



การควบคุมคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา
(Microbial quality control)

- Sterility tests
- Bacterial endotoxin test
- Microbial enumeration test
- Tests for specified microorganisms
- Antibiotics-microbial assays
- Antimicrobial effectiveness test (Efficacy of antimicrobial preservation)

2

การควบคุมคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา (Microbial quality control)

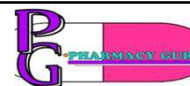


Specifications	Type of products
Sterility	Sterile products
Bacterial endotoxins ^a	Injections
Microbiological quality ^b - Total aerobic microbial counts - Total aerobic yeasts and moulds counts - Tests for specified microorganisms	Oral use (Non-aqueous preparations, Aqueous preparations), Rectal use, Oromucosal use, Gingival, Cutaneous, Nasal, Auricular, Vaginal, Transdermal, Liquid preparation for nebulization
Microbial assay	Antibiotics

หมายเหตุ: ^aบางช่องทางการบริหารยาไม่กำหนดมาตรฐาน ^bมาตรฐานขึ้นกับช่องทางการบริหารยา

3

Sterility test



- การทดสอบว่าผลิตภัณฑ์มีความปราศจากเชื้อ เป็นหนึ่งในข้อกำหนดของ Sterile products เช่น Parenteral products, Ophthalmic preparation, NSS เป็นต้น
- ต้องทำภายใต้พื้นที่สะอาด Laminar air flow class A ภายในห้องสะอาด (Clean room) ระดับ Class B หรือทำโดยใช้ Isolator
- Media ที่ใช้ในการทดสอบ: Fluid thioglycolate medium (FTG) 30 – 35 °C และ Soybean casein digest medium (TSB) 20 – 25 °C
- ระยะเวลาในการบ่ม (Incubation): ไม่น้อยกว่า 14 วัน
- เกณฑ์ประเมิน: ต้องไม่มีเชื้อขึ้นทั้งใน FTG และ TSB

The test applied to substances, preparations, or articles which, according to the Pharmacopoeia, are required to be sterile. However, a satisfactory result only indicates that no contaminating microorganism has been found in the sample examined under the conditions of the test.

Ref. USP41 <71> Sterility tests p.5984

4

Sterility test



การทดสอบมี 2 วิธีหลัก คือ 1. Membrane filtration และ 2. Direct inoculation

Sample preparation: upside down & กลับขวดไปมาอย่างน้อย 20 ครั้ง & ทำความสะอาดภายนอกด้วย 70 % Alcohol

USP Rinsing and diluting fluid

Fluid A: Peptic digest >> Rinsing and diluting for membrane filtration

Fluid D: Fluid A + Tween 80 >> Neutralize preservative/ Wash membrane filter when testing ointment (lecithin, oil) or devices labeled as “Sterile pathway”

Fluid K: Fluid A + Beef extract + Tween 80 >> Wetting filter and washing filter for product contain petrolatum

Direct Inoculation

- เติมห่วงอย่างลงใน Media (FTG, TSB) Incubate ทั้งหมด 14 วัน
- เหมาะกับยาที่มีขนาดบรรจุน้อย และไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

Membrane Filtration

- นำตัวอย่างมากรองผ่าน Membrane filter 0.45 µm แล้ว rinse ด้วย Sterile rinsing solution แบ่งแผ่นกรอง 2 ส่วนลงใน TSB และ FTG Incubate 14 วัน
- เหมาะกับยาที่มีขนาดบรรจุมาก หรือมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

Growth promotion

Method suitability test

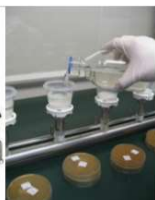
5



Dispenser		1 (TSB) day old				5 (TSB) day old			
Group	Treatment	Plastic	Treatment	Plastic	Negative control	Plastic	Treatment	Plastic	Treatment
Medium	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral



https://www.researchgate.net/figure/Sterility-testing-Above-The-content-of-all-tubes-was-clear-and-no-turbidity-was-seen_fig3_312372621



<https://www.npra.gov.my/images/Announcement/Archives/Slides-amv/AMV%20-%20STERILITY%20TEST.pdf>

6

Sterility

TABLE 3.

