

# Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov

## Microbiological quality of pharmaceutical products

Meta Resnik, Janez Kerč

**Povzetek:** Farmacevtska industrija velja za eno najbolj reguliranih proizvodnih okolij, saj neposredno vpliva na zdravje človeka. Velik delež k temu prispeva tudi mikrobiološka kontrola farmacevtskih izdelkov, na katero vpliva bodisi okolje, v katerem jih izdelujemo, bodisi snovi, ki jih uporabljamo v farmacevtskih oblikah. V današnjem načinu proizvodnje, z zagotavljanjem kakovosti kot prvim pogojem izvajanja dobre proizvodne prakse, želimo z natančnimi postopki preprečiti mikrobo kontaminacijo v vseh izdelkih. Farmacevtska podjetja se trenutno srečujejo z zahtevno nalogo izvrševanja harmonizacije zahtev, ki naj bi kljub poenotenju nudile še močnejšo osnovo za zagotavljanje varnosti izdelkov. Poleg mikroorganizmov, ki so pomembni v farmacevtski industriji, so v članku predstavljeni ključni dejavniki, ki vplivajo na mikrobo kontaminacijo farmacevtskih izdelkov in različni testi za mikrobiološko kontrolo kakovosti izdelkov.

**Ključne besede:** mikrobiološka kontrola, mikrobna kontaminacija, limitni testi, test sterilnosti, harmonizacija

**Abstract:** Pharmaceutical industry is known to be one of the most regulated production environments because of its direct effect on human health. Microbiological quality control of pharmaceutical products contributes a huge part to this whether it is the production environment that mostly affects them or the substances which are used in the products. With quality assurance as the first approach of performing good manufacturing practice in today's production the aim is to prevent microbial contamination in every product. Nowadays pharmaceutical companies are dealing with pretentious implementation of harmonised regulations which would offer even better basis for product's quality. Besides microorganisms found in pharmaceutical industry, factors affecting microbial contamination, microbiological control and different tests are reviewed in the article.

**Key words:** microbiological quality control, microbial contamination, limit testing, sterility testing, harmonization

## 1 Mikroorganizmi, pomembni v farmacevtski industriji

Mikroorganizmi naseljujejo skoraj vsa okolja in so sposobni zelo hitrega razmnoževanja, kar pomeni, da jim izredna metabolna prilagodljivost omogoča menjavanje in naseljevanje novih ekoloških niš. Mednje uvrščamo bakterije (prokarioti) in arheje, ter glive, praživali in alge kot evkariotski tip mikroorganizmov (1).

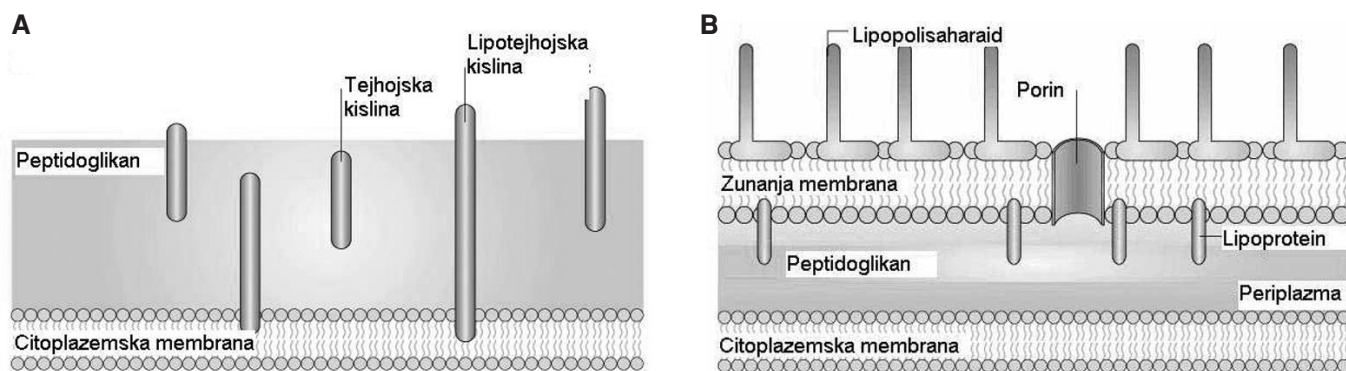
### 1.1 Bakterije

Bakterije so zelo pestra skupina organizmov, ki naseljujejo praktično vsa naravna okolja. Bakterijsko celico sestavljajo trije pomembni deli: tekoča citoplazma, citoplazemska membrana in celična stena, ki daje celici trdnost in rigidnost. Primarna identifikacija bakterij poteka na podlagi razlik v sestavi celične stene (Slika 1). Gram-pozitivne bakterije sestavlja debelejša plast peptidoglikana v steni (po Gramu se obarvajo modro), gram-negativne pa tanjša (rdeče obarvanje po Gramu). Bakterijski genom ponavadi predstavlja dvoverižna krožna DNK, vsebuje pa lahko tudi nekromosomske elemente kot so plazmidi, ki nosijo zapise za edinstvene lastnosti in se prenašajo z genskimi prenosi. Nekatere vrste lahko oblikujejo dormantne oblike, t.i. spore, ki so zelo odporne in mirujoče strukture. Vsebujejo ves

