

# Mikrobiologie ve farmacii

Seminář mikrobiologie a molekulární biotechnologie

Brno, 28.4.2016

M. Bursík

# Úvod

---

- Úvod – představení mikrobiologie Zentiva
- Požadavky na mikrobiální kvalitu – proč, jak a co kontrolovat
- Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)
- Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků
- Monitoring čistých prostor
- Další mikrobiologické metody
- Možnosti uplatnění absolventa v Zentivě

# Úvod – Historie Zentivy / Sanofi Generics

- Výrobní závod Praha - Dolní Měcholupy: 85 let výroby léků





Harmonization of the **Western European Gx** business



Acquisition of **Zentiva** - a leading Gx company in **CEE**



Acquisition of **Helvepharm** in **Switzerland**



Creation of **Sanofi Generics** Hosting strong, well-established and recognized brands for Gx

**SANOFI GENERICS**  
**HISTORICAL**  
**ROOTS**



Acquisition of **Medley** - a leading Gx company in **Brazil**



Acquisition of **Kendrick** in **Mexico**



**JV**  
Joint Venture with **Nichi-Iko** - a leading Gx player in **Japan**



Acquisition of **Genfar** - a leading Gx company in **Colombia**



**JV**  
Joint Venture with **Dubai investments** in the **Middle-East**

SANOFI GENERICS  
OUR PORTFOLIO

## Our Brands

Sanofi Generics operates worldwide using already strong generics brands like Zentiva, Medley, Genfar, Winthrop and Globalpharma.

