROBIOLOGICKÉ HODNOTENIE NESTERILNÝCH PRODUKTOV:
SKÚŠKY NA STANOVENIE POČTU MIKRÓBOV****1. ÚVOD**

Skúšky opísané ďalej umožňujú kvantitatívne stanovenie mezofilných baktérií a húb, ktoré rastú v aeróbných podmienkach.

Tieto skúšky sú zamerané predovšetkým na zistenie, či látka alebo produkt vyhovuje stanovenej špecifikácii pre mikrobiologickú kvalitu. Ak sa použijú na tieto účely, treba sledovať ďalej uvedené pokyny, vrátane počtu vzoriek, ktoré sa majú odobrať, a vyhodnotenia výsledkov, ako je uvedené ďalej.

Metódy sa nevzťahujú na produkty, ktoré obsahujú živé mikroorganizmy ako účinné zložky.

Alternatívne mikrobiologické postupy, vrátane automatizovaných metód, sa môžu použiť za predpokladu, že bola preukázaná ich zhoda s liekopisnou metódou.

2. VŠEOBECNÉ POSTUPY

Stanovenie sa vykoná za podmienok navrhnutých tak, aby sa zabránilo vonkajšej mikrobiálnej kontaminácii skúšaného produktu. Opatrenia na zamedzenie kontaminácie musia byť také, aby nezasiahli žiadne mikroorganizmy, ktorých výskyt sa má v skúške odhaliť.

Ak má skúšaný produkt antimikrobiálnu aktivitu, táto sa musí vylúčiť alebo neutralizovať podľa možnosti na najvyššiu mieru. Ak sa na tento účel použijú inaktívatory, musí sa dokázať ich účinnosť a neškodnosť pre mikroorganizmy.

Ak sa na prípravu vzorky použijú povrchovo aktívne látky, musí sa dokázať ich neškodnosť pre mikroorganizmy a ich kompatibilita s použitými inaktívatormi.

3. METÓDY POČÍTANIA

Použije sa metóda membránovej filtrácie alebo platňové metódy, podľa toho aká metóda je predpísaná. Metóda najpravdepodobnejšieho počtu (MPN) je všeobecne menej presná metóda na zistenie počtu mikróbov, avšak pre niektoré produkty s veľmi nízkou mikrobiálnou záťažou môže byť najvhodnejšou metódou.

Výber metódy určujú faktory, ako sú povaha produktu a požadovaný limit mikroorganizmov. Zvolená metóda musí umožniť skúšanie dostatočne veľkej vzorky, aby sa mohla posúdiť zhoda so špecifikáciou a je potrebné určiť vhodnosť zvolenej metódy.

4. SKÚŠKA RASTOVÝCH VLASTNOSTÍ, VHODNOSŤ PLATŇOVEJ METÓDY A NEGATÍVNA KONTROLA**4-1. VŠEOBECNÉ ÚVAHY**

Musí sa preukázať schopnosť skúšky detegovať mikroorganizmy za prítomnosti skúšaného produktu.

Vhodnosť sa musí potvrdiť pri každej zavedenej zmene skúšobného postupu alebo produktu, ktorá by mohla ovplyvniť výsledok skúšky.

4-2. PRÍPRAVA TESTOVACÍCH KMEŇOV

Použijú sa štandardizované stabilné suspenzie testovacích kmeňov alebo sa pripraví ďalej uvedeným postupom. Naočkované kultúry sa udržiavajú takým systémom kultivácie, aby živé mikroorganizmy použité na inokuláciu neboli viac ako 5-krát pasážované z pôvodného primárneho inokula. Každý bakteriálny a hubový testovací kmeň sa kultivuje oddelene podľa opisu v tabuľke 2.6.12.-1.

Na prípravu testovacích suspenzií sa použije tlmivý roztok chloridu sodného s peptónom s pH 7,0 alebo tlmivý fosforečnanový roztok s pH 7,2; na suspendovanie spór *A. niger* sa k tlmivému roztoku môže pridať 0,05 % polysorbátu 80. Suspenzie sa použijú do 2 h alebo 24 h, ak sa uchovávajú pri teplote 2 °C až 8 °C. Na prípravu a riedenie čerstvej suspenzie vegetatívnych buniek *A. niger* a *B. subtilis* sa pripraví stabilná suspenzia spór, z ktorej sa použije potrebný objem na inokuláciu. Stabilná suspenzia spór sa môže uchovávať pri teplote 2 °C až 8 °C počas doby platnosti.

4-3. NEGATÍVNA KONTROLA

Na overenie podmienok skúšania sa vykoná negatívna kontrola s použitím zvolenej riediacej kvapaliny namiesto skúšaného produktu. Nesmú vyrásť žiadne mikroorganizmy. Negatívna kontrola sa vykoná aj pri skúšaní produktov postupom opísaným v odseku 5. Nevyhovujúca negatívna kontrola vyžaduje ďalšie skúmanie.

4-4. KULTIVÁCIA NA ŽIVNÝCH PÔDACH

Skúša sa každá šarža hotovej živnej pôdy a každá šarža živnej pôdy pripravenej zo sušenej živnej pôdy alebo z predpísaných zložiek.

Skúmavky s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje a platne s agarom s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje sa naočkujú malým počtom (najviac 100 CFU) mikroorganizmov oddelene z každého druhu uvedených v tabuľke 2.6.12.-1. Platne so Sabouraudovým agarom s glukózou sa naočkujú malým počtom (najviac 100 CFU) mikroorganizmov oddelene z každého druhu uvedených v tabuľke 2.6.1.2.-1. Naočkované živné pôdy sa inkubujú v podmienkach opísaných v tabuľke 2.6.12.-1.

Získaný rast na pevných živných pôdach sa od vypočítanej hodnoty štandardizovaného inokula nesmie odlišovať faktorom nárastu väčším ako 2. Rast mikroorganizmov z čerstvo pripraveného inokula je porovnateľný s rastom získaným na vopred odskúšanej a povolenej šarži živnej pôdy. Kvapalné živné pôdy sú vhodné, ak sa v nich vyskytuje zreteľný rast mikroorganizmov porovnateľný s rastom získaným na vopred odskúšanej a povolenej šarži živnej pôdy.

4-5. VHODNOSŤ PLATŇOVEJ METÓDY ZA PRÍTOMNOSTI PRODUKTU

4-5-1. **Príprava vzorky.** Spôsob prípravy vzorky závisí od fyzikálnych vlastností skúšaného produktu. Ak sa žiadny z ďalej opísaných postupov nepreukáže ako vhodný, musí sa vyvinúť alternatívny postup.

Produkty rozpustné vo vode. Skúšaný produkt sa rozpustí alebo zriedi (zvyčajne sa pripraví riedenie 1 v 10) v tlmivom roztoku chloridu sodného s peptónom s pH 7,0, tlmivom fosforečnanovom roztoku s pH 7,2 alebo v enzymatickom hydrolyzáte kazeínu a sóje. Ak treba, hodnota pH sa upraví na 6 až 8. Ak sú potrebné ďalšie riedenia, pripraví sa s tou istou riediacou kvapalinou.

Nemastné vo vode nerozpustné produkty. Skúšaný produkt sa suspenduje (zvyčajne sa pripraví riedenie 1 v 10) v tlmivom roztoku chloridu sodného s peptónom s pH 7,0, tlmivom fosforečnanovom roztoku s pH 7,2 alebo v enzymatickom hydrolyzáte kazeínu a sóje. Na uľahčenie prípravy suspenzie slabozmáčateľných látok sa môže pridať povrchovo aktívna látka. Ak treba, hodnota pH sa upraví na 6 až 8. Ak sú potrebné ďalšie riedenia, pripraví sa s tou istou riediacou kvapalinou.

