การทดสอบความปราศจากเชื้อ (Sterility Test)

บทความวิชาการเพื่อการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์

2.0 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง
รหัส 1001-1-000-003-10-2565
วันที่รับรอง 21 พฤศจิกายน 2565
วันที่หมดอายุ 20 พฤศจิกายน 2566

รศ. ภญ. ดร. มะลิ วิโรจน์แสงทอง
ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

หลังจากศึกษาบทความนี้จบแล้ว

1. ผู้อ่านมีความรู้ความเข้าใจหลักการและวิธีการ รวมทั้งข้อจำกัดของการทดสอบความปราศจากเชื้อของผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ
2. ผู้อ่านสามารถประเมินผลการทดสอบและมีความรู้ความเข้าใจการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบความปราศจากเชื้อของผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อได้

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ (compounded sterile preparations, CSPs) หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อทางจุลชีววิทยาเป็นเรื่องที่สำคัญมากโดยเฉพาะการทดสอบความปราศจากเชื้อ (sterility test) ซึ่งมี 2 วิธี คือ direct inoculation method และ membrane filtration method ทั้ง 2 วิธี ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด เหมือนกันซึ่งใช้ตรวจหาแบคทีเรียทั้งชนิดไม่พึ่งอากาศ (anaerobic bacteria) และชนิดพึ่งอากาศ (aerobic bacteria) รวมทั้งยีสต์และรา การทดสอบความปราศจากเชื้อเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยตรวจหาการปนเปื้อนแบคทีเรีย ยีสต์และราว่าพบหรือไม่พบ จากการสังเกตความขุ่นของอาหารเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 14 วัน การนำผลทดสอบตัวอย่างมารับรองผลิตภัณฑ์ทั้งรุ่นผลิต (batch) ควรจะต้องมีวิธีการสุ่มตัวอย่างที่มีมาตรฐาน มีจำนวนตัวอย่างและปริมาณตัวอย่างอย่างน้อยที่สุดตามที่ระบุในเภสัชตำรับ การแปลผลทดสอบจะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งได้แก่ method suitability test และ growth promotion test รวมทั้งจะต้องมีการตรวจติดตามทางจุลชีววิทยา (microbiological monitoring) ของสิ่งแวดล้อมด้วย

คำสำคัญ: การทดสอบความปราศจากเชื้อ ผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี

บทนำ

ผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ (compounded sterile preparations, CSPs) ได้แก่ ยา ผลิตภัณฑ์ชีววัตถุ (compounded biologics) วัสดุหรือเครื่องมือทางการแพทย์ (medical devices) สารวินิจฉัย (diagnostics) สารอาหาร (nutrients) และสารเภสัชรังสี (radiopharmaceuticals) ที่ต้องปราศจากเชื้อเมื่อให้แก่ผู้ป่วย เช่น สารละลายที่ใช้กับหลอดลม (aqueous bronchial), ยาสูดพ่นทางจมูก (nasal inhalations), สารที่ใช้อาบและแช่อวัยวะและเนื้อเยื่อสด ยาฉีดและอุปกรณ์ สารชะล้างแผลและช่องว่างในลำตัว (irrigations for wounds and body cavities), ยาตา เนื้อเยื่อที่ปลูกฝัง (tissue implants)[1-2] คำว่า “ปราศจากเชื้อ” ในที่นี้หมายถึงปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอกผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live-attenuated vaccine), วัคซีนลูกผสม (chimeric vaccine), วัคซีนพาหะ (vector vaccine) จะมีเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในวัคซีน[3] การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ ได้แก่ การทดสอบทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยา และการควบคุมสิ่งแวดล้อม เป็นเรื่องที่สำคัญมาก โดยเฉพาะการทดสอบหลักทางจุลชีววิทยาคือการทดสอบความปราศจากเชื้อ (sterility test)[4] ผู้ปฏิบัติการทดสอบต้องมีทักษะและความเชี่ยวชาญ เภสัชกรที่ทำงานเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อควรจะต้องเข้าใจหลักการและวิธีการทดสอบ การหาจำนวนและปริมาณตัวอย่างทดสอบ การแปลผลทดสอบ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีซึ่งรวมถึงการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี โดยอ้างอิงตามที่ระบุในเภสัชตำรับ[2,5] และข้อจำกัดของการทดสอบ