dedni material, vendar niso metabolno aktivne. Prenesejo zelo neugodne pogoje, kot so izsušitve, razkužila (70% etanol) in visoke temperature (>100°C). Spore tvorijo sporogene bakterije kot npr. *Clostridium* in *Bacillus*. Razmnoževanje bakterij je nespolno, za rast pa nujno potrebujejo vodo, hranila, kisik, ustrezno temperaturo in pH okolja. Glede na potrebo po kisiku ločimo obligatne aerobe, fakultativne anaerobe, obligatne anaerobe, aerotolerantne anaerobe in mikroaerofile (1, 2).

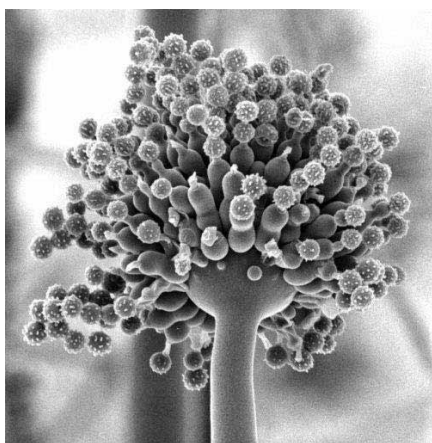
### 1.2 Glive

Glive najdemo v vodi, zemlji in zraku, prav tako so tudi del normalne flore pri ljudeh in živalih. Poznamo jih kot nižje (plesni, kvasovke) in višje glive (npr. gobe). Kvasovke so enocelični organizmi, večji od bakterij in se razmnožujejo s cepitvijo ali brstenjem. Micelij plesni sestavljajo filamentozne strukture - hife, na katerih nastajajo spolne ali nespolne oblike spor (Slika 2). Nekatere glive, npr. patogen *Candida albicans*, lahko fenotipsko preklapljajo med kvasno rastjo v nekaterih okoljih in filamentozno v drugih. Glive uspevajo počasneje kot bakterije, zmožne so rasti pri nižjih pH, prenesejo tudi visoke koncentracije sladkorja. Večina gliv ni patogena, a so zaradi odpornosti spor pomembne kot kontaminanti surovin, zlasti tistih naravnega izvora (1, 2).



Slika 1: Celična stena a) Gram pozitivnih bakterij in b) Gram negativnih bakterij (prirejeno po 3).

Figure 1: Cell wall of a) Gram positive bacteria and b) Gram negative bacteria. (adapted from 3).



Slika 2: Nespolne strukture Aspegillus niger (4).

Figure 2: Asexual structures of Aspegillus niger (4).

### 1.3 Virusi

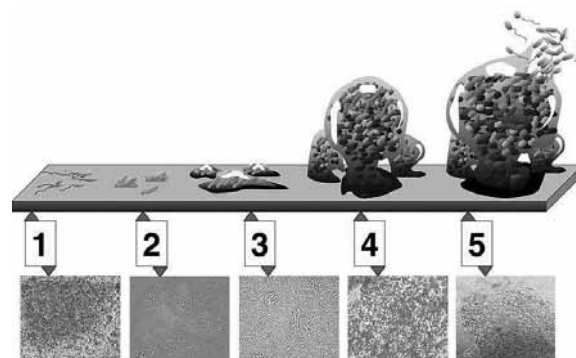
Viruse, viroide in prione uvrščamo med neživeče organizme, saj je njihov obstoj odvisen od gostitelja. V farmacevtskem kontekstu so pomembni zaradi izjemne odpornosti proti sterilizaciji – pari, gama sevanju in dezinficiensom (1, 2).

## 2 Viri mikrobne kontaminacije v farmacevtski industriji

Mikrobi v končnem izdelku lahko izvirajo iz surovin, opreme, uporabljene v proizvodnem postopku, vode, atmosfere, osebjaja, ki sodeluje v procesu ali primarne ovojnine izdelka. Kontaminanti izdelkov so lahko patogeni ali nepatogeni, ki so sposobni rasti navkljub prisotnosti protimikrobnih sredstev. Večino prisotnih mikrobov uničimo s segrevanjem in dezinfekcijo, nekateri celični ostanki lahko kljub temu ostanejo toksični ali pirogeni (2, 5).

Zahteva za mikrobiološko kakovost surovin dovoljuje prisotnost določenega števila nepatogenih mikroorganizmov, če sta bila ovrednotena tveganje njihovega preživetja in s tem možnost kvarjenja končnega izdelka. Hkrati mora biti proučeno obnašanje

mikroorganizmov v prisotnosti protimikrobnih sredstev in učinkovitost uničenja mikrobov med procesom. Naravne surovine so lahko težavne zaradi samega izvora (rastlinskega, živalskega), načina pridobivanja, obdelave in pogojev shranjevanja, medtem ko so sintetične surovine manj problematične zaradi neugodnih pogojev med samo sintezo, možna pa je kasnejša kontaminacija npr. z okuženo vodo (2, 6).