Table 2. Minimum Quantity to be Used for Each Medium

Quantity per Container	Minimum Quantity to be Used (unless otherwise justified and authorized)
Liquids	
Less than 1 mL	The whole contents of each container
1–40 mL	Half the contents of each container, but not less than 1 mL
Greater than 40 mL, and not greater than 100 mL	20 mL
Greater than 100 mL	10% of the contents of the container, but not less than 20 mL
Antibiotic liquids	1 mL
Insoluble preparations, creams, and ointments to be suspended or emulsified	Use the contents of each container to provide not less than 200 mg
Solids	
Less than 50 mg	The whole contents of each container
50 mg or more, but less than 300 mg	Half the contents of each container, but not less than 50 mg
300 mg–5 g	150 mg
Greater than 5 g	500 mg
Catgut and other surgical sutures for veterinary use	3 sections of a strand (each 30-cm long)
*Surgical dressing/cotton/gauze (in packages)	100 mg per package
Sutures and other individually packaged single-use material	The whole device
Other medical devices	The whole device, cut into pieces or disassembled,

Table 3. Minimum Number of Articles to be Tested in Relation to the Number of Articles in the Batch

Number of Items in the Batch*	Minimum Number of Items to be Tested for Each Medium (unless otherwise justified and authorized)**
Parenteral preparations	
Not more than 100 containers	10% or 4 containers, whichever is the greater
More than 100 but not more than 500 containers	10 containers
More than 500 containers	2% or 20 containers, whichever is less
*For large-volume parenterals	2% or 10 containers, whichever is less
Antibiotic solids	
Pharmacy bulk packages (<5 g)	20 containers
Pharmacy bulk packages (≥5 g)	6 containers
Bulks and blends	See Bulk solid products,
Ophthalmic and other noninjectable preparations	
Not more than 200 containers	5% or 2 containers, whichever is the greater

* If the batch size is unknown, use the maximum number of items prescribed.

** If the contents of one container are enough to inoculate the two media, this column gives the number of containers needed for both the media together.

7

Sterility

Table 3. Minimum Number of Articles to be Tested in Relation to the Number of Articles in the Batch (Continued)

Number of Items in the Batch*	Minimum Number of Items to be Tested for Each Medium (unless otherwise justified and authorized)**
More than 200 containers	10 containers
If the product is presented in the form of single-dose containers, apply the scheme shown above for preparations for parenteral use.	
Catgut and other surgical sutures for veterinary use	2% or 5 packages, whichever is the greater, up to a maximum total of 20 packages
*Not more than 100 articles	10% or 4 articles, whichever is greater
More than 100, but not more than 500 articles	10 articles
More than 500 articles	2% or 20 articles, whichever is less,
Bulk solid products	
Up to 4 containers	Each container
More than 4 containers, but not more than 50 containers	20% or 4 containers, whichever is greater
More than 50 containers	2% or 10 containers, whichever is greater

* If the batch size is unknown, use the maximum number of items prescribed.

** If the contents of one container are enough to inoculate the two media, this column gives the number of containers needed for both the media together.

The test may be carried out using the technique of *Membrane Filtration* or by *Direct Inoculation of the Culture Medium* with the product to be examined. Appropriate negative controls are included. The technique of membrane filtration is used whenever the nature of the product permits; that is, for filterable aqueous preparations, for alcoholic or oily preparations, and for preparations miscible with, or soluble in, aqueous or oily solvents, provided these solvents do not have an antimicrobial effect in the conditions of the test.

8

Sterility test



Growth promotion (positive control)

TSB: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*

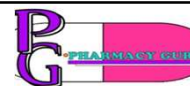
FTG: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

Bact. เจริญภายใน 3 วัน Fungi เจริญภายใน 5 วัน

Aerobic bacteria	Anaerobic bacteria	Fungi
<i>Staphylococcus aureus</i> (+) <i>Bacillus subtilis</i> (+) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	<i>Clostridium sporogenes</i> (-)	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>

9

Sterility test

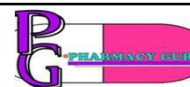


Method Suitability Test

- วัตถุประสงค์: วิธีการทดสอบสำหรับตัวอย่างที่ทำอยู่ ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ
- >> ตัวอย่าง + เชื้อ (NMT 100 cfu/tube) เติมนลงไปใน media (TSB, FTG)
- เกณฑ์กำหนด: ต้องพบการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบใน 5 วัน

10

Sterility test



Sample	Growth promotion	Negative control	Test suitability	Result	Validity	Result
A	G	G	G	NG	Invalid	Inconclusive
B	NG for fungi	NG	G	NG	Invalid	Inconclusive
C	G	NG	NG	NG	Invalid	Inconclusive
D	G (Count >100 cfu)	NG	G	NG	Invalid	Inconclusive
E	G	NG	G	NG	Valid	Negative
F	G	NG	G	G (Test environment contaminate)	Invalid	Inconclusive