Mastné produkty. Skúšaný produkt sa rozpustí v izopropylmyristáte sterilizovanom filtráciou alebo sa zmieša s najmenším potrebným množstvom sterilného polysorbátu 80 alebo inej neinhibujúcej sterilnej povrchovo aktívnej látky, ak treba, na teplotu neprevyšujúcu 40 °C, alebo vo výnimočných prípadoch najviac na 45 °C. Zmes sa dôkladne mieša a ak treba, udržuje sa teplota vodného kúpeľa. Pridá sa potrebné množstvo vopred zahriatej zvolenej riediacej kvapaliny, aby vzniklo riedenie 1 v 10 pôvodného produktu. Zmes sa dôkladne mieša za udržiavania rovnakej teploty po najkratšiu potrebnú dobu do vzniku emulzie. Ďalšie série 10-násobných riedení sa môžu pripraviť s použitím zvolenej riediacej kvapaliny obsahujúcej vhodnú koncentráciu sterilného polysorbátu 80 alebo inej neinhibujúcej sterilnej povrchovo aktívnej látky.

Kvapaliny alebo tuhé látky vo forme aerosólu. Skúšaný produkt sa asepticky preniesie do zariadenia na membránovú filtráciu alebo do sterilnej nádoby na ďalšie vzorkovanie. Použije sa celý obsah alebo definovaný počet odmeraných dávok z každého skúšaného obalu.

Transdermálne náplasti. Z transdermálnych náplastí sa stiahne ochranný film a vložia sa do sterilných sklenených alebo plastových misiek priľnavou stranou nahor. Priľnavý povrch sa prikryje sterilným pórovitým materiálom, napr. sterilnou gázou, aby sa zabránilo vzájomnému zlepeniu náplastí a prenesú sa do vhodného objemu zvolenej riediacej kvapaliny obsahujúcej inaktívatory, napr. polysorbát 80 a (alebo) lecitín. Obsah sa najmenej 30 min silne pretrepáva.

4-5-2. Inokulácia a riedenie. Do vzorky pripravenej opísaným postupom (odsek 4-5-1) a do kontroly (bez skúšaného produktu) sa pridá dostatočný objem mikrobiálnej suspenzie, aby sa získalo inokulum najviac 100 CFU. Objem suspenzie inokula nemá prekročiť 1 % objemu zriedeného produktu.

Na dôkaz prijateľného pomnoženia mikrobov v produkte sa skúška musí vykonať so vzorkou pripravenou s najnižším možným faktorom riedenia. Ak to nie je z hľadiska antimikrobiálnej aktivity alebo pre slabú rozpustnosť produktu možné, musia sa vyvinúť ďalšie vhodné postupy. Ak sa nedá inak vyhnúť inhibícii rastu spôsobenej vzorkou, môže sa pred neutralizáciou, riedením alebo filtráciou pridať mikrobiálna suspenzia.

4-5-3. Neutralizácia/vylúčenie antimikrobiálnej aktivity. Počet mikroorganizmov pomnožených v pripravenej vzorke zriedenej postupom opísaným v odseku 4-5-2 a inkubovanej postupom opísaným v odseku 4-5-4 sa porovná s počtom pomnožených mikroorganizmov v kontrolnom prípravku.

Ak je rast inhibovaný (redukcia o faktor väčší ako 2), treba upraviť postup pre konkrétnu skúšku, aby sa zabezpečila platnosť výsledkov. Postup sa môže upraviť napríklad 1. zväčšením objemu riediacej kvapaliny alebo živnej pôdy, 2. prídavkom špecifických alebo bežných neutralizačných látok do riediacej kvapaliny, 3. membránovou filtráciou alebo 4. kombináciou týchto opatrení.

Neutralizačné látky. Neutralizačné látky sa môžu použiť na neutralizáciu aktivity antimikrobiálnych látok (tabuľka 2.6.12.-2). Môžu sa pridať k riediacej kvapaline alebo k živnej pôde najlepšie pred sterilizáciou. Ak sa použijú, ich účinnosť a neškodnosť pre mikroorganizmy sa musí dokázať kontrolnou skúškou s neutralizačnou látkou a bez produktu.

Tabuľka 2.6.12.-1. – Príprava a použitie testovacích mikroorganizmov

Mikroorganizmus	Príprava testovacieho kmeňa	Kultivácia na živných pôdach		Vhodnosť platňovej metódy za prítomnosti produktu	
		Celkový počet aeróbných mikróbov	Celkový počet kvasiniek a plesní	Celkový počet aeróbných mikróbov	Celkový počet kvasiniek a plesní
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje alebo enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje 30 °C až 35 °C 18 h až 24 h	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje a enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 3 dni		Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje /MPN enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 3 dni	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje alebo enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje 30 °C až 35 °C 18 h až 24 h	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje a enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 3 dni		Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje/MPN enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 3 dni	
<i>Bacillus subtilis</i> : ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje alebo enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje 30 °C až 35 °C 18 h až 24 h	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje a enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 3 dni		Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje/MPN enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 3 dni	
<i>Candida albicans</i> : ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Sabouraudov agar s glukózou alebo Sabouraudov bujón s glukózou 20 °C až 25 °C 2 až 3 dni	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 5 dní	Sabouraudov agar s glukózou ≤ 100 CFU 20 °C až 25 °C ≤ 5 dní	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 5 dní MPN: nepoužije sa	Sabouraudov agar s glukózou ≤ 100 CFU 20 °C až 25 °C ≤ 5 dní
<i>Aspergillus niger</i> : ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Sabouraudov agar s glukózou alebo zemiakový agar s glukózou 20 °C až 25 °C 5 až 7 dní alebo kým sa nedosiahne dobrá sporulácia	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 5 dní	Sabouraudov agar s glukózou ≤ 100 CFU 20 °C až 25 °C ≤ 5 dní	Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje ≤ 100 CFU 30 °C až 35 °C ≤ 5 dní MPN: nepoužije sa	Sabouraudov agar s glukózou ≤ 100 CFU 20 °C až 25 °C ≤ 5 dní

Tabuľka 2.6.12.-2. – Bežné neutralizačné látky pre interferujúce látky

Interferujúca látka	Potenciálna neutralizačná metóda
Glutaraldehyd, organické zlúčeniny ortuti	Hydrogensiričitan sodný (nátriumbisulfit)
Fenolové zlúčeniny, etanol, aldehydy, sorbát	Riedenie
Aldehydy	Glycín
Kvartérne amóniové zlúčeniny (QACs), parahydroxybenzoáty (parabeny), bis-biguanidy	Lecitín
QACs, jód, parabeny	Polysorbát
Organické zlúčeniny ortuti	Tioglykolát
Organické zlúčeniny ortuti, halogény, aldehydy	Tiosíran
EDTA (edetát)	Mg ²⁺ alebo Ca ²⁺ ióny

Ak sa nenájde žiadna vhodná neutralizačná metóda, dá sa predpokladať, že neschopnosť izolovať inokulovaný mikroorganizmus možno pripísať mikrobicídnej aktivite produktu. Táto informácia naznačuje, že produkt pravdepodobne nie je kontaminovaný daným druhom mikroorganizmu. Možné však je, že produkt inhibuje len niektoré mikroorganizmy špecifikované v tejto stati, ale neinhubuje tie, ktoré nie sú zaradené medzi testovacími kmeňmi alebo pre ktoré nie sú testovacie kmene reprezentatívne. Vtedy treba vykonať skúšku s najvyšším faktorom riedenia, ktoré je zlučiteľné s mikrobiálnym rastom a so špecifickým kritériom prijateľnosti.

4-5-4. Pomnoženie mikroorganizmu za prítomnosti produktu. Skúšky sa vykonávajú s každým uvedeným mikroorganizmom zvlášť. Spočítajú sa len pridané mikroorganizmy testovacích kmeňov.