Slika 3: Proces nastajanja bakterijskega biofilma. 1. povratna (reverzibilna) pritrnitev mikrobnih celic; 2. nepovratna (ireverzibilna) pritrnitev; 3. bujna rast mikrobnih celic in razvoj mikrobne kolonije; 4. razvoj zrelega biofilma; 5. delni razkroj biofilma in sprostitvev mikrobnih celic. Te mikrobne celice poiščejo nove površine za naselitev in ponovni razvoj biofilma (7).

Figure 3: Biofilm maturation. 1. initial (reversible) attachment; 2. irreversible attachment; 3. cell growth and maturation of microbial colony; 4. development of mature biofilm; 5. partial decomposition and dispersion of microbial cells. These cells then attach to new surfaces and mature into the biofilm again (7).

Mikrobna ekologija vode ima v farmacevtski industriji velik pomen zaradi mnogokratnosti njene uporabe, bodisi kot sestavine izdelkov ali kot čistilne in hladilne tekočine. Voda predstavlja življenjsko okolje za mikroorganizme in posledično deluje kot prenašalni vektor. Je med pogostejšimi vzroki mikrobne kontaminacij. V industrijski vodi se v

98% kontaminacij pojavljajo Gram-negativne bakterije (*Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacter* spp., *Chromobacter*, *Serratia* sp., enterobakterije,...), drugi najdeni izolati so še *Micrococcus* spp., *Cytophaga* spp., kvasovke, glive in aktinomycete (2). Zelo pomembno vlogo igra sposobnost pritrjevanja nekaterih mikroorganizmov na površino, kjer tvorijo biofilm (Slika 3). Ti se lahko formirajo v vodnih sistemih ali procesnih posodah in predstavljajo vir kontaminacije izdelka, povzročajo korozijo ter zmanjšujejo učinkovitost toplotnega prenosa. Biofilmi so ponavadi zelo odporne oblike mikrobne rasti, katerih ne uniči niti dezinfekcija (2, 5).

Zrak bolj kot naravno življenjsko okolje predstavlja za mikroorganizme prenašalni medij. V zrak se vnašajo s prašnimi delci, ki se dvigujejo zaradi aktivnosti v okolju, preko kože in obleke oseba ali z vlažnimi kapljicami slin. Vsebnost mikrobov v zraku se poviša tudi pri rokovanju s kontaminiranim materialom med pripravo farmacevtskih oblik (8). Najpogosteje v zraku zasledimo sporogene mikroorganizme, kot sta *Bacillus* in *Clostridium*, nesporogene *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium*, plesni *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* in kvasovke iz rodu *Rhodothorula* (1, 2).

V čistih prostorih osebje kljub zaščitni obleki povzroča dviganje delcev. Izvor okužbe so običajno mikroorganizmi, ki so del normalne človeške mikroflore respiratornega trakta in kože (2, 8). Posebno pozornost si zaslužita tudi *oprema* in *prostor*, zato je treba skrbeti da sta ustrezno očiščena, posušena, dezinficirana oz. sterilizirana, da sta iz primerne materiala (npr. oprema iz nerjavečega), s čimbolj gladkimi površinami (2).

*Ovojnina* ima z mikrobiološkega vidika vlogo, da ohranja izdelek neoporečen in preprečuje vstop mikroorganizmov ali vlage, hkrati pa sama ne sme predstavljati vira kontaminacije. Zelo primerni sta steklena in plastična ovojnina, saj sta primerni za pranje, preneseta višje temperature, čistilna sredstva in dobro tesnita. Neprimerna ovojnina je kartonska, ker lahko vsebuje glivne in bakterijske spore, ima hrapavo površino in je ne moremo prati (2).

Mikrobiološko testiranje spremlja sterilno in nesterilno farmacevtsko proizvodnjo in podpira razvoj izdelkov tako, da nadzira proizvodni proces in polnjenje, ter testira končne izdelke. Mikrobiološko testiranje torej zajema nadzor pogojev okolja (zrak, površine, medije in osebje), testiranje mikrobiološke obremenitve vstopnih surovin in ovojnine, testiranje prisotnosti bakterijskih endotoksinov (BET), neoporečnost shranjevanja in validacijo aseptičnega postopka polnjenja z gojiščem (9).

### 3 Vpliv mikroorganizmov na kakovost zdravil

Mikrobne združbe oblikujejo večji del naravnega procesa recikliranja biološkega materiala v okolju in razgradnja kompleksnih spojin se pojavi v ostrem boju za ekološko nišo. Mikrobna pokvarljivost farmacevtskih izdelkov je lahko rezultat preživetja patogenih mikroorganizmov, prisotnosti toksičnih mikrobnih metabolitov ali mikrobne rasti zaradi kemijske razgradnje sestavin farmacevtske oblike (2).