11

Pyrogen



Pyrogens include any substance capable of eliciting a febrile (or fever) response upon injection or infection (e.g. endotoxin released in vivo by infecting bacteria)

Type of pyrogen

- **Endogenous pyrogens** เป็นสารที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเอง อย่าง Mediator หรือ Cytokines เช่น IL-1, IL-6, หรือ TNF-alpha เมื่อร่างกายเกิดการอักเสบหรือติดเชื้อจะหลั่งสาร cytokines ส่งกระแสเลือดผ่านไปยัง hypothalamus ซึ่งจะส่งสัญญาณผ่าน Arachidonic acid pathway เกิดกระบวนการที่ก่อให้เกิดไข้
- **Exogenous pyrogens**
 - **Microbial pyrogens:** Bacterial endotoxins (LPS from gram - bacteria), Peptidoglycans (cell wall of gram + and gram - bacteria), Bacterial exotoxin, Virus, Yeast, Mold
 - **Nonmicrobial pyrogens:** Antigen, Steroids, Adjuvant

12

Rabbit pyrogen test



- Gold standard
- วัดอุณหภูมิร่างกายของกระต่ายที่เพิ่ม/ลดภายหลังจากฉีด IV injection ของตัวอย่างหรือผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อที่ต้องการทดสอบ >> ฉีดเข้าที่ marginal vein (ด้านหลังใบหูกระต่าย)

ขั้นตอน	คำอธิบาย
Animal selection	1.5 kg and not used for pyrogen test for a certain time
Preliminary test	Inject warmed pyrogen-free 9 g/L NaCl No temperature variation greater than 0.6 Celsius
Main test	Inject 3 rabbit with specific amount and rate Monitor temperature for interval 30 minutes at initial injection until 3 hours

Response =

Temp. สูงสุดของกระต่ายหลังฉีดภายใน 3 ชม.

– Temp. อุณหภูมิของกระต่ายก่อนฉีด

Number of rabbits	Product passes if summed response does not exceed	Product fails if summed response exceeds
3	1.15 °C	2.65 °C
6	2.80 °C	4.30 °C
9	4.45 °C	5.95 °C
12	6.60 °C	6.60 °C

กระต่ายมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอาจทำให้เกิด False positive ได้ง่าย

13

Endotoxin test/LAL test



- **LAL test:** ใช้ Amoebocyte lysate จาก limulus polyphemus (ลิ้มเลือดแมงดาทะเล) ซึ่งเป็น Preclotting enzyme >>> เจอ Endotoxin >>> จะได้ Active clotting enzyme >>> เปลี่ยน Coagulogen เป็น Coagulin
- มี 3 วิธี ได้แก่ Gel-clot technique, Turbidimetric method, และ Chromogenic method

14

Endotoxin test/LAL test



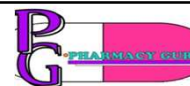
Gel-clot techniques

Product + lysate	+/-	
Standard endotoxin + product + lysate	+	ถ้าไม่ Clot = มี Interference
Standard endotoxin + water + lysate	+	ถ้าไม่ Clot = endotoxin/lysate มีปัญหา
Water + lysate	-	ถ้า Clot = technique มีปัญหา

ผลที่ปรากฏ	การอ่านผล	ปริมาณ Endotoxin ในหลอดทดลอง เมื่อเทียบกับความไวที่ระบุบนฉลากของ Reagent (λ)
เกิดการจับตัวเป็นก้อนเกาะติดกันหลอด	+	$\geq$
ไม่เกิดการจับเป็นก้อนแข็ง	-	$<$

15

Endotoxin test/LAL test



Turbidimetric method

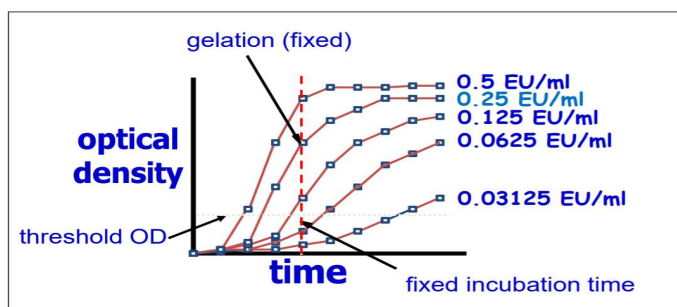
- การวิเคราะห์หาปริมาณ Endotoxin โดยดูความขุ่นของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยถ้าความเข้มข้นของ Endotoxin เพิ่มขึ้นก็จะทำให้ความขุ่นเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการตกตะกอน Coagulogen มากขึ้น

Biological assay: Safety Tests

Nongyao Sombdach

**Institution of Biological Products
Department of Medical Sciences
Ministry of Public Health**

March 11, 2016 By Nongyao Sombdach TBP.DM.Sc.