4-5-4-1. Membránová filtrácia. Použijú sa membránové filtre s nominálnou veľkosťou pórov najviac 0,45 µm. Druh filtračného materiálu sa volí tak, aby zložky skúšanej vzorky neovplyvňovali účinnosť zachytávania baktérií. Na každý uvedený mikroorganizmus sa použije jeden membránový filter.

Vhodné množstvo vzorky pripravenej postupom opísaným v odsekoch 4-5-1 až 4-5-3 (najlepšie 1 g produktu alebo menej, ak sa očakáva veľký počet CFU) sa preniesie na membránový filter, ihneď sa prefiltruje a membránový filter sa premyje potrebným objemom riediacej kvapaliny.

Pre určenie celkového počtu aeróbnych mikróbov (TAMC) sa membránový filter preniesie na povrch agaru s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje. Pre určenie celkového počtu kvasiniek/plesní (TYMC) sa membránový filter preniesie na povrch Sabouraudovho agaru s glukózou. Platne sa inkubujú podľa údajov uvedených v tabuľke 2.6.12.-1. Vyrastené kolónie sa spočítajú.

4-5-4-2. Platňové metódy. Skúšky sa vykonávajú s dvojnásobným počtom každej živnej pôdy a použije sa priemerná hodnota výsledku.

4-5-4-2-1. Metóda zalievania.

Do každej Petriho misky s priemerom 9 cm sa pridá 1 ml vzorky pripravenej postupom opísaným v odsekoch 4-5-1 až 4-5-3 a 15-20 ml agaru s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje alebo Sabouraudovho agaru s glukózou. Teplota živných pôd nesmie byť vyššia ako 45 °C. Pri použití väčších Petriho misiek sa množstvo agarovej pôdy primerane zvýši. Pre každý mikroorganizmus uvedený v tabuľke 2.6.12.-1 sa použijú najmenej dve Petriho misky. Platne sa inkubujú podľa údajov uvedených v tabuľke 2.6.12.-1. Z každej živnej pôdy sa vypočíta aritmetický priemer počtu kolónií a stanoví sa počet CFU v pôvodnom inokule.

4-5-4-2-2. Metóda povrchového rozotierania.

Do každej Petriho misky s priemerom 9 cm sa pridá 15-20 ml agaru s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje alebo Sabouraudovho agaru s glukózou s teplotou asi 45 °C a nechajú sa stuhnúť. Pri použití väčších Petriho misiek sa množstvo agarovej pôdy primerane zvýši. Platne sa nechajú vysušiť v boxe s laminárnym prúdením vzduchu alebo v termostate. Pre každý mikroorganizmus uvedený v tabuľke 2.6.12.-1 sa použijú najmenej dve Petriho misky. Odmeraný objem najmenej 0,1 ml vzorky pripravenej postupom opísaným v odsekoch 4-5-1 až 4-5-3 sa rozotrie na povrchu živnej pôdy. Platne sa inkubujú a stanoví sa počet CFU spôsobom opísaným v odseku 4-5-4-2-1.

4-5-4-3. *Metóda najpravdepodobnejšieho počtu (MPN)*. Presnosť a správnosť metódy MPN je menšia ako presnosť a správnosť metódy membránovej filtrácie alebo platňovej metódy. Nespolahlivé výsledky sa získajú najmä pri počítaní plesní. Z týchto dôvodov je metóda MPN vyhradená pre výpočet TAMC v situáciách, kde nie je dostupná žiadna iná metóda. Ak je použitie tejto metódy odôvodnené, postupuje sa takto:

Pripravujú sa série najmenej troch postupných 10-násobných riedení produktu postupom opísaným v odsekoch 4-5-1 až 4-5-3. Z každého riedenia sa použijú tri vzorky po 1 g alebo 1 ml na inokuláciu troch skúmaviek s obsahom 9 ml až 10 ml enzymatického hydrolyzáta kazeínu a sóje. Ak treba, do živnej pôdy sa môže pridať povrchovo aktívna látka, napr. polysorbát 80 alebo inaktivátor antimikrobiálnej látky. Teda, ak sa pripravujú tri riedenia, inokuluje sa deväť skúmaviek.

Všetky skúmavky sa inkubujú najviac 3 dni pri teplote 30 °C až 35 °C. Ak je odčítanie výsledkov náročné alebo neisté pre povahu skúšaného produktu, vyočkujú sa do rovnakého bujónu alebo na agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje, naočkované živné pôdy sa inkubujú 1-2 dni pri tej istej teplote a použijú sa takto získané výsledky. Určí sa najpravdepodobnejší počet mikroorganizmov na gram alebo mililiter skúšaného produktu z tabuľky 2.6.12.-3.

4-6. VÝSLEDKY A VYHODNOTENIE

Po overení vhodnosti metódy membránovej filtrácie alebo platňovej metódy sa musí dosiahnuť priemerný počet každého testovacieho mikroorganizmu, ktorý sa neodlišuje viac ako o faktor 2 od hodnoty kontroly za neprítomnosti produktu definovanej v odseku 4-5-2. Po overení vhodnosti metódy MPN vypočítaná hodnota z inokula sa musí nachádzať v limitoch 95 % spoľahlivosti výsledkov dosiahnutých v kontrole.

Ak sa vyššie uvedené kritériá nemôžu dosiahnuť s jedným alebo viacerými testovacími mikroorganizmami so žiadnou opísanou metódou, na skúšanie produktu sa použije taká metóda a podmienky skúšky, ktoré sa najviac približujú kritériám.

5. SKÚŠANIE PRODUKTOV

5-1. MNOŽSTVO POUŽITÉ NA SKÚŠKU

Ak nie je predpísané inak, použije sa 10 g alebo 10 ml skúšaného produktu odobraného s vyššie uvedenými preventívnymi opatreniami. Pri skúšaní kvapalín alebo tuhých látok vo forme aerosólu sa odoberie 10 obalov. Pri skúšaní transdermálnych náplastí sa odoberie 10 náplastí.

Tabuľka 2.6.12.-3. – Hodnoty najpravdepodobnejšieho počtu mikroorganizmov (MPN)

Pozorované kombinácie počtov skúmaviek vykazujúcich rast v každej sérii			MPN na gram alebo mililiter produktu	Limity 95 % spôľahlivosti
Počet gramov alebo mililitrov produktu v skúmavke				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	< 3	0-9,4
0	0	1	3	0,1-9,5
0	1	0	3	0,1-10
0	1	1	6,1	1,2-17
0	2	0	6,2	1,2-17
0	3	0	9,4	3,5-35
1	0	0	3,6	0,2-17
1	0	1	7,2	1,2-17
1	0	2	11	4-35
1	1	0	7,4	1,3-20
1	1	1	11	4-35
1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5-38
2	0	0	9,2	1,5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-94
2	2	0	21	5-40
2	2	1	28	9-94
2	2	2	35	9-94
2	3	0	29	9-94
2	3	1	36	9-94
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	160	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	2	3	290	90-990
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1980
3	3	2	1100	200-4000
3	3	3	> 1100	

Skúšaná vzorka môže byť menšia, ak ide o liečivá v liekovej forme v týchto podmienkach: množstvo v jednej dávkovej jednotke (napr. tableta, kapsula, injekcia) je menšie alebo sa rovná 1 mg, alebo množstvo v 1 grame alebo mililitri (lieky, ktoré nie sú v dávkových jednotkách) je menšie ako 1 mg. V takýchto prípadoch skúšané množstvo nebude menšie ako množstvo prítomné v 10 dávkových jednotkách alebo v 10 g alebo 10 ml produktu.

Pri produktoch používaných ako liečivá, kde je množstvo vzorky limitované alebo veľkosť šarže je príliš malá (napr. menej ako 1 000 ml alebo 1 000 g), skúšané množstvo by malo predstavovať 1 % šarže, ak nie je predpísané alebo odôvodnené a povolené menšie množstvo.

