**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Микробиологический мониторинг чистых помещений (зон)** |  | **ОФС** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Микробиологический мониторинг – это комплекс мероприятий, используемых для контроля условий работы предприятия и/или лаборатории.

В настоящей общей фармакопейной статье изложены основные требования к параметрам окружающей среды чистых помещений и/или зон, предназначенных для производства и испытания стерильных и нестерильных лекарственных средств (ЛС), за исключением производственной зоны аптечных учреждений; ключевые факторы, которые необходимо учитывать при разработке и проведении программ микробиологического контроля производственной среды, составлении планов отбора проб, выборе методов и оборудования для проведения анализа в ходе текущего контроля и аттестации чистых помещений, а также идентификации выделенных микроорганизмов и др.

Настоящая ОФС носит информационный характер и при её применении необходимо учитывать конкретные условия и технологии, используемые при производстве и анализе ЛС.

**Термины и определения**

Критическая поверхность – поверхность, находящаяся в непосредственной близости к асептическим операциям и представляющая повышенный риск контаминации ЛС.

Оснащенное состояние – состояние, в котором чистое помещение построено и функционирует, технологическое оборудование полностью укомплектовано, но персонал отсутствует.

Уровень действия – установленный критический уровень содержания микроорганизмов, при превышении которого требуется немедленное вмешательство и проведение корректирующих действий.

Уровень тревоги – установленный докритический уровень содержания микроорганизмов, дающий раннее предупреждение о возможном отклонении от нормальных рабочих условий производства, не требующий немедленного вмешательства и корректирующих действий, но который является поводом для проведения дополнительного мониторинга и анализа результатов.

Чистое помещение (зона) – помещение, построенное и эксплуатируемое таким образом, что в нём сведены к минимуму проникновение, образование и накопление загрязнений в виде частиц, микроорганизмов и, в некоторых случаях, пирогенных веществ.

Эксплуатируемое состояние — это состояние, при котором чистое помещение и технологическое оборудование функционируют в требуемом режиме с заданным количеством работающего персонала.

**Общие требования**

Проектирование, эксплуатация и мониторинг чистых помещений/зон осуществляют в соответствии с действующими правилами надлежащей производственной практики (GMP).

Для обеспечения надлежащих условий окружающей среды чистых помещений/зон разрабатывают, внедряют и поддерживают документированную систему контроля загрязнений, частью которой является программа микробиологического мониторинга. Основной целью такой программы является гарантия стабильности условий проведения работ, выявление начальных отклонений и выработка корректирующих действий до возникновения ситуаций, приводящих к появлению ЛС ненадлежащего качества, получению недостоверных результатов испытания и др.

Программа микробиологического мониторинга окружающей среды охватывает: оценку микробной контаминации воздуха, сжатых газов, критических поверхностей, рук и одежды персонала, работающего в чистом помещении/зоне; оценку эффективности очистки и дезинфекции помещений и оборудования; оценку эффективности дезинфицирующих средств; анализ эффективности работы бактерицидных установок; контроль воды и др.

К контролируемым параметрам окружающей среды чистых помещений/зон также относят содержание взвешенных частиц в воздухе, скорость потока воздуха, перепад давления между помещениями разных классов чистоты, кратность воздухообмена, целостность и эффективность работы фильтров тонкой очистки воздуха, температуру и влажность в помещениях. Данные параметры контролируют в соответствии с действующими отраслевыми нормативными документами. Контроль стерилизации осуществляют в соответствии с ОФС «Стерилизация».

В программе микробиологического мониторинга описывают максимально допустимые количества микроорганизмов и частиц, методики проведения испытаний и анализа данных, а также действия в ситуациях, когда установленные пределы превышены.

Точки отбора проб и периодичность всех видов мониторинга выбирают на основе анализа рисков и результатов, полученных при классификации чистых помещений (зон). Анализ данных способствует отслеживанию трендов в изменениях окружающей среды.

Текущий микробиологический мониторинг чистых помещений (зон) проводят в эксплуатируемом состоянии только валидированными методиками с использованием поверенного или аттестованного оборудования, а также материалов с известными характеристиками, подтверждёнными документально.

Используют питательные среды, соответствующие требованиям, установленным соответствующими статьями Государственной фармакопеи или Фармакопеи ЕАЭС. Свойства питательных сред определяют до проведения испытания для корректного воспроизведения методики. Допускается проводить контроль качества питательных сред одновременно с выполнением анализа по мониторингу, однако, если среда будет признана непригодной, результаты испытания считают недостоверными.

**Классы чистоты помещений**

Чистые помещения (зоны) классифицируют в соответствии с требуемыми характеристиками производственной среды. При этом учитывают вид проводимых работ и изготавливаемых ЛС (стерильных или нестерильных). Класс чистоты помещения (зоны) подтверждают не реже одного раза в год в ходе аттестации.

Чистые помещения (зоны) подразделяют на четыре класса: А, B, C и D. Ниже приведены примеры работ, выполняемых в помещениях разных классов чистоты.