หลักการและวิธีการทดสอบ

หลักการทดสอบความปราศจากเชื้อคือการตรวจหาจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อาจมีในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในอาหารเหลวและอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อบ่มถึงเวลาที่เหมาะสม จุลินทรีย์ในอาหารเหลวจะเจริญและสังเกตเห็นความขุ่นของอาหารได้ด้วยตาเปล่า โดยการทดสอบต้องกระทำด้วยความระมัดระวังด้วยการใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ในสถานที่และสิ่งแวดล้อมที่เป็นห้องสะอาด มี air filter, laminar air flow มีการควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์ระหว่างปฏิบัติการ[2,5] รวมทั้งเครื่องแต่งกายของผู้ทดสอบควรเป็นชุดที่ปกปิดไม่มีช่องว่าง ปราศจากเชื้อ เป็นผ้าที่ปราศจากไฟฟ้าสถิต (static-free clothing) สวมหน้ากาก หมวก และรองเท้า[5]

การทดสอบความปราศจากเชื้อมี 2 วิธี คือ direct inoculation method และ membrane filtration method ทั้ง 2 วิธี ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด เหมือนกันคือ Fluid Thioglycollate Medium (FTM) และ Tryptic Soy Broth (TSB) โดย FTM บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 14 วัน[5] โดยการสังเกตผลทุกวัน หากสังเกตเห็นความขุ่นของอาหารก่อน 14 วัน ก็สามารถแปลผลได้ก่อน

สาเหตุที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด เนื่องจาก FTM ใช้ตรวจหาแบคทีเรียทั้งชนิดไม่พึ่งอากาศ (anaerobic bacteria) และชนิดพึ่งอากาศ (aerobic bacteria) ส่วน TSB ใช้ตรวจหาแบคทีเรียพึ่งอากาศ ยีสต์และรา[2] ซึ่งครอบคลุมเชื้อปนเปื้อนส่วนใหญ่ในผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อ[6-7] อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมแล้ว ถ้ายังไม่ใช้ควรเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเก็บนานเกินระยะเวลาที่กำหนดโดยห้องปฏิบัติการ จะต้องตรวจสอบอายุการใช้งานของอาหารแต่ละชนิดด้วย และ FTM ก่อนใช้ต้องตรวจดูว่าสีชมพู (ที่เกิดจาก redox indicator คือ resazurin ซึ่งแสดงถึงปริมาณออกซิเจนในอาหาร) ที่ผิวของอาหารต้องไม่เกินหนึ่งในสามของความลึกของอาหารทั้งหมด ถ้าเกินให้นำอาหารไปอุ่นใน water bath เพื่อไล่ออกซิเจนส่วนเกินออก[2,5] เพื่อเอื้อให้แบคทีเรียไม่พึ่งอากาศเจริญได้ด้วย และไม่ควรอุ่นอาหารซ้ำ กรณีผลิตภัณฑ์มีปรอทเป็นสารกันเสีย (preservative) จะใช้วิธี membrane filtration ไม่ได้ ให้ใช้วิธี direct inoculation และ FTM แทน TSB และบ่มกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ควรจะต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีด้วยการทำ Growth Promotion Test กับเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดไม่พึ่งอากาศและชนิดพึ่งอากาศ รวมทั้งยีสต์และราด้วย[5]