SANOFI GENERICS 

**ZENTIVA**  
A SANOFI COMPANY

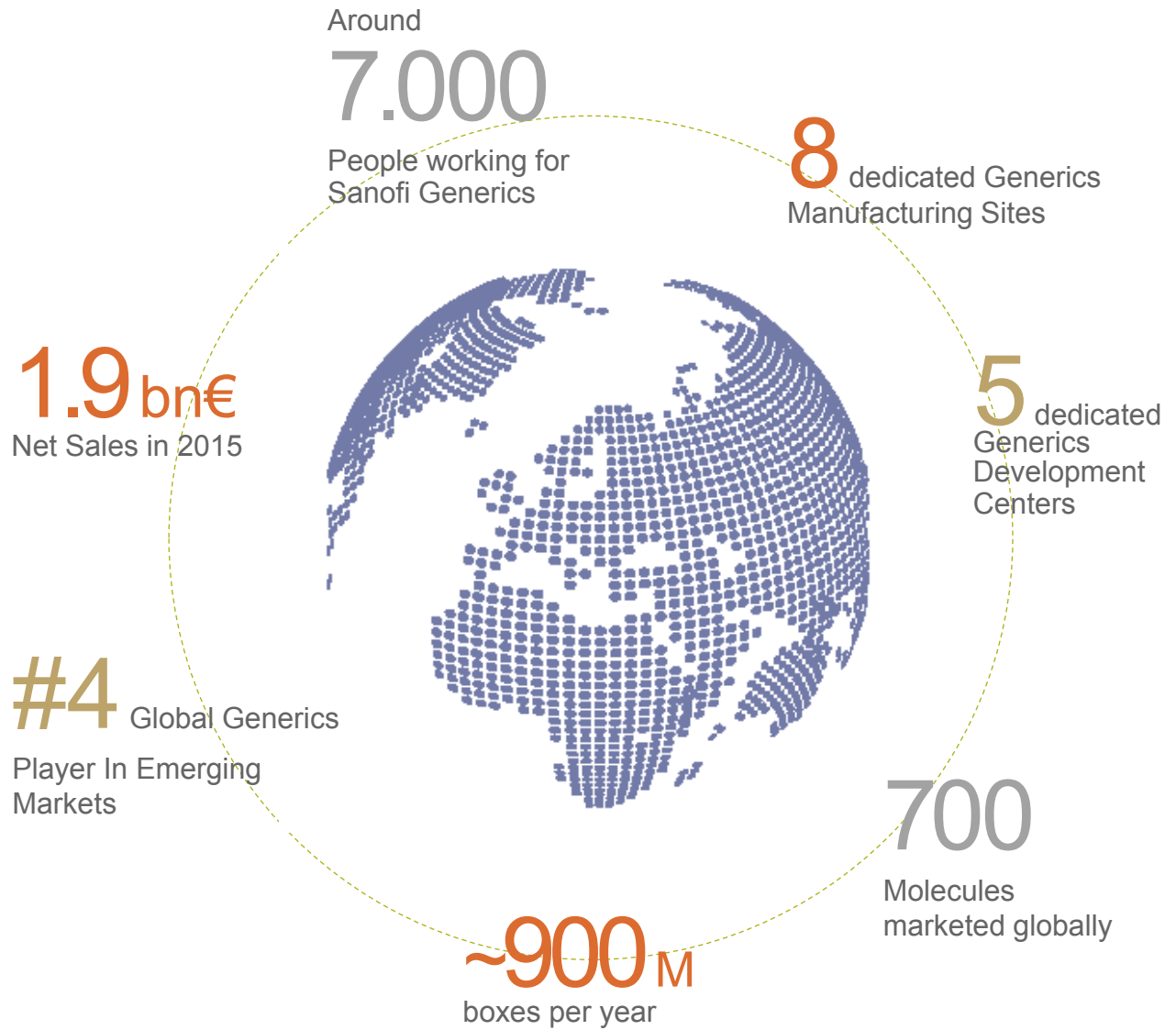
**Winthrop**  
A SANOFI COMPANY

**Medley**  
A SANOFI COMPANY

**Genfar**  
A SANOFI COMPANY

**globalpharma**  
A SANOFI COMPANY

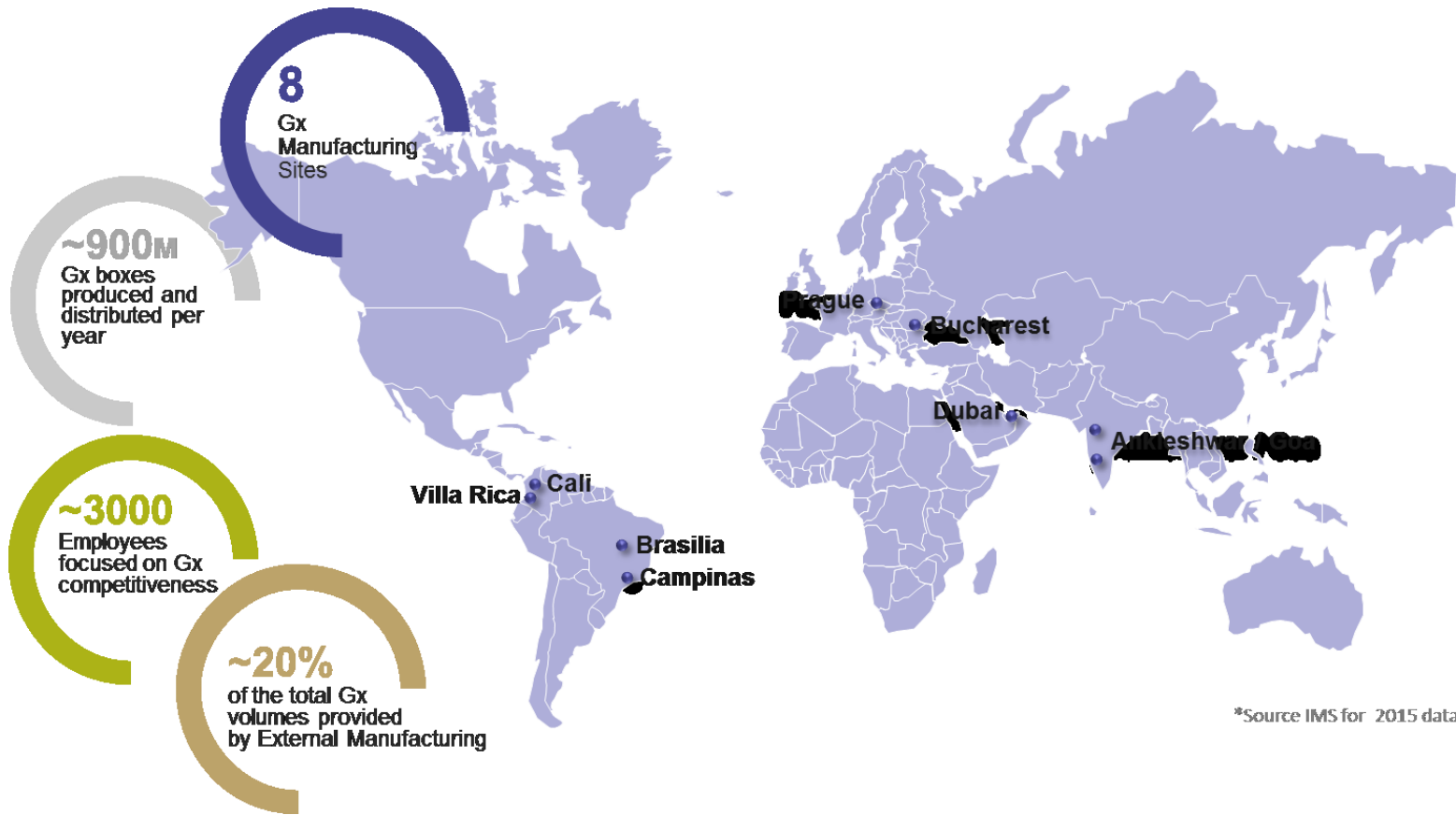
SANOFI GENERICS  
KEY FIGURES



# A WORLDWIDE FOOTPRINT OF COMPETITIVE GX DEDICATED SITES COVERING ALL MARKETS NEEDS

SANOFI GENERICS

INDUSTRIAL  
AFFAIRS BU GX  
MANUFACTURING  
ORGANIZATION



# Úvod – představení mikrobiologie Zentiva

---

- Laboratoře mikrobiologické kontroly Zentiva Praha
  - 10 zaměstnanců
  - součástí kontrolních laboratoří kontroly kvality QC



- Výrobní portfolio, analyzované v mikrobiologické laboratoři
  - pevné lékové formy (tablety, potahované tablety, dražé, kapsle)
  - polotuhé LF (masti, krémy, čípky), včetně sterilních mastí
  - parenterálie (injekce, infuzní roztoky)
  - tekuté LF nesterilní (kapky, sirupy, suspenze)
  - tekuté LF sterilní (oční kapky)
  - výroba hormonálních přípravků
  - HLP (hodnocené léčivé přípravky – klinické šarže)
  - vývoj API (farmaceutické substance)



# Požadavky na mikrobiální kvalitu – proč, jak a co kontrolovat

- Proč sledovat mikrobiální kvalitu?

*přítomnost mikrobů v přípravku*



*možná rizika*

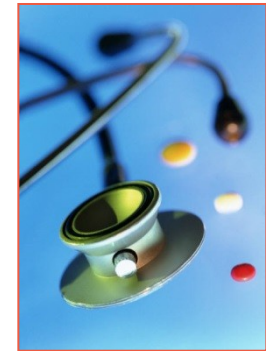
- infekce u pacienta
  - znehodnocení léčiva
- ➔ *poškození zákazníka*

**obrana:** - používání konzervačních látek

- výroba v kontrolovaném prostředí (čisté prostory)

- Podle čeho jí posuzovat?

