



# Badania mikrobiologiczne wody stosowanej do wytwarzania produktów leczniczych

Jadwiga Marczevska, Krystyna Mysłowska\*

Woda w przemyśle farmaceutycznym i biotechnologicznym jest najczęściej stosowanym surowcem i być może najważniejszym ze wszystkich mediów farmaceutycznych wytwarzanych przez wytwórcę produktów leczniczych. Jest wykorzystywana w procesach fermentacji, ekstrakcji, syntezy a także jako rozpuszczalnik w procesach technologicznych np. granulacji. Jest surowcem bazowym dla wielu gotowych produktów, takich jak np. szczepionki oraz leków w postaci płynnej, także zawiesin. Może występować jako substancja pomocnicza lub być stosowana do rekonstrukcji (przywracania postaci) produktu leczniczego.

Woda jest używana w procesach czyszczenia pomieszczeń, urządzeń i sprzętu, również jako rozpuszczalnik koncentratów środków dezynfekujących. Stanowi ważny składnik podłoża mikrobiologicznych stosowanych do hodowli drobnoustrojów w laboratorium mikrobiologicznym kontroli jakości.

Woda w wytwórni farmaceutycznej jest zwykle wykorzystywana bezpośrednio po wytworzeniu, w odróżnieniu od innych surowców stosowanych w produkcji preparatów

leczniczych, które przed dopuszczeniem do stosowania podlegają określonym badaniom.

Jakość mikrobiologiczna wody jako surowca do celów farmaceutycznych, ze względu na możliwość pozostałości zanieczyszczeń w gotowym produkcie, jest ważna nawet w tych produktach leczniczych, z których została usunięta w trakcie procesu technologicznego.

Wytwórnice farmaceutyczne oprócz systemów wody tzw. ogólnego zastosowania, zależnie od potrzeb, posiadają systemy generowania wody oczyszczonej, wody wysoko oczyszczonej lub wody do wstrzykiwań, o jakości zgodnej z wymaganiami obowiązującej farmakopei. Wody te różnią się stopniem czystości, który to parametr stanowi podstawę do użycia określonej wody do konkretnego zastosowania. Rodzaj stosowanej wody powinien być uzależniony od rodzaju i zamierzonego zastosowania gotowego produktu leczniczego oraz etapu wytwarzania, na którym jest ona wykorzystywana.

Jakość wody, zwłaszcza jakość mikrobiologiczna, jest parametrem krytycznym w procesie wytwarzania leków i dlatego przemysł farmaceutyczny

przeznacza znaczne środki na modernizację i konserwację systemów oczyszczania wody. Walidacja procesu wytwarzania wody do celów farmaceutycznych, przechowywanie i systemy rozprowadzania są integralną częścią przepisów Dobrej Praktyki Wytwarzania. Zgodnie z tymi przepisami rurociągi wody oczyszczonej stosowanej w procesach wytwórczych, tam gdzie jest to wskazane, należy dezynfekować i sterylizować wg pisemnych procedur. Procedury te oprócz opisu metody przeprowadzania tych zabiegów powinny podawać dopuszczalny poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych oraz sposób postępowania w przypadku ich przekroczenia [1, 2].

Surowcem do wytwarzania wody do celów farmaceutycznych o czystości farmakopealnej jest woda spełniająca wymagania dla wody przeznaczonej do spożycia dla ludzi [3].

W Farmakopei Polskiej (FP) [4] zamieszczono monografie różnych rodzajów wody stosowanej do celów farmaceutycznych. Opisane są w nich wymagania i sposoby ich otrzymywania.

Wyróżnia się wodę do wstrzykiwań produkcyjną oraz jał-

wą; wodę oczyszczoną produkcyjną i w pojemnikach oraz wodę wysoko oczyszczoną. FP zawiera również monografię wody stosowanej do rozcieńczania koncentratów do hemodializy.