ในการทดสอบทุกครั้งจะต้องทำชุดควบคุม (controls) ควบคู่ไปด้วย ได้แก่ media control, negative control (ใช้สารชะล้างหรือสารเจือจางแทนตัวอย่าง) ผลที่ได้ต้องไม่มีเชื้อขึ้น เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดสอบและเพื่อให้แน่ใจว่าผลการทดสอบที่ได้นั้นน่าเชื่อถือได้ ทั้งนี้จะต้องมีข้อมูลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมาก่อนการทดสอบ[2,5]

วิธี direct inoculation เป็นการนำตัวอย่างใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง แล้วบ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามกำหนด นิยมใช้กับตัวอย่างที่มีขนาดบรรจุหรือปริมาตรน้อย เช่น แบบ single use โดยตัวอย่างต้องมีปริมาตรไม่เกินร้อยละ 10 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้อาหารยังมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ และเมื่อเพาะตัวอย่างลงในอาหารควรกดให้ตัวอย่างซึมซับอาหารได้ทั้งหมด ตัวอย่างอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ในกรณีตัวอย่างมีปริมาตรมากอาจใช้อาหารที่มีความเข้มข้น (concentrated medium) แล้วนำมาเจือจางภายหลังหรือเติมอาหารเข้มข้นลงในภาชนะของตัวอย่างก็ได้[2] ถ้าตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเชื้ออาจใช้สารสะเทินฤทธิ์ (neutralizer) ที่เหมาะสมหรือเจือจางตัวอย่างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ[2,5] หรืออาจเพิ่มปริมาตรอาหารได้ถึง 2 ลิตรหรือมากกว่าจนตัวอย่างหมดฤทธิ์ต้านเชื้อ[5] ในทางปฏิบัติตัวอย่างที่มีปริมาตรมากหรือมีฤทธิ์ต้านเชื้อ มักจะไม่ใช้วิธีนี้

สารสะเทินฤทธิ์ที่เหมาะสม เช่น β-lactam antibiotic อาจใช้ β-lactamase[2,5] สารสะเทินฤทธิ์ทั่วไปสำหรับตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ดังปรากฏในตารางที่ 1[8]

ตัวอย่างที่เหมาะกับวิธีนี้ คือตัวอย่างที่ไม่สามารถเตรียมเป็นสารละลายและกรองได้ หรือเป็นตัวอย่างปริมาตรน้อย เช่น sterile gauze, cotton ball, cotton swab, needle, single-use product, small device, small volume drug, preservative-free liquid products

ตารางที่ 1 สารสะเทินฤทธิ์ทั่วไปสำหรับตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ[8]

Interfering Substance	Potential Neutralizing Method
Glutaraldehyde, mercurials	Sodium hydrogensulfite (sodium bisulfite)
Phenolics, ethanol, aldehydes, sorbate	Dilution
Aldehydes	Glycine
Quaternary Ammonium Compounds (QACs), parahydroxy benzoates (parabens), bisbiguanides	Lecithin
QACs, iodine, parabens	Polysorbate
Mercurials	Thioglycolate
Mercurials, halogens, aldehydes	Thiosulfate
EDTA (edetate)	Mg^{2+} or Ca^{2+} ions

วิธี membrane filtration เป็นการนำตัวอย่างมากรองด้วยแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูเท่ากับหรือน้อยกว่า 0.45 ไมครอน ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 47[5] หรือ 50[2] มม. [โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอาจปรับเปลี่ยนได้แต่ปริมาณสารชะล้าง (rinsing fluid) หรือสารเจือจาง (diluent) ที่จะกล่าวต่อไปก็ควรปรับเปลี่ยนด้วย] จากนั้นนำแผ่นเยื่อกรองมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ[2,5] หรืออาจตัดแบ่งครึ่งก่อนแล้วนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด[5] (กรณีตัวอย่างมีจำนวนจำกัด) หรือถ้าใช้ชุดกรองสำเร็จรูปพร้อมเครื่องที่ทำงานแบบระบบปิด (closed sterility test system) ก็สามารถเติมอาหารลงในภาชนะที่มีเยื่อกรองหลังกรองตัวอย่างแล้ว[2] จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