Pri produktoch, kde je celkové množstvo entity tvoriacej šaržu menšie ako 200 (napr. vzorky použité na klinické skúšky), veľkosť vzorky sa môže zmenšiť o 2 jednotky alebo o 1 jednotku, ak je veľkosť šarže menšia ako 100.

Vzorka sa odoberie náhodným spôsobom z celkového objemu alebo z dostupných obalov produktu. Na získanie požadovaného množstva vzorky sa zmieša obsah dostatočného počtu obalov.

5-2. SKÚŠANIE PRODUKTU

5-2-1. Membránová filtrácia

Použije sa filtračné zariadenie, ktoré umožňuje prenesenie filtra do živnej pôdy. Pripraví sa vzorka najvhodnejším spôsobom opísaným v odseku 4 a jej vhodné množstvo sa preniesie na dva membránové filtre. Ihneď sa prefiltruje a každý filter sa premyje vhodným overeným postupom.

Na stanovenie TAMC sa preniesie jeden membránový filter na povrch agaru s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje. Na stanovenie TYMC sa preniesie druhý membránový filter na povrch Sabouraudovho agaru s glukózou. Platňa s agarom s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje sa inkubuje 3-5 dní pri teplote 30 °C až 35 °C a platňa so Sabouraudovým agarom s glukózou 5-7 dní pri teplote 20 °C až 25 °C. Vypočíta sa množstvo CFU na gram alebo mililiter produktu.

Pri skúšaní transdermálnych náplastí sa prefiltruje 10 % objemu pripravenej vzorky postupom opísaným v odseku 4-5-1 cez dva sterilné membránové filtre zvlášť. Jeden membránový filter sa preniesie na agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje pre stanovenie TAMC a druhý membránový filter na Sabouraudov agar s glukózou pre stanovenie TYMC.

5-2-2. Platňové metódy

5-2-2-1. Metóda zalievania

Pripraví sa vzorka vhodnou overenou metódou opísanou v odseku 4. Na každú živnú pôdu a na každé riedenie sa použijú najmenej 2 Petriho misky. Platne s agarom s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje sa inkubujú 3-5 dní pri teplote 30 °C až 35 °C a platne so Sabouraudovým agarom s glukózou 5-7 dní pri teplote 20 °C až 25 °C. Vyberú sa platne zodpovedajúce danému riedeniu, v ktorom vykazujú najväčší počet kolónií, v prípade TAMC menej ako 250 a v prípade TYMC menej ako 50. Z každej živnej pôdy sa vypočíta aritmetický priemer počtu kolónií a stanoví sa počet CFU na gram alebo mililiter produktu.

5-2-2-2. Metóda rozotierania

Pripraví sa vzorka vhodnou overenou metódou opísanou v odseku 4. Na každú živnú pôdu a na každé riedenie sa použijú najmenej 2 Petriho misky. Inkubácia a výpočet množstva CFU sa vykoná postupom opísaným pri metóde zalievania.

5-2-3. Metóda najpravdepodobnejšieho počtu

Vzorka sa pripraví a nariedi vhodnou overenou metódou opísanou v odseku 4. Všetky skúmavky sa inkubujú 3-5 dní pri teplote 30 °C až 35 °C. Ak treba, vyočkuje sa vhodným overeným postupom. Z každého riedenia sa zaznamená počet skúmaviek, ktoré vykazujú mikrobiálny rast. Stanoví sa najpravdepodobnejší počet mikroorganizmov na gram alebo mililiter skúšaného produktu z tabuľky 2.6.12.-3.

5-3. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Celkový počet aeróbných mikrobov (TAMC) sa považuje za rovnaký ako počet CFU zistený na agare s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje; ak sa zistia kolónie húb na tomto agare, počítajú sa medzi TAMC. Celkový počet kvasiniek/plesní (TYMC) sa považuje za rovnaký ako počet CFU zistený na Sabouraudovom agare s glukózou; ak sa zistia kolónie baktérií na tomto agare, počítajú sa medzi TYMC. Tam, kde sa dá predvídať, že TYMC prekročí kritérium prijateľnosti kvôli bakteriálnemu rastu, môže sa použiť Sabouraudov agar s glukózou a antibiotikami. Ak sa počítanie vykonáva metódou MPN, vypočítaná hodnota je TAMC.

Ak je predpísané kritérium prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu, vyjadruje sa takto:

- 10^1 CFU: najvyšší prijateľný počet = 20;
- 10^2 CFU: najvyšší prijateľný počet = 200;
- 10^3 CFU: najvyšší prijateľný počet = 2000, atď.

Odporúčané roztoky a živné pôdy sa opisujú vo všeobecnej stati 2.6.13.

2.6.13. MIKROBIOLOGICKÉ HODNOTENIE NESTERILNÝCH PRODUKTOV: DÔKAZ ŠPECIFICKÝCH MIKROORGANIZMOV

1. ÚVOD

Skúškami opísanými ďalej sa zisťuje neprítomnosť alebo obmedzený výskyt špecifických mikroorganizmov, ktoré môžu byť detegované za opísaných podmienok.

Tieto skúšky sú zamerané predovšetkým na zistenie, či látka alebo produkt vyhovuje stanovenej špecifikácii pre mikrobiologickú kvalitu. Ak sa použijú na tieto účely, treba sledovať ďalej uvedené pokyny, vrátane počtu vzoriek, ktoré sa majú odobrať, a vyhodnotenia výsledkov, ako je uvedené ďalej.

Alternatívne mikrobiologické postupy, vrátane automatizovaných metód, sa môžu použiť za predpokladu, že bola preukázaná ich zhoda s liekopisnou metódou.

2. VŠEOBECNÉ POSTUPY

Príprava vzoriek sa vykonáva postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12.

Ak má skúšaný produkt antimikrobiálnu aktivitu, táto sa musí vylúčiť alebo neutralizovať podľa možnosti na najvyššiu mieru postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12.

Ak sa na prípravu vzorky použijú povrchovo aktívne látky, musí sa dokázať ich neškodnosť pre mikroorganizmy a ich kompatibilita s použitými inaktivátormi postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12.

3. RASTOVÉ A INHIBIČNÉ VLASTNOSTI ŽIVNÝCH PÔD, VHODNOSŤ SKÚŠKY A NEGATÍVNA KONTROLA

Musí sa preukázať schopnosť skúšky detegovať mikroorganizmy za prítomnosti skúšaného produktu. Vhodnosť sa musí potvrdiť pri každej zmene skúšobného postupu alebo produktu, ktorá by mohla výsledok skúšky ovplyvniť.

3-1. PRÍPRAVA TESTOVACÍCH KMEŇOV

Použijú sa štandardizované stabilné suspenzie testovacích kmeňov alebo sa pripravia ďalej uvedeným postupom. Naočkované kultúry sa udržiavajú takým systémom kultivácie, aby živé mikroorganizmy použité na inokuláciu neboli viac ako 5-krát pasážované z pôvodného primárneho inokula.

3-1-1. **Aeróbne mikroorganizmy.** Bakteriálne testovacie kmene sa kultivujú oddelene v enzymatickom hydrolyzáte kazeínu a sóje alebo na agare s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C. *Candida albicans* sa kultivuje oddelene v Sabouraudovom bujóne s glukózou alebo na Sabouraudovom agare s glukózou 2 až 3 dni pri teplote 20 °C až 25 °C.

- *Staphylococcus aureus*, napr. ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 alebo NBRC 13276;
- *Pseudomonas aeruginosa*, napr. ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 alebo NBRC 13275;
- *Escherichia coli*, napr. ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 alebo NBRC 3972;
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, napr. ATCC 14028 alebo ako alternatíva *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Abony, napr. NBRC 100797, NCTC 6017 alebo CIP 80.39;
- *Candida albicans*, napr. ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 alebo NBRC 1594.

