

Raport privind rezultatele testului de competență a laboratoarelor pentru determinarea nivelului de microorganisme din produsele farmaceutice

Report concerning results of laboratory proficiency testing on microbial enumeration level from pharmaceutical products

Simona Sturzu, Daniela Tirsinoaga, Ioana Tihulca, Mariana Dumitrache, Alina Karina Draghici
Institute for Control of Veterinary Biological Products and Medicines

Cuvinte cheie: *shema de competenta a laboratoarelor, comparări inter-lab, filtrare prin membrana, determinarea numărului de microorganisme*
Key words: *proficiency testing schemes (PTS), Inter-Lab Comparisons, membrane filtration, microbial enumeration*

Rezumat

Lucrarea descrie rezultatele obtinute de catre Laboratorul Control Microbiologic din cadrul Institutului pentru Controlul Produselor Biologice si Medicamentelor de uz Veterinar dupa participarea la shema de competenta a laboratoarelor pentru determinarea numarului total de microorganisme prin metoda microbiologica (PTS 274). Schema de competenta a laboratoarelor a fost organizata de catre LGC Standards, Marea Britanie, organizatie cu competenta in organizarea shemelor de competenta a laboratoarelor. Tehnica microbiologica utilizata la determinarea numarului de germeni a fost filtrarea prin membrana care consta in transferarea unei cantitati adecvate din proba, preparată conform prevederilor Farmacopeei Europene, prin membrana filtranta, incubarea acestora pe medii corespunzatoare, urmata de citirea si interpretarea rezultatelor. Rezultatul obtinut de catre Laboratorul Control Microbiologic a fost de 34 UFC/flacon, iar valoarea atribuita de LGC Standards a fost de 30 UFC/flacon. Scorul Z obținut a fost 0,16, iar performanta Laboratorului Control Microbiologic a fost apreciata ca fiind foarte buna pentru determinarea numarului minim de microorganisme.

Abstract

The present study describes the results obtained by the Microbiological Control Laboratory from Institute for Control of Biological Products and Veterinary Medicines after participating in the proficiency testing scheme study on low – level microbial enumeration from pharmaceutical products. The proficiency testing scheme was organized by LGC Standards, Great Britain, organisation with competences in managing of the proficiency testing scheme for laboratories. Membrane filtration is a microbiological technique used for the microbial enumeration test, which consist in the transfer of the appropriate amounts from the sample, prepared according to the provisions of the European Pharmacopoea, through a membrane filter, incubating it on appropriate culture media, followed by reading and interpretation of the results. The result obtained by the Microbiological Control Laboratory was 34 CFU/vial, and the value attributed by LGC Standards was 30 CFU/vial. The Z- scores were 0,16 and the performance of Microbiological Control Laboratory was very good for low – level microbial enumeration from sample.

Introducere

Participarile la teste de competenta (teste de evaluare intre laboratoare) sunt considerate obligatorii pentru laboratoarele acreditate conform cerintelor standardului ISO/IEC 17025.

Verificarea rezultatelor analizelor cu cele obtinute de alte laboratoare este una din

cele mai importante elemente ale controlului calitatii.

Increderea ca un laborator produce constant rezultate fiabile este de o importanta majora pentru laborator in sine si pentru organizatia din care face parte.

Laboratorul Control Microbiologic din cadrul ICBMV participă regulat la schemele de competență organizate de către

Directoratul European pentru Calitatea Medicamentelor (EDQM).

La testul de competență (PTS 274) cele 38 laboratoare participante au trebuit să determine conținutul de microorganisme din probele de produse farmaceutice, conform cerințelor cuprinse în Farmacopeea Europeană, ediția a 7-a, capitolul 2.6.12. [1].

1. Materiale și Metodă

Principii generale

Tehnica utilizată pentru determinarea nivelului minim de microorganisme aerobe din proba a fost **filtrarea prin membrana**.

Tehnica permite determinarea cantitativa a bacteriilor mezofile și a fungilor care pot crește în condiții de aerobioză și trebuie executată ținând cont de toate măsurile de precauție, pentru a evita contaminarea cu microorganisme a probei de examinat.