Za mikrobno kontaminacijo so občutljive farmacevtske sestavine kot so npr. *organski polimeri*. Mikrobi s specifičnimi ekstracelularnimi

encimi depolimerizirajo spojine v hranljive fragmente in monomere. Pod določenimi pogoji lahko tudi sintetični polimeri, ki naj bi veljali za bolj odporne, postanejo občutljivi na te procese. Hitro prilagodljive pseudomonade lahko izkoriščajo *površinsko aktivne snovi*. Prisotnost določenih mikroorganizmov v nesterilnih pripravkih lahko povzroči znižanje ali celo inaktivacijo *zdravilne učinkovine*. V nekatere izdelke vključujemo snovi z nizko molekularno maso - *vlažila* (glicerol, sorbitol), ki zmanjšujejo izgubo vode. Če niso prisotni v višjih koncentracijah, jih mikroorganizmi lahko zelo hitro razgradijo. Tudi *maščobe in olja* so lahko tarča mikrobne razgradnje, ko so razpršene v vodi (O/V emulzije). *Sladila, ojačevalci okusa in barvila* so že same po sebi substrati za mikrobno rast. Če jih uporabimo v zelo visokih koncentracijah, znižujejo vodno aktivnost v tekočih izdelkih in inhibirajo mikrobno rast. *Konzervanse* uporabljamo kot protimikrobni sistem za farmacevtske izdelke zato, da med proizvodnim procesom in do konca roka uporabnosti inhibirajo rast potencialnih mikroorganizmov. Razgrajuje jih širok spekter gram negativnih bakterij. Problematični kontaminanti kot npr. pseudomonade so sposobne razgraditi konzervans tako, da izgubi protimikrobno delovanje. Farmakopeja predpisuje uradne metode za testiranje učinkovitosti konzervansov, za katere moramo preveriti učinkovitost proti potencialnim kontaminantom med uporabo izdelka kot tudi potencialnim medprocesnim kontaminantom (2, 5, 6, 10).

Zgodnje indikacije pokvarljivosti izdelka so ponavadi organoleptične, z zaznavnim neprijetnim vonjem in okusom metabolitov. Rast je lahko lokalizirana na površini v obliki filma ali neenakomerno porazdeljena po viskozem izdelku. Mikrobi lahko s svojimi pigmenti povzročijo tudi razbarvanje izdelka. Sredstva za zgoščevanje in redčenje depolimerizirajo, s tem izdelek izgubi viskoznost in suspendirane sestavine sedimentirajo. pH izdelka se spremeni glede na kislost oz. bazičnost metabolitov, ki se sproščajo ob razgradnji. Kemijske spremembe lahko tako modificirajo izdelek, da ga napadejo mikrobi, ki so bili s prvotnim pH inhibirani (2, 11).

### 3.1 Dejavniki, ki vplivajo na mikrobno kontaminacijo farmacevtskih izdelkov

Koncentracija prisotnih mikroorganizmov (inokulum) ni vedno pokazatelj možnosti za kvarjenje izdelka, saj nizka koncentracija kontaminanta še ne pomeni pokvarjenega izdelka, če se v njem ni sposoben razmnoževati. Nizka koncentracija pseudomonad na primer predstavlja večje tveganje kot visoka mikrobiološka obremenitev z glivnimi in bakterijskimi sporami (2, 11).

Preproste zahteve po *hranilih* in izjemna metabolna prilagodljivost omogočajo mikroorganizmom izrabo mnogih sestavin farmacevtskega izdelka kot substrat za biosintezo in rast. Naravne rastlinske in živalske snovi že same po sebi predstavljajo vir hranil, demineralizirana voda kljub odsotnosti hranil nudi še vedno ugodno okolje za rast Gram negativnih bakterij. Nepreživetje takšnih kontaminantov je bolj kot pomanjkanje hranil posledica fizikalno-kemijskih sprememb ali toksičnih učinkov. Za akutne patogene so farmacevtski izdelki neugodno okolje, kjer se sicer ne morejo razmnoževati, lahko pa ostanejo živi in infektivni za določen čas v trdnih farmacevtskih oblikah (2, 11).