Na prípravu testovacích suspenzií sa použije tlmivý roztok chloridu sodného s peptónom s pH 7,0 alebo tlmivý fosforečnanový roztok s pH 7,2. Suspenzie sa použijú do 2 h alebo 24 h, ak sa uchovávajú pri teplote 2 °C až 8 °C.

3-1-2. **Klostrídie.** Použije sa *Clostridium sporogenes*, napr. ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) alebo ATCC 19404 (NCTC 532 alebo CIP 79.03) alebo NBRC 14293. Testovací kmeň klostrídií sa kultivuje za anaeróbných podmienok v obohatenej živnej pôde pre klostrídie 24 h až 48 h pri teplote 30 °C až 35 °C. Namiesto prípravy a následného riedenia čerstvej suspenzie vegetatívnych buniek *Cl. sporogenes* sa na inokuláciu môže alternatívne použiť stabilná spórová suspenzia, ktorá sa uchováva pri teplote 2 °C až 8 °C počas doby platnosti.

3-2. NEGATÍVNA KONTROLA

Na overenie podmienok skúšky sa vykoná negatívna kontrola s použitím zvolenej riediacej kvapaliny namiesto skúšaného produktu. Nesmie sa prejavíť rast mikroorganizmov. Negatívna kontrola sa vykoná aj pri skúšaní produktov postupom opísaným v odseku 5. Nevyhovujúca negatívna kontrola vyžaduje ďalšie skúmanie.

3-3. RASTOVÉ A INHIBIČNÉ VLASTNOSTI ŽIVNÝCH PÔD

Skúša sa každá šarža hotovej živnej pôdy a každá šarža živnej pôdy pripravenej buď zo sušenej živnej pôdy alebo z predpísaných zložiek. Overia sa potrebné vlastnosti príslušných živných pôd podľa tabuľky 2.6.13.-1.

Skúška na rastové vlastnosti kvapalných živných pôd: časť vhodnej živnej pôdy sa inokuluje malým množstvom (najviac 100 CFU) vhodného mikroorganizmu. Inkubuje sa pri špecifikovanej teplote po dobu, ktorá neprekročí najkratšiu dobu špecifikovanú v skúške. Prejaví sa zreteľný rast mikroorganizmov porovnateľný s rastom získaným na vopred odskúšanej a povolenej šarži živnej pôdy.

Skúška na rastové vlastnosti pevných živných pôd: metódou povrchového rozotierania sa inokuluje každá platňa malým množstvom (najviac 100 CFU) vhodného mikroorganizmu. Inkubuje sa pri špecifikovanej teplote po dobu, ktorá neprekročí najkratšiu dobu špecifikovanú v skúške. Prejaví sa zreteľný rast mikroorganizmov porovnateľný s rastom získaným na vopred odskúšanej a povolenej šarži živnej pôdy.

Skúška na inhibičné vlastnosti kvapalných a pevných živných pôd: vhodná živná pôda sa inokuluje najmenej 100 CFU vhodného mikroorganizmu. Inkubuje sa pri špecifikovanej teplote po dobu, ktorá neprekročí najkratšiu dobu špecifikovanú v skúške. Neprejaví sa rast testovacích mikroorganizmov.

Skúška na dôkazné vlastnosti: metódou povrchového rozotierania sa inokuluje každá platňa malým množstvom (najviac 100 CFU) vhodného mikroorganizmu. Inkubuje sa pri špecifikovanej teplote v časovom rozpätí predpísanom v skúške. Kolónie sú na vzhľad a dôkazné reakcie porovnateľné s reakciami získanými na vopred odskúšanej a povolenej šarži živnej pôdy.

Tabuľka 2.6.13.-1 – Rastové, inhibičné a dôkazné vlastnosti živných pôd

	Živná pôda	Vlastnosti	Testovacie kmene
Skúška na žľč tolerujúce gramnegatívne baktérie	Mosselov bujón obohatený pre enterobaktérie	Podporujúce rast	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
		Inhibičné	<i>S. aureus</i>
	Agar s kryštálovou violetou, neutrálnou červenou, žľčovými soľami a glukózou	Podporujúce rast + dôkazné	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Skúška na <i>Escherichia coli</i>	MacConkeyov bujón	Podporujúce rast	<i>E. coli</i>
		Inhibičné	<i>S. aureus</i>
	MacConkeyov agar	Podporujúce rast + dôkazné	<i>E. coli</i>
Skúška na <i>Salmonella</i>	Obohatený bujón pre <i>Salmonella</i> Rappaport Vassiliadis	Podporujúce rast	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium alebo <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Abony
		Inhibičné	<i>S. aureus</i>
	Deoxycholátový agar so xylózou a lyzínom	Podporujúce rast + dôkazné	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium alebo <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Abony
Skúška na <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimidový agar	Podporujúce rast	<i>P. aeruginosa</i>
		Inhibičné	<i>E. coli</i>
Skúška na <i>Staphylococcus aureus</i>	Agar s manitolom	Podporujúce rast + dôkazné	<i>S. aureus</i>
		Inhibičné	<i>E. coli</i>
Skúška na klostrídie	Obohatená živná pôda pre klostrídie	Podporujúce rast	<i>Cl. sporogenes</i>
	Kolumbia agar	Podporujúce rast	<i>Cl. sporogenes</i>
Skúška na <i>Candida albicans</i>	Sabouraudov bujón s glukózou	Podporujúce rast	<i>C. albicans</i>
	Sabouraudov agar s glukózou	Podporujúce rast + dôkazné	<i>C. albicans</i>

3-4. VHODNOSŤ SKÚŠOBNEJ METÓDY

Z každého skúšaného produktu sa pripraví vzorka postupom opísaným v odseku 4. Každý testovací kmeň sa pridá za miešania do predpísanej živnej pôdy. Inokuluje sa každý testovací kmeň zvlášť. Použije sa množstvo mikroorganizmov, ktoré zodpovedá najviac 100 CFU v inokulovanom skúšanom prípravku.

Vykoná sa skúška postupom opísaným v príslušnom odseku 4 a inkubuje sa po najkratšiu predpísanú dobu.

Špecifikované mikroorganizmy sa musia preukázať dôkaznými reakciami opísanými v odseku 4.

Antimikrobiálna aktivita produktu si vyžaduje zmenu skúšobného postupu (pozri odsek 4-5-3 vo všeobecnom článku 2.6.12).

V prípade, že antimikrobiálnu aktivitu daného produktu voči predpísanému mikroorganizmu nie je možné neutralizovať, predpokladá sa, že inhibovaný mikroorganizmus nie je v produkte prítomný.

4. SKÚŠANIE PRODUKTOV

4-1. ŽĽČ TOLERUJÚCE GRAMNEGATÍVNE BAKTÉRIE

4-1-1. Príprava vzorky a predinkubácia. Pripraví sa vzorka najmenej 1 g skúšaného produktu s použitím riedenia 1 v 10 postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12, ale s použitím enzymatického hydrolyzátnu kazeínu a sóje ako riediacej kvapaliny; premieša sa a inkubuje pri teplote 20 °C až 25 °C dostatočne dlhú dobu na oživenie baktérií, ale nie na ich pomnoženie (zvyčajne 2 h, ale najviac 5 h).

4-1-2. Skúška na neprítomnosť. Ak nie je predpísané inak, použije sa objem zodpovedajúci 1 g skúšaného produktu pripraveného podľa odseku 4-1-1 na inokuláciu Mosselovho bujónu obohateného pre enterobaktérie. Inkubuje sa 24 h až 48 h pri teplote 30 °C až 35 °C. Vyočkuje sa na platne s agarom s kryštálovou violetou, neutrálnou červenou, žľčovými soľami a glukózou. Inkubuje sa 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov.