Таблица 1 – Примеры работ, проводимых в помещениях разных классов чистоты

| Класс чистоты | Проводимые операции |
| --- | --- |
| Производство стерильных лекарственных средств, подлежащих финишной стерилизации | |
| А | Наполнение продукции, которую нельзя подвергать риску контаминации |
| С | Приготовление растворов, которые нельзя подвергать риску контаминации. Наполнение продукции. |
| D | Приготовление растворов и подготовка первичной упаковки, материалов для последующего наполнения. |
| Производство лекарственных средств в асептических условиях | |
| А | Асептическое приготовление и наполнение. |
| С | Приготовление растворов, подлежащих стерилизующей мембранной фильтрации. |
| D | Операции с материалами после мойки. |
| Производство нестерильных лекарственных средств (порошков «ангро», твердых, мягких, жидких лекарственных форм и аэрозолей) | |
| С | Получение пустых желатиновых капсул на автоматических линиях. |
| D | Подготовка материалов первичной упаковки, приготовление лекарственного средства, наполнение, упаковка. Приготовление дезинфицирующих растворов. |
| Лабораторные испытания | |
| А | Посев лекарственных средств при определении стерильности. |
| B | Подготовительные работы, например, разгрузка автоклава в помещениях для определения стерильности. |
| D | Инкубация посевов, учет результатов. |

К классу В относят помещение (зону), непосредственно окружающую зону класса A, предназначенную для асептического приготовления и наполнения, а также контроля качества стерильных ЛС. Если анализ стерильности осуществляют в изоляторе класса А, последний может располагаться в неклассифицированном помещении или в классе чистоты D.

Для определенного класса чистоты установлены соответствующие предельно допустимые концентрации жизнеспособных микроорганизмов в воздушной среде, на поверхностях и руках персонала (таблица 2).

Таблица 2 – Рекомендуемые предельно допустимые значения при микробиологическом мониторинге чистых помещений (зон) в эксплуатируемом состоянии (приведены средние значения).

| Рекомендуемое предельно-допустимое содержание микроорганизмов | Класс чистоты | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| А | B | C | D |
| воздух, КОЕ/м3 | <1 | <10 | 100 | 200  500\* |
| седиментационная чашка диаметром 90 мм, КОЕ/чашка за 4 ч | <1 | 5 | 50 | 100 |
| на поверхностях (за исключением пола и стен), КОЕ/контактная чашка диаметром 55 мм | <1 | 5 | 25 | 50 |
| на поверхностях (пол и стены), КОЕ/контактная чашка диаметром 55 мм | <1 | 5 | — | — |
| на руках персонала (5 пальцев), КОЕ/1 перчатка | <1 | 5 | — | — |

\*Примечание: при производстве нестерильных ЛС и в условиях лаборатории.

По результатам мониторинга устанавливают соответствующие пределы: уровень тревоги и уровень действия.

**Уровни тревоги и действия** устанавливают индивидуально для отдельных чистых помещений/зон по результатам анализа имеющихся ретроспективных данных мониторинга с учётом рекомендуемых требований к классу чистоты.

Уровни тревоги и/или действия периодически пересматривают, как правило, в рамках анализа трендов, при изменении технологий, способов очистки и дезинфекции и т.д.

Содержание микроорганизмов в любом чистом помещении/зоне имеет изменчивые значения, причем их вариабельность во времени является лучшим индикатором уровня контроля помещения/зоны. В чистых помещениях, функционирующих надлежащим образом, разброс значений, как правило, низкий.

Значение уровня тревоги устанавливают таким образом, чтобы оно было ниже максимально допустимого содержания микроорганизмов в помещении/зоне определенного класса чистоты, но значительно превышало характерные для него отклонения результатов мониторинга. Особое внимание уделяют тому, является ли обнаруженное отклонение случайным событием или нежелательной тенденцией.

Значение уровня действия превышает уровень тревоги, но, как правило, устанавливается ниже нормативного требования для помещения определенного класса чистоты. Уровни тревоги и действия в некоторых случаях могут быть равны. При высокой чувствительности методик, используемых для обнаружения микроорганизмов, а также в случае, если условия в помещении/зоне контролируемы и стабильны, уровень действия может быть равен значению, рекомендуемому соответствующим нормативным документом.

Превышение уровня действия влечёт за собой проведение необходимых расследований и корректирующих действий. Таким образом, это значение должно быть выбрано так, чтобы предотвратить нежелательное влияние на процесс производства или анализа качества.

Для установления уровней тревоги и действия могут быть использованы следующие подходы, описанные в нижеследующих примерах.

А. Установление порогового значения.

Результаты мониторинга конкретного помещения/зоны представляют в виде диаграммы. В качестве уровней тревоги и действия выбирают значения, которые соответственно на 1 % и 5 % выше полученного уровня.

Помимо этого, в качестве уровней тревоги и действия могут использоваться значения 95-го и 99-го процентилей, полученных на основании последних 100 результатов мониторинга.