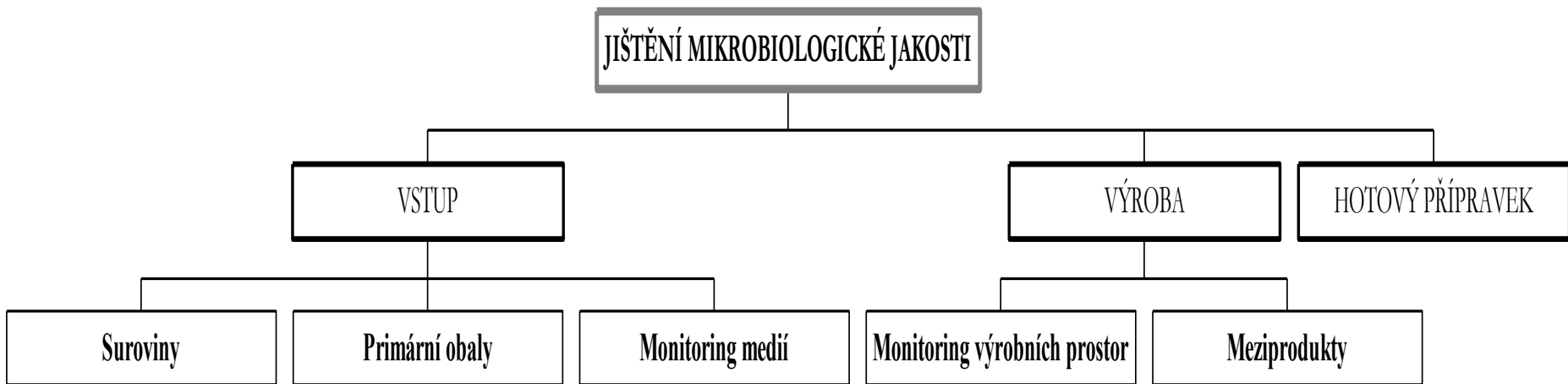
- lékopisy (Ph Eur, USP, JP, BP, GF...) – v ČR forma zákonné úpravy
- další dokumenty SVP/SLP (metodické pokyny SÚKLu, ISO normy, směrnice EU..)



Adobe Acrobat  
Document



# Požadavky na mikrobiální kvalitu – proč, jak a co kontrolovat



# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

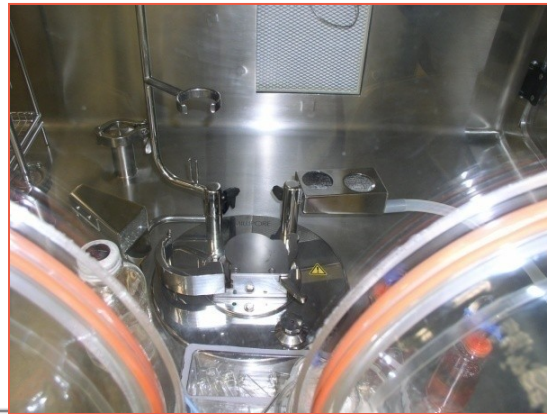
---

- Ph. Eur.: sterilita  
“Přípravky, u nichž je v platném článku na lékovou formu předepsána sterilita, nebo jiné přípravky, jež jsou označeny jako sterilní“
  - předepsáno např. pro parenterálie (injekce, infuze), oční přípravky, přípravky na popáleniny, chirurgický materiál apod.
- Některé látky: “Pokud je určena k výrobě parenterálních přípravků bez dalšího vhodného sterilizačního postupu...”
  - sterilizovaná VNI, radioaktivně značená VNI
- Živné půdy pro testy sterility



# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

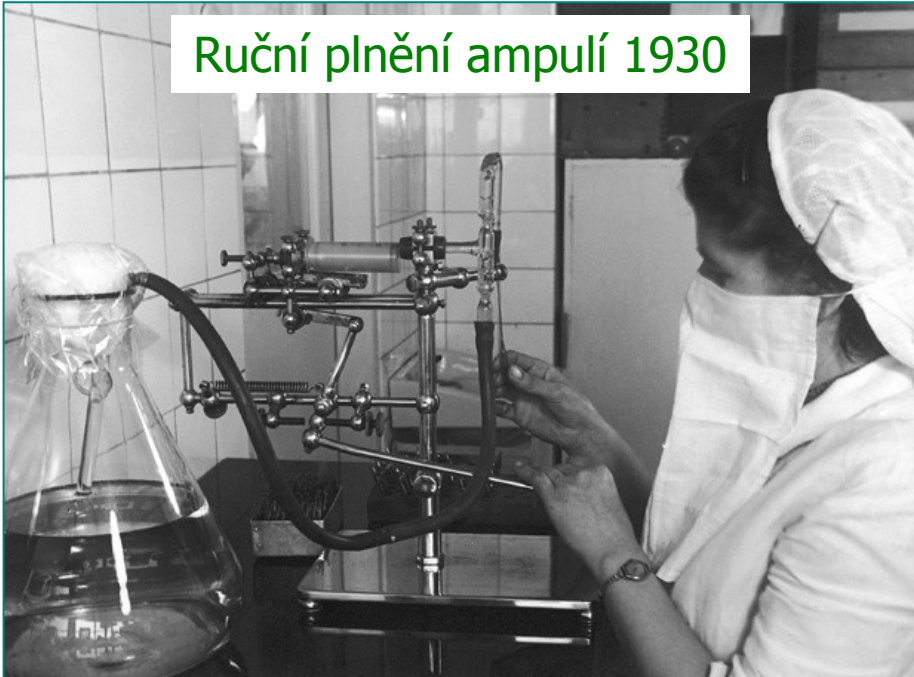
- Test sterility = kvalitativní stanovení mikroorganismů, “...zjistitelných v podmínkách zkoušky.”
  - většina běžných aerobních i anaerobních bakterií, kvasinek a plísní
- Metody
  - membránová filtrace (často filtrační přístroje)
  - přímé očkování do živných půd
  - kultivace na dvou různých půdách (thioglykolanová a soja-kasein) při dvou různých teplotách (30-35 a 20-25 C) nejméně 14 dní
  - lze využít i alternativní metody (např. produkce CO<sub>2</sub> – systém Bact-alert)



# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

- Sterilní přípravky – kvalita prostředí je klíčová
- Dosažení aseptických podmínek použitím laminárního boxu nebo izolátoru
  - izolátorová technologie – ochrana procesu před vnějším prostředím
  - izolátor pracuje v přetlaku a využívá transferových systémů
  - pracovní prostor sterilizovatelný, bez přístupu personálu
- Hlavní cíl: eliminace člověka jako nejvýznamnějšího zdroje znečištění

Ruční plnění ampulí 1930



Izolátorová plnicí linka 2016





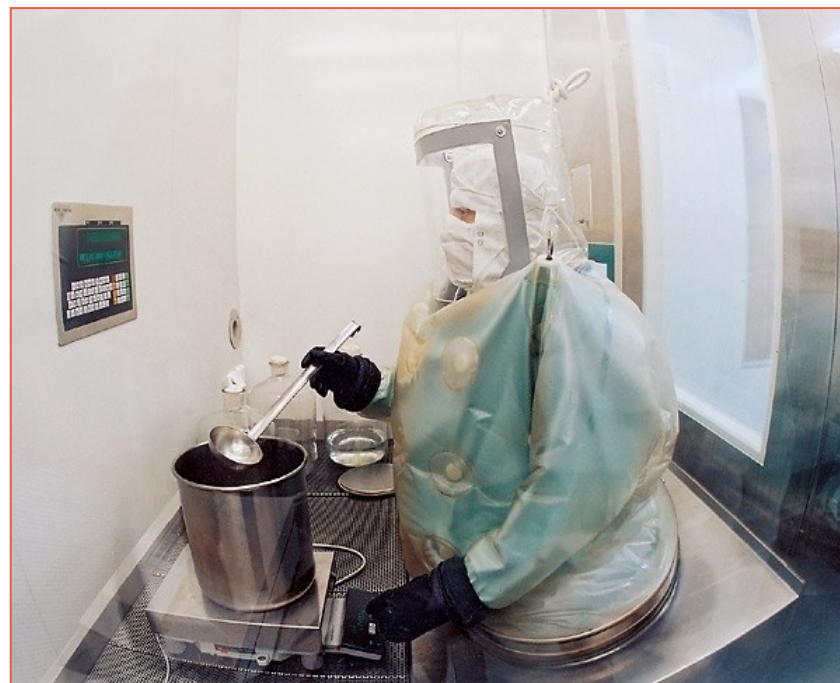
# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

- Izolátor - omezená nutnost převlékání - čas, náklady, pohodlí při práci



# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

- Odběr a navažování sterilních substancí v izolátoru



# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

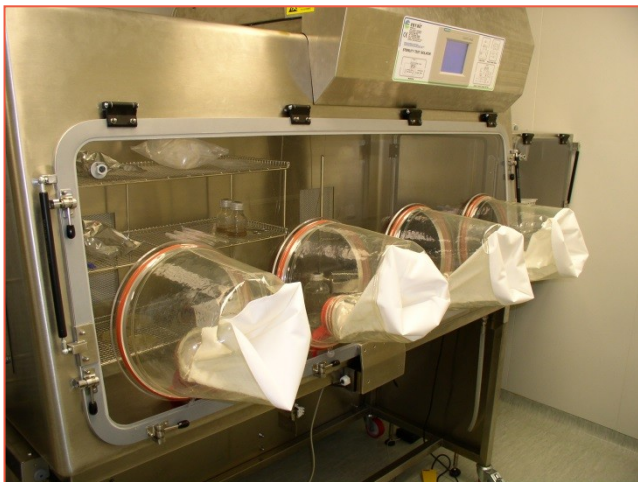
- Izolátor pro test sterility v Zentivě Praha





# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

- Izolátor pro test sterility v Zentivě Praha



# Zkouška na sterilitu (izolátorová technologie)

- Izolátor pro test sterility v Zentivě Praha



# Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků

Způsob podání	TAMC (CFU/g nebo CFU/ml)	TYMC (CFU/g nebo CFU/ml)	Specifické mikroorganismy
perorální - nevodné přípravky	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	nepřítomnost <i>Escherichia coli</i> (v 1 g nebo 1 ml)
perorální - vodné přípravky	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	nepřítomnost <i>Escherichia coli</i> (v 1 g nebo 1 ml)
rektální	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	-
orální, na dásně, kožní, nosní, ušní	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	nepřítomnost <i>Staph. aureus</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Pseud. aeruginosa</i> (v 1 g nebo 1 ml)
vaginální	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	nepřítomnost <i>Pseud. aeruginosa</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Staph. aureus</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Candida albicans</i> (v 1 g nebo 1 ml)
transdermální náplasti (limity pro jednu náplast včetně lepivé a zadní vrstvy)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	nepřítomnost <i>Staphylococcus aureus</i> (v 1 náplasti) nepřítomnost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (v 1 náplasti)
inhalační podání (zvláštní požadavky se vztahují na tekuté přípravky k rozprašování)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	nepřítomnost <i>Staph. aureus</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Pseud. aeruginosa</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost žluč tolerujících gramnegativních bakterií (v 1 g nebo 1 ml)



# Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků

Způsob podání	TAMC (CFU/g nebo CFU/ml)	TYMC (CFU/g nebo CFU/ml)	Specifické mikroorganismy
perorální lékové formy obsahující suroviny přírodního (živočišného, rostlinného nebo nerostného) původu, které nelze protimikrobně ošetřit a pro něž oprávněná autorita připouští TAMC suroviny přesahující $10^3$ CFU v gramu nebo mililitru	$10^4$	$10^2$	nejvýše $10^2$ CFU žluč tolerujících gramnegativních bakterií (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Salmonella sp.</i> (v 10 g nebo 10 ml) nepřítomnost <i>Escherichia coli</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Staph. aureus</i> (v 1 g nebo 1 ml)
rostlinné léčivé přípravky pro perorální použití: – určené pro přípravu nálevů a odvarů za použití vroucí vody  – jiný způsob přípravy (např. extrakce), který redukuje hladinu mikroorganismů (*dle typu extrakce)	$10^7$  $10^5/10^4$ *	$10^5$  $10^4/10^2$ *	ne více než $10^2$ CFU <i>Escherichia coli</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Salmonella sp.</i> (v 25 g)  ne více než $10^4/10^3$ * CFU žluč tolerujících gramnegativních bakterií (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Escherichia coli</i> (v 1 g nebo 1 ml) nepřítomnost <i>Salmonella sp.</i> (v 25 g)

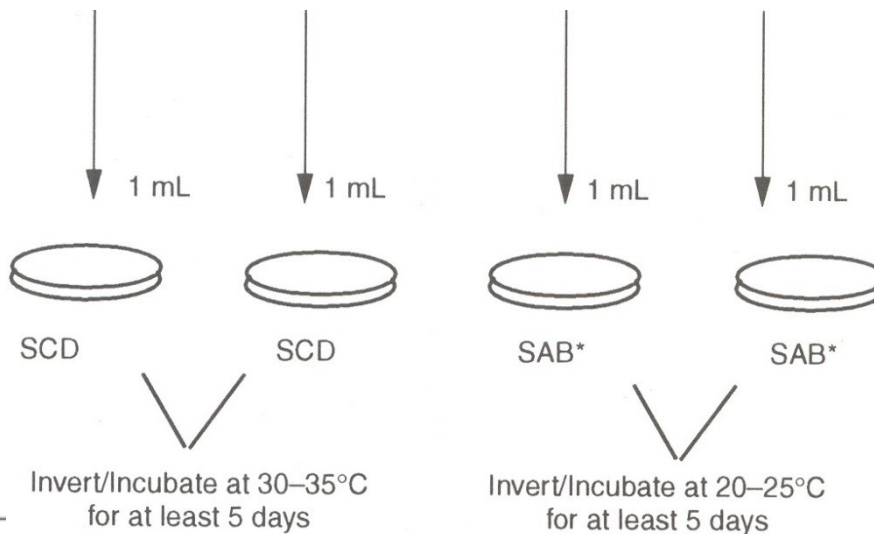
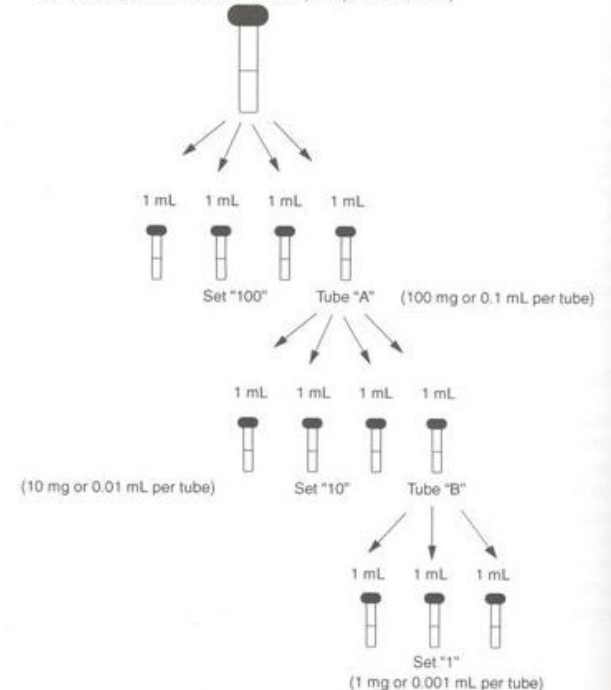
# Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků

- Kvantitativní stanovení aerobních mikroorganismů (bakterie, kvasinky, plísně)
  - membránová filtrace (např. vody, náplasti)
  - počítání na pevných půdách - zalévání do agaru
  - počítání na pevných půdách - očkování na povrch agarové pudy
  - metoda nejpravděpodobnějšího počtu



