

# Стерилизација

Доц. Д-р Бистра Ангеловска

# Стерилизација

- фармацевтско-технолошка операција со која се убиваат или отстрануваат сите микроорганизми (габи, бактерии, вируси...) во еден фармацевтски препарат, на еден предмет, медицинско помагало или во одредена средина, воздух.

# Стерилизација

➤ Задолжителна при изработката на:

- Инјекции, инфузии
- Препарати за очи
- Препарти за вдишување
- За третман на свежи рани
- Медицински помагала за имлантација
- Медицински помагала за апликација на стерилни препарати и други

Две категории на стерилни производи:

- Терминално стерилизирани – добиени со стерилизација на крајниот производ и
- Подготвени со асептична постапка – препарати што не може да се стерилизираат терминално

За успешноста на стерилизацијата е неопходно познавање на следните фактори:

- Материјалот, препаратот што е предмет на стерилизација (единичен, сложен, компоненти)
- Можни микроорганизми за контаминација
- Дали материјалите, препаратот треба претходно процесно да се стерилизираат
- Соодветна постапка за стерилизација според материјалот и пакувањето
- Потврдување на стерилизацијата
- Соодветно складирање на стерилниот материјал, препарат
- Испорака, отварање и употреба на стерилните материјали, препарати без можна повторна контаминација

# Можни микробиолошки контаминенти

## Аеробни

### Грам-позитивни (+)

*Staphylococcus aureus*  
*Staphylococcus epidermidis*  
*Streptococcus pneumoniae*

### Грам-негативни (-)

*Escherichia coli*  
*Haemophilus influenzae*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Proteus mirabilis*  
Индол позитивни *Proteus*  
*Proteus spp.*  
*Neisseria spp.*  
*Providentia spp.*  
*Serratia marcescens*

## Анаеробни

### Грам-позитивни (+)

*Peptococcus spp*  
*Peptostreptococcus spp*  
*Microaerophilic Streptococcus*  
*Clostridium perfringens*  
*Clostridium spp.*  
*Propionibacterium spp.*  
*Eubacterium spp.*

### Грам-негативни (-)

*Bacterie fragilis*  
*Bacterie melominogemeus*  
*Bacteroides spp.*  
*Fusobacterium spp.*  
*Vellionella spp.*

## Методи за подготовка на стерилни производи – Европска фармакопеја

- **Стерилноста** е отсуството на живи микро-организми.
  - не може да се гарантира со тестирање, тоа мора да биде обезбедено со примена на соодветно валидирани процеси.
  - избраните постапки за стерилизација на производот (вклучувајќи го и финалното пакување или пакет) треба да обезбедат ефективност и интегритет на производот и дека постапката е валидирана пред да се примени во пракса.
  - изборот на пакувањето треба да е таков што овозможува примена на оптимална стерилизација на производот.
  - Неуспехот да се следи внимателно валидираниот процес вклучува ризик од можности за појава на нестерилен или лош производ.
  - Рестерилизацијата се врши кога се прават големи промени во постапката за стерилизација, вклучувајќи ги и промените во количината на материјалот што се стерилизира.

Примена на принципите на GMP (Водичите на Европската заедница за GMP) при дизајнирањето на процесот, вклучувајќи посебно:

- Квалификуван персонал со соодветна обука,
  - Соодветни простории,
  - Соодветна опремата за производство, дизајнирана за лесно чистење и стерилизација,
  - Соодветни мерки на претпазливост за да се минимизира бројот на живи микроорганизми пред стерилизација,
  - Потврдени процедури за сите критични чекори во производството,
  - Мониторинг на животната средина и внатрешните процедури на процесот.
- Неопходните мерки на претпазливост за да се минимизира бројот на живи микроорганизми пред стерилизација вклучува користење на компоненти со прифатлив низок степен на микробна контаминација.
  - Микробиолошкиот мониторинг и поставување на соодветни граници може да се препорача за состојки кои би можеле да бидат контаминирани поради нивното потекло, карактер или начин на изработка.