Voda je nujno potrebna za rast mikroorganizmov. *Vodno aktivnost* tekočih oblik lahko znižamo z dodatkom visokih koncentracij sladkorjev, PEG ali s sušenjem. Na površini trdnih farmacevtskih oblik se lahko akumulira kondenzirana voda v obliki filma, ki je zelo ugoden za rast gliv (2, 15). Mikrobna rast v okolju je odvisna od razmerja oksidacij – redukcij (*redoks potenciala*), saj je potreben kompatibilen terminalni akceptor za sklenitev dihalnih poti (2). Kvarjenje farmacevtskih izdelkov se lahko pojavi v območju od -20°C do 60°C. *Temperatura shranjevanja* za sestavljene sirupe in večodmerne kapljice za oči je 8 - 12°C (hladilnik) zaradi zmanjšanja tveganja rasti mikroorganizmov med uporabo. Voda za injekcije naj bi se pred pakiranjem in sterilizacijo hranila pri 80°C, da se prepreči rast Gram negativnih bakterij (2, 11). Ekstremne *pH vrednosti* preprečujejo mikrobno rast. Nad pH 8 je rast mikrobov redka, pri izdelkih z nižjim pH pa je možen pojav plesni in kvasovk. Kvasovke lahko s presnavljanjem organskih kislin dvignejo pH, ki je potem ugoden za sekundarno bakterijsko rast (2). Poleg vseh opisanih dejavnikov ima tudi *ovojnina* pomemben vpliv na mikrobno stabilnost farmacevtskih oblik pri kontroli vstopa kontaminantov med shranjevanjem in uporabo (2).

Na preživetje mikroorganizmov velikokrat vpliva prisotnost relativno inertnih materialov, mikrobi so bolj odporni na vročino ali sušenje v prisotnosti polimerov (škrob, želatina). Adsorpcija na delce lahko pomaga pri preživetju mikroorganizmov v nekaterih okoljih (2).

## 4 Mikrobiološka kontrola kakovosti

V 60. letih prejšnjega stoletja so mikrobne kontaminacije predstavljale velik problem. Na Švedskem je npr. izbruhnila salmoneloza, kjer je bil

vir kontaminacije tiroidni prah (10, 11). V ZDA je leta 1965 več ljudi zbolelo za infekcijo s *Salmonello* zaradi jemanja kapsul, obarvanih s karminom (12), poznane so tudi kontaminacije raztopine jod-poloksamera s *Pseudomonas aeruginosa* (13), uroinfekcije pseudomonad s klorheksimidinom (14), metaproterenol sulfat inhalacijske raztopine, kontaminirane s *Pseudomonas gladioli/cepacia* (16). To je vodilo do podrobnejših raziskav in težnje za zmanjšanje kontaminacij ter večji nadzor in mikrobiološko kontrolo kakovosti sterilnih in nesterilnih farmacevtskih izdelkov in snovi za farmacevtsko uporabo.

### 4.1 Mikrobiološka kontrola sterilnih in nesterilnih farmacevtskih izdelkov in snovi za farmacevtsko uporabo

Proizvajalec mora zagotavljati nizko biološko obremenitev končnega izdelka s tem, da upošteva smernice dobre proizvodne prakse med proizvodnjo, shranjevanjem in distribucijo farmacevtskih izdelkov (9).

S farmakopejami so predpisane splošne zahteve za mikrobiološko testiranje sterilnih in nesterilnih zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi in izdelkov (17, 18, 19, 20). Izdelki so razvrščeni v posamezne skupine glede na način uporabe, ter učinkovine in pomožne snovi glede na namen uporabe (19), prav tako pa je določena pogostost testiranja in ustrezna metoda (17, 18).

Merilo sprejemljivosti za nesterilne farmacevtske izdelke se vrednoti na osnovi določanja skupnega števila aerobnih mikroorganizmov (ang. TAMC, total aerobic microbial count), skupnega števila plesni in kvasovk (ang. TYMC, total combined yeast/mould count) in odsotnosti specifičnih mikroorganizmov (Pregl. 1 in 2) (19).

**Preglednica 1:** Zahteve za mikrobiološko kakovost nesterilnih in sterilnih farmacevtskih oblik (19).

**Table 1:** Acceptance criteria for microbiological quality of non-sterile and sterile dosage forms (19).

Skupina / Način uporabe izdelka	TAMC (CFU/g oz. CFU/ml)	TYMC (CFU/g oz. CFU/ml)	Specifični mikroorganizmi
1 Parenteralni izdelki, oftalmiki	Testiranje sterilnosti		Odsotnost viabilnih mikroorganizmov
2A Inhalacijska uporaba (posebne zahteve za tekoče izdelke za razprševanje)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Na žolč odpornih gram negativnih bakterij
2B Izdelki za lokalno uporabo: Oromukozalna uporaba Gingivalna uporaba Dermalna uporaba Nazalna uporaba Aurikularna uporaba TTS izdelki* Vaginalna uporaba	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  <i>Candida albicans</i>
3A Tekoči izdelki za peroralno uporabo	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Escherichia coli</i>
3B Trdni izdelki za peroralno uporabo Rektalna uporaba	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Escherichia coli</i> -

\* TTS izdelki / transdermalni obliži (ang. transdermal therapeutic systems / transdermal patches)

**Preglednica 2:** Zahteve za mikrobiološko kakovost farmacevtskih izdelkov, ki vsebujejo snovi naravnega izvora in pripravke rastlinskega izvora (19).

**Table 2:** Acceptance criteria for the microbiological quality of dosage forms containing raw materials of natural origin and herbal medicinal products (19).