กรณีใช้ชุดกรองที่ต้องประกอบเอง การทำให้ปราศจากเชื้อสามารถกระทำได้ทั้งแบบที่ประกอบชุดกรองทั้งชุดหรือแยกส่วนประกอบชุดกรอง แต่ถ้าตัวอย่างเป็นน้ำมัน ควรจะแยกส่วนประกอบชุดกรองแล้วทำให้ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งก่อนประกอบชุดกรอง[5]

ควรเลือกชนิดของเยื่อกรองให้เหมาะกับชนิดของตัวอย่างที่จะกรอง เช่น

- Cellulose nitrate filter เหมาะกับตัวอย่างที่ละลายน้ำ ตัวอย่างที่เป็นไขมัน หรือสารละลายที่มีแอลกอฮอลปริมาณต่ำ (weakly alcoholic solutions) [2]
- Cellulose acetate filter เหมาะกับตัวอย่างที่มีแอลกอฮอลปริมาณสูง (strongly alcoholic solutions) [2]
- Polyvinylidene difluoride filter (PVDF) มีคุณสมบัติจับกับสารอื่นต่ำ (low-binding filter) จึงเหมาะกับตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ [9]

สารชะล้างหรือสารเจือจาง มีประโยชน์ในการช่วยชะล้างสารยับยั้งเชื้อที่คั่งค้างอยู่บนเยื่อกรอง ก่อนกรองตัวอย่างควรใช้สารนี้ปริมาณเล็กน้อยหยดให้ทั่วเยื่อกรองก่อนที่จะกรองตัวอย่างเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่เยื่อกรองและสะดวกในการกรอง สารนี้ยังมีประโยชน์ในแง่ช่วยให้ตัวอย่างที่ข้นหนืดเจือจางลงและช่วยให้ตัวอย่างที่ไม่ละลายสามารถเข้ากับน้ำได้ สารเจือจางบางชนิดก็มีฤทธิ์เป็น neutralizer ด้วย

การชะล้างสารยับยั้งเชื้อที่คั่งค้างอยู่บนเยื่อกรอง ใช้รอบละ 100 มล. อย่างน้อยที่สุด 3 รอบ อย่างมากที่สุดไม่เกิน 5 รอบ ถึงแม้ว่าระหว่างการตรวจสอบความเหมาะสมของวิธี พบว่าการชะล้าง 5 รอบนั้นไม่สามารถกำจัดฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้สมบูรณ์[2]

สารชะล้างหรือสารเจือจาง ตามที่ระบุในเภสัชตำรับของสหรัฐอเมริกา ได้แก่[2]

- Fluid A ประกอบด้วย peptone (ร้อยละ 0.1) pH 7.1± 0.2 เหมาะกับตัวอย่างที่ละลายน้ำได้ ช่วยละลาย และเจือจางตัวอย่าง ช่วยให้จุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมาในตัวอย่างได้ฟื้นฟู
- Fluid D ประกอบด้วย Fluid A และ polysorbate 80 (ร้อยละ 0.1) เหมาะกับตัวอย่างที่มี lecithin หรือน้ำมัน ตัวอย่างที่เป็น sterile pathway device เนื่องจาก polysorbate 80 มีคุณสมบัติเป็นตัวทำอิมัลชั่น
- Fluid K ประกอบด้วย peptone (ร้อยละ 0.5), beef extract (ร้อยละ 0.3) และ polysorbate 80 (ร้อยละ 1) เหมาะกับตัวอย่างที่มี petrolatum หรือตัวอย่างที่เป็นน้ำมันหรือสารละลายน้ำมัน เนื่องจาก polysorbate 80 มีคุณสมบัติเป็นตัวทำอิมัลชั่น ส่วน peptone, beef extract ช่วยให้จุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมาในตัวอย่างและบาดเจ็บหรือเจริญยากได้ฟื้นฟู