Uzupełnieniem monografii farmakopealnych są wytyczne Europejskiej Agencji Oceny Produktów Leczniczych dotyczące jakości wody stosowanej w przemyśle farmaceutycznym, które określają w jakiej sytuacji poszczególne rodzaje wody znajdują zastosowanie. Dokument jest przeznaczony dla przemysłu farmaceutycznego jako wskazówka przy wytwarzaniu substancji czynnych i produktów leczniczych dla ludzi i zwierząt [5].

Na podstawie tych wytycznych w tabelach 1 i 2 przedstawiono minimalne wymagania jakości jakie powinna spełniać woda stosowana w produktach leczniczych niejałowych i dla których wymagania jest jałowość. W tabeli 3 zamieszczono wymagania czystości wody stosowanej w procesach technologicznych podczas wytwarzania produktów leczniczych, w których nie jest ona obecna w końcowej postaci leku.

W wytycznych EMEA [5] oprócz informacji dotyczą-



Tabela 1. Jakość wody stosowanej przy wytwarzaniu niejałowych produktów leczniczych

Niejałowe produkty lecznicze	Minimum jakości wody do akceptacji
Preparaty doustne	Oczyszczona
Roztwory do rozpylania	Oczyszczona*
Preparaty do stosowania na skórę	Oczyszczona**
Preparaty do nosa/uszu	Oczyszczona
Preparaty dojelitowe/dopochwowe	Oczyszczona

\* W niektórych chorobach np. mukowiscydozie, produkty lecznicze podawane przez rozpylenie muszą być jałowe i apirogenne. W takich przypadkach należy użyć WFI lub jałowej wody wysokooczyszczonej.

\*\* W przypadku niektórych produktów weterynaryjnych np. preparaty do dezynfekcji strzyków wymion stosowane w weterynarii, akceptowalne może być użycie wody pitnej, gdy to uzasadnione i zatwierdzone po uwzględnieniu zmienności składu chemicznego i jakości mikrobiologicznej.

Tabela 2. Jakość wody stosowanej przy wytwarzaniu jałowych produktów leczniczych

Jałowe produkty lecznicze	Minimalna jakość wody jaka może być zaakceptowana
Podawane pozajelitowo	WFI
Oftalmiczne	Oczyszczona
Roztwory do hemofiltracji	WFI
Roztwory do hemodializofiltracji	WFI
Roztwory do dializy otrzewnowej	WFI
Roztwory do irygacji	WFI
Preparaty do nosa/uszu	Oczyszczona
Preparaty do stosowania na skórę	Oczyszczona

Tabela 3. Jakość wody stosowanej w procesach technologicznych podczas wytwarzania produktów leczniczych, jeśli nie jest ona obecna w końcowej postaci leku

Produkcja	Minimalna jakości wody jaka może być zaakceptowana
Granulacja	Oczyszczona*
Powlekanie tabletek	Oczyszczona
Stosowana w formulacji przed liofilizacją niejałową	Oczyszczona
Stosowana w formulacji przed liofilizacją jałową	WFI

\* W przypadku niektórych prefiksów weterynaryjnych np. granulowane koncentraty może być akceptowalne użycie wody do picia, gdy to uzasadnione i zatwierdzone, po uwzględnieniu składu chemicznego jakości mikrobiologicznej.

cych minimalnej jakości wody stosowanej przy wytwarzaniu różnych rodzajów produktów leczniczych przedstawiono wymagania dotyczące jakości wody jaka może być zaakceptowana przy myciu, płukaniu urządzeń, pojemników i systemów zamykających zależ-

nie od typu produktu np.: produkty lecznicze jałowe, produkty pośrednie, aktywne substancje do celów farmaceutycznych (API) i etapu płukania, np.: wstępne, końcowe. W dokumencie przedstawiono również wymagania jakości wody stosowanej podczas



## Elix® Advantage Systemy do oczyszczania wody

Najlepsza jakość wody oczyszczonej na wyciągnięcie ręki



Możesz polegać na jakości wody dostarczanej przez system Elix!

