

Czystość biologiczna środowiska wytwarzania produktów leczniczych

Jolanta Długaszewska, Zygmunt Muszyński

Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Adres do korespondencji: dr n. farm. Joanna Długaszewska, Katedra i Zakład Bakteriologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań, tel./faks 061 854 67 20, e-mail: jdlugasz@ump.edu.pl

Jakość produktów leczniczych jest ważnym zagadnieniem, dotyczy bowiem zdrowia i życia człowieka. Obecne w lekach drobnoustroje mogą powodować rozkład substancji aktywnej, a także wywoływać zakażenia.

Zaburzenia w równowadze ekologicznej oraz obniżenie naturalnej odporności populacji ludzkiej zwiększają zagrożenie ze strony otaczających drobnoustrojów, w tym również ryzyko wystąpienia zakażeń odlewkowych. Odnotowane przypadki zakażeń wywołanych przez obecne w lekach drobnoustroje, były przyczyną powołania w drugiej połowie ubiegłego wieku specjalnej komisji przy Międzynarodowej Federacji Farmaceutycznej (FIP) oraz zespołów krajowych (np. odpowiedniej komisji przy Instytucie Leków), których zadaniem była analiza badań zanieczyszczenia mikrobiologicznego leków, szczególnie tych, wobec których jałowość nie jest wymagana, a także przyczyn stwierdzonego stanu czystości [1].

Wykazano, że jednym z ważniejszych czynników wpływających na obecność w lekach drobnoustrojów jest pierwotne zanieczyszczenie surowców farmaceutycznych. Komisje wskazywały również na niewłaściwą konserwację leków oraz brak kontroli produktu finalnego przed wprowadzeniem do obrotu. Ważnym czynnikiem okazał się także sam proces produkcyjny, a zwłaszcza niektóre jego etapy, sprzyjające rozwojowi drobnoustrojów, jak np. granulacja.

W wyniku tych prac sformułowano wymogi czystości mikrobiologicznej dla wszystkich postaci leków i wskazano na konieczność kontroli przed przekazaniem do stosowania, czy leki spełniają te wymagania. Ponadto opracowano zasady prawidłowej produkcji leków (GMP – ang. *Good Manufacturing Practice*), w tym dotyczące higieny produkcji i kontroli jej przebiegu.

W Polsce warunkiem uzyskania zgody na wytwarzanie produktów leczniczych jest spełnienie wymogów zawartych w rozporządzeniu ministra zdrowia

Environmental microbiological purity of pharmaceutical manufacturing

The quality of pharmaceutical products is dependent not only upon the purity of the components used, the process itself or training and attitudes of the personnel involved but also upon the environmental hygienic conditions under which the process is performed. Each component of this environment needs to be considered as a potential source of microorganisms which can contaminate a drug. The effectiveness of actions undertaken to achieve a proper level of purity is checked by microbiological evaluation of "workspace".

This study is a retrospective analysis of environmental microbial monitoring of oral pharmaceuticals manufacturing (nonsterile). The analysis included the results of studies conducted in 2001–2007 at nine pharmaceutical works from Wielkopolska. The inquiries evaluated microbiological purity of air, surfaces of equipment, wet environments and personnel. The airborne microbial contaminants were determined by sieve impactor sampler, surface and personnel samplings were accomplished by use of contact plates and by swabbing.

On the whole, 5317 samples were analyzed, of which 957 were obtained from air, 1642 from usable surfaces, 1248 from surfaces of equipment, 453 from wet environments, 371 from hands of personnel, 342 from clothing and 304 from footwear. Thirty seven per cent of air samples, 7.8% samples from surfaces of equipment, 19.5% samples from other surfaces exceeded the limits for Class D working area. In 26.2% of samples of wet environment Gram negative rods were detected. The number of microorganisms isolated from hands/gloves ranged from 1 to 184 cfu/five fingertips, those from clothing from 5 to 77 cfu/cm², while those from footwear from 16 to >300 cfu/cm². An analysis of the results of microbial monitoring indicates the usefulness of microbiological control as a key element in detection of potential dangers for the quality of pharmaceutical products.