Skupina / Način uporabe izdelka	TAMC (CFU/g oz. CFU/ml)	TYMC (CFU/g oz. CFU/ml)	Specifični mikroorganizmi
4A Posebni predpis Ph. Eur.: Trdni izdelki za peroralno uporabo, ki vsebujejo sestavine naravnega izvora (živalskega, rastlinskega, mineralnega) in za katere predhodni postopek odstranjevanja mikroorganizmov ni mogoč. Kompeten ten regulatorni organ mora dovoljevati, da je začetni TAMC več kot $10^3$ CFU/g oz. ml	$10^4$	$10^2$	Odsotnost (v 1g oz. ml): <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella</i> (v 10g oz. 10 ml) Ne več kot $10^2$ CFU na žolč odpornih gram negativnih bakterij
Pripravki rastlinskega izvora, ki so sestavljeni iz ene ali več rastlinskih drog (celih, razdrobljenih ali v prahovih):			
4B Pripravki rastlinskega izvora, katerim se pred uporabo dodaja vre la voda	$10^7$	$10^5$	V 1g oz. ml: Ne več kot $10^2$ CFU <i>Escherichia coli</i> → kvantifikacijski test za <i>E. coli</i>
4C Pripravki rastlinskega izvora, katerim se pred uporabo ne dodaja vre la voda	$10^5$	$10^4$	V 1g oz. ml: Ne več kot $10^3$ CFU na žolč odpornih gram negativnih bakterij Odsotnost <i>Salmonella</i> (v 10g oz. 10 ml)

Harmonizirana poglavja priporočajo tudi ovrednotenje vpliva drugih mikroorganizmov, ki niso navedeni. V okviru pričakovanj ameriške agencije za zdravila (ang. FDA, Food and drug administration) predpisujejo odsotnost spornih mikroorganizmov, njihovo določanje pa zaupajo v roke posameznega podjetja in njihovega mikrobiološkega laboratorija (19, 22).

V skladu s harmonizirano verzijo farmakopeje se prvič pojavijo tudi splošne zahteve za mikrobiološko kakovost surovin (Pregl. 3) (19, 23).

**Preglednica 3:** Splošne zahteve za mikrobiološko kakovost surovin (19).

**Table 3:** Acceptance criteria for the microbiological quality of non sterile substances for pharmaceutical use (19).

	TAMC (CFU/g oz. ml)	TYMC (CFU/g oz. ml)
Surovine	$10^3$	$10^2$

## 4.2 Limitni testi

Izbira metode za določanje mikrobiološke kvalitete je odvisna od lastnosti izdelka, zahtev, protimikrobne učinkovitosti in količine vzorca na razpolago. Skupno število aerobnih mikroorganizmov (TAMC) in skupno število kvasovk in plesni (TYMC) določamo z metodami membranske filtracije, petrijevih plošč ali MPN metode (ang. Most probable number, metoda najbolj verjetnega števila) (17, 18).

Membransko filtracijo ponavadi uporabljamo za vzorce, ki vsebujejo protimikrobne snovi. Uporabljamo membranske filtre z nominalno velikostjo por ne večjo od  $45 \mu\text{m}$ . Po filtraciji filter obvezno spiramo s primernim tekočim medijem, katerega volumen in količina spiranja sta odvisna od velikosti filtra in protimikrobnih lastnosti vzorca, katerih vpliv je prav tako treba proučiti. Filter potem prenesemo na ustrezno gojišče za detekcijo mikrobov (17, 18). Pri metodi petrijevih plošč poznamo več izvedb. Metodo razmazovanja po površini gojišča (ang. spread plate), kjer vzorec nanese mo na površino gojišča in ga potem enakomerno razmažemo, ter metodo umešanja (ang. pour plate), pri kateri v prazno, sterilno petrijevko najprej dodamo ustrezno količino vzorca, nato pa dodamo utekočinjeno trdno gojišče, ohlajeno na  $45^\circ\text{C}$ , ter vsebino petrijevke nežno pomešamo (1). Metodo petrijevih plošč izvajamo vsaj v dveh paralelkah za posamezno gojišče (17). Metoda MPN je manj natančna metoda za vrednotenje mikrobov kot prejšnji dve, ker ni zanesljiva pri določevanju števila plesni. Zato jo uporabljamo za določevanje TAMC v primerih, ko uporaba druge metode ni možna oziroma za izdelke ali surovine z zelo nizko biološko obremenitvijo.