ตัวอย่างที่เหมาะกับวิธีนี้ คือผลิตภัณฑ์ที่สามารถเตรียมเป็นสารละลายและกรองได้ หรือมีปริมาตรมาก เช่น prefilled syringe, normal saline, water for injection, large-volume product หรือผลิตภัณฑ์ที่มีสารกันเสีย (preservative-containing product) ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และวัสดุทางการแพทย์ที่มีช่องทางภายใน (pathway devices)

การหาจำนวนและปริมาณตัวอย่างทดสอบ

ผลการทดสอบที่ไม่พบความขุ่นทั้งในขวดอาหารตัวอย่างและขวดอาหาร negative control เป็นการรับรองตัวอย่างที่ทดสอบว่าปราศจากเชื้อภายใต้สภาวะที่ทดสอบ[5] การที่จะนำผลทดสอบมารับรองผลิตภัณฑ์ทั้งรุ่นผลิต (batch) ควรจะต้องมีวิธีการสุ่มตัวอย่างที่มีมาตรฐาน มีจำนวนตัวอย่างและปริมาณตัวอย่างอย่างน้อยที่สุด ตามที่ระบุในเภสัชตำรับ เช่น เภสัชตำรับไทยระบุจำนวนตัวอย่างน้อยที่สุดที่ใช้ทดสอบความปราศจากเชื้อสัมพันธ์กับจำนวนผลิตในแต่ละรุ่นในตารางที่ 2 และปริมาตรตัวอย่างอย่างน้อยที่สุดต่อภาชนะต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในตารางที่ 3[5] ยกตัวอย่างการหาจำนวนตัวอย่างทดสอบ

- ยาฉีดปริมาตรน้อย ถ้าผลิตจำนวนมากกว่า 100 ขวด แต่ไม่ถึง 500 ขวด จะใช้ 10 ตัวอย่าง แต่ถ้าผลิตมากกว่า 500 ขวด จะใช้ตัวอย่างร้อยละ 2 หรือ 20 ขวด โดยให้เลือกจำนวนที่น้อยกว่า เช่น ผลิตทั้งรุ่น 600 ขวด ร้อยละ 2 คือ 12 ซึ่งน้อยกว่า 20 ให้เลือก 12 ดังนั้นจะใช้ทดสอบ 12 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

- ยาฉีดปริมาตรมาก จะใช้ตัวอย่างร้อยละ 2 หรือ 10 ขวด โดยให้เลือกจำนวนที่น้อยกว่า เช่น ผลิตทั้งรุ่น 600 ขวด ร้อยละ 2 คือ 12 ซึ่งมากกว่า 10 ให้เลือก 10 ดังนั้นจะใช้ทดสอบ 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างน้อยที่สุดที่ใช้ทดสอบความปราศจากเชื้อสัมพันธ์กับจำนวนผลิตในแต่ละรุ่น[5]

Number of Articles in the Batch	Number of Articles to Be Tested
Injections/for Injections	
Not more than 100 articles	10 per cent or 4 articles, whichever is greater
More than 100 but not more than 500 articles	10 articles
More than 500 articles	2 per cent or 20 articles, whichever is less
For large-volume parenterals	2 per cent 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 *Solid Bulk Products*
Products Not Intended for Injection	
Not more than 200 articles	5 per cent or 2 articles, whichever is greater
More than 200 articles	10 articles
Devices	
Not more than 100 articles	10 per cent or 4 articles, whichever is greater
More than 100 but not more than 500 articles	10 articles
More than 500 articles	2 per cent or 20 articles, whichever is less
Solid Bulk Products	
Up to 4 containers	Each container
More than 4 but not more than 50 containers	20 per cent or 4 containers, whichever is greater
More than 50 containers	2 per cent or 10 containers, whichever is greater

