

## 1/7 微生物試驗方法確效與數據偏差調查研討會 Q&A

### 問題一：

1. 環境落下菌文中提到得少於 4 小時，100 cfu / plate，祁講師提到可執行 1、2、3、4 小時都可，請問

①. 落下菌監測時間到底可否 1~3 小時？

回答：監測時間需涵蓋製程時間，最多不得大於 4 小時。講師並未提及 1、2、3、4 小時都可，需視製程涵蓋時間與培養基乾燥程度決定更換培養基時間。

②. 合格標準都是 100 cfu / plate 嗎？(之前廠內是 1 小時，<20 cfu plate，但查廠時要我們做 4 小時，允收 100 cfu / plate)

回答：依照 PIC/S 規範，不同級區有不同要求，100 cfu / plate 是 Grade D 規格。

2. 適用性試驗是否要做三批，才可成立(稱之確效)，可否做一 or 二批？若中和劑都用過了，菌還是培養不成，是否判定失敗？(陽性對照是成功的)

回答：是的，需執行三批，需針對各種方法(中合法、稀釋法、濾膜法)都執行過無法成功，才能說明該產品針對特定菌有抑制作用。

(註：陽性對照成功即表示通過適用性試驗，所以須考量陽性試驗使用哪一隻或哪幾隻菌株？如果產品檢驗方法通過適用性試驗，以及培養基完成效能試驗，通常不用每批執行陽性對照)

3. 純水規範 100 cfu / ml，但 RO 膜前端之水的微生物監控也是 100 cfu / ml？(自來水的合格標準是 100 cfu / ml)，而每個單元處理都要執行 M.O(microorganism?)檢測嗎？允收也是 100 cfu / ml？

回答：每個單元皆須依照處理特性去設定合理的化驗項目及規格。但純水必須符合藥典的規格，自來水可根據環保署公告的飲用水水質標準設定。純水與飲用水的總菌數在 USP 與飲用水標準皆規定為 100 cfu / ml，雖然規格相同，但飲用水含氯可抑制細菌生長。

4. 市售配好之培養基(plate)也要執行效能試驗？還是依 COA 即可？減免嗎？(不用每批執行)

回答：是的，雖有 COA 佐證，但購入時仍需要執行效能試驗，不得減免。

5. 抗生素生產之產品的環境落下菌監控，是否要做 plate 曝露後，加入指標菌一起培養？以確保抗生素不會抑制 or 影響落下菌的結果。

回答：含抗生素無菌產品製造時，環境監控的培養基需加入中合劑，但仍需先執行過促生長試驗與合適性試驗來確認。

### 問題二：

1. 每批產品微生物檢測時除了做 Negative Control 外，需做 positive control 嗎？(於測 TAMC, TYMC 及病原菌時)如需做則需接種多少菌量？

回答：促生長試驗與合適性試驗可為 positive control，應在產品檢測前，培養基製備時執行，產品檢測時並不需額外再執行 positive control，接種菌量為 Not more than 100c. f. u.。

2. 在做產品 suitability test 時，產品+微生物後需經培養再取樣至培養基中培養嗎？預試驗時的產品取樣量一樣是 10 g or 10 ml 嗎？

回答：是的，suitability test 取樣量需跟產品試驗操作時一致。

### 問題三：

1. USP 〈61〉 章節 TAMC、TYMC 是否有菌落生長就執行 ID？(在規格內)

回答：不需要，若有追蹤污染來源的需求可另外執行 ID test。

2. 使用 USP 〈61〉〈62〉 章節，在 media 品質試驗中需執行無菌試驗(培養 14 天)嗎？

回答：依規範要求，除了促生長試驗與合適性試驗外，需額外執行 negative control，若為環境監控使用之培養基則可增加 14 天的預培養來進一步確認品質。

### 問題四：

1. 當微生物檢驗結果超出規格進行 MDD 後，無法確定 root cause，但最後有可能為人為操作過程的偏差所造成時，是否可利用第二個人重覆試驗，用此確認第一人的偏差？另，如第二人檢驗合格，是否可以第二人檢驗結果進行報告？