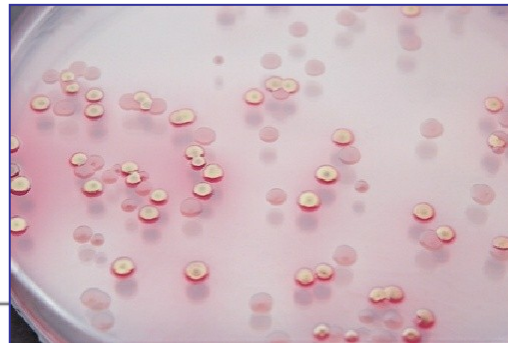
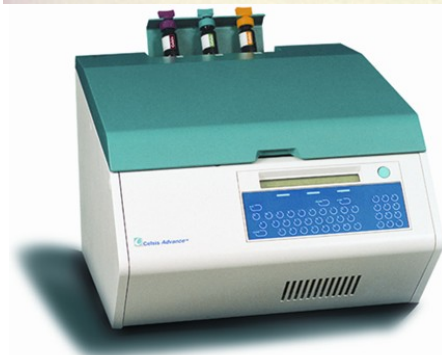
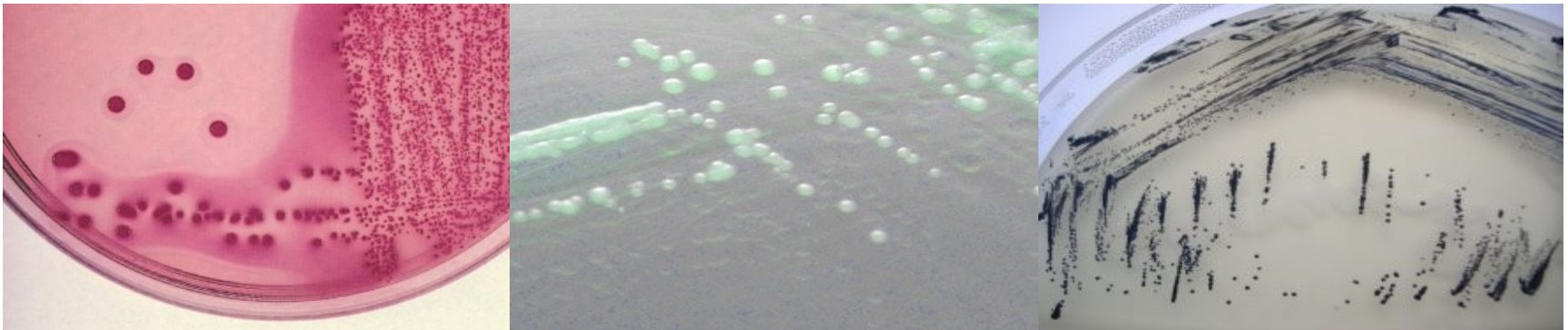
Figure 3.7. Total Aerobic Count by the MPN method.

Sample preparation in chosen diluent (1:10 product dilution)



# Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků

- Zkoušky na specifické mikroorganismy
  - kvantitativní i kvalitativní stanovení patogenních mikroorganismů
  - zkoušky založeny na využití selektivních půd
  - možné použití alternativních metod (ATP-bioluminiscence, cytometrie v pevné fázi, průtokové cytometrie atd.)



# Mikrobiologické zkoušení nesterilních výrobků

- Prostředí: “Stanovení se provádí za podmínek, vylučujících nahodilé znečištění zkoušeného výrobku.”



# Monitoring čistých prostor

- Třídy čistoty

**A - pracovní prostor pro rizikové operace (aseptické plnění)**

**B - pro aseptické činnosti, prostor, který obklopuje třídu A**

**C a D - prostory pro méně kritické činnosti**

Třída čistoty je definována počtem částic a mikroorganismů v 1 m<sup>3</sup>

Tabulka 1:

Třída	Za klidu		Za provozu	
	Maximální přípustný počet částic/m <sup>3</sup> rovný nebo větší			
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm
A	3 500	0	3 500	0
B	3 500	0	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	nedefinován	nedefinován





# Monitoring čistých prostor

**Tabulka 2 :**

Doporučené limity pro mikrobiologickou kontaminaci <sup>(a)</sup>				
Třída	Vzorkování vzduchu cfu/m <sup>3</sup>	Spadové misky Ø90 mm cfu/4hod <sup>(b)</sup>	Kontaktní desky Ø90 mm cfu/deska	Otisk rukavice 5 prstů cfu/otisk
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