ยกตัวอย่างการหาปริมาณตัวอย่างทดสอบ

- ถ้าปริมาณตัวอย่างต่อภาชนะน้อยกว่า 10 มล. ให้ใช้ 1 มล. (หรือถ้าน้อยกว่า 1 มล. ให้ใช้ทั้งหมด) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยวิธี direct inoculation ใช้อาหารชนิดละ 15 มล. และวิธี membrane filtration ใช้อาหารชนิดละ 100 มล. (ตารางที่ 3)
- ถ้าปริมาณตัวอย่างต่อภาชนะเท่ากับ 60 มล. และเป็นแบบให้ทางหลอดเลือดดำ ให้ใช้ 30 มล. ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยวิธี direct inoculation ใช้อาหารชนิดละ 200 มล. และวิธี membrane filtration ใช้อาหารชนิดละ 100 มล. (ตารางที่ 3)
- ถ้าปริมาณตัวอย่างต่อภาชนะต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดไม่เพียงพอ ให้เพิ่มจำนวนตัวอย่างเป็นสองเท่า[2,5]

ตารางที่ 3 ปริมาณตัวอย่างอย่างน้อยที่สุดต่อภาชนะต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด[5]

Container Content (ml)	Minimum Volume Taken from Each Product Container for Each Medium	Minimum Volume, in ml, of Each Medium	
		Used for Direct Inoculation of Volume Taken from Each Container**	Used for Membrane or Half Membrane Representing Total Required Volume from the Appropriate Number of Containers
Less than 10	1 ml, or entire contents if less than 1 ml	15	100
10 to less than 50	5 ml	40	100
50 to less than 100	10 ml	80	100
50 to less than 100, intended for intravenous administration	1/2 content	200	100
100 to 500	1/2 content	NA***	100
Over 500	500 ml	NA	100
Antibiotics (liquid)	1 ml	NA	100

*Constitute powder products according to the manufacturer's instructions, and then treat as liquid products.
**For products that cannot be tested by the membrane filtration test procedure.
***Not applicable.

การแปลผลทดสอบ

การแปลผลทดสอบในระหว่างเวลาของการบ่ม 14 วัน ควรจะสังเกตทุกวัน เมื่อพบเห็นความขุ่นของอาหารด้วยตาเปล่า จะแสดงถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ถ้าไม่พบการเจริญของเชื้อแสดงว่าตัวอย่างที่นำมาทดสอบผ่านการทดสอบความปราศจากเชื้อ ทั้งนี้จะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมาก่อน ซึ่งจะกล่าวต่อไป

ถ้าพบการเจริญของเชื้อในตัวอย่างและไม่พบการเจริญของเชื้อใน negative control และ media control แสดงว่าตัวอย่างไม่ผ่านการทดสอบ อย่างไรก็ดีหากพบว่าสาเหตุที่ทำให้ไม่ผ่านการทดสอบนั้นไม่เกี่ยวข้องกับตัวอย่าง ได้แก่

1. ทบทวนกระบวนการทดสอบแล้วพบข้อผิดพลาด
2. Negative control พบการเจริญของเชื้อ
3. การตรวจติดตามทางจุลชีววิทยา (microbiological monitoring) ของสิ่งแวดล้อมในการทดสอบพบเชื้อปนเปื้อน เกินกำหนด
4. เมื่อตรวจชนิดของเชื้อในตัวอย่าง พบว่าเป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในการตรวจติดตามทางจุลชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมในการทดสอบ เช่น เชื้อปนเปื้อนในอากาศ วัสดุทดสอบ เครื่องมือ หรือตัวผู้ทดสอบ

หากพบเหตุการณ์ดังกล่าวให้ทำการทดสอบใหม่โดยใช้จำนวนตัวอย่างเท่าเดิม ถ้าไม่พบการเจริญของเชื้อ แสดงว่าตัวอย่างผ่านการทดสอบ ถ้าพบการเจริญของเชื้อแสดงว่าตัวอย่างไม่ผ่านการทดสอบ