回答：偏差的 root cause 若不是發生於實驗室時，不能以重覆化驗之結果來取代。

2. USP 規範熱消溫度為 80°C，但 WHO、PIC/S 為 70°C，是否只要符合其中之一就好？

回答：若可證明其方法的有效性或有法源依據即可。

### 問題五：

1. 請問脂溶性產品(乳膏)加入 Tween 80 之濃度或量有何規範？還是依狀況需求加入？

回答：Tween 80 的使用量應與合適性試驗方法一致，依合適性的結果來添加。

2. 承上題，以 isopropyl myristate 溶解乳膏後，其量以實際需求使用，是否有上限？

回答：使用量應與合適性試驗方法一致，依合適性的結果來添加。

3. Positive control 有規範如何做嗎？

回答：促生長試驗與合適性試驗可為 positive control。在產品檢測前，培養基製備時執行促生長試驗，新產品或原物料與製程變更對產品有影響時，需先執行合適性試驗。

### 問題六：

1. 想詢問培養基的 pH 該如何測定？(滅菌前 or 後？)

回答：培養基 pH 應於滅菌後執行測定。

2. Air Sample 取樣點的決定是如何決定？單點取樣量是多少？

回答：Sampling points 應由 risk assessment 的角度來決定，單點取樣至少 1 M<sup>3</sup>。

### 問題七：

1. 回收率有明確簡單達成方式嗎？

回答：請參考 USP <1227> VALIDATION OF MICROBIAL RECOVERY FROM PHARMACOPEIAL ARTICLES。

2. 消毒劑確效有更簡易方法嗎？

回答：請參考 USP <1072> DISINFECTANTS AND ANTISEPTICS。

### 問題八：

1. 若菌種是用外購的，買進來時需要鑑定嗎？

回答：依照風險評估需要執行，確認購入菌種無誤。

2. 若每次使用都是使用新的菌種(外購的、沒有做繼代)，這樣每次還需要鑑定嗎？這樣也需要再做 Growth Promotion 嗎？

回答：需要確認菌種無污染與變異，Growth Promotion Test 是針對培養基做確認。

### 問題九：

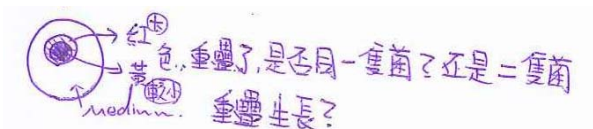
1. ID test = API test ?

回答：API 是菌種鑑定所使用的工具，不是方法。

2. 培養基為何會很黑 or 很淡(for 相同培養基)？

回答：培養基配製與滅菌條件不當，會使培養基發生 Maillard reaction 造成顏色變深。

3. 若同一培養基同 time 同溫度培養出現下圖的狀況：



請問是否同一隻菌？還是兩隻菌重疊生長？

回答：菌落 (colony) 為一群細菌數所組成，單從顏色、外觀、氣味可初步研判，但還是要由單一菌落的純菌(pure culture)才能執行菌種鑑定，如懷疑該菌落有不同菌株，可進一步將原菌落畫劃線分離培養。

### 問題十：

1. MacConkey Agar 及 Broth 差異在於 agar 的添加，但為什麼在 Growth Promotion test 時所使用的菌株不太一樣？MacConkey Broth 有添加 S. aureus(inhibitory)而 Agar 沒有添加，Agar 需要添加 S. aureus 嗎？

回答：依照藥典規範執行即可。

#### 問題十一：

1. 選擇性培養基之 Growth Promotion 是否可用四區劃線呈現？

回答：Growth Promotion Test 不適用四區劃法，無法控制下菌量，NMT 100 CFU。

#### 問題十二：

1. A-31 第 61 張投影片中，TYMC 生長過多，是部分細菌生長，於 SDA 可加入抗生素，添加抗生素這個部分於 SOP 內容要如何說明解釋？

回答：應於個別檢驗方法中說明，並非所有檢測方法都添加抗生素。

#### 問題十三：

1. Suitability 的 candida 只要 2~3 天，如果超過 3 天還沒有長好，要繼續培養嗎？還是要重做？

回答：若無長好表示失敗，需調查原因後重新執行。

2. 菌種活化過程要計算代數嗎(冷凍 powder 開始)？

回答：每次轉接菌種為一代。

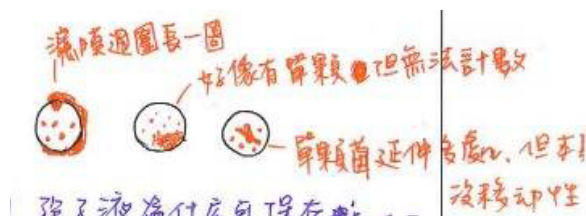
3. 非無菌製劑需要做 Suitability test 嗎？也要每天 check 結果及 double check 最終結果嗎？