Keywords: pharmaceutical manufacturing, microbiological purity, environment, contamination

© Farm Pol, 2009, 65(5): 323-326

Tabela 1. Zalecane limity w monitorowaniu zanieczyszczeń mikrobiologicznych pomieszczeń czystych w działaniu

Klasa	Zalecane limity zanieczyszczeń mikrobiologicznych (a)			
	próbka powietrza cfu/m ³	plytki używane w metodzie sedymentacyjnej (średnica 90 mm) cfu/4 godz. (b)	plytki odciskowe (średnica 55 mm) cfu/plytkę	odciski palców (dłoń w rękawiczce z 5 palcami) cfu/ rękawiczkę
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	–
D	200	100	50	–

Uwaga: (a) wartości średnie, (b) poszczególne płytki stosowane w metodzie sedymentacyjnej mogą być wystawione przez okres krótszy niż 4 godziny.

Tabela 2. Liczba prób pobranych w latach 2001–2007

Liczba wytwórni – 9	9
Liczba badań – 104	104
Liczba prób ogółem – 5317	5317
w tym: powietrze	957
powierzchnie urządzeń	1248
inne powierzchnie	1642
środowisko wilgotne	453
rękawice	342
obuwie /ręce personelu	371
odzież	304

Tabela 3. Czystość mikrobiologiczna środowiska nieożywionego

Przedmiot badań	Wartość minimalna–maksymalna	Wartość średnia	Liczba przekroczeń limitu dla klasy D
Powietrze	5–1070 cfu/m ³	337 cfu/m ³	355
Powierzchnie urządzeń	0 – >300 cfu/25 m ²	9 cfu/m ²	97
Inne powierzchnie	0 – >300 cfu/25 m ²	42 cfu/m ²	320

w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania z dnia 1 października 2008 roku [2].

Zapewnienie odpowiedniego poziomu czystości środowiska produkcji, minimalizującego ryzyko zanieczyszczenia produktu mikroorganizmami, jest jednym z elementów systemu zapewnienia jakości. Skuteczność tych działań jest sprawdzana przez ocenę mikrobiologiczną środowiska. W pracy przeprowadzono retrospektywną analizę badań czystości mikrobiologicznej środowiska wytwarzania form doustnych produktów leczniczych (niesterylnych).

Materiał i metody

Analiza objęła wyniki badań przeprowadzonych w latach 2001–2007 w dziewięciu wytwórniach farmaceutycznych z Wielkopolski. W badaniach oceniano czystość mikrobiologiczną:

- powietrza,
- powierzchni urządzeń produkcyjnych,
- innych powierzchni (podłogi, ściany, meble itp.),

- środowisk wilgotnych (syfony zlewowe, kratki ściekowe itp.),
- personelu (rękawice/ręce, odzież, obuwie).

Ocena czystości mikrobiologicznej powietrza

Czystość mikrobiologiczną powietrza oceniano metodą uderzeniową z wykorzystaniem aparatów MicroBio (DeVilbe) i MAS (Merck). Za pomocą aparatów pobierano określoną objętość powietrza. Obecne w badanym powietrzu drobnoustroje zostały zatrzymywane na powierzchni podłoża agarowego z wyciągami z kazeiny i soi (TSA). Próby inkubowano przez 5 dni w temperaturze 35°C. Po inkubacji zliczano wyrosłe kolonie drobnoustrojów i obliczano liczbę cfu (*colony forming unit*, jednostek tworzących kolonię) w 1 m³ powietrza.

Ocena czystości mikrobiologicznej powierzchni

Czystość mikrobiologiczną powierzchni oceniano metodą kontaktową oraz metodą wymazów.

Metoda kontaktowa

Zastosowano w niej płytki RODAC (*Replicate Organism Detection and Counting*), zawierające podłoże TSA z inaktywatorami dla środków dezynfekcyjnych. Próbkę pobierano przez przyciśnięcie otwartej płytki z meniskiem wypukłym podłoża agarowego do badanej powierzchni. Płytki inkubowano przez 5 dni w 35°C. Po inkubacji zliczano wyrosłe kolonie. Wyniki podawano jako liczbę cfu na 25 cm² powierzchni (pole płytki).

Metoda wymazów

Jałową, zwilżoną wymazówką pobierano do badania próbki z powierzchni 25 cm². Następnie przenoszono wymazówkę do roztworu 0,9% NaCl, wytrząsano, po czym wykonywano ilościowy posiew na podłoże TSA. Próby inkubowano przez 5 dni w temperaturze 35°C. Po inkubacji zliczano wyrosłe kolonie i wyznaczano liczbę cfu na 25 cm² powierzchni, uwzględniając objętość płynu użytego do wytrząsania oraz objętość posiewaną na podłoże.

Ocena czystości mikrobiologicznej personelu

Czystość mikrobiologiczną odzieży, obuwia i rękawic/rąk personelu określono metodą kontaktową z użyciem płytek RODAC.