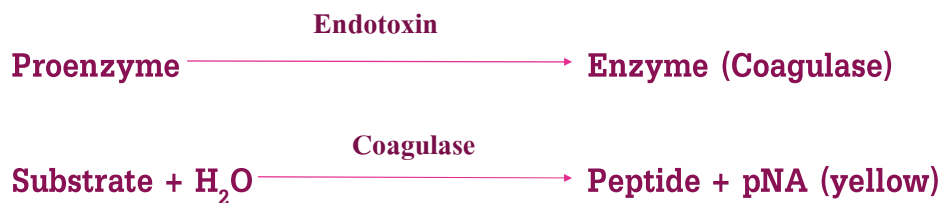


16

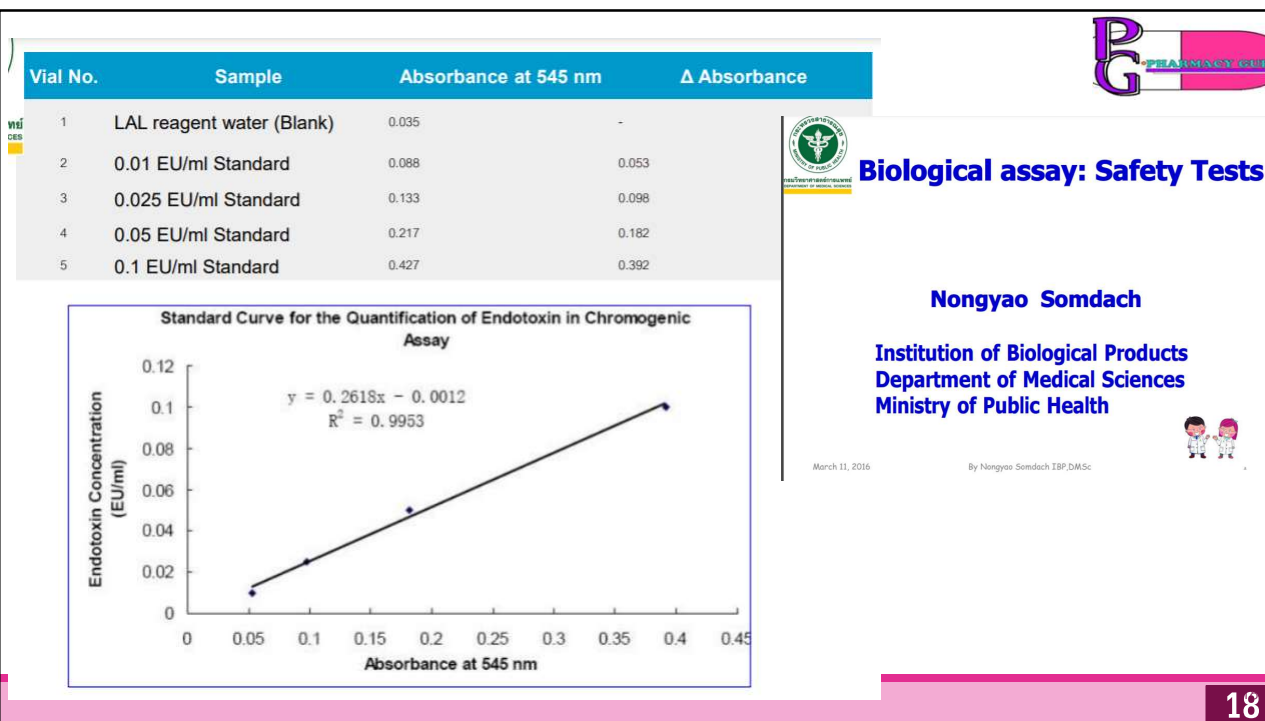
Endotoxin test/LAL test



Chromogenic method



17

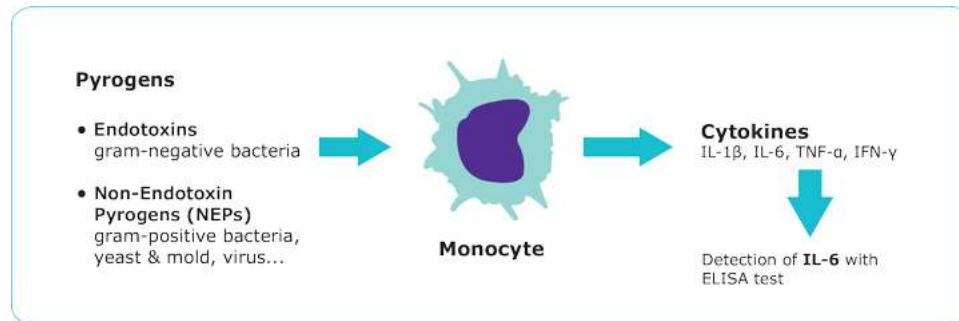


18

Monocyte activation test (MAT)