กรณีที่ตัวอย่างทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นตั้งแต่วันแรกของการทดสอบ ให้บ่มตัวอย่างกับอาหารไปจนครบ 14 วัน แล้วย้ายบางส่วนของอาหารที่ขุ่นอย่างน้อย 1 มล. ไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และบ่มไม่น้อยกว่า 4 วัน จากนั้นให้สังเกตผลทดสอบตามปกติ

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ประกอบด้วย 2 การทดสอบได้แก่ growth promotion test และ method suitability test

Growth promotion test เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อว่าสามารถสนับสนุนการเจริญของเชื้อที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ได้ โดยการเพาะเชื้อทดสอบที่เป็นเชื้อมาตรฐาน (เภสัชตำรับสหรัฐอเมริกากำหนดให้เพาะเลี้ยงได้ไม่เกิน 5 รุ่น นับจาก master seed-lot[2]) ไม่เกิน 100 colony forming unit (CFU) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด และบ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามกำหนด[2,5] โดยเชื้อแบคทีเรียจะใช้เวลาไม่เกิน 3 วัน ส่วนยีสต์และราจะใช้เวลาไม่เกิน 5 วัน[2] อย่างไรก็ดีเภสัชตำรับไทยระบุเชื้อทดสอบมาตรฐานพร้อมสภาวะในตารางที่ 4 และเชื้อจะเจริญใช้เวลาไม่เกิน 5 วัน[5] ผลที่ได้ควรมีเชื้อขึ้นจนสังเกตเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า

Growth promotion test จะกระทำทุกครั้งที่อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยน lot number [2] ไม่จำเป็นต้องทำทุกครั้งที่ทดสอบตัวอย่าง

ตารางที่ 4 เชื้อมาตรฐานที่ใช้ใน Growth Promotion Test และ Method Suitability Test[5]

Medium	Test Micro-organisms	Incubation Conditions	Incubation Temperature
Fluid Thioglycolate Medium	*Staphylococcus aureus* (ATCC[1] 6538, DMST[2] 8013)*	Aerobic	30° to 35°
	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027, DMST 15501)**		
	Clostridium sporogenes (ATCC 11437, DMST 15536)†		
Alternative Thioglycolate Medium	*Clostridium sporogenes* (ATCC 11437, DMST 15536)†	Anaerobic	30° to 35°
Soybean-Casein Digest Medium	*Bacillus subtilis* (ATCC 6633, DMST 5871)	Aerobic	20° to 25°
	Candida albicans (ATCC 10231, DMST 5815)		
	Aspergillus niger (ATCC 16404, DMST 15538)		

*An alternative strain is *Bacillus subtilis* (ATCC 6633, DMST 5871).
**An alternative strain is *Micrococcus luteus* (ATCC 9341, DMST 15503).
†An alternative strain is *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482, DMST 15535).
[1]ATCC = American Type Culture Collection
[2]DMST = Department of Medical Sciences, Thailand

Method suitability test เป็นวิธีทดสอบความเหมาะสมของวิธีว่าสามารถตรวจหาการเจริญของเชื้อที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ได้ โดยการจำลองวิธีทดสอบความปราศจากเชื้อแต่เพาะเชื้อทดสอบที่เป็นเชื้อมาตรฐานไม่เกิน 100 CFU ไปกับตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยวิธี membrane

filtration ให้เติมเชื้อในรอบสุดท้ายของการใช้สารชะล้างแผ่นกรองหลังกรองตัวอย่าง[2] และบ่มที่อุณหภูมิตามกำหนด ถ้าอ้างอิงเภสัชตำรับไทยให้ใช้สภาวะตามตารางที่ 4 ผลที่ได้ควรมีเชื้อขึ้นจนสังเกตเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าภายใน 7 วัน โดยต้องพบทั้งในขวดตัวอย่าง (เพาะเชื้อทดสอบกับตัวอย่างในอาหาร) และขวดควบคุม (เพาะเชื้อทดสอบในอาหารแต่ไม่มีตัวอย่าง) หากไม่มีเชื้อขึ้นในขวดตัวอย่างแต่พบเชื้อขึ้นในขวดควบคุม แสดงว่าตัวอย่างมีฤทธิ์ bacteriostatic หรือ fungistatic ต้องกำจัดฤทธิ์ก่อนการทดสอบ[2,5] โดยอาจใช้สารสะเทินฤทธิ์ที่เหมาะสมในตารางที่ 1 หรือเจือจางตามที่กล่าวในวิธีทดสอบ