Wyniki porównano z kryteriami dla pomieszczeń klasy D, w której najczęściej wytwarza się leki niesterylne, zawartymi w rozporządzeniu ministra zdrowia w sprawie Dobrej Praktyki Wytwarzania (**tabela 1**) [6].

Wyniki

Przeanalizowano wyniki 104 badań prowadzonych w dziewięciu wytwórniach farmaceutycznych

(tabela 2). Ogółem ze środowiska ożywionego i nieożywionego pobrano 5317 prób. 1642 próby pobrano z powierzchni użytkowych, 1248 z powierzchni urzędzeń, 957 z powietrza, 453 ze środowisk wilgotnych, 371 z rąk personelu, 342 z odzieży oraz 304 próby z obuwia.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki oceny czystości mikrobiologicznej środowiska nieożywionego, z wyłączeniem środowisk wilgotnych.

Z powietrza badanych pomieszczeń izolowano od 5 do 1070 cfu/m³ (średnio 337 cfu/m³). Przekroczenie limitu dla pomieszczeń o klasie czystości D (>200 cfu/m³) odnotowano w 355 przypadkach, co stanowi ok. 37% ogółu przebadanych próbek powietrza (rycyna 1). Przekroczenia te najczęściej dotyczyły śluz osobowych i towarowych, a więc pomieszczeń znajdujących się na pograniczu strefy kontrolowanej i niekontrolowanej. W 17,1% prób liczba drobnoustrojów mieściła się w przedziale od 101 do 200 cfu/m³, jednak aż w 45,8% prób liczba drobnoustrojów w 1m³ powietrza była niższa niż 100 cfu.

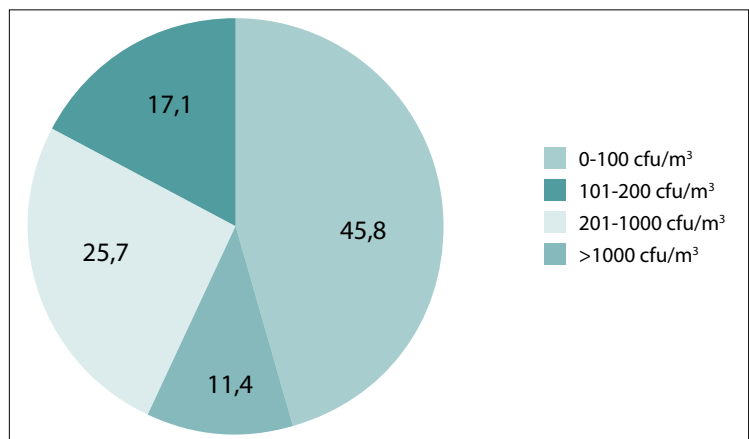
Z powierzchni urzędzeń izolowano od 0 do >300 cfu/25 cm². Przekroczenie limitu dla pomieszczeń klasy D, wynoszącego 50 cfu/25cm², odnotowano jedynie w 97 próbach (niespełna 8%) (rycyna 2). Zanieczyszczenie mieszczące się w przedziale od 26 do 50 cfu/25 cm² stwierdzono w 8,3% próbach. Najczęściej z badanych powierzchni nie izolowano drobnoustrojów lub izolowano je w niewielkiej liczbie (83,9% prób).

Z innych powierzchni, takich jak podłogi czy meble, podobnie jak z powierzchni urzędzeń, izolowano od 0 do >300 cfu/25 cm², a liczba izolowanych drobnoustrojów wynosiła średnio 42 cfu/25 cm². Odnotowano 320 prób, w których dopuszczalna liczba drobnoustrojów została przekroczona, z czego w 10% odnotowano od 51 do 100 cfu/25 cm², a w 9,5% powyżej 100 cfu/25 cm² (rycyna 3). Aż w 59,3% prób liczba drobnoustrojów nie przekraczała 25 cfu/25 cm², a w 21,2% mieściła się w przedziale od 26 do 50 cfu/25 cm².