4-1-3. Kvantitatívna skúška

4-1-3-1. **Výber a subkultivácia.** Vhodné množstvo Mosselovho bujónu obohateného pre enterobaktérie sa inokuluje vzorkou pripravenou postupom opísaným v odseku 4-1-1 alebo jej riedeniami, ktoré obsahujú 0,1 g, 0,01 g a 0,001 g (alebo 0,1 ml, 0,01 ml a 0,001 ml) skúšaného produktu. Inkubuje sa 24 h až 48 h pri teplote 30 °C až 35 °C. Každá kultúra sa vyočkuje na agar s kryštálovou violetou, neutrálnou červenou, žltými soľami a glukózou. Inkubuje sa 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-1-3-2. **Vyhodnotenie.** Rast kolónií sa hodnotí ako pozitívny výsledok. Zaznamená sa najmenšie množstvo produktu, ktoré dáva pozitívny výsledok a najväčšie množstvo, ktoré dáva negatívny výsledok. Z tabuľky 2.6.13-2 sa určí pravdepodobný počet baktérií.

Tabuľka 2.6.13.-2 – Vyhodnotenie výsledkov

Výsledky pre každé množstvo produktu			Pravdepodobný počet baktérií na gram alebo mililiter produktu
0,1 g alebo 0,1 ml	0,01 g alebo 0,01 ml	0,001 g alebo 0,001 ml	
+	+	+	> 10 ³
+	+	–	< 10 ³ a > 10 ²
+	–	–	< 10 ² a > 10
–	–	–	< 10

4-2. *ESCHERICHIA COLI*

4-2-1. **Príprava vzorky a predinkubácia.** Pripraví sa vzorka najmenej 1 g skúšaného produktu s použitím riedenia 1 v 10 postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 a použije sa 10 ml alebo množstvo zodpovedajúce 1 g alebo 1 ml na inokuláciu vhodného množstva (určeného postupom opísaným v odseku 3-4) enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje, premieša sa a inkubuje 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-2-2. **Výber a subkultivácia.** Nádoba sa pretrepe, 1 ml enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje sa preniesie do 100 ml MacConkeyovho bujónu a inkubuje sa 24 h až 48 h pri teplote 42 °C až 44 °C. Vyočkuje sa na platňu s MacConkeyovým agarom a inkubuje sa 18 h až 72 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-2-3. **Vyhodnotenie.** Rast kolónií indikuje možnú prítomnosť *E. coli*. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov alebo ak sú potvrdzujúce skúšky totožnosti negatívne.

4-3. *SALMONELLA*

4-3-1. **Príprava vzorky a predinkubácia.** Pripraví sa skúšaný produkt postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 a použije sa množstvo zodpovedajúce najmenej 10 g alebo 10 ml na inokuláciu vhodného množstva (určeného postupom opísaným v odseku 3-4) enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje, premieša sa a inkubuje 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-3-2. **Výber a subkultivácia.** 0,1 ml enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje sa preniesie do 10 ml obohateného bujónu pre *Salmonella* Rappaport Vassiliadis a inkubuje sa 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C. Vyočkuje sa na platňu s deoxycholátovým agarom so xylózou a lyzínom a inkubuje sa 18 h až 48 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-3-3. **Vyhodnotenie.** Rast dobre vyvinutých červených kolónií s čiernym stredom alebo bez neho indikuje možnú prítomnosť *Salmonella*. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov alebo ak sú potvrdzujúce skúšky totožnosti negatívne.

4-4. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

4-4-1. **Príprava vzorky a predinkubácia.** Pripraví sa vzorka najmenej 1 g skúšaného produktu s použitím riedenia 1 v 10 postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 a použije sa 10 ml alebo množstvo zodpovedajúce 1 g alebo 1 ml na inokuláciu vhodného množstva (určeného postupom opísaným v odseku 3-4) enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje a premieša sa. Pri skúšaní transdermálnych náplastí sa objem vzorky zodpovedajúci jednej náplasti pripravenej postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 prefiltruje cez sterilný membránový filter, ktorý sa preniesie do 100 ml enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje. Inkubuje sa 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-4-2. **Výber a subkultivácia.** Vyočkuje sa na platňu s cetrimidovým agarom a inkubuje sa 18 h až 72 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-4-3. **Vyhodnotenie.** Rast kolónií indikuje možnú prítomnosť *P. aeruginosa*. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov alebo ak sú potvrdzujúce skúšky totožnosti negatívne.

4-5. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

4-5-1. **Príprava vzorky a predinkubácia.** Pripraví sa vzorka najmenej 1 g skúšaného produktu s použitím riedenia 1 v 10 postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 a použije sa 10 ml alebo množstvo zodpovedajúce 1 g alebo 1 ml na inokuláciu vhodného množstva (určeného postupom opísaným v odseku 3-4) enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje a premieša sa. Pri skúšaní transdermálnych náplastí sa objem vzorky zodpovedajúci jednej náplasti pripravenej postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 prefiltruje cez sterilný membránový filter, ktorý sa preniesie do 100 ml enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje. Inkubuje sa 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-5-2. **Výber a subkultivácia.** Vyočkuje sa na platňu s manitolovým agarom a inkubuje sa 18 h až 72 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-5-3. **Vyhodnotenie.** Rast žltých alebo bielych kolónií so žltou zónou indikuje možnú prítomnosť *S. aureus*. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov alebo ak sú potvrdzujúce skúšky totožnosti negatívne.

4-6. *CLOSTRIDIA*

4-6-1. **Príprava vzorky a tepelná úprava.** Pripraví sa vzorka s použitím riedenia 1 v 10 (s najmenším celkovým objemom 20 ml) najmenej s 2 g alebo 2 ml skúšaného produktu postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12. Vzorka sa rozdelí na dve polovice najmenej po 10 ml. Jedna polovica sa zahrieva 10 min pri teplote 80 °C a rýchlo sa ochladí. Druhá polovica sa nezahrieva.

4-6-2. **Výber a subkultivácia.** Použije sa 10 ml alebo množstvo zodpovedajúce 1 g alebo 1 ml skúšaného produktu z každej časti na inokuláciu vhodného množstva (určeného postupom opísaným v odseku 3-4) obohatenej živnej pôdy pre klostrídie. Inkubuje sa za anaeróbnych podmienok 48 h pri teplote 30 °C až 35 °C. Po inkubácii sa vyočkuje z každej nádoby na Kolumbia agar a inkubuje sa za anaeróbnych podmienok 48 h až 72 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-6-3. **Vyhodnotenie.** Rast anaeróbných tyčínok (s endospórmi alebo bez nich), ktoré dávajú negatívnu katalázovú reakciu, indikuje prítomnosť klostrídií. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov alebo ak sú potvrdzujúce skúšky totožnosti negatívne.

4-7. *CANDIDA ALBICANS*

4-7-1. **Príprava vzorky a predinkubácia.** Pripraví sa skúšaný produkt postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 a použije sa 10 ml alebo množstvo zodpovedajúce najmenej 1 g alebo 1 ml na inokuláciu 100 ml Sabouraudovho bujónu s glukózou a premieša sa. Inkubuje sa 3 až 5 dní pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-7-2. **Výber a subkultivácia.** Vyočkuje sa na platňu so Sabouraudovým agarom s glukózou a inkubuje sa 24 h až 48 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

4-7-3. **Vyhodnotenie.** Rast bielych kolónií môže indikovať prítomnosť *C. albicans*. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Skúšaný produkt vyhovuje skúške, ak sa neprejavil rast kolónií opísaných druhov alebo ak sú potvrdzujúce skúšky totožnosti negatívne.

Nasledujúca stat' je uvedená pre informáciu.

5. ODPORÚČANÉ ROZTOKY A ŽIVNÉ PÔDY

Nasledujúce roztoky a živné pôdy sa ukázali ako vyhovujúce pre vykonanie skúšok na mikrobiologické hodnotenie predpísaných v liekopise. Môžu sa použiť aj iné živné pôdy, ak sa preukázala ich vhodnosť.