Principiul metodei are la baza concentrarea microorganismelor din probele analizate pe suprafața membranei filtrante (diametrul porilor de cel mult 0,45 μm) urmata de incubarea acestora pe medii de cultura corespunzatoare.

Materialele

Proba de analizat: produs farmaceutic primit în stare corespunzatoare

Materiale necesare:

- agar cazeina soia, apă peptonată.
- dispozitiv filtrare prin membrana: pompă de vid; rampă cu posturi pentru filtrare, pâlnie de vid

Metoda

Pentru a obține rezultate relevante în controlul microbiologic, este necesară respectarea protocolului de lucru în laboratoarele de microbiologie și asigurarea eliminării microorganismelor străine, care influențează negativ rezultatele. Înainte de începerea lucrului locul în care s-a desfășurat analiza a fost dezinfectat (alcool 70%).

Tipul de filtru a fost ales în așa fel încât eficiența reținerii microorganismelor să nu fie afectată de componentele probei de investigat.

Dispozitivul de filtrare, pensetele și foarfecele au fost sterilizate înainte de utilizare prin flambare (periodic și prin autoclavare).

Placile Petri au fost pregătite cu mediu de cultura adecvat: **agar cazeina soia**.

Proba de lucru s-a preparat conform protocolului primit de la LGC Standards [2].

După pregătirea probei de lucru, s-a plasat membrana de filtru pe rampa filtrantă, iar proba de analizat a fost filtrată.

În timpul procesului, microorganismele din proba de analizat au fost reținute pe suprafața filtrului prin acțiunea de selecție a membranei filtrante. Inhibitorii de creștere au fost îndepărtați prin spălarea suportului cu apă peptonată sterilă după filtrare.

După finalizarea procesului de filtrare, s-a transferat membrana filtrantă pe suprafața plăcilor Petri pregătite cu agar cazeină soia.

Plăcile astfel pregătite au fost incubate timp de 5 zile, la 30-35°C.

Rezultate și discuții

În acest studiu microbiologic s-a estimat cantitatea de microorganisme din proba furnizată de către LGC Standards [2].

Rezultatul final s-a obținut în urma numărărilor directe a coloniilor dezvoltate pe placile Petri după 5 zile de incubare, la 30 - 35°C. Rezultatul final a fost de 34 și a fost exprimat ca UFC / flacon.

Rezultatele studiilor au fost trimise la LGC Standards - Pharmasure pentru evaluare. După evaluare datelor primite de la laboratoarele implicate în acest studiu, LGC Standards a calculat, valoarea medie, deviația standard, deviația standard relativă și scorul Z.

Datele sunt raportate de obicei folosind o valoare de *cut-off*, ca **scor Z** situat în **intervalul cuprins între - 2 și + 2**.

LGC Standards a stabilit că pentru proba supusă testării, media tuturor rezultatelor (de la 38 de laboratoare) a fost de **1,49 log 10** și deviația standard de **0,16 log 10**.

Pentru Laboratorul Control Microbiologic scorul Z a fost de **0,16 (34 UFC / flacon)** pentru numărul de microorganisme din produsul farmaceutic analizat.

Valoarea LGC Standards atribuită probelor a fost de **30 UFC / flacon** pentru numărul de microorganisme din produsul farmaceutic inclus în schema de comparare.

Concluzii

Rezultatele obținute de Laboratorul Control Microbiologic au condus la

incadrarea scorului Z în intervalul stabilit de principiile statisticii (+ 0,16).

Performanța Laboratorului Control Microbiologic a fost foarte bună, în consecință, LGC Standards a transmis "*Atestatul participării la schema de teste de competență*" [3].

Bibliografie

1. Farmacopeea Europeană, Ed. 7, Ch. 2.6.12.
2. Protocol de lucru LGC Standards privind determinarea numărului de microorganisme aerobe (PTS 274).
3. Raportul LGC Standards privind determinarea numărului de microorganisme aerobe (PTS 274).