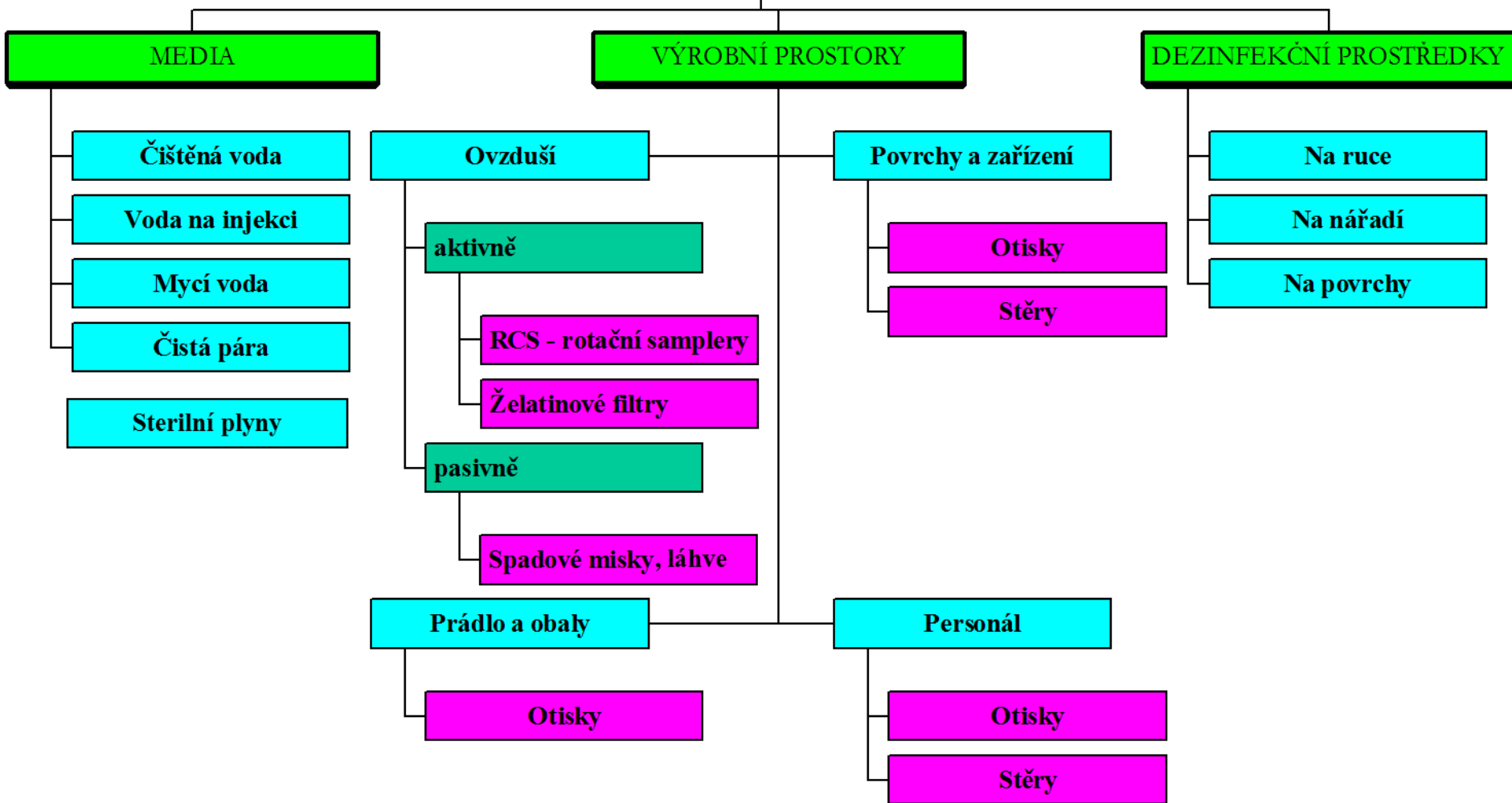
<sup>(a)</sup> V tabulce jsou uváděny průměrné hodnoty

<sup>(b)</sup> Jednotlivé spadové misky mohou být exponovány maximálně 4 hodiny

- Každý výrobce musí mít definovaný **monitorovací program**
  - popis (plánky, místa, frekvence)
  - metodika
  - zodpovědnosti
  - způsob vyhodnocování, trendování dat
  - nastavení limitů pro hodnocení
  - nápravná opatření