回答：非無菌製劑需要執行 suitability test，應於新產品或原、物料、製程變更對產品有影響時執行。每天 check 結果及 double check 最終結果是好的作業程序，可盡早知道結果並避免誤判。

#### 問題十四：

1. 過濾後 Smear 的 colony(如下圖)，如何計數(都是未知菌)？

回答：Smear 的 colony 無法計數，過濾後通常將濾膜直接培養，不再塗抹。塗抹技術法通常使用 L 型玻璃棒將試驗液體平均塗抹於固體培養基上面。菌液濃度，塗抹量與塗抹技術會影響計數結果。



2. Suspensions 2~8°C 保存 24 小時，但市售的孢子液為什麼可保存數月？

回答：自製 Suspensions 保存條件可依藥典規範，若有使用其他方式需經過驗證。

孢子種類，菌液處方，包裝方式，儲存條件都會影響效期，須各別驗證，可向廠商索取資料。

### 問題十五：

1. Antimicrobial Effectiveness Test 的 Initial Count 是在加入產品前(含防腐劑)？還是加入產品後？

回答：加入產品前。

2. 如為加入產品後，防腐劑的抗菌/殺菌效果是否會影響 Initial Count 的結果？

回答：加入產品後執行計數時，需加入中和劑才能計數。

### 問題十六：

1. 產品組成含有 EDTA，如何添加中和劑(Mg or Ca ions)？

回答：依照合適性試驗的結果來執行。

2. 如何測試枯草桿菌菌落數，落在 100 cfu / ml？

回答：可使用濁度法或使用序列稀釋法做 plate count method。

3. 成品培養基(市售)是否需要調 pH？如果需要時，是在滅菌前或滅菌後？

回答：市售品需要經過確認才能使用，pH 測定應於滅菌後。

4. 產品規格檢驗中，如有黴菌、總菌、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、沙門氏桿菌，預備試驗時是否全部檢驗？或依中華藥典預備試驗中所述四種株菌進行檢測？

回答：需全檢，建議參照 USP 現行版執行。

5. 中華藥典中  $10^{-3}$  之菌液 1 ml 是多少 cfu？

回答： $10^{-3}$  是稀釋倍數，不是菌落數的表示方式。

### 問題十七：

1. 防腐劑效能試驗是否需加做中和劑毒性試驗與中和劑效能試驗？

回答：需要。

2. P.58 所述的貼劑測試方法為何？

回答：TAMC and TYMC，以過濾法測試貼劑。

3. 在防腐劑效能試驗中，若起始菌液濃度無法達到規範所需的濃度是否可加超過 1% 的體積量？

回答：否，應該改善培養的時間與菌量使達到規範要求。

### 問題十八：

1. 利用 membrane filtration method 作微生物計數，利用 0.45  $\mu\text{m}$  membrane 作過濾，那計數時是否需要考慮到小於 0.45  $\mu\text{m}$  的細菌計數？這牽涉到滅菌驗證的微生物數量決定滅菌劑量。

回答：微生物計數試驗是監測產品污染的程度，與濾膜滅菌的過濾驗證不同意義。

2. 數量計數時當數量過大或 smear，講師建議將 sample dilute 再測，但如果產品為固體，只能進行一次性試驗，那計數時的結果敘述該註明嗎？且 smear 的菌落數該如何計算？