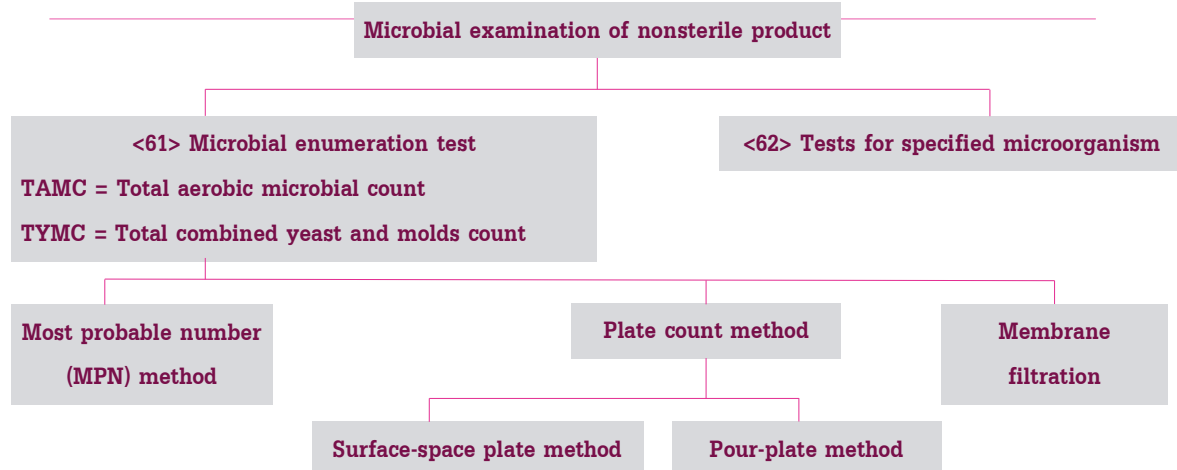
เป็นการทดสอบสารก่อไข้โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวและตรวจสอบเชิงปริมาณของการหลั่ง
Endogenous mediators เช่น TNF-alpha, IL6, IL1 หรือ IL8 โดยวิธี ELISA (Enzyme link
immunosorbent assay)



Ref. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology/monocyte-activation-test-for-pyrogen-detection.html>

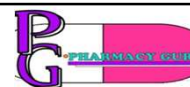
19

Microbial examination of nonsterile products



20

Microbial enumeration test



To perform quantitative enumerate of mesophilic bacteria and fungi that may grow under aerobic conditions

- Method suitability (Suitability of the Counting method in the Presence of product)
- Growth promotion of the media
 - *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, and *A. brasiliensis*
- Negative control
- Test method
 - Membrane filtration
 - Use 45 micron filter for, approximately, 1 g of sample
 - Transfer membrane filter on agar media and incubate (TAMC 3-5 days, TYMC 5-7 days)

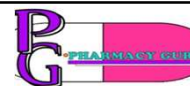
10^1 cfu: maximum acceptable count = 20;

10^2 cfu: maximum acceptable count = 200;

10^3 cfu: maximum acceptable count = 2000; and so forth.

21

Microbial enumeration test



▪ Test method

▪ Plate-count methods

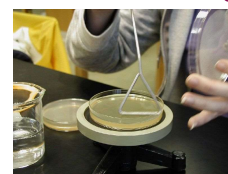
- Pour-plate method: 1 ml of sample and pour with media// Higher accuracy
- Surface-spread method: NLT 0.1 ml of sample



<https://www.sciencephoto.com/media/1150447/view/pour-plate-plating-method>

▪ MPN method

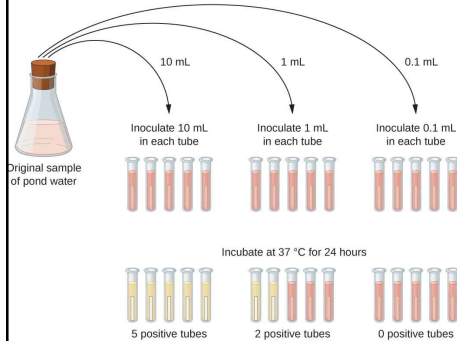
- Least accuracy and precision >> Used for TAMC when other method is not available
- Incubate and interpret by using specified table