- Produkcja wody klasy II w oparciu o technologię odwróconej osmozy (RO) i elektrodjonizacji (EDI) bez dodatkowych wkładów żywic jonowymiennych spełniająca wymagania najwyższych standardów, zapewniając jednocześnie niezmienną jej jakość
- Unikalna technologia gwarantuje uzyskanie czystej wody przy minimalnych kosztach eksploatacyjnych

## System Milliflex®

System Milliflex® w istotnym stopniu usprawnia pracę laboratorium otwierając nowe możliwości:

- kontrakty prewencyjno-serwisowe
- opracowanie metody
- serwis walidacyjny na miejscu IQ, OQ, PQ
- protokół walidacyjny IQ, OQ, PQ
- pompy Milliflex Plus
  - 1, 2, 3, głowicowe
  - tryb automatyczny
  - drukarka
- lejki Milliflex z membranami
  - 100 i 200 ml
  - membrany z mieszanych estrów celulozy
  - membrany polimerowe z Durapore
- sterylne płyny do płukania
- MilliSnap
- gotowe do użycia kasyety z podłożami agarowymi



Połączenie produktów Milliflex oraz towarzyszących im usług

- ✓ usprawnia pracę laboratorium
- ✓ podnosi poziom zabezpieczenia jakości
- ✓ wdraża system całkowicie zgodny z wymaganiami GLP/GMP



wytwarzania API biorąc pod uwagę typ wytwarzania np.: ekstrakcja ziół, pożywki fermentacyjne, końcowa izolacja i oczyszczanie oraz wymagania dla produktu.

## **Woda do wstrzykiwań**

Jest to woda służąca do przygotowania leków do podawania pozajelitowego.

W procesie technologicznym – jako rozpuszczalnik – wykorzystywana jest woda do wstrzykiwań produkcyjna, zaś do rozpuszczania i rozcieńczania leków do podawania pozajelitowego stosowana jest woda do wstrzykiwań wyjałowiona.

## Woda do wstrzykiwań produkcyjna

Wodę do wstrzykiwań otrzymuje się z wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi lub z wody oczyszczonej na drodze destylacji. Aby zapewnić właściwą jakość wody produkcyjnej wytwórcy muszą stosować zwalidowany proces produkcji i regularnie kontrolować jej czystość mikrobiologiczną. Powinny być ustalone odpowiednie limity:

- ostrzegawczy, który pozwoli na wcześniejsze wykrycie zanieczyszczenia i zidentyfikowanie rodzaju nieprawidłowości w systemie przesyłania i wytwarzania wody;
- interwencyjny, którego przekroczenie obliguje wytwórcę do podjęcia ustalonych działań opisanych w procedurach.

Poziom interwencyjny zalecany przez FP wynosi 10cfu/100ml wody, wykrywanych w badaniu metodą sączków membranowych. Ważnym parametrem jakości wody do

wstrzykiwań jest obecność endotoksyn bakteryjnych, których zawartość dopuszcza się poniżej 0,25 IU/ml.

## Woda do wstrzykiwań wyjałowiona

Jest to woda do wstrzykiwań, która została rozdozowana do odpowiednich pojemników i wyjałowiona.

## **Woda oczyszczona**

Przeznaczona jest do wytwarzania produktów leczniczych, którym nie stawia się jednocześnie wymagań jałowości i apirogenności.

## Woda oczyszczona produkcyjna

Jest otrzymywana z wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi jedną z metod takich jak np.: destylacja, wymiana jonowa czy też odwrócona osmoza. Sposób przechowywania i rozprowadzania wody oczyszczonej produkcyjnej musi zapewnić warunki zabezpieczające przed wzrostem drobnoustrojów i wprowadzeniem innych zanieczyszczeń. Podczas produkcji i przechowywania należy kontrolować i monitorować ilość drobnoustrojów. Należy ustalić odpowiednie limity ostrzegawcze i interwencyjne w zakresie liczby drobnoustrojów.

Poziom interwencji zalecany przez FP wynosi 100 cfu/1 ml.

## Woda oczyszczona w pojemnikach

Jest to woda oczyszczona produkcyjna, która została rozdozowana do odpowiednich pojemników, zapewniających jej odpowiednią czystość mikrobiologiczną.