Б. Нормальное распределение результатов.

Данный подход используют только для больших массивов данных (для выборок малых размеров применяют распределение Пуассона). Рассчитывают среднее значение и стандартное отклонение полученных результатов мониторинга. Значения уровней тревоги и действия определяют как среднее значение плюс два и три стандартных отклонения, соответственно.

Как правило, результаты микробиологических исследований не подчиняются нормальному распределению и требуют математического преобразования перед статистической обработкой (например, логарифмирование или трансформацию с помощью квадратного корня). Помимо этого, могут применяться непараметрические методы обработки данных. Целесообразно определить статистическую модель, наилучшим образом описывающую получаемые результаты мониторинга, и использовать её для установления уровней тревоги и действия.

**Уборка и дезинфекция**

Ключевую роль при эксплуатации чистого помещения/зоны играют процедуры уборки и дезинфекции. Эти процедуры проводят в соответствии с утверждёнными инструкциями, которые включают в себя:

- выбор дезинфицирующих средств с учётом эффективности, подтвержденной бактерицидности и фунгицидности;

- порядок приготовления рабочих растворов дезинфицирующих и моющих средств;

- способ применения дезинфицирующих и моющих средств;

- время экспозиции дезинфицирующих и моющих средств;

- порядок очистки после дезинфекции (если необходимо);

- требования к хранению дезинфицирующих и моющих средств;

- график очистки (дезинфекции) помещений/зон;

- меры по защите персонала и др.

Эффективность проведения очистки и дезинфекции помещения/зоны, а также методов удаления остатков моющих и дезинфицирующих средств на критических поверхностях устанавливают в процессе валидации.

При необходимости, в рамках валидации очистки проверяют наличие на поверхностях бактериальных эндотоксинов. Как правило, это имеет значение, если с использованием обрабатываемого оборудования производят ЛС, отсутствие бактериальных токсинов в котором регламентировано нормативной документацией.

При выборе дезинфицирующих средств учитывают: тип обрабатываемой поверхности, время контакта, виды целевых микроорганизмов, эффективность средства (бактерицидную, фунгицидную, спороцидную и др.), токсичность, образование остатков, способ нанесения и др.

Применяют несколько типов дезинфицирующих средств. Для предотвращения появления устойчивых штаммов микроорганизмов в окружающей производственной/лабораторной среде зоны асептического процесса следует предусмотреть порядок смены или ротации дезинфицирующих средств, различающихся по механизму воздействия на микроорганизмы.

Дезинфицирующие и моющие средства, используемые в зонах классов A и B, должны быть стерильны. Емкости, в которых хранятся дезинфицирующие средства перед повторным использованием, тщательно очищают и, если необходимо, стерилизуют.

Дезинфицирующие и моющие средства, используемые в других зонах, контролируют на наличие микробной контаминации. Требования к микробиологической чистоте устанавливают индивидуально. Испытание проводят методами, описанными в ОФС «Микробиологическая чистота».

Дезинфекция труднодоступных мест может проводиться с использованием газов (фумигация). Безопасность такой обработки, в том числе концентрацию остатков вредных веществ в окружающей среде, устанавливают в процессе валидации очистки.

Для подтверждения эффективности проводимых процедур очистки и дезинфекции, а также выявления резистентных штаммов микроорганизмов проводят регулярный мониторинг окружающей среды.

**Выбор точек отбора проб**

Расположение точек отбора проб из воздуха и с поверхностей, как правило, устанавливают в процессе первичной или повторной аттестации чистого помещения/зоны.

Точки отбора проб различаются в зависимости от конструкции чистого помещения/зоны и производственного процесса. При выборе точек тщательно изучают каждый процесс и проводят соответствующий анализ рисков.

Основная цель отбора проб заключается в предоставлении значимых интерпретируемых данных, позволяющих определить фактическое или потенциальное загрязнение, причиной которого являются конкретная процедура, оборудование, материал и процесс.

Необходимо иметь возможность осуществлять отбор пробы на тех участках, загрязнение которых наиболее вероятно приведёт к загрязнению ЛС или нарушению производственного процесса. Однако, следует принимать во внимание, что сама процедура мониторинга может повысить вероятность загрязнения воздуха или поверхности, поэтому для отбора проб могут быть выбраны точки, которые находятся рядом с ЛС или используемыми в ходе процесса материалами, но не контактируют с ними.

Ключевыми точками для отбора проб при текущем мониторинге являются:

- зоны наиболее высокой вероятности контаминации ЛС;

- зоны наибольшего риска скопления микроорганизмов при нормальном рабочем процессе (накопление пыли на поверхностях с электростатическими свойствами, более холодных поверхностях; дверные ручки и т.д.);

- труднодоступные зоны для уборки и дезинфекции;

- точки смежных зон А и В;

- потенциальные источники контаминации;

- зоны возмущения воздушного потока рельефом поверхности, смешение потоков.