เชื้อทดสอบ[2,5] ที่ใช้มี 6 ชนิด ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria)
- *Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria)
- *Clostridium sporogenes* เป็นตัวแทนแบคทีเรียไม่พึ่งอากาศ (anaerobic bacteria)
- *Bacillus subtilis* เป็นตัวแทนแบคทีเรียสร้างสปอร์ (spore-forming bacteria)
- *Candida albicans* เป็นตัวแทนราเซลล์เดียวหรือยีสต์ (yeast)
- *Aspergillus niger* เป็นตัวแทนราหลายเซลล์หรือราสาย (mold)

Method suitability test จะกระทำทุกครั้งที่มีการทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่หรือเปลี่ยนสภาวะการทดสอบไปจากเดิม [2] ไม่จำเป็นต้องทำทุกครั้งที่ทดสอบตัวอย่าง

ข้อจำกัดของการทดสอบ

ข้อจำกัดของการทดสอบความปราศจากเชื้อคือเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ โดยตรวจหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ว่าพบหรือไม่พบ มิได้หาเชิงปริมาณ และการทดสอบเป็นการตรวจหาแบคทีเรีย ราและยีสต์ มิได้ตรวจหาไวรัสหรือแบคทีเรียที่มีชีวิตแต่เพาะเลี้ยงไม่ได้ (viable but non-culturable bacteria) หรือแบคทีเรียเพาะเลี้ยงยาก เช่น Mycoplasma, Leptospira spp.

บทสรุป

การทดสอบความปราศจากเชื้อ จะต้องเข้าใจหลักการและวิธีการทดสอบ การหาจำนวนและปริมาณตัวอย่างทดสอบ การแปลผลทดสอบ ตลอดจนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

เอกสารอ้างอิง

1. The United State Pharmacopeia (USP) 45 and The National Formulary (NF) 40, Asian edition. Pharmaceutical Compounding -Sterile Preparation. 2022; Chapter 797. Rockville: USP Convention Inc.
2. The United State Pharmacopeia (USP) 45 and The National Formulary (NF) 40, Asian edition. Sterility Test. 2022; Chapter 71. Rockville: USP Convention Inc.

3. Gomez PL, Robinson JM. Vaccine Manufacturing. Plotkin's Vaccines. 2018: 51–60.e1. doi: 10.1016/B978-0-323-35761-6.00005-5. Epub 2017 Jul 17. PMCID: PMC7152262.
4. Allen LV Jr. Summary of Quality-Control Testing for Sterile and Nonsterile Compounded Preparations, Part 2: Microbiological Testing. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2019 Jul-Aug; 23(4): 299-303. PMID: 31315081.
5. The Thai Pharmacopeia (TP) II. Sterility Test. 2011; Appendices 10.1: 615-621. Bureau of Drug and Narcotic. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.
6. Luis Jimenez. Microbial Diversity in Pharmaceutical Product Recalls and Environments. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2007; 61: 383-399.
7. Scott Sutton and Luis Jimenez. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on FDA Considerations of “Objectionable Organisms”. American Pharmaceutical Review. 2012; 15(1).
8. The Thai Pharmacopeia (TP) II. Microbial Limit Tests. 2011; Appendices 10.2: 621-638.
Bureau of Drug and Narcotic. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health.
9. The United State Pharmacopeia (USP) 45 and The National Formulary (NF) 40, Asian edition. Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles. 2022; Chapter 1227. Rockville: USP Convention Inc.