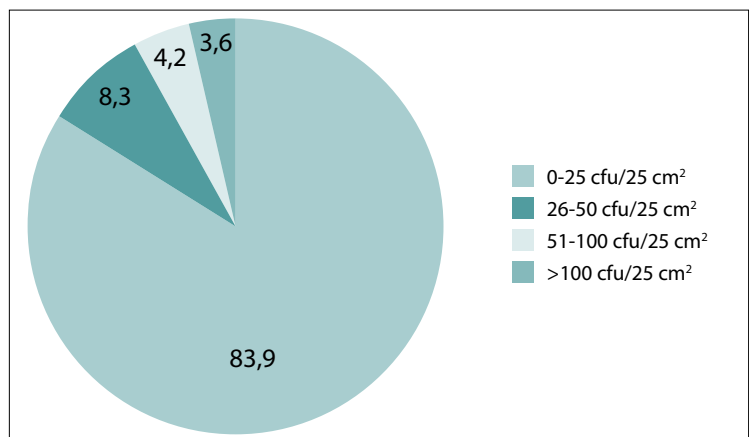
Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej środowisk wilgotnych, takich jak syfony zlewowe czy kratki ściekowe, przedstawiono w tabeli 4. Na ogólną liczbę 453 prób w 119 (26,2%) stwierdzono obecność pałeczek Gram-ujemnych. Najczęściej izolowano pałeczki z rodzajów: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* oraz pałeczki *Enterobacteriaceae* z gatunku *Citrobacter freundii* i *Enterobacter cloacae*.

Wyniki oceny czystości mikrobiologicznej personelu przedstawiono w tabeli 5.

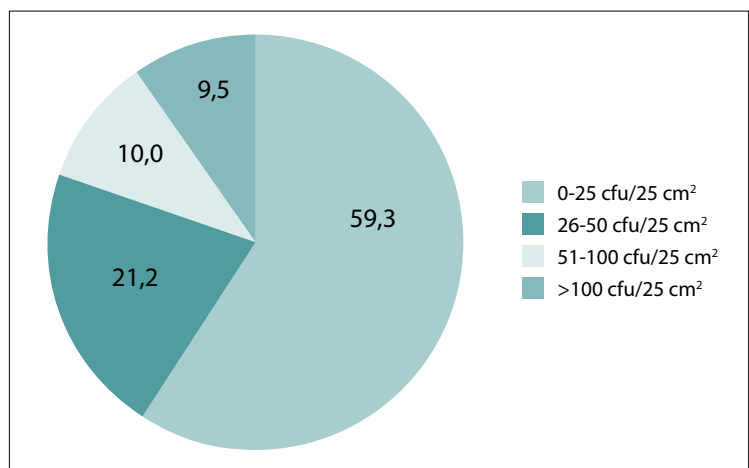
Z rąk/rękawic izolowano średnio 44 cfu/opuszki pięciu palców. Liczba drobnoustrojów izolowanych z rąk była znacznie wyższa niż z rękawic (odpowiednio: 23–184 cfu i 1–89 cfu; wartości średnie odpowiednio: 18 cfu i 76 cfu).



Rycina 1. Wyniki badań czystości mikrobiologicznej powietrza mieszczące się w poszczególnych przedziałach



Rycina 2. Wyniki badań czystości powierzchni urzędzeń mieszczące się w poszczególnych przedziałach



Rycina 3. Wyniki badań czystości mikrobiologicznej innych powierzchni mieszczące się w poszczególnych przedziałach

Z odzieży personelu izolowano od 5 do 77 cfu/25 cm² (średnio 18 cfu/25 cm²). Znacznie wyższe liczby drobnoustrojów, mieszczące się w przedziale od 16 do >300 cfu/25 cm² (średnio 120 cfu/25 cm²) izolowano z obuwia pracowników.

Tabela 4. Czystość mikrobiologiczna środowisk wilgotnych

Liczba prób, w których stwierdzono obecność pałeczek Gram-ujemnych	119 (26,2%)
Najczęściej izolowane drobnoustroje	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Sterotrophomonas maltophilia</i>	<i>Aeromonas spp.</i>

Tabela 5. Czystość mikrobiologiczna personelu

Przedmiot badań	Wartość minimalna–maksymalna cfu/opuszki pięciu palców	Wartość średnia cfu/opuszki pięciu palców
Rękawice/ręce	rękawice 1–89 ręce 23–184	ogółem 44 (rękawice 18; ręce 76)
Odzież	5–77	18
Obuwie	16–>300	120

Omówienie wyników

W latach 90. ubiegłego wieku w polskich wytwórniach farmaceutycznych dokonano ogromnych zmian w procesie wytwarzania leków niejałowych. Wprowadzone zasady prawidłowego wytwarzania leków (GMP) w zakresie zagadnień mikrobiologicznych dotyczyły przede wszystkim zapewnienia właściwej czystości mikrobiologicznej przestrzeni pracy. W zasadach GMP określono różne klasy czystości mikrobiologicznej wymaganej przy produkcji różnych produktów leczniczych lub na poszczególnych etapach wytwarzania tego samego leku.