# Monitoring čistých prostor

## monitorovací schema Zentiva Praha



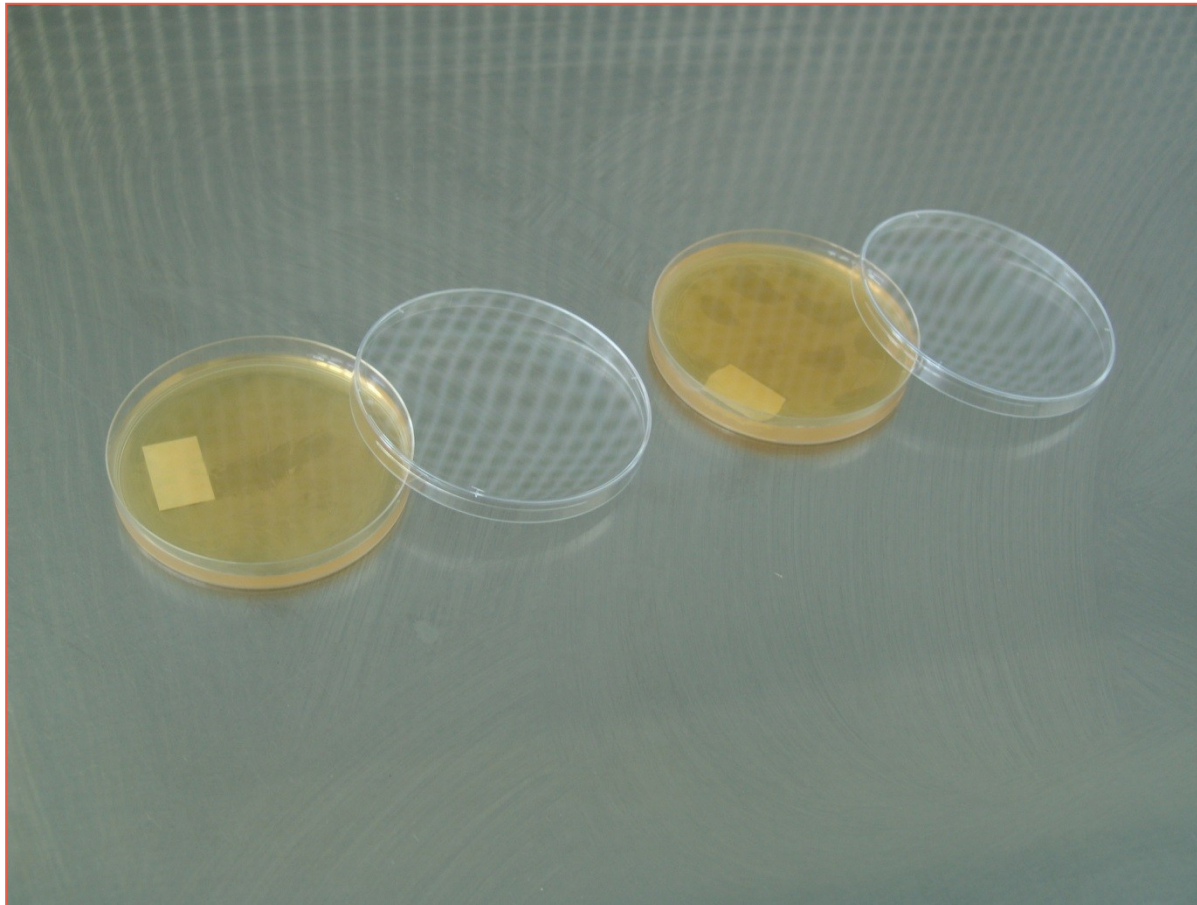
# Monitoring čistých prostor

- Aktivní kontrola ovzduší



# Monitoring čistých prostor

- **Pasivní kontrola ovzduší – spadové plotny**



# Další mikrobiologické metody

---

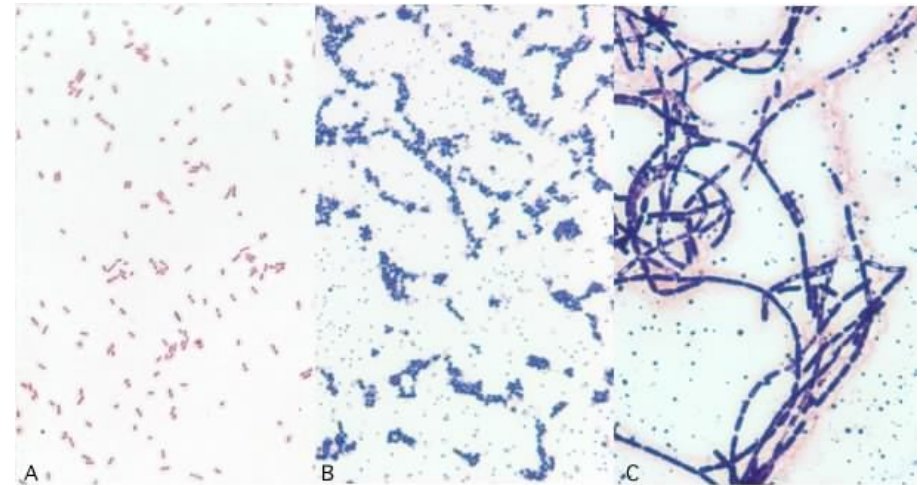
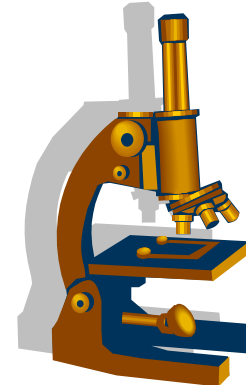
- Simulační testy (Media Fills)
  - ověření aseptického výrobního postupu
  - místo přípravku se rozplňuje živné medium s cílem zjistit možný zdroj kontaminace ve výrobě
  - plánovaná simulace všech možných zásahů do výrobního procesu
  - kultivace jako při zkoušce sterility





# Další mikrobiologické metody

- Identifikace mikroorganismů
  - hodnocení růstu a morfologie kolonií
  - Gramovo barvení
  - biochemická identifikace (Enterotest, API)
  - latexové aglutinace
  - automatické systémy



# Další mikrobiologické metody

---

- **Mikrobiologické testování účinnosti antibiotik**
  - princip: sledování inhibice růstu vybraných citlivých mikroorganismů (srovnání vzorek vs. standard)
  - metody: difuzní, turbidimetrická
  - trend: nahrazováno chemickým stanovením



# Další mikrobiologické metody

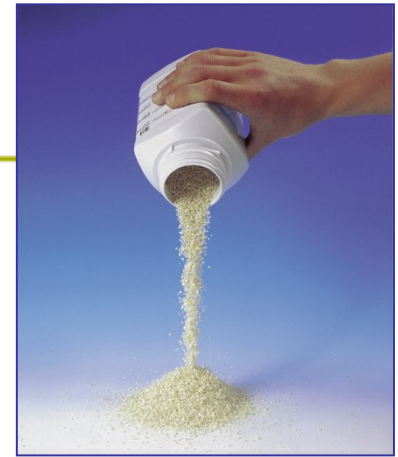
- Účinnost protimikrobní konzervace
  - princip: zkoušený přípravek zaočkován testovacím kmenem, kontrola případné změny počtu mikroorganismů
  - provádí se u vícedávkových balení
  - součást vývoje léčivého přípravku





# Další mikrobiologické metody

- Příprava a zkoušení živných půd
  - ověření růstových a selektivních vlastností
  - zkouška sterility, předinkubace



# Možnosti uplatnění absolventa v Zentivě

## Oddělení vývoje



Vývojový analytik  
Vývojový chemik  
Chemický inženýr  
Formulační specialista  
Projektový manažer

## Léková regulace a jistění jakosti

Specialista registrací - junior  
Specialista DMF (Drug Master File)  
Specialista farmakovigilance  
Specialista jistění jakosti  
Inspektor jistění jakosti



## Výroba a logistika

Inženýr pro farmaceutické procesy  
Specialista přípravkové technologie  
Analytik kontroly kvality  
Technolog



## Marketing a obchod

Produktový manažer  
Medicínský reprezentant



# Možnosti uplatnění absolventa v Zentivě

---

- **PhD Program**
  - pro studenty posledního ročníku magisterského studia / čerstvé absolventy, pro studenty doktorandského studia
  - spolupráce po celou dobu doktorského studia + nabídka pracovní pozice po úspěšném absolvování
- **VIE**
  - International Job Rotation Program – absolventi Mgr. studia (18-28 let)
- **Trainee**
  - pro čerstvé absolventy
  - 1 rok trainee program + nabídka pracovní pozice po úspěšném absolvování
- **Jak se přihlásit:**
  - **Kontaktovat personální oddělení a zaslat životopis**



Děkuji vám za  
pozornost!