Uporabljamo lahko tudi alternativne metode, če le dokažemo primerljivost s klasičnimi metodami (21). Hitre mikrobiološke metode farmacevtskim podjetjem omogočajo boljše in hitrejše rezultate kot klasične metode, so lahko bolj učinkovite glede na stroške in izboljšujejo kvaliteto samega testiranja. V uporabi so neposredne ali posredne metode detekcije, ponekod je za povečanje signala potrebna tudi obogatitvena faza. Alternativne metode za kontrolo mikrobiološke kvalitete omogočajo kvalitativno, kvantitativno analizo,

ter identifikacijska testiranja. Razlikujemo jih glede na način detekcije celic oz. iskanih sestavin. Poznamo metode na osnovi mikrobne rasti, kjer povečanje signala dosežemo s kultivacijo celic (bioluminescenca, mikrokalorimetrija, turbidimetrija, metoda s fagi,...), direktne metode, kjer lahko posamezne celice ločimo med seboj in jih potem vrednotimo (fluorescentne tehnike, pretočna citometrija,...), analitske metode posameznih celičnih komponent, kjer iz izražanja določene komponente lahko sklepamo na prisotnost mikroorganizmov (fenotipske kot npr. masna spektrometrija, profiliranje maščobnih kislin, imunološke tehnike in genotipske metode z nukleinskimi kislinami npr. verižna reakcija s polimerazo, ribotipizacija) in komplementarne metode, ki združujejo klasične in alternativne tehnike (mikročipi) (21, 23).

### 4.3 Testiranje sterilnosti

Testiranje sterilnosti izvajamo za snovi, izdelke in predmete, za katere se po farmakopeji zahteva, da so sterilni. Pomembno je, da se testiranje izvaja v aseptičnih pogojih, ter da se skušamo čimbolj izogniti sekundarni kontaminaciji. Testiranje vključuje dve osnovni gojišči: tekoče tioglikolatno gojišče se primarno uporablja za gojenje anaerobnih bakterij, prav tako lahko odkriva aerobne - inkubiramo ga 14 dni pri temperaturi 30 - 35°C, ter tekoče gojišče iz soje, ki je primerno za gojenje gliv in aerobnih bakterij - inkubiramo ga 14 dni pri temperaturi 20 - 25°C. Pomembno vlogo pri testiranju imajo tudi negativne kontrole, s katerimi zagotovimo, da pozitivni rezultati niso posledica kontaminacije gojišča (20).

Pri testiranju sterilnosti uporabljamo metodi membranske filtracije in direktne inokulacije v gojišče. Izbira metode je odvisna od lastnosti izdelka in vrste farmacevtske oblike, pri čemer mora imeti prednost metoda membranske filtracije. Uporabljamo membranske filtre z nominalno velikostjo por ne večjo od 45 µm. Za filtracijo vodnih, oljnih in šibko alkoholnih raztopin uporabljamo celulozno nitratne filtre, za filtracijo močno alkoholnih raztopin celulozno acetatne filtre, posebej prilagojene filtre pa uporabljamo za posamezne specifične izdelke (npr. antibiotike). Testiranje izvajamo pri aseptičnih pogojih, treba je tudi nevtralizirati morebitne protimikrobne aktivnosti z večkratnimi spiranji ter membrano prenesti v primerno gojišče ali dodati ustrezno gojišče v samo filtrsko enoto za inkubacijo. Analizirati moramo vsaj minimalno določeno količino vzorca. Aseptične pogoje lahko dosežemo v komori razreda A z laminarnim pretokom zraka, katera je postavljena v prostor razreda čistosti B, najlažje pa se sekundarni kontaminaciji izognemo z delom v izolatorju (24).

### 5 Harmonizacija predpisov

V zadnjih dveh desetletjih sta globalizacija in širjenje mednarodne trgovine postavile tudi farmacevtsko industrijo pred izzivalno nalogo, da razvije celovite standardne kakovosti, ki bi upravljali zahtevna področja registracij, nadzora trga in prostega pretoka zdravil med čimveč možnimi državami. V tej težnji se je začela uresničevati ideja harmonizacije treh večjih farmakopej, evropske, ameriške in japonske.

Harmonizacija predpisov je prinesla spremembe tudi v mikrobiološko testiranje farmacevtskih izdelkov. Poleg uvedbe novih parametrov (TAMC, TYMC) in uvajanja harmoniziranih analitskih metod so največji

kompromis zagotovo testiranja za specifične mikroorganizme (22, 25). Spremenile so se tudi zahteve za interpretacijo mejnih vrednosti, s tem pa posredno povzročile zaostrovanje (ožanje mej) specifikacij izdelkov. Trenutno poteka faza uvajanja novosti harmonizirane izdaje, kar za podjetja pomeni zelo obširen proces revalidacije obstoječih metod in usklajevanja specifikacij za njihove izdelke (25, 26).

Sprejemanje zahtev za največje trge se vseeno razlikuje glede na napotke posameznih regulatornih organov. Medtem ko harmonizirana poglavja lahko zamenjajo poglavja v japonski farmakopeji z odobritvijo japonskega ministrstva za zdravje, delo in blaginjo, bo ameriška agencija za hrano in zdravila lahko zahtevala dokaz ustreznosti izbrane metode za posamezen material oz. izdelek neodvisno od osnovne metode opisane v ameriški farmakopeji. Podjetja morajo za evropski trg upoštevati monografije iz evropske farmakopeje, harmonizirane zahteve pa se lahko uporabijo le kot dopolnitev (27).