回答：Sampling 的數量至少應能執行兩次試驗。

smear 較難計算，塗抹技術法通常使用 L 型玻璃棒將試驗液體平均塗抹於固體培養基上面，菌液濃度，塗抹量與塗抹技術會影響計數結果。

## 問題十九：

1. 如何確認中和劑不會破壞產品本身？

回答：應以合適性(中和劑毒性)試驗結果判定。

2. 當使用稀釋方式(放大倍數)來做去除抑菌性時，是否需要搭配濾膜方式來做？

回答：藥典提到微生物計數時，稀釋法若樣品量過大不易操作可搭配濾膜法執行。

3. 如果 API 進貨量少時( $\approx 10 < 500 \text{ g}$ )，一樣是取 10 g？

回答：應考慮分析所需數量，不得少於規範要求。

4. USP 〈61〉樣品以 1:10 比例稀釋時，應該不用完全溶解吧？

回答：樣品應完全分散於 Buffer 或 media 中。

5. 如果有不溶時，可由靜置 5 min 後取樣？還是均勻狀態取樣，但有時均勻狀態很混濁，在做適用性時不好判斷。

回答：需於樣品均勻時取樣，可加入 TTC (氯化三苯四氮唑) 菌落顯色劑來判讀。

## 問題二十：

1. 抗生素 or 抗菌效果的產品藥品，稀釋至多少倍數內才能算是合理的稀釋？還是一定要稀釋至菌可以生長的程度？或是多少稀釋倍數下可說此產品對某菌有抑菌效果免作？

回答：應依合適性試驗結果來決定，合適性試驗結果需於 factor 2 的生長數量才合格。可使用稀釋法配合中和劑使用來執行。

2. 有些培養基沒有收錄在藥典內，該如何選用設定該培養基適用性(Growth promotion, Inhibitory, Indicative)等菌種？

回答：使用非藥典方法，可使用適當的菌種來測試，但需執行替代方法驗證與確效。

## 問題二十一：

1. 請問水質的 Colifom 使用 m-Endo Broth，可否還有其他符合 USP 規範的培養基？

回答：USP 並無規範 coliform test，可參考台灣環檢署公告之水中糞生大腸桿菌群 (Fecal coliform) 檢測方法—多管發酵法。



2. 是否有規範依據什麼藥品較適合用什麼防腐劑？若要制訂防腐劑 specification，是否有建議之範圍？

回答：需依據配方組成的安定性來考慮，不同防腐劑有其用途與特性，防腐劑規格可依安定性降解量制定，並能證明其有效性。

#### 問題二十二：

1. 在製藥用水的製造過程中，會有哪些原因會導致水中 TOC 數值偏高？

回答：微生物、離子交換樹脂釋放等，表示水中有機污染物偏高。

2. 水中的微生物含量是否會影響水中 TOC 含量？(微生物含量多，導致水中 TOC 值偏高嗎？)

回答：會。

3. 水系統消毒對 TOC 值的減少是有幫助的嗎？

回答：是。

#### 問題二十三：

1. 水質 test 使用 3M 快篩檢測片是否符合相關法規？

回答：以藥典執行規範中並無快篩檢測套組的應用，藥典提到替代方法使用方式為：若有使用非規範的方法則需要執行方法確效驗證。

#### 問題二十四：

1. 在取完水樣 2 小時內須進行 test，或保存在 2~8°C 不得超過 12 小時，最多不得超過 48 小時，請問須作水樣 hold time study 嗎？

回答：compendium 有依據可參考執行，若可增加驗證 holding time 更好。

#### 問題二十五：

1. Isolator 中測試環境是否要執行 surface contact？手套於執行 sterility 後，是否需 contact 採樣？

回答：環境需執行 surface contact，手套也需執行 contact 採樣。

2. 人員平板不採頭部？手肘？

回答：若採用隔離裝置(Isolator)執行無菌試驗，則無人員介入疑慮，不需執行。

3. Isolator 執行 sterility test 中，於 P.9 PPT 中無提到 particulate test？PIC/S 中規定要執行？在這沒提到的原因？

回答：無菌試驗執行時 A、B 級區應做環境、人員監控，包括微生物與粒子數監控，規範如投影片 P.11 and P.12(講義 C-6)。

4. 更衣年度測試不用執行左右手肘？法規？測試點位的選擇源自於那？

回答：更衣驗證需執行人員污染監測，測試點位置應依風險評估考量。

5. Sterility test→Turbid 有類似菌生長→取 1ml 接種 new 培養基常會養不出來，表示無污染嗎？

回答：不是，應執行更進一步確認。

## 問題二十六：

1. 更衣測試的前胸、口罩、前額如何取樣？直接用 Rodac 貼上去？

回答：是。

2. 新人年度 8 點，原本廠內人員也是 8 點嗎？還是 5 點？

回答：依據風險評估來做監控。

3. C、D 級區也需要每 5 點或 8 點測試嗎？

回答：C、D 級區不需做人員更衣監測。

4. 預培養 plate 中的水分是否會乾掉？

回答：不會，須注意包裝方式。

5. 若是純水的使用水點(用來清洗器具或滅菌、配製 buffer 用水)，是否也需要做每個月一次的 Endotoxin 檢測？

回答：純水不需執行 Endotoxin test，WFI 須於每個使用點做例行監控。

## 問題二十七：

1. 無菌試驗 fail 時，要 retest 時，是使用留樣品，還是再取樣？該如何執行？是在調查前/中/後哪個階段？

回答：無菌試驗在沒有找出 root cause 或歸屬於實驗室的錯誤時，不允許 retest。