Rozporządzenie ministra zdrowia w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania, precyzujące dopuszczalne liczby drobnoustrojów i cząstek mechanicznych w jednostce objętości powietrza oraz dopuszczalne liczby mikroorganizmów na powierzchniach i na rękawicach, odnosi się do pomieszczeń czystych, w których wytwarza się leki jałowe. Dlatego producenci leków niejałowych są zobowiązani do określenia własnych limitów zanieczyszczeń mikrobiologicznych. W każdej wytwórni powinny być opracowane limity alarmowe i limity działania. Ministerialne rozporządzenie definiuje limit alarmowy jako: *ustalone kryteria służące wczesnemu ostrzeżeniu o potencjalnym odchyleniu od prawidłowych warunków, które mogą nie być wystarczającą podstawą do zdecydowanych działań naprawczych, ale wymagają badań następczych*, natomiast limit działania jako: *ustalone kryteria, których przekroczenie wymaga podjęcia niezwłocznych działań następczych i naprawczych*. Limity te w są wytwórniach ustalane zazwyczaj na podstawie własnych wyników monitorowania środowiska, z uwzględnieniem wartości zalecanych w rozporządzeniu.

Ocena czystości mikrobiologicznej środowiska wytwarzania jest prowadzona metodami opartymi na

zasadach mikrobiologii klasycznej, dostosowanymi do specyfiki badanego środowiska [3].

Objęte analizą wyniki badań porównano z limitami dla klasy czystości D. Należy jednak zaznaczyć, że do grudnia 2002 roku obowiązywało rozporządzenie, w którym dopuszczalne zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza wynosiło 500 cfu/m³, a limity zanieczyszczeń powierzchni nie były sprecyzowane [4, 5].

W piśmiennictwie nie ma danych opisujących zanieczyszczenie mikrobiologiczne środowiska wytwarzania produktów leczniczych. Mimo że badania przestrzeni pracy są często wykonywane, jednak ich wyników zazwyczaj się nie publikuje. Wyniki badań prowadzonych przez Marczewską i wsp. wskazują na niewielką liczbę przekroczeń limitów zanieczyszczeń mikrobiologicznych w monitorowanych wytwórniach. Przekroczenia te dotyczyły zarówno powietrza i powierzchni, jak i personelu [6].

W uzyskanych przez nas wynikach przekroczenia najczęściej dotyczyły powietrza i powierzchni (podłogi). Często również izolowano pałeczki Gram-ujemne w środowiskach wilgotnych (syfony zlewowe). Dotyczyło to jednak przede wszystkim śluz personalnych brudnych. Jak wiadomo, pomieszczenia te zazwyczaj mają bezpośredni kontakt ze strefą niekontrolowaną, a pracownicy wchodzą do nich w odzieży ogólnozakładowej.

Uzyskanie wyników przekraczających dopuszczalne w danej wytwórni limity powodowało analizę przyczyn zaistniałej sytuacji oraz wprowadzenie działań naprawczych. Skuteczność podjętych działań była sprawdzana w powtórnej ocenie czystości mikrobiologicznej środowiska produkcyjnego.

Wnioski

Przeprowadzona analiza wyników badań czystości mikrobiologicznej przestrzeni pracy wskazuje na celowość prowadzenia kontroli mikrobiologicznej pozwalającej na wykrycie potencjalnych zagrożeń dla jakości leku.

Otrzymano: 2009.01.25 · Zaakceptowano: 2009.03.12

Piśmiennictwo

1. Parnowska W.: Mikrobiologia farmaceutyczna Problemy produkcji i kontroli leków. Wyd.1, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998, s. 244. ISBN 83-200-2192-8.
2. Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 1 października 2008, Dz. U. z 2008 r. nr 184, poz.1143.
3. Muszyński Z., Ratajczak M.: Monitoring mikrobiologiczny środowiska produkcji leków. Farmacja Polska, 2008, 64, 14, s. 625-664.
4. Rozporządzenie MZIOS z dnia 8 lipca 1993, Dz. U. z 1993 r. nr 67, poz. 326.
5. Rozporządzenie MZIOS z dnia 3 grudnia 2002, Dz. U. z 2002 r. nr 224, poz.1882.
6. Marczevska J., Łukaszkiewicz Z.: Ocena mikrobiologiczna środowiska produkcyjnego przy wytwarzaniu produktów leczniczych; Pharmaceutica, 2001, 14.