Vključevanje zahtev in posodabljanje metod je naloga specifičnih združenj strokovnjakov, ki postopoma uresničujejo harmonizacijo. Prednost je vseeno ta, da se poleg obveznih predpisov pušča prostor za najboljšo individualno prilagoditev oz. rešitev, ki najbolj ustreza posameznemu podjetju in je v rokah njegovega mikrobiološko usposobljenega osebja.

### 6 Sklep

Mikrobiološka kontrola kakovosti predstavlja nepogrešljiv del vsakega farmacevtskega podjetja. Njena vloga je nadzor kakovosti proizvodnih in sterilizacijskih procesov ter končnih izdelkov. Poenotenje predpisov največjih svetovnih farmacevtskih trgov pomeni njihovo regulatorno zblíževanje, v tako kompleksnem procesu pa je najpomembnejše ohraniti osnovni cilj farmacevtskih podjetij, da zagotavljajo učinkovita, kakovostna in varna zdravila.

### 7 Literatura

1. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed., Prentice Hall, Pearson Education, New Jersey 2003.
2. Denyer SP, Hodges NA, Gorman SP, Hugo & Russell's Pharmaceutical microbiology. 7<sup>th</sup> ed., Blackwell, Oxford 2004.
3. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. Nature Rev Micr 2005; 3: 601-610.
4. <http://kacatko.wordpress.com/2008/11/16/mykotoxiny-hrozba-ci-plany-poplach/>. Dostopano: 29.06.2009
5. Winkowski K. Controlling microbial contamination. Paint & coatings industry 2002: 60-67.
6. de la Rosa MC, Medina MR, Vivar C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. Pharmaceutica Acta Helvetiae 1995; 70: 227-232.
7. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. PLoS Biol 2007; 5(11): 2458-2461.
8. Ljungqvist B, Reinmueller B. Predicted contamination levels in cleanrooms: When cleanroom-dressed people are the contamination source. Pharmaceutical technology, Aseptic processing 2006: 18-22.
9. Flickinger B. Drug-resistant pathogens drive a more concerted effort against microbial contamination. Cleanrooms 2006: 16-21.
10. Kallings LO, Ringerts O, Silverstolpe L. Microbiological contamination of medical preparations. Acta Pharm Scand 1966; 3: 219-228.
11. [http://www.pharmmedia.com/Stability\\_Of\\_Drugs:Microbiological\\_Stability](http://www.pharmmedia.com/Stability_Of_Drugs:Microbiological_Stability). Dostopano: 29.06.2009.
12. Lang DJ, Kunz LS, Martin AR et al. Carmine as a source of nosocomial salmonellosis. New Eng J Med 1967; 276: 829-832.

13. Berkelman RL, Anderson RL, Davis BJ e tal. Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 752-756.
14. Mitchell RG, Hayward AC. Postoperative urinary tract infection caused by contaminating irrigation fluid. *Lancet* 1966; 9i: 793-795.
15. Martinez EJ. Microbial bioburden on oral solid dosage forms. *Pharm tech* 2002: 58-70.
16. FDA. IGS: Guide to inspections of microbiological pharmaceutical quality control laboratories, [fda.gov/ora/Inspect\\_ref/igs/micro.html](http://fda.gov/ora/Inspect_ref/igs/micro.html). Dostopano: 29.06.2009.
17. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Ed, Suppl. 6.5: 2.6.12 Microbiological examination of non sterile products, microbial enumeration tests. EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3923-3927.
18. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Ed, Suppl. 6.5: 2.6.13 Microbiological examination of non sterile products, tests for specified microorganisms. EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3927-3931.
19. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Ed, Suppl. 6.5: 5.1.4 Microbiological quality of non sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use, EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3957-3958.
20. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Ed, Suppl. 6.5: 2.6.1 Sterility, EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008: 3919-3922.
21. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Ed, Suppl. 6.5: 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality. EDQM, Council of Europe, Strasbourg 2008:532-543.
22. Sutton S. The harmonization of the microbial limits tests. *Pharm tech* 2006. <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/Microbiological+testing/The-Harmonization-of-the-Microbial-Limits-tests/ArticleStandard/Article/detail/390985>. Dostopano: 29.06.2009.
23. Moldenhauer J. Rapid microbiological methods and the PAT initiative. *BioPharm Intl* 2005; 18(12): 31-46.
24. Agalloco J. Importance of background microbial levels in the manufacture and testing of sterile products. *Pharm tech* 2005: 74-80.
25. McAteer F. Pharmaceutical microbiology: Harmonization of microbial limits test for nonsterile products. *Cleanrooms* 2007: 30-31.
26. Bombles L, Weiss C, Beckmann G. Examination of microbiological quality of pharmaceutical raw materials. *Pharmeuropa scientific notes* 2007; 1:1-7.
27. Q4B evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions, Annex 8: Sterility test general chapter. Bruselj, 2008, <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM127798.pdf>. Dostopano: 22.01.2010.