Zásobný tlmivý roztok. 34 g dihydrogenfosforečnanu draselného sa preniesie do 1 000 ml odmernej banky, rozpustí sa v 500 ml čistenej vody, hodnota pH sa upraví na $7,2 \pm 0,2$ hydroxidom sodným, zriedi sa čistenou vodou na 1 000,0 ml a premieša sa. Naplní sa do nádob a vysterilizuje sa. Uchováva sa pri teplote 2 °C až 8 °C.

Tlmivý fosforečnanový roztok s pH 7,2. Pripraví sa zmes zásobného tlmivého roztoku a čistenej vody (1:800 V/V) a vysterilizuje sa.

Tlmivý roztok chloridu sodného s peptónom s pH 7,0

Dihydrogenfosforečnan draselný	3,6 g
Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát	7,2 g, zodpovedá 0,067 mol/l fosforečnanov
Chlorid sodný	4,3 g
Peptón (mäsový alebo kazeínový)	1,0 g
Čistená voda	1 000 ml

Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Enzymatický hydrolyzát kazeínu a sóje

Pankreatický hydrolyzát kazeínu	17,0 g
Papaický hydrolyzát sóje	3,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Hydrogenfosforečnan draselný	2,5 g
D-Glukóza, monohydrát	2,5 g
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,3 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Agar s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu a sóje

Pankreatický hydrolyzát kazeínu	15,0 g
Papaický hydrolyzát sóje	5,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Agar	15,0 g
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,3 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Sabouraudov agar s glukózou

Glukóza	40,0 g
Zmes peptického hydrolyzáta živočíšneho tkaniva a pankreatického hydrolyzáta kazeínu (1:1)	10,0 g
Agar	15,0 g
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $5,6 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Zemiakový agar s glukózou

Zemiakový odvar	200 g
Glukóza	20,0 g
Agar	15,0 g
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $5,6 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Sabouraudov bujón s glukózou

Glukóza	20,0 g
Zmes peptického hydrolyzáta živočíšneho tkaniva a pankreatického hydrolyzáta kazeínu (1:1)	10,0 g
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $5,6 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Mosselov bujón obohatený pre enterobaktérie

Pankreatický hydrolyzát želatíny	10,0 g
D-glukóza, monohydrát	5,0 g
Sušená hovädzia žľč	20,0 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	2,0 g
Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát	8,0 g
Briliantová zeleň	15 mg
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,2 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Zahrieva sa 30 min pri teplote 100 °C a ihneď sa ochladí.

Agar s kryštálovou violetou, neutrálnou červeňou, žľčovými soľami a glukózou

Kvasničný autolyzát	3,0 g
Pankreatický hydrolyzát želatíny	7,0 g
Žľčové soli	1,5 g
Chlorid sodný	5,0 g
D-Glukóza, monohydrát	10,0 g
Agar	15,0 g
Neutrálne červené	30 mg
Kryštálová violet	2 mg
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po zahriatí $7,4 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zahrieva sa do teploty varu; nesmie sa zahrievať v autokláve.

MacConkeyov bujón

Pankreatický hydrolyzát želatíny	20,0 g
Laktóza, monohydrát	10,0 g
Sušená hovädzia žľč	5,0 g
Brómkrezolový purpur	10 mg
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,3 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

MacConkeyov agar

Pankreatický hydrolyzát želatíny	17,0 g
Peptón (mäsový a kazeínový)	3,0 g
Laktóza, monohydrát	10,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Žľčové soli	1,5 g
Agar	13,5 g
Neutrálne červené	30,0 mg
Kryštálová violet	1 mg
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,1 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Varí sa 1 min za stáleho miešania a potom sa sterilizuje v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Obohatený bujón pre *Salmonella* Rappaport Vassiliadis

Sójový peptón	4,5 g
Chlorid horečnatý, hexahydrát	29,0 g
Chlorid sodný	8,0 g
Fosforečnan draselný	0,4 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,6 g
Malachitová zeleň	0,036 g
Čistená voda	1 000 ml

Zložky sa miernym zahrievaním rozpustia. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu pri teplote neprevyšujúcej $115\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hodnota pH má byť $5,2 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ po zahrievaní a autoklávovaní.

Deoxycholátový agar so xylózou a lyzínom

Xylóza	3,5 g
L-Lyzín	5,0 g
Laktóza, monohydrát	7,5 g
Sacharóza	7,5 g
Chlorid sodný	5,0 g
Kvasničný autolyzát	3,0 g
Fenolová červeň	80 mg
Agar	13,5 g
Náriumdeoxycholát	2,5 g
Tiosíran sodný	6,8 g
Citrónan amónno-železitý	0,8 g
Čistená voda	1 000 ml

Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po zahrievaní $7,4 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zahrieva sa do teploty varu, ochladí sa na teplotu $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vyleje sa do Petriho misiek. Nesmie sa zahrievať v autokláve.

Cetrimidový agar

Pankreatický hydrolyzát želatíny	20,0 g
Chlorid horečnatý	1,4 g
Síran draselný	10,0 g
Cetrimid	0,3 g
Agar	13,6 g
Čistená voda	1 000 ml
Glycerol	10,0 ml

Zahrieva sa 1 min za stáleho miešania do teploty varu. Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,2 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Agar s manitolom

Pankreatický hydrolyzát kazeínu	5,0 g
Peptický hydrolyzát živočíšneho tkaniva	5,0 g
Hovädzí odvar koncentrovaný	1,0 g
D-Manitol	10,0 g
Chlorid sodný	75,0 g
Agar	15,0 g
Fenolová červeň	0,025 g
Čistená voda	1 000 ml

Zahrieva sa 1 min za stáleho miešania do teploty varu. Hodnota pH sa upraví tak, aby bola po sterilizácii $7,4 \pm 0,2$ pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Obohatená živná pôda pre klostrídie

Hovädzí odvar koncentrovaný	10,0 g
Peptón	10,0 g
Kvasničný autolyzát	3,0 g
Rozpustný škrob	1,0 g
D-Glukóza, monohydrát	5,0 g
Cysteíniumchlorid	0,5 g
Chlorid sodný	5,0 g
Octan sodný	3,0 g
Agar	0,5 g
Čistená voda	1 000 ml

Agar sa nechá hydrátovať v čistenej vode a za stáleho miešania sa rozpustí zahriatím do teploty varu. Ak treba, upraví sa hodnota pH tak, aby bola po sterilizácii $6,8 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu.

Kolumbia agar

Pankreatický hydrolyzát kazeínu	10,0 g
Peptický hydrolyzát mäsa	5,0 g
Pankreatický hydrolyzát srdca	3,0 g
Kvasničný autolyzát	5,0 g
Kukuričný škrob	1,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Agar, podľa gelifikačnej schopnosti	10,0 až 15,0 g
Čistená voda	1 000 ml

Agar sa nechá hydrátovať v čistenej vode a za stáleho miešania sa rozpustí zahriatím do teploty varu. Ak treba, upraví sa hodnota pH tak, aby bola po sterilizácii $7,3 \pm 0,2$ pri teplote 25 °C. Sterilizuje sa v autokláve s použitím validovaného cyklu. Ochladí sa na teplotu 45 °C až 50 °C; ak treba, pridá sa gentamicíniumsulfát v množstve zodpovedajúcom 20 mg gentamicínu a vyleje sa do Petriho misiek.

Ph. Eur. 6.3 čl. 01/2009:50104

5.1.4. MIKROBIOLOGICKÁ KVALITA NESTERILNÝCH LIEKOV A LÁTOK NA FARMACEUTICKÉ POUŽITIE

Prítomnosť niektorých mikroorganizmov v nesterilných liekoch môže potenciálne redukovať alebo dokonca inaktivovať terapeutickú aktivitu lieku a môže mať potenciálne nepriaznivé účinky na zdravie pacienta. Výrobcovia preto musia zabezpečiť nízku biozáťaž finálnych liekových foriem uplatnením aktuálnych smerníc o Správnej výrobnjej praxi počas výroby, skladovania a distribúcie farmaceutických produktov.