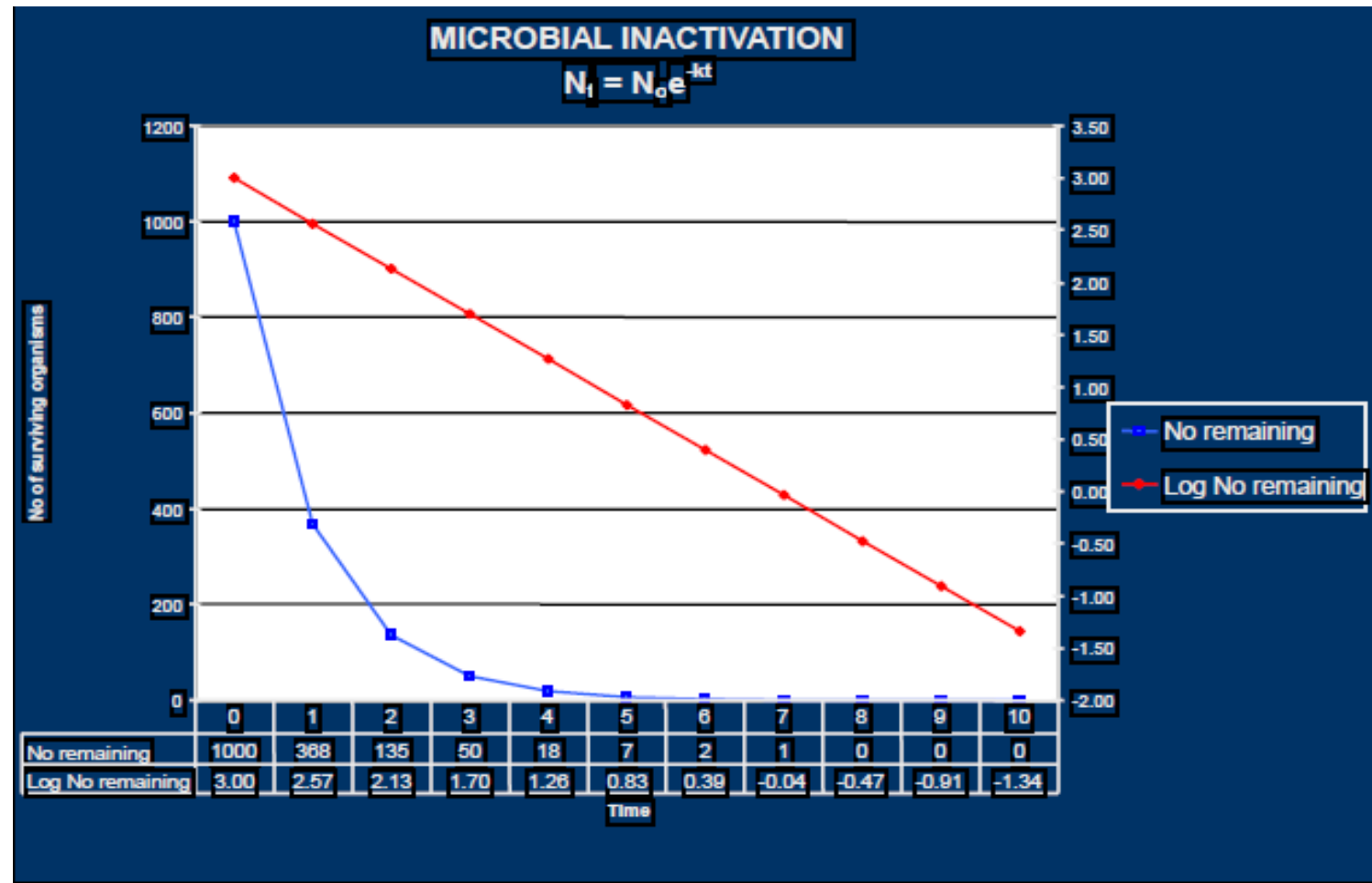
Методите опишани тука се однесуваат главно на инактивација или отстранување на бактериите, квасците и мувлите:

- За биолошки производи од животинско или анимално потекло или во случаи кога таквиот материјал се користи во производствениот процес, потребно е во текот на контролата, да се покаже дека процесот е способен за отстранување или инактивација на релевантната бактериска контаминација (упатство - во соодветните Водичи на Европската заедница).
- Секогаш кога е можно, се одбира процес со кој производот се стерилизира во неговото финално пакување (**терминална стерилизација**).
- Ако не е можна терминална стерилизација, се користи **филтрација преку бактериолошки филтер** или **асептична изработка на препаратот**; секогаш кога е можно, се применува соодветен дополнителен третман на производот (на пример, загревање на производот) во финалното пакување.
- Финалното пакување и затворувачот се важни за одржување на стерилноста на производот во текот на неговиот рок на траење.



# Sterility Assurance Level (SAL) – Сигурносно ниво на стерилност

- Постигнувањето на стерилност кај еден производ од вкупниот број на доставени производи за стерилизација не може да се гарантира, а ниту пак може да се докаже.
- Деактивирањето на микроорганизмите со физички или хемиски методи значи следење на експоненцијален закон, така што секогаш постои конечна статистичка веројатност дека некој микроорганизам може да го преживе процесот на стерилизација.

