

MICROSPEC - Prüfvorschrift mpv 3

Konservierungs-Belastungstest (USP-Methode)

5 Stämme, getrennte Beimpfung (5 Behälter)

A Folgende Keime kommen zum Einsatz:

1. Bakterien:
 - 1.1. Staphylococcus aureus DSM 799 / ATTC 6538
 - 1.2. Pseudomonas aeruginosa DSM 1128 / ATTC 9027
 - 1.3. Escherichia coli DSM 1576 / ATTC 8739
2. Pilze
 - 2.1. Candida albicans DSM 1386 / ATTC 10231
 - 2.2. Aspergillus niger DSM 1988 / ATTC 16404

B Herstellung der Keim-Suspensionen für die Belastung

1. Bakterien und Hefen werden von den Stammkulturen abgeimpft, auf CaSo- bzw. Sabouraud-Agar ausgestrichen und 24 Std. bei 30°C bebrütet. Schimmelpilze (Aspergillus niger) werden von der Stammkultur auf Sabouraud-Agar abgeimpft und bei 30°C solange bebrütet bis die Sporenbildung eingesetzt hat (in der Regel etwa 5 Tage).
2. Kolonien werden mit der Öse abgehoben und in NaCl-Pepton-Puffer suspendiert: Dazu werden die Kolonien mit der Öse am Glasrand verrieben und anschließend mit dem Schüttler gut gemischt. Die Aspergillus-Sporen werden mit NaCl-Pepton-Puffer mit Tween-Zusatz abgeschwemmt.
Die Keimdichte der Bakteriensuspensionen werden auf ca. 10^8 /ml und der Pilzsuspensionen auf ca. 10^7 /ml bis 10^8 /ml eingestellt = Belastungs-Suspensionen

C Belastung der Produkt-Proben

1. 5 x 20 g Produktprobe werden in geeignete Behälter z.B. 50 ml Salbendosen aus PP abgefüllt.
Im Idealfall wird der Test mit Originalbehältern durchgeführt.
2. Je 100µl jeder Impfsuspension wird in je 1 Probe eingeimpft. Die beimpften Proben werden mit einem geeigneten Spatel gut vermischt.
Falls keine 20g Produkt vorhanden sein sollten, wird die vorhandene Menge im Verhältnis 1:200 beimpft.
3. Beimpfte Proben werden im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 +/- 2°C aufbewahrt.

MICROSPEC - Prüfvorschrift mpv 3

D Keimzahlbestimmung an den Belastungs-Suspensionen

1. Die Belastungs-Suspensionen werden in einer Verdünnungsreihe bis zu den Verdünnungsstufen 10^{-6} mit NaCl-Pepton-Puffer verdünnt.
2. Je 50 µl der 2 letzten Verdünnungsstufen werden auf CaSo-Agar bzw. Sabouraud-Agar ausspiraliert. Bei Bedarf können auch andere Mengen bzw. Verdünnungsstufen ausspiraliert werden.
3. Die Platten werden 24 – 48 Std. bei 25 - 30°C bebrütet, die Kolonien ausgezählt und gemäß mpv5 ausgewertet.

E Keimzahlbestimmungen an den belasteten Proben gemäß mpv5

Die Keimzahlbestimmung an den belasteten Proben erfolgt nach 7, 14, 21 und 28 Tagen.

1. Die Proben werden gut mit einem Spatel durchmischt. 1 g Produkt wird in einen Stomacher-Beutel eingewogen, 9 ml Verdünnungsmittel CLP hinzugefügt und im Stomacher vollständig vermischt.
2. 50 µl der mit Bakterien-belasteten, verdünnten Probe werden auf CaSo-Agar ausspiraliert und 50 µl der mit Pilzen-belasteten, verdünnten Probe werden auf Sabouraud-Agar ausspiraliert. Bei Bedarf können auch 100 µl bzw. 200 µl ausspiraliert werden.
3. Die Platten werden 2-3 Tage bei 25-30 °C bebrütet. Die Kolonien werden ausgezählt und die Keimzahl der Probe gemäß mpv5 ermittelt. Die Keimzahl/g Produkt wird für jeden Teststamm getrennt angegeben.

F. Bericht

Der Test wird nach der Auswertung des 14 Tage-Wertes und nach Rücksprache mit dem Auftraggeber abgebrochen, wenn die Kriterien zum Bestehen des Tests eindeutig nicht erfüllt sind.

Nach Abschluss der Bestimmungen wird ein Bericht erstellt und die Konservierung des Produkts gemäß den Anforderungen der USP beurteilt.

G. Materialien

siehe Liste „Materialien in der Mikrobiologie“

Anhang: Beimpfungsprotokoll mpv 3+4
 Berichtvorlage mpv 3