## **Woda wysoko oczyszczona**

Przeznaczona jest do stosowania przy wytwarzaniu produktów leczniczych gdy potrzebna jest woda o wysokiej jakości biologicznej.

Wodę wysoko oczyszczoną otrzymuje się z wody spełniającej wymagania dla wody przeznaczonej do spożycia dla ludzi, metodą podwójnej osmozy w połączeniu z ultrafiltracją i dejonizacją.

Zgodnie z zaleceniami FP jakość mikrobiologiczna wody wysoko oczyszczonej powinna być regularnie monitorowana. Poziom interwencji ustalony przez FP wynosi 10cfu/100 ml wody.

## **Badania mikrobiologiczne wody**

W wytwórni farmaceutycznej badanie wody zwykle jest przeprowadzane jednocześnie z procesem wytwarzania produktu, a wyniki badań są dostępne dopiero po zakończeniu tego procesu i otrzymaniu produktu gotowego.

Badania wody nie można powtórzyć na tej samej próbce gdyż jest ona wytwarzana i utrzymywana w systemie zapewniającym jej ciągłą rotację. Dlatego we wszystkich monografiach wody do celów farmaceutycznych, z wyjątkiem wody do wstrzykiwań jałowej oraz wody oczyszczonej w pojemnikach, zaleca się ustalić dopuszczalne limity zanieczyszczenia mikrobiologicznego na poziomie interwencji i działania w celu zapewnienia odpowiedniej jakości wody i możliwości wczesnego podjęcia działań gdy tylko pojawi się problem.

## Pobieranie prób do badań

Próby do badań powinny być pobierane w sposób aseptyczny przez specjalnie wyszkolony personel. Zgodnie z planem pobierania prób, który określa częstotliwość, miejsce i wielkość pobieranej próby. Należy stosować oddzielne pojemniki do badań mikrobiologicznych i chemicznych. Pobieranie prób powinno być poprzedzone odkażeniem zaworu, spuszczeniem i odrzuceniem określonej objętości wody przed pobraniem próby przeznaczonej do badań. Próba powinna być we właściwy sposób opisana. Należy zapisać takie informacje jak: data i miejsce pobrania, numer zaworu, nazwisko lub kod próbobiorcy, ewentualne spostrzeżenia i uwagi, których znajomość może być przydatna w interpretacji uzyskanych wyników.

Pobrane próby należy chronić przed światłem i transportować oraz przechowywać w odpowiedniej temperaturze. Jeżeli transport próby trwa dłużej niż 3 godz., to należy zadbać aby w tym czasie próba była przechowywana w temperaturze 4-8°C. Czas pomiędzy pobraniem próby a rozpoczęciem badania mikrobiologicznego nie powinien przekraczać 24 godzin.

## Sprzęt i podłoża stosowane w badaniu

Szkló używane do badań powinno być myte w zwalidowanym cyklu mycia, w myjni automatycznej lub ręcznie, który obejmuje: czyszczenie mechaniczne, mycie pod bieżącą wodą, płukanie wodą demineralizowaną i suszenie



w temp. 80°C. Następnym etapem przygotowania szkła do badań jest sterylizacja suchym gorącym powietrzem w temperaturze 160°C lub 180°C odpowiednio przez 2 godziny lub 30 minut.

Do badań należy stosować podłoża hodowlane zgodnie z wymaganiami FP i opracowanymi procedurami nadzoru. (Nadzór nad podłożami hodowanymi został omówiony w LAB 6/2013) [6]. Zgodnie z zaleceniami FP oraz normy ISO 11133 [7] do sporządzania podłoży do hodowli drobnoustrojów powinna być stosowana woda oczyszczona.

#### Przeprowadzanie badań

Badania wody należy wykonywać w pomieszczeniach czystych laboratorium, wyposażonych w tzw. boksy (szafy) z laminarnym przepływem powietrza, chroniące próbę przed zanieczyszczeniami ze środowiska.