Составленные перечни точек отбора проб для контроля микробиологических параметров указывают в программе мониторинга, а также размещают на схемах производственных/лабораторных помещений.

В зависимости от конкретных условий микробиологическому мониторингу подвергают: воздух помещений; оборудование; инструментарий; рабочие поверхности; руки оператора в перчатках; одежду персонала; контейнеры, в которых хранится продукт; воду и оборудование для водоподготовки; сжатый воздух, инертные газы.

При необходимости по результатам анализа рисков контролируют стены, пол и потолок помещения; двери; мебель и транспортные тележки; контейнеры для сбора отходов; инструменты и приборы для испытания.

Количество точек отбора проб воздуха зависит от размера и конфигурации помещения:

- до 15м² – в одной точке;

- 15–100м² – в двух точках;

- более 100м² – в пяти точках;

- узкие длинные помещения (с отношением ширины к длине ≥1:5) – не менее, чем в трех точках на расстоянии не более 5 м друг от друга.

**Время отбора проб**

Для сравнительного анализа состояний окружающей среды отбор проб должен проводиться в одно и то же фиксированное в плане время, т.е. приходиться на равнозначную по интенсивности процесса временную точку.

Отбор проб с поверхности перчаток и других участков одежды каждого оператора осуществляют в начале работы перед обработкой перчаток дезинфицирующим средством или перед заменой наружных перчаток в случаях, когда используются двойные перчатки. Отбор может производиться сразу после выполнения сотрудником критических операций. Дезинфекция перчаток непосредственно перед отбором проб неприемлема, поскольку это может препятствовать росту микроорганизмов, присутствовавших во время проведенных манипуляций, и не позволяет своевременно их обнаружить.

Смывы с объектов окружающей среды в процессе микробиологического мониторинга отбирают после проведения надлежащей обработки поверхности до начала работы, либо во время производственного процесса.

В зависимости от вида выполняемой деятельности отбор проб воздуха в начале, середине и конце производственного процесса обеспечивает прослеживаемость влияния окружающей среды, облегчая расследование выявленных несоответствий, связанных с выпуском ЛС.

**Периодичность контроля**

Частоту отбора проб определяют на основании анализа рисков. Периодичность контроля окружающей среды зависит от:

- класса чистоты конкретного помещения с учётом планировочных и технологических решений;

- типа производимого ЛС;

- степени вмешательства человека в процесс;

- использования терминальной стерилизации;

- данных предшествующего контроля и прочих факторов.

Процесс, включающий ручные операции, имеет повышенный риск контаминации ЛС. В таких случаях частоту проведения мониторинга увеличивают. Кроме того, периодичность отбора проб может быть увеличена или уменьшена на основании анализа тенденций результатов мониторинга. Исключение составляют помещения/зоны классов A и B.

Ниже приведена рекомендуемая периодичность отбора проб при микробиологическом мониторинге контролируемой среды (таблица 3).

Таблица 3 – Рекомендуемая периодичность отбора проб в «чистых» помещениях/зонах

|  |  |
| --- | --- |
| Помещение/зона | Периодичность отбора проб |
| Помещения класса А | Каждая смена |
| Зоны класса B, окружающие зоны класса А | Каждая смена или один раз в день |
| Зоны класса С | Два раза в неделю |
| Зоны класса D или вспомогательные зоны потенциального воздействия на ЛС (процесс) | Два раза в неделю |
| Другие вспомогательные зоны, не имеющие потенциального контакта с ЛС | Один раз в неделю |

Если помещения/зоны класса A или B используются непрерывно, отбор проб проводят один раз в смену. В этом случае мониторинг помещения в оснащённом состоянии может быть исключён или проводиться 1 раз в месяц.

**Методы микробиологического мониторинга**

*Мониторинг воздушной среды*

Для микробиологического исследования воздуха используют седиментационный (пассивный) и аспирационный (активный) методы.

Метод седиментации

Стерильные чашки Петри с агаризованной питательной средой открывают в месте отбора проб воздуха и экспонируют в течение определённого валидированного времени, после чего плотно закрывают, аккуратно перемещают в инкубатор для инкубации в стандартных условиях.

Применение методики седиментации целесообразно в сочетании с активным методом контроля микробной контаминации воздуха – аспирационным, основанным на фильтрации или аспирации (прохождении) воздуха через специальные фильтры, жидкости, порошки, материалы, адсорбирующие микрофлору, и предусматривающим использование различных пробоотборников: импакторов, импинджеров или приборов, действующих по методу фильтрации.

1. Импакторы

Принцип действия импакторов основан на инерционном осаждении твёрдых частиц на поверхность агаризованной среды. Различают импакторы щелевого, ситового или центрифужного (ротационного) типа.

1. Ситовые импакторы

В ситовых (просеивающих) пробоотборниках воздух с определённой скоростью проходит через решетку с калиброванными отверстиями, и микроорганизмы оказывают ударное воздействие на плотную питательную среду.