<https://www.pinterest.com/pin/506232814336422077/>

22

Microbial enumeration test



<https://microbeonline.com/probable-number-mpn-test-principle-procedure-results/>

Observed Combinations of Numbers of Tubes Showing Growth in Each Set			MPN per g or per mL of Product	95% Confidence Limits
Number of g or mL of Product per Tube				
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	2	1	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	2	0	160	30-380
3	2	1	93	18-360
3	2	2	150	30-380
3	2	3	210	30-400
3	3	0	290	90-990
3	3	1	240	40-990
3	3	2	460	90-1980
3	3	3	1100	200-4000
3	3	3	>1100	

23

Test for specified microorganism

The determination of absence, or limited occurrence of specified microorganisms (Mostly pathogen)

- Bile-tolerant gram-negative bacteria
- *Escherichia coli*
- Salmonella
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- Clostridia
- *Candida albicans*

24

Test for specified microorganism

Growth Promotion and Inhibitory Properties of the Media

Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium prepared either from dehydrated medium or from ingredients. Verify suitable properties of relevant media as described in Table 1.

Table 1. Growth Promoting, Inhibitory, and Indicative Properties of Media

Test/Medium	Property	Test Strains
<i>Test for bile-tolerant Gram-negative bacteria</i>		
Enterobacteria Enrichment Broth Mossel	Growth promoting	<i>E. coli</i>
		<i>P. aeruginosa</i>
	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
Violet Red Bile Glucose Agar	Growth promoting + Indicative	<i>E. coli</i>
		<i>P. aeruginosa</i>
<i>Test for Escherichia coli</i>		
MacConkey Broth	Growth promoting	<i>E. coli</i>
	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
MacConkey Agar	Growth promoting + Indicative	<i>E. coli</i>
<i>Test for Salmonella</i>		
Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth	Growth promoting	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium or
		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
Xylose Lysine Deoxycholate Agar	Growth promoting + Indicative	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium or
		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
<i>Test for Pseudomonas aeruginosa</i>		
Cetrimide Agar	Growth promoting	<i>P. aeruginosa</i>
	Inhibitory	<i>E. coli</i>
<i>Test for Staphylococcus aureus</i>		
Mannitol Salt Agar	Growth promoting + Indicative	<i>S. aureus</i>
	Inhibitory	<i>E. coli</i>
<i>Test for Clostridia</i>		
Reinforced Medium for Clostridia	Growth promoting	<i>Cl. sporogenes</i>
Columbia Agar	Growth promoting	<i>Cl. sporogenes</i>
<i>Test for Candida albicans</i>		

<1111> Microbiological examination of nonsterile products: acceptance criteria for pharmaceutical preparation and substances for pharmaceutical uses

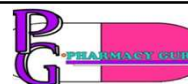


Table 1. Acceptance Criteria for Microbiological Quality of Nonsterile Dosage Forms

Route of Administration	Total Aerobic Microbial Count (cfu/g or cfu/mL)	Total Combined Yeasts/Molds Count (cfu/g or cfu/mL)	Specified Microorganism(s)
Nonaqueous preparations for oral use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Escherichia coli</i> (1 g or 1 mL)
Aqueous preparations for oral use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Escherichia coli</i> (1 g or 1 mL)
Rectal use	10 ²	10 ²	—
Oromucosal use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Gingival use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Cutaneous use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Nasal use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Auricular use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Vaginal use	10 ²	10 ²	Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Candida albicans</i> (1 g or 1 mL)
Transdermal patches (limits for one patch including adhesive layer and backing)	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 patch) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 patch)
Inhalation use (special requirements apply to liquid preparations for nebulization)	10 ²	10 ²	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL) Absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria (1 g or 1 mL)

Microbiological assay



วิเคราะห์คุณภาพของยาปฏิชีวนะ โดยใช้ Microbial assay เป็นการหาความแรงในการออกฤทธิ์ของยาโดยเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเมื่อใช้สภาวะการทดสอบเดียวกัน

มี 2 รูปแบบ คือ

- **Agar diffusion assay** อาศัยการแพร่ของยาไปในเนื้ออาหาร ทำให้เกิดวงใสของการยับยั้งเชื้อขึ้น ขนาดของวงใสจะผันแปรตามความเข้มข้นของยาที่ใช้
- **Turbidimetric assay** อาศัยการยับยั้งเชื้อในอาหารเหลว ทำให้ปริมาณการเจริญของเชื้อลดลงเมื่อปริมาณยามีมากขึ้น การวัดผล %T เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของยาในหลอดทดลอง

27

Microbiological assay



Agar Diffusion

One-dimension assay

(Agar tube diffusion assay)

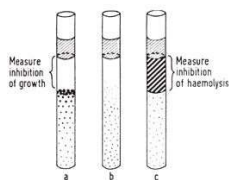
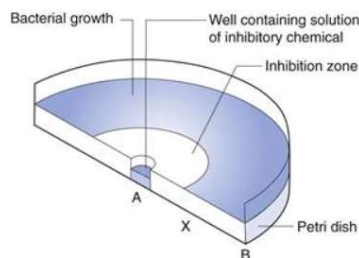


Figure 8.1 ■ Diagrammatic illustration of the one-dimensional assay. A: Assay of streptomycin with *Staphylococcus aureus* as test organism. B: Penicillin assay with *Staphylococcus aureus* as test organism. C: Penicillin assay with *Streptococcus pyogenes* in blood agar. (from Garrod LJ, Lambert H, O'Grady F. Antibiotics and chemotherapy. Edinburgh, United Kingdom: Churchill Livingstone, 1973, with permission.)

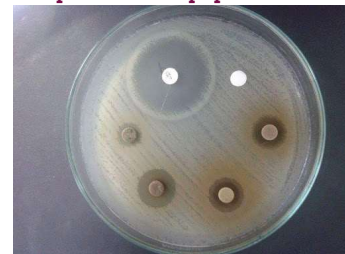
Two-dimension assay

(Agar plate diffusion assays: well method)



Three-dimension assay

(Agar plate diffusion assays: cup method & paper disc)



ตัวอย่างต้องละลายน้ำและแพร่ได้

ตัวอย่างแพร่ออก 2 ทิศทาง

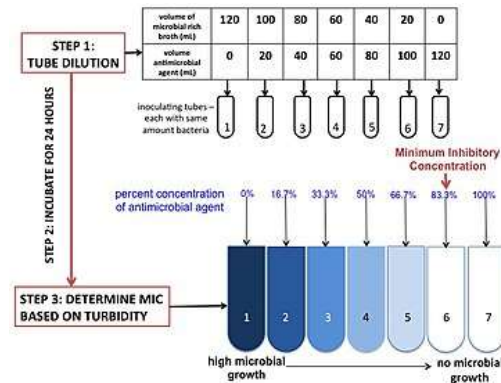
28

Microbiological assay



Turbidimetric method

การยับยั้งเชื้อในอาหารเหลว ดูความขุ่นของ
spectrophotometry
สร้าง Standard curve แล้วเอาตัวอย่างที่วัด
ได้ไปแปลผล



29

Test for preservative effectiveness



- การประเมินประสิทธิภาพสารกันบูด ทำได้โดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงในยาเตรียมสำเร็จรูป แล้วดูผลการออกฤทธิ์ของสารกันบูดเมื่อเก็บยานั้นไว้ในสภาพปกติ สารกันบูดต้องยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อหรือทำลายเชื้อได้ในช่วงเวลาที่เหมาะสม
- "Challenge test" คือ เติมน้ำเชื้อลงไปผลิตภัณฑ์ >> เก็บที่อุณหภูมิเหมาะสม >> เอาเชื้อมานับแล้วเทียบกับเกณฑ์
- ทำใน Multiple dose preparations โดยต้องทำใน packaging ที่เอาไปขายจริง (original containers)
- Test organisms ต้องทำทุกตัว: *A. niger*, *C. albican*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, และ *S.aureus*
- Test procedure: ใช้ตัวอย่าง 20 ml x 5 ขวด >> ใส่เชื้อประมาณ 0.5 - 1 % ของปริมาตรตัวอย่าง >> สุ่ม 0/7/14/21/28 วัน
- Evaluation: appearance ไม่เปลี่ยนแปลง และจำนวนเชื้อต้องลดลง (Log reduction) หรือไม่เพิ่มขึ้น (NI: not increase)

30

Test for preservative effectiveness

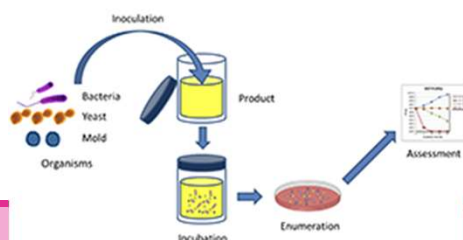


Pharmaceuticals, including sterile ophthalmics, sterile parenterals, sterile packaged ophthalmics, and sterile ophthalmics.