Metodą z wyboru do oznaczania poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody stosowanej w przemyśle farmaceutycznym jest metoda z użyciem sączków membranowych wykonywana zgodnie z opisem FP w rozdziale „Badanie ilościowe czystości mikrobiologicznej produktów niejałowych” (2.6.12) oraz w rozdziale 2.6.1 dla wody do wstrzykiwań wyjałowionej. (Farmakopealne metody badań były publikowane w LAB 2/2014).

Aby ocenić ilościową zawartość drobnoustrojów, odpowiednie objętości pobranych do badań prób wody należy przesączyć przez sączki o minimalnej wielkości porów 0,45 µ. Następnie sączki umie-

ścić na płytkach zawierających podłoże agarowe R2A, gdy badana jest woda produkcyjna, zarówno do wstrzykiwań jak i oczyszczona. Do przeprowadzenia badania czystości mikrobiologicznej wody oczyszczonej w pojemnikach należy stosować podłoże agarowe TSA. Natomiast

po przesączeniu prób wody w kierunku oceny jałowości, sączki umieszcza się: jeden w płynnym podłożu tioglikolanowym, drugi w bulionie kazeinowo-sojowym. Te podłoża pozwalają na identyfikację bakterii beztlenowych oraz grzybów i bakterii tlenowych. Podłoże agarowe wzrostowe

R2A jest stosowane do izolacji drobnoustrojów występujących w wodzie. Ma ono zastosowanie do izolacji drobnoustrojów uszkodzonych jak również tych rosnących i tolerujących warunki niedoboru substancji odżywczych. Bakterie te zwykle wolno rosną i na innych podłożach bogatych

## MIKROSKOPY BIOLOGICZNE

# MIKROSKOPY BIOLOGICZNE

**PRECOPTIC Co.**

ul. Arkuszowa 60, 01-934 Warszawa  
tel./fax (22) 835-54-73, 834-12-25  
<http://www.precoptic.pl>, e-mail: [precoptic@precoptic.pl](mailto:precoptic@precoptic.pl)



w substancje odżywcze ich wzrost może być zdominowany a nawet tłumiony przez inne współwystępujące drobnoustroje.

Podłoże agarowe TSA jest podstawowym podłożem stałym, na którym rośnie szeroka gama drobnoustrojów o stosunkowo niskich wymaganiach pokarmowych.

Inkubacje hodowli należy prowadzić przez 5 dni w temperaturze 30°C - 35°C. Jedynie dla prób wody wyjałowionej do wstrzykiwań okres inkubacji nie może być krótszy niż 14 dni zarówno gdy przebiega w temperaturze 30°C-35°C jak i w temperaturze 20°C-25°C, odpowiednio w podłożu tioglikolanowym i w podłożu z hydrolizatem kazeiny.

Po okresie inkubacji, oceniając czystość mikrobiologiczną należy policzyć wyrosłe na podłożach stałych mikroorganizmy zaś w badaniach jałowości dokonać oceny zmętnienia lub jego braku podłożu płynnych, świadczącym o dodatnim lub ujemnym wyniku badania.

### Interpretacja uzyskanych wyników

Badanie wody do celów farmaceutycznych pomimo pozornej łatwości ich wykonania, ze względu na dużą różnorodność źródeł pozyskiwania wody, jak również ze względu na unikalne właściwości chemiczne wody, nie jest proste. Nie ma czystej wody w przyrodzie, co sprawia, że w „uniwersalnym rozpuszczalniku” mogą być obecne różnorodne związki.

Dane WHO wskazują, że istnieje ponad 90 możliwych niedopuszczalnych zanieczyszczeń wody pitnej, w tym mikroorga-

nizmy, które mogą być szczególnie kłopotliwe ponieważ mogą bytować i rozmnażać się w czystej wodzie pozbawionej substancji odżywczych [7].

Obecność mikroorganizmów jest przyczyną powstawania biofilmu, który stanowi barierę ochronną wobec środków przeciwdrobnoustrojowych, w tym środków dezynfekcyjnych i biobójczych. Powstanie biofilmu powoduje, że nie jest możliwa eradykacja, utrzymują się komórki przetrwałe co umożliwia przemieszczanie się biofilmu i/lub rozsiew komórek potomnych [9].