Mikrobiologické skúšanie nesterilných produktov sa vykonáva metódami uvedenými vo všeobecných štátiach 2.6.12 a 2.6.13. Kritériá prijateľnosti pre nesterilné farmaceutické produkty založené na celkovom počte aeróbných mikróbov (TAMC) a celkovom počte kvasiniek a húb (TYMC) sú uvedené v tabuľkách 5.1.4-1 a 5.1.4-2. Kritériá prijateľnosti sú založené na individuálnych výsledkoch alebo na priemernom počte výsledkov opakovaných skúšok, ak sa vykonalo sčítanie po opakovaných skúškach (napr. priame platňové metódy).

Ak je predpísané kritérium prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu, hodnotí sa takto.

- 10^1 CFU: najvyšší prijateľný počet = 20;
- 10^2 CFU: najvyšší prijateľný počet = 200;
- 10^3 CFU: najvyšší prijateľný počet = 2 000, atď.

Tabuľka 5.1.4.-1 obsahuje zoznam špecifických mikroorganizmov, pre ktoré boli kritériá prijateľnosti určené. To nutne neznamená, že zoznam je úplný a pre daný produkt môže byť potrebné vykonať skúšku na iné mikroorganizmy v závislosti od povahy východiskového materiálu a výrobného procesu.

Ak sa ukáže, že žiadnou z predpísaných skúšok sa nezíska platný počet mikroorganizmov na predpísanej úrovni, použije sa validovaná metóda, ktorej limit detekcie sa najviac približuje ku kritériu prijateľnosti.

Okrem mikroorganizmov uvedených v tabuľke 5.1.4.-1 sa význam iných zistených mikroorganizmov posudzuje z hľadiska:

- použitia produktu: riziko sa mení podľa miesta aplikácie (oko, nos, dýchacie cesty);
- povahy produktu: jeho schopnosť podporovať rast, prítomnosť vhodných antimikrobiálnych látok;
- spôsobu podania;
- zamýšľaného obalu: riziko sa môže líšiť v prípade novorodencov, detí, oslabených;
- použitia imunosupresívnych liekov, kortikosteroidov;
- prítomnosti choroby, rán, poškodenia orgánov.

Kde je to odôvodnené, hodnotenie dôležitých faktorov založené na riziku riadi personál so špecializovaným kurzom v mikrobiológii s výkladom mikrobiologických údajov. Pri hodnotení východiskových materiálov sa berie do úvahy proces, ktorému bol produkt vystavený, súčasná technológia skúšania a dostupnosť materiálov požadovanej kvality.

Tabuľka 5.1.4.-1. – Kritériá prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu nesterilných liekových foriem

Miesto aplikácie	TAMC (CFU/g alebo CFU/ml)	TYMC (CFU/g alebo CFU/ml)	Špecifické mikroorganizmy
Lieky bez obsahu vody na perorálne použitie	10 ³	10 ²	Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml)
Lieky s obsahom vody na perorálne použitie	10 ²	10 ¹	Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml)
Rektálne použitie	10 ³	10 ²	
Orálne použitie Gingiválne použitie Dermálne použitie Nazálne použitie Podanie do ucha	10 ²	10 ¹	Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g alebo 1 ml)
Vaginálne použitie	10 ²	10 ¹	Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Candida albicans</i> (1 g alebo 1 ml)
Transdermálne náplasti (limity pre jednu náplasť vrátane príľnavej vrstvy a ochrannej fólie)	10 ²	10 ¹	Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 náplasť) Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 náplasť)
Inhalačné použitie (zvláštne požiadavky sa vzťahujú na kvapalné lieky na rozprašovanie)	10 ²	10 ¹	Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť gramnegatívnych žlč-tolerujúcich baktérií (1 g alebo 1 ml)
Osobitné ustanovenia Ph. Eur. pre perorálne liekové formy s obsahom látok prírodného pôvodu (živočíšneho, rastlinného, minerálneho), ktorých antimikrobiálna úprava nie je technicky možná a pre ktoré kompetentná autorita povolí TAMC v pôvodnom materiáli nad 10 ³ CFU na gram alebo mililiter	10 ⁴	10 ²	Najviac 10 ² CFU žlč-tolerujúcich gramnegatívnych baktérií (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Salmonella</i> (10 g alebo 10 ml) Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g alebo 1 ml)
Osobitné ustanovenia Ph. Eur. pre rastlinné lieky s obsahom jednej alebo viacerých rastlinných drog (celých, rozdrobených alebo práškovaných): – rastlinné lieky, ktoré sa pred použitím zalievajú vriacou vodou – rastlinné lieky, ktoré sa pred použitím nezalievajú vriacou vodou	10 ⁷ 10 ⁵	10 ⁵ 10 ⁴	Najviac 10 ² CFU <i>Escherichia coli</i> (pozri Dodatok) (1 g alebo 1 ml) Najviac 10 ³ CFU žlč-tolerujúcich gramnegatívnych baktérií (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Escherichia coli</i> (1 g alebo 1 ml) Neprítomnosť <i>Salmonella</i> (10 g alebo 10 ml)

Tabuľka 5.1.4.-2. – Kritériá prijateľnosti pre mikrobiologickú kvalitu nesterilných látok na farmaceutické použitie

	TAMC (CFU/g alebo CFU/ml)	TYMC (CFU/g alebo CFU/ml)
Látky na farmaceutické použitie	10 ³	10 ²

Dodatok:**Osobitné ustanovenie Ph. Eur. pre rastlinné lieky s obsahom jednej alebo viacerých rastlinných drog (celých, rozdrobených alebo práškových): kvantitatívne stanovenie *E. coli***

Použije sa tento postup.

Príprava vzorky a predinkubácia. Pripraví sa vzorka v 10-násobnom riedení najmenej s 1 g skúšaného produktu postupom opísaným vo všeobecnom článku 2.6.12 a použijú sa množstvá zodpovedajúce 0,1 g, 0,01 g a 0,001 g (alebo 0,1 ml, 0,01 ml a 0,001 ml) na inokuláciu vhodného množstva (určeného postupom opísaným v odseku 3-4 všeobecnom článku 2.6.13) enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje, premieša sa a inkubuje 18 h až 24 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

Výber a subkultivácia. Nádoba sa pretrepe, 1 ml enzymatického hydrolyzátu kazeínu a sóje sa preniesie do 100 ml MacConkeyovho bujónu a inkubuje sa 24 h až 48 h pri teplote 42 °C až 44 °C. Vyočkuje sa na platňu s MacConkeyovým agarom a inkubuje sa 18 h až 72 h pri teplote 30 °C až 35 °C.

Vyhodnotenie. Rast kolónií indikuje možnú prítomnosť *E. coli*. Potvrdí sa to skúškami totožnosti.

Zaznamená sa najmenšie množstvo produktu, ktoré dáva pozitívny výsledok a najväčšie množstvo, ktoré dáva negatívny výsledok.

Určí sa pravdepodobný počet baktérií z nasledujúcej tabuľky.

Výsledky pre každé množstvo produktu			Pravdepodobný počet baktérií na gram alebo mililiter produktu
0,1 g alebo 0,1 ml	0,01 g alebo 0,01 ml	0,001 g alebo 0,001 ml	
+	+	+	$> 10^3$
+	+	-	$< 10^3$ a $> 10^2$
+	-	-	$< 10^2$ a > 10
-	-	-	< 10

S metodickým pokynom č. 126/2009 „ Mikrobiologické hodnotenie nesterilných liekov a látok na farmaceutické použitie” som sa oboznámil/a:

Č.	Meno	Funkcia	Dátum	Podpis
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				