Среди ситовых импакторов выделяют пробоотборники, в которые воздух поступает под действием вакуума. Существуют стационарные и портативные системы.

1. Щелевые импакторы

Действие импакторов щелевого типа основано на ударно-прибивном действии струи воздуха, которая проходит через узкую клиновидную щель, и с большой скоростью ударяясь о поверхность питательной среды. Используемое в приборе вращение чашки обеспечивает равномерное распределение микроорганизмов по поверхности среды.

1. Центрифужные (ротационные) пробоотборники

В ротационных пробоотборниках воздух всасывается с помощью импеллера (крыльчатки), концентрически поступая в барабан импеллера, где подвергается вращению. При этом частицы, содержащиеся в воздухе, ударяются под действием центробежной силы о пластиковую ленту с питательной средой.

1. Импинджеры

Контроль воздуха с помощью импинджеров осуществляется методом столкновения в жидкости (например, питательной среды или раствора натрия хлорида). Жидкость из приёмника диспергируется струёй воздуха, входящего в прибор. Затем жидкость, ударяясь о стеклянную лопатку, дробится на мелкие капли (с возможно адсорбируемыми микроорганизмами) и стекает обратно в приёмник, из которого производят посев. Данный метод применим для отбора проб воздуха в сильно загрязнённом помещении.

1. Метод фильтрации

При мониторинге воздуха с помощью пробоотборников, работающих по принципу мембранной фильтрации, пробы попадают на поверхность мембраны, которую затем исследуют (микроскопируют, помещают на питательную среду для получения колоний или др.). Данный метод сопровождается повышенной по сравнению с методами импакции гибелью клеток при осаждении на поверхность фильтра.

Результаты, полученные в одних и тех же условиях с помощью различных пробоотборников, могут существенно отличаться друг от друга. В связи с этим проводят оценку общей пригодности устройства для мониторинга содержания микроорганизмов в воздухе до его ввода в эксплуатацию.

При выборе пробоотборника воздуха оценивают его пригодность для использования в помещении, основываясь на эффективности отбора проб, возможности его очистки и стерилизации. Кроме того, работающее устройство для отбора проб не должно изменять параметры воздушного потока, обеспечивающего чистоту конкретного помещения.

Скорость и продолжительность отбора проб для каждого типа устройств для отбора проб должны быть провалидированы, так как могут оказывать неблагоприятное влияние на жизнеспособность микроорганизмов.

Объём отбираемой пробы должен быть достаточно большим, чтобы обеспечить достоверность полученных данных при низком содержании микроорганизмов. В то же время по завершении периода инкубации количество колоний микроорганизмов должно быть таким, чтобы можно было различить отдельные колонии и провести их учет. Длительность отбора пробы не должна приводить к изменениям (высыханию) питательной среды.

*Мониторинг поверхностей*

Под микробной контаминацией поверхностей помещений и оборудования понимают общее количество аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов в пробах, взятых с общей площади 100 см2 (например, 4 участка по 25 см2).

Задачей контроля микробной контаминации поверхностей и оборудования является проверка эффективности дезинфекции.

Посуда, питательные среды и растворы, а также материалы, которые используются для контроля микробной контаминации поверхностей, должны быть стерильны.

При выборе метода отбора проб учитывают тип поверхности и вид получаемой информации (качественный или количественный результат). Большое значение для обнаружения репрезентативной микрофлоры на участке отбора пробы имеет документально подтверждённое качество используемых питательных сред.

Отбор проб для микробиологического мониторинга поверхностей проводят контактным методом (отпечаток), методом смыва (мазок) или ополаскиванием (проба промывного раствора).

1. Контактный метод

Данный метод прост в использовании и позволяет получить количественные результаты. Он заключается в том, что агаризованную питательную среду известной площади (24 – 30 см2) прикладывают к контролируемой поверхности, выдерживают на поверхности и затем инкубируют. Образовавшиеся колонии являются зеркальным отражением («картой») жизнеспособных микроорганизмов, присутствующих на поверхности.

Могут использоваться контактные пластины или другие устройства, в которых питательная среда помещена в твёрдые или эластичные контейнеры, как правило, специально упакованные контактные чашки Петри, которые имеют диаметр 55 мм, и заполнены так, что питательная среда образует купол. Площадь, с которой получена проба-отпечаток, составляет примерно 24–25 см2.

Данный метод не подходит для мониторинга неровных и труднодоступных поверхностей.

В месте отбора проб могут оставаться остатки питательной среды, что требует проведения соответствующей обработки (очистки) поверхности.

Контакт питательной среды с поверхностью должен происходить в течение нескольких секунд при постоянном и однородном давлении на всю поверхность без вращательных и поступательных движений, для стандартизации процесса отбора проб могут быть использованы соответствующие аппликаторы.

1. Метод смыва

Метод смыва используют для мониторинга неровных поверхностей, оборудования и др., пробы с которых невозможно отобрать контактным методом.