Tak więc, interpretacja i ocena uzyskiwanych wyników może sprawiać trudności z powodu ich zmienności powodowanej możliwością występowania różnorodnej flory bakteryjnej a często z powodu występowania w wodzie drobnoustrojów, które nie dają się hodować.

W przypadku uzyskania wyników niezgodnych z założonymi limitami należy przeprowadzić proces wyjaśniający, który pozwoli zidentyfikować przyczyny niepowodzenia i podjąć określone działania. W tym celu należy opisać szczegółowo zaistniałą sytuację podając: datę, miejsce lub miejsca pobrania, osobę pobierającą i warunki transportu prób do laboratorium. Jednocześnie należy podjąć działania w celu wykluczenia lub stwierdzenia błędu w działalności samego laboratorium, który mógł mieć wpływ na uzyskany wynik. Należy sprawdzić wszystkie zapisy dotyczące użytych materiałów, wyników kontroli środowiska prowadzenia badań, zastosowania właściwych procedur metodycznych.

Równocześnie działania wyjaśniające są prowadzone na wydziale produkcyjnym, z którego pochodziła próba niespełniająca wymagań. Sprawdzane są wszystkie dokumenty związane z wytwarzaniem partii wody niespełniającej wymagań jakości.

Jeśli w trakcie działań wyjaśniających zostanie wykluczony błąd laboratoryjny w ocenie jakości mikrobiologicznej wody, wówczas jest uruchamiana procedura sanizacji stacji wytwarzania wody. W celu sprawdzenia skuteczności podjętych działań są pobierane próby w kierunku oznaczenia czystości mikrobiologicznej wody.

W dalszym etapie postępowania przeprowadza się analizę ryzyka wpływu użytej wody na jakość całej serii wszystkich wytworzonych produktów i przeprowadza kontrolę mikrobiologiczną produktów, do wytworzenia których została użyta woda o parametrach niezgodnych z przyjętymi wymaganiami.

Celem postępowania wyjaśniającego przeprowadzonego zarówno w laboratorium jak i na wydziale produkcyjnym jest wykrycie przyczyny uzyskania wyniku niezgodnego z przyjętymi kryteriami i wprowadzenie działań korygujących i zapobiegawczych, które wyeliminują przyczynę powstania wyniku niezgodnego i pojawienia się go ponownie w przyszłości.

### Literatura

[1] Poradnik GMP. Dobra praktyka wytwarzania środków farmaceutycznych i materiałów medycznych. Praca zbiorowa. Polfarmed – Polska Izba

Przemysłu Farmaceutycznego i Sprzętu Medycznego, 1998.

[2] Obwieszczenie MZ z dnia 17 października 2013 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia MZ w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania.

[3] Rozporządzenie MZ w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi z dnia 29 marca 2007 (Dz. U. Nr 61, poz.417 z p. zmian.).

[4] Farmakopea Polska IX Tom 1, 2011.

[5] EMEA – C European Agency For the Evolution of Medical Products: Note for Guidance on Quality of Water for Pharmaceutical Use. London, maj, 2002. (CPMP/QWP/158/01 Revision, EMEA/CVMP/115/01).

[6] J. Marczevska, K. Mysłowska. Nadzór nad materiałami stosowanymi w badaniach mikrobiologicznych (cz. I). Podłoża hodowlane. LAB – Laboratoria Aparatura Badania, 6/2013.

[7] PN-EN ISO 11133:2014-07 Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

[8] Essential Medicines and Health Products Information Portal WHO. Spplementary Training Modules: Validation, Water, Air Handling System – Water for Pharmaceutical Use (Part 1): Introduction and Treatment. 2006.

[9] E. Trafny. Biofilm w systemach wodnych. Mikrobiologia farmaceutyczna. IV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa. Wrocław, 2013.

\* Dr Jadwiga Marczevska – [jmarczevska@interia.pl](mailto:jmarczevska@interia.pl), mgr Krystyna Mysłowska – [krystynamyslowska@gmail.com](mailto:krystynamyslowska@gmail.com)