Table 1. Compendial Product Categories

Category	Product Description
1	Injections; other parenterals including emulsions, otic products, sterile nasal products, and ophthalmic products made with aqueous bases or vehicles
2	Topically used products made with aqueous bases or vehicles; nonsterile nasal products and emulsions, including those applied to mucous membranes
3	Oral products other than antacids, made with aqueous bases or vehicles
4	Antacids made with an aqueous base

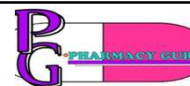
PROCEDURE



https://www.happi.com/issues/2021-10-01/view_features/preservative-efficacy-test-2020-practitioners-survey/

31

Test for preservative effectiveness



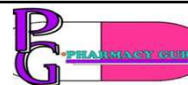
Pharmaceuticals, including sterile ophthalmics, sterile parenterals, sterile packaged ophthalmics, and sterile ophthalmics.

Table 2. Culture Conditions for Inoculum Preparation

Organism	Suitable Medium	Incubation Temperature	Inoculum Incubation Time	Microbial Recovery Incubation Time
<i>Escherichia coli</i> (ATCC No. 8739)	Soybean–Casein Digest Broth; Soybean–Casein Digest Agar	32.5 ± 2.5°	18–24 h	3–5 days
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC No. 9027)	Soybean–Casein Digest Broth; Soybean–Casein Digest Agar	32.5 ± 2.5°	18–24 h	3–5 days
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC No. 6538)	Soybean–Casein Digest Broth; Soybean–Casein Digest Agar	32.5 ± 2.5°	18–24 h	3–5 days
<i>Candida albicans</i> (ATCC No. 10231)	Sabouraud Dextrose Agar; Sabouraud Dextrose Broth	22.5 ± 2.5°	44–52 h	3–5 days
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC No. 16404)	Sabouraud Dextrose Agar; Sabouraud Dextrose Broth	22.5 ± 2.5°	6–10 days	3–7 days

32

Test for preservative effectiveness



Criteria for Antimicrobial Effectiveness

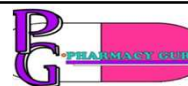
The requirements for antimicrobial effectiveness are met if the criteria specified in Table 3 are met (see •General Notices, 7. Test Results). • (CN 1-May-2018) "No increase" in counts is defined as NMT 0.5 log₁₀ unit more than the value to which it is compared.

Table 3. Criteria for Tested Microorganisms

For Category 1 Products	
Bacteria	NLT 1.0 log reduction from the initial calculated count at 7 days, NLT 3.0 log reduction from the initial count at 14 days, and no increase from the 14 days' count at 28 days
Yeast and molds	No increase from the initial calculated count at 7, 14, and 28 days
For Category 2 Products	
Bacteria	NLT 2.0 log reduction from the initial count at 14 days, and no increase from the 14 days' count at 28 days
Yeast and molds	No increase from the initial calculated count at 14 and 28 days
For Category 3 Products	
Bacteria	NLT 1.0 log reduction from the initial count at 14 days, and no increase from the 14 days' count at 28 days
Yeast and molds	No increase from the initial calculated count at 14 and 28 days
For Category 4 Products	
Bacteria, yeast, and molds	No increase from the initial calculated count at 14 and 28 days

33

หัวข้อควบคุมคุณภาพใดใน Ranitidine Injection ที่ไม่จำเป็นต้องทำ



- A. Identification
- B. pH
- C. Microbial limit
- D. Bacterial endotoxin
- E. Particulate matter

34



การควบคุมคุณภาพหัวข้อใดในตำรับยา Diclofenac eye drop solution ที่ไม่จำเป็นต้องทดสอบ

- A. pH
- B. Viscosity
- C. Sterility test
- D. Particulate matter
- E. Bacterial endotoxin

35



ผลการตรวจ Sterility test ต้องรอผลตรวจอย่างน้อยกี่วัน

- A. 5 วัน
- B. 7 วัน
- C. 14 วัน
- D. 21 วัน
- E. 28 วัน

36



วิธีการตรวจ Sterility test สำหรับ Ringer's solution ตำรับนี้
ต้องตรวจด้วยวิธีใด

- A. Direct inoculation method
- B. Membrane filtration method
- C. MPN method
- D. Pour plate method
- E. Spread plate method

37



การตรวจ Sterility test ทำให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์ปราศจากสิ่งใด

- A. Anaerobe bacteria
- B. Aerobe bacteria
- C. Anaerobe and aerobe bacteria
- D. Anaerobe, aerobe bacteria, Fungi
- E. Anaerobe, aerobe bacteria, fungi, virus

38