При отборе смывов с поверхности необходимо использовать стерильный тампон, увлажненный стерильной пептонной водой, внесённой в каждую пробирку в количестве не менее 2,0 мл. Допускается смачивание тампона (материала для отбора) стерильным изотоническим раствором хлорида натрия или иной допустимой транспортной средой, а также использование стерильных зонд-тампонов (свабов, тупферов и т.д.) промышленного производства. Тампон увлажняют наклонением пробирки или опусканием тампона в жидкость непосредственно перед взятием смыва. На контролируемой поверхности после ее обработки возможно наличие остатков дезинфицирующего средства, для нейтрализации которого следует использовать подходящий нейтрализатор.

Для определения размера образца целесообразно использовать стерильную рамку-трафарет. Её размер обычно составляет 10×10 см или 5×4 см.

Пробы могут быть испытаны с помощью чашечных агаровых методов или методом мембранной фильтрации.

На результаты тестирования могут повлиять следующие факторы: угол снятия пробы и давление тампона, а также возможность повторного снятия мазка с того же участка поверхности.

1. Метод ополаскивания поверхности

Метод ополаскивания подразумевает промывку всех поверхностей оборудования растворителем (водой, водным раствором и др.) и отбор из полученного раствора проб, в которых определяют содержание микроорганизмов. Количественное определение микроорганизмов в этом случае, как правило, проводят с помощью мембранной фильтрации.

Данный метод применим для мониторинга внутренней поверхности используемого оборудования.

Модификацией метода отбора проб промывных растворов является отбор промывного раствора для мелких деталей. Промывным раствором заполняют стерильную ёмкость, в которую помещают детали или части оборудования и проводят смыв. Далее отбирают пробу промывного раствора и контролируют её на наличие потенциального загрязнения.

Отбор проб для оценки микробиологической чистоты мелких деталей (например, иглы) представляет собой пропускание определённого объёма раствора и его сбор в отдельную ёмкость. Весь отобранный раствор является пробой, который перемешивают и анализируют на наличие потенциального загрязнения.

*Определение микробной контаминации одежды и перчаток персонала*

Для определения микробной контаминации перчаток персонала делают отпечатки пяти пальцев каждой руки на поверхности агаризованной питательной среды. Для получения наиболее полной информации о загрязнении, делают скользящее движение пальцами по всей поверхности агара. Руки после контакта с агаром тщательно обрабатывают дезинфицирующим средством.

Микробную контаминацию одежды персонала обычно определяют на предплечьях с помощью контактных пластин. Также проверяют бахилы. Для этого может быть использован метод смыва. С четырёх участков площадью по 25 см2 каждый делают смыв увлажнённым тампоном на нижней части двух рукавов, верхней передней поверхности комбинезона (халата) и шлеме.

*Альтернативные микробиологические методики*

Для сокращения времени получения результатов микробиологического мониторинга допустимо использовать альтернативные методики анализа. Выбор такой методики осуществляют, исходя из её целевого назначения, разнообразия проводимых анализов, требуемой производительности, скорости получения результата, возможности ее интеграции с автоматической системой управления лабораторной информацией, особенностей анализируемого образца, размера пробы, трудозатрат и др.

Например, для контроля воздушной среды или условий в изолирующих системах могут использоваться системы, принцип работы которых основан на оптической спектроскопии. Для анализа проб, полученных методом смывов, могут применяться методики, основанные на измерении потреблённого или образованного в результате жизнедеятельности микроорганизмов газа, АТФ-биолюминесценция, флуоресцентное окрашивание и др.

Применимость альтернативных методик подтверждают валидационным исследованием, выполненным в соответствии с ОФС «Валидация микробиологических методик».

**Выбор питательных сред и условий культивирования**

В зависимости от вида микроорганизмов, которые предполагается выделить из окружающей производственной среды, следует подобрать соответствующие питательные среды и условия культивирования микроорганизмов (температура, влажность, длительность инкубации питательной среды).

Применяемые питательные среды должны быть неселективными, то есть поддерживать рост широкого спектра микроорганизмов, включая дрожжевые и плесневые грибы.

Для определения ростовых свойств питательной среды используют соответствующие тест-штаммы микроорганизмов, а также микроорганизмы, выделенные из окружающей среды конкретных помещений.

Дезинфицирующие средства или остаточные количества антимикробных препаратов, присутствующие на поверхностях, подлежащих микробиологическому мониторингу, могут попадать в питательную среду и подавлять рост микроорганизмов. Для предотвращения этого в питательные среды необходимо добавлять соответствующие нейтрализаторы.

Выбор конкретных нейтрализаторов и способов инактивации дезинфицирующих средств, а также эффективность их нейтрализации в той концентрации, которая используется для обработки поверхностей, обосновывают и подтверждают при валидации методик микробиологического контроля поверхностей.

Для проведения исследований могут быть использованы питательные среды, указанные в ОФС «Микробиологическая чистота», или аналогичные им готовые питательные среды при условии, что их ростовые свойства соответствуют установленным требованиям.

Питательные среды (включая контактные чашки, пластины, полоски с агаризованной средой и др.) должны быть стерильны.

Время инкубации посевов должно быть оптимальным для оперативного получения результатов микробиологических испытаний и достаточным для восстановления повреждённых микроорганизмов.

Инкубацию посевов на питательных средах для бактерий осуществляют при температуре (32,5±2,5) °С в течение 48–72 ч, на питательных средах для дрожжевых и плесневых грибов – при температуре (22,5±2,5) °С в течение 5–7 сут.

Если достоверные результаты могут быть получены за более короткое время, время инкубации может быть сокращено. В связи с тем, что при уменьшении сроков культивирования существует риск получения ложноотрицательных или заниженных результатов исследования, все изменения обосновывают в ходе валидации.

При высокой концентрации микроорганизмов в окружающей среде, подсчёт колоний после инкубации в ряде случаев представляется невозможным. Для получения статистически достоверных результатов допустимо увеличивать степень разведения пробы.

Микроорганизмы, выделенные из окружающей среды, могут подвергаться влиянию стрессовых факторов, таких как недостаток питательных веществ; воздействие химических веществ; резкие изменения температуры; рН; осмотический стресс и др.

Под влиянием этих факторов микроорганизмы могут переходить в некультивируемое состояние, т.е. не образовывать видимого роста на питательных средах, сохраняя при этом метаболическую активность и жизнеспособность. В некоторых случаях это является штаммоспецифичным свойством. Применение стандартных методов определения в данном случае приводит к получению ложноотрицательных результатов. Это учитывают при выборе метода выделения и идентификации микроорганизмов. Например, одним из эффективных способов восстановления угнетенных микроорганизмов можно считать использование накопительной питательной среды. Помимо этого, для определения таких микроорганизмов могут быть использованы различные альтернативные методы, например, флуоресцентная микроскопия, методы ПЦР-диагностики, проточная цитометрия, иммуноферментный анализ и др.

**Идентификация микроорганизмов**

Идентификация микроорганизмов, обнаруженных в окружающей среде, на перчатках и одежде персонала, является важной частью программы мониторинга. Документально устанавливают частоту выполнения идентификации и стандартные процедуры её выполнения.

Впервые выделенные микроорганизмы идентифицируют для создания базы данных микроорганизмов, обнаруженных в конкретном помещении (зоне). После создания базы данных частота идентификации может быть уменьшена, но не исключена.

Процедура идентификации включает в себя изучение морфологии, окраску по Граму и, при необходимости, определение родовой или видовой принадлежности с использованием различных питательных сред и систем (ручных или автоматических).

Полученная при идентификации информация важна при подтверждении того, что микроорганизмы, обнаруженные в пробе, характерны для данного материала или окружающей среды. Кроме того, она необходима для выявления вероятного источника загрязнения при расследовании таких ситуаций, как получение положительных результатов испытания стерильности продукта, контаминация питательных сред при розливе, превышение уровня тревоги или действия и др., а также позволяет оценить эффективность уборки, дезинфекции и микробиологического мониторинга.

Уровень идентификации, проводимой в ходе мониторинга, определяется видом выполняемых операций и местом, где микроорганизм был выделен. При превышении уровня действия в зонах классов A и B проводят идентификацию микроорганизмов до вида, а в случае, если превышен уровень тревоги – до рода. Если превышен уровень действия в зонах класса C при подозрении на наличие специфицированных микроорганизмов (микроорганизмов, нормируемых в спецификациях на ЛС) проводят их идентификацию до рода, в зонах класса D для микроорганизмов, обнаруживаемых особенно часто, выполняют окрашивание по Граму.

Выделение одного и того же микроорганизма может свидетельствовать о развивающейся устойчивости к дезинфицирующему средству. Выделение ранее необнаруженных видов может свидетельствовать об изменениях в системе, которые необходимо расследовать.

**Контроль воды**

Вода является одним из основных продуктов, используемых в фармацевтической промышленности при производстве ЛС, для очистки, мойки и др. Области применения воды определяют на основании оценки рисков, исходя из информации о системе водоподготовки. В зависимости от цели применения используют воду различных категорий:

- вода питьевая;

- вода очищенная;

- вода высоокоочищенная;

- вода для инъекций.

В случае, если для специфического процесса требуется вода специальной категории качества, отличной от предусмотренных фармакопеей, в отношении этой воды разрабатывают спецификацию в соответствии с системой обеспечения качества производителя.

Вода для фармацевтического применения должна соответствовать фармакопейным требованиям по химическим показателям и микробиологической чистоте с соответствующими уровнями тревоги и действия. Вода должна быть защищена от повторной контаминации, размножения и распространения микроорганизмов.

Вода питьевая должна соответствовать требованиям отраслевых нормативных документов в части, касающейся показателей её качества.

Вода очищенная производится из воды, имеющей как минимум качество воды питьевой. К воде очищенной предъявляют следующие требования: общее количество аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 100 КОЕ в 1 мл. Отсутствие *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* в 100 мл. Необходимость определения *E.coli, S.aureus, P.aeruginosa* устанавливают в результате оценки рисков, исходя из сведений о системе получения воды. Анализ проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Вода высокоочищенная производится из воды, имеющей как минимум качество воды питьевой и должна соответствовать требованиям, предъявляемым к качеству воды для инъекций (в том числе по содержанию бактериальных эндотоксинов).

К воде для инъекций предъявляют следующие требования: общее количество аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 10 КОЕ в 100 мл. Анализ проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Особое внимание уделяют контролю микробной контаминации различных узлов системы водоподготовки. Микроорганизмы, присутствующие в исходной воде, могут адсорбироваться в угольных пластах, деионизирующих смолах, фильтрах, трубах, клапанах и др. и провоцировать образование биопленки с последующим распространением микроорганизмов (и эндотоксинов) по всей системе водоподготовки. Биопленки представляют собой постоянный источник загрязнения, их трудно определить и дать количественную оценку. Постоянное наличие повышенной концентрации свободных микроорганизмов обычно является индикатором развития биопленки.

Снижение риска контаминации может осуществляться за счёт:

- надлежащего проектирования системы получения, очистки, хранения и распределения воды;

- непрерывной циркуляции потока в системах распределения воды;

- источников ультрафиолетового облучения, расположенных в системе трубопроводов;

- поддержания воды в системе в нагретом состоянии (при температуре выше 70 °С);

- химической и (или) термической обработки системы.

Удаление химических веществ, используемых при обработке системы, до использования воды должно быть подтверждено в ходе валидации.

Отбор проб воды для микробиологического мониторинга осуществляют в асептических условиях в соответствии с установленными пользователем процедурами из точек потребления. В случае если отбор проб из точек потребления невозможен, он проводится из точек, установленных в ходе подтверждения надежности и безопасности системы водоподготовки.

Пробы воды для проведения микробиологических анализов отбирают в стерильную тару. Анализ проводят в день отбора проб в соответствии с методиками, представленными в ОФС «Микробиологическая чистота». Допустимо использовать различные альтернативные методы, например, твердофазная цитометрия; флуоресцентное окрашивание; АТФ-биолюминесценция; методы, основанные на ускоренной детекции роста и др.

Время хранения проб воды от отбора до начала их анализа включает продолжительность транспортирования, регистрации и подготовки к испытанию.

Транспортирование проб осуществляют в чистых продезинфицированных контейнерах, крышка которых не должна соприкасаться с пробками емкостей. При транспортировании емкости проб упаковывают таким образом, чтобы защитить их от внешнего воздействия (солнечного излучения, нагревания, загрязнения, замораживания и др.). Хранение проб осуществляют при температуре (2 - 8) оС в течение не более 6 ч. Если охладить пробу невозможно, анализ выполняют не позднее, чем через 2 ч. Время хранения должно быть задокументировано.

Данные, полученные в ходе проведения мониторинга, используют для анализа тенденций. Как правило, значения тенденции изменений должны находиться в пределах отклонения в две сигмы (2σ). На основании годового тренда устанавливают уровни тревоги и действия. Если имеется несколько контуров воды, уровень действия устанавливают для каждого контура отдельно.

Результаты микробиологического исследования носят ретроспективный характер (в большинстве случаев для их получения требуется не менее 48 ч). Поэтому уровни тревоги и действия устанавливают таким образом, чтобы их превышение не могло сказываться на качестве продукта, процесса. Как правило, значение уровня действия по показателю «Микробиологическая чистота» для воды очищенной и воды для инъекций в 10 раз меньше требования, указанного в соответствующей ОФС.

**Контроль сжатого воздуха / газа**

Сжатые газы, контактирующие с продуктом, первичной упаковкой или поверхностями, имеющими прямой контакт с ЛС, подлежат периодическому микробиологическому контролю.

Сжатые газы, используемые для повышения давления или защиты ЛС в стерильных резервуарах для хранения, подают через гидрофобные вентиляционные фильтры и контролируют с частотой, гарантирующей, что газ не препятствует удерживанию бактерий на фильтре.

Сжатый газ, используемый в асептических условиях, подают через стерилизующие фильтры и проверяют с частотой, гарантирующей, что газ не оказывает вредного воздействия на окружающую среду помещения/зоны.

Количество точек и периодичность мониторинга определяют на основании анализа рисков. Любое соединение, через которое газ поступает в окружающую среду, контролируют с частотой, позволяющей гарантировать, что условия окружающей среды соответствуют установленному классу чистоты помещения/зоны. Соединения системы подготовки сжатого воздуха, которые не влияют на подачу воздуха в рабочее пространство, контролируют с меньшей частотой.

Отбор проб осуществляют с помощью пробоотборника подходящего типа. Питательную среду выбирают также, как и при мониторинге окружающей среды.

Содержание микроорганизмов в сжатом воздухе/газе не должно превышать требования к воздуху чистых зон, в которые он поступает.