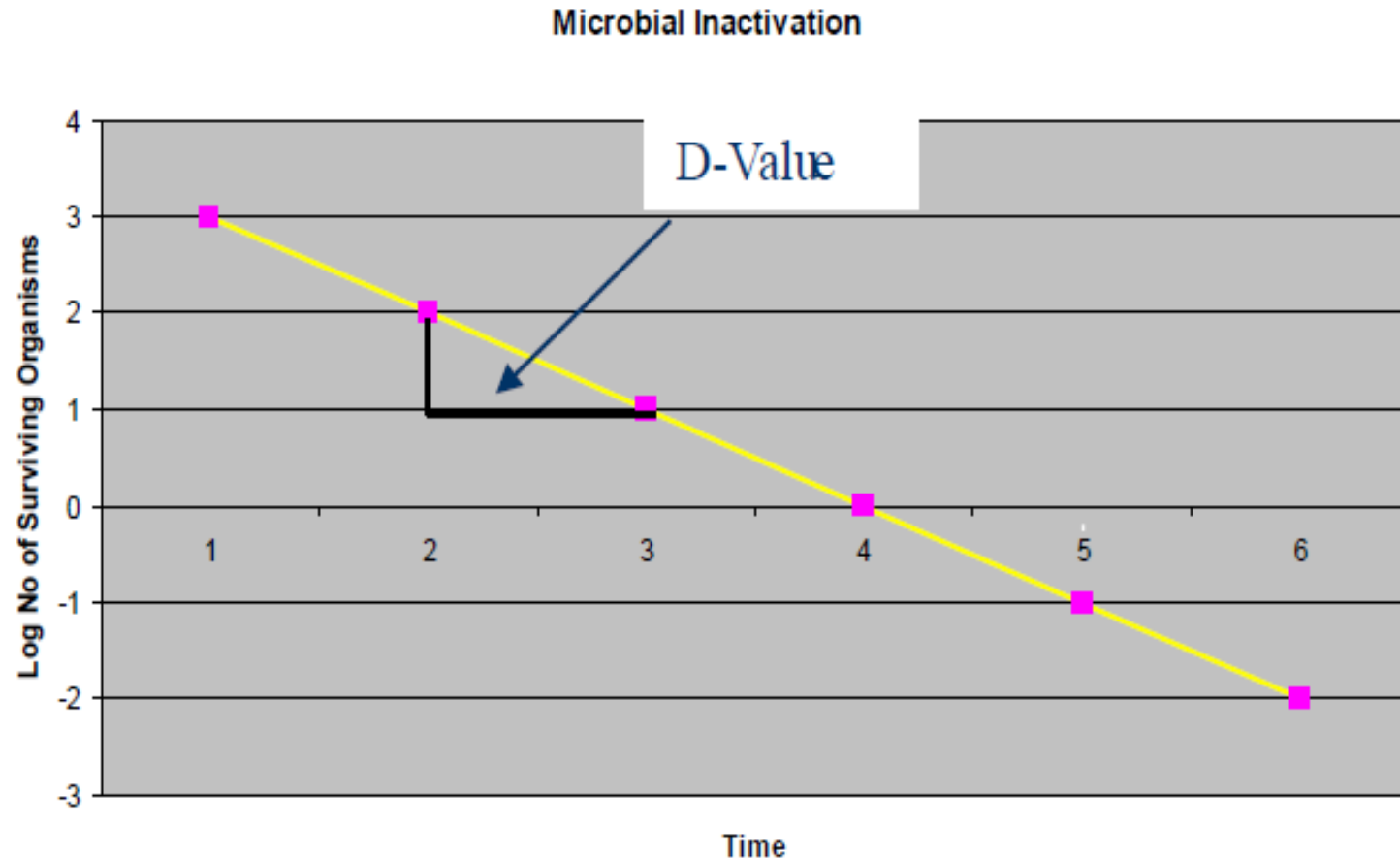


## Sterility Assurance Level (SAL) – Сигурносно ниво на стерилност

- За даден процес, веројатноста за преживување е одредена од бројот, видовите и отпорноста на микроорганизмите кои се присутни и од страна на средината во која организмите опстојуваат за време на третманот.
- SAL на процесот на стерилизација е степенот на сигурност, со кој се доведува во прашање бројот на живи организми на производ после стерилизација.
- SAL за даден процес е изразен како веројатност на нестерилна точка кај таа популација.
- SAL на  $10^{-6}$ , на пример, означува веројатноста за не повеќе од еден жив микроорганизам во  $1 \times 10^6$  стерилизирани примероци од финалниот производ.
- SAL на процесот за даден производ е утврдени со соодветни валидациони студии.

# Вредноста D

- Резистентноста на микроорганизмите изразена преку D-вредноста, или децимално редуциско време
- D-вредност – време (или доза) потребна за редуција на популацијата на микроорганизми за 1 log (или за 90%)
- 90% ( $\log 1000 = 3$ ;  $\log 100 = 2$ , редуција на бројот на микроорганизми за 90%)



## Начин и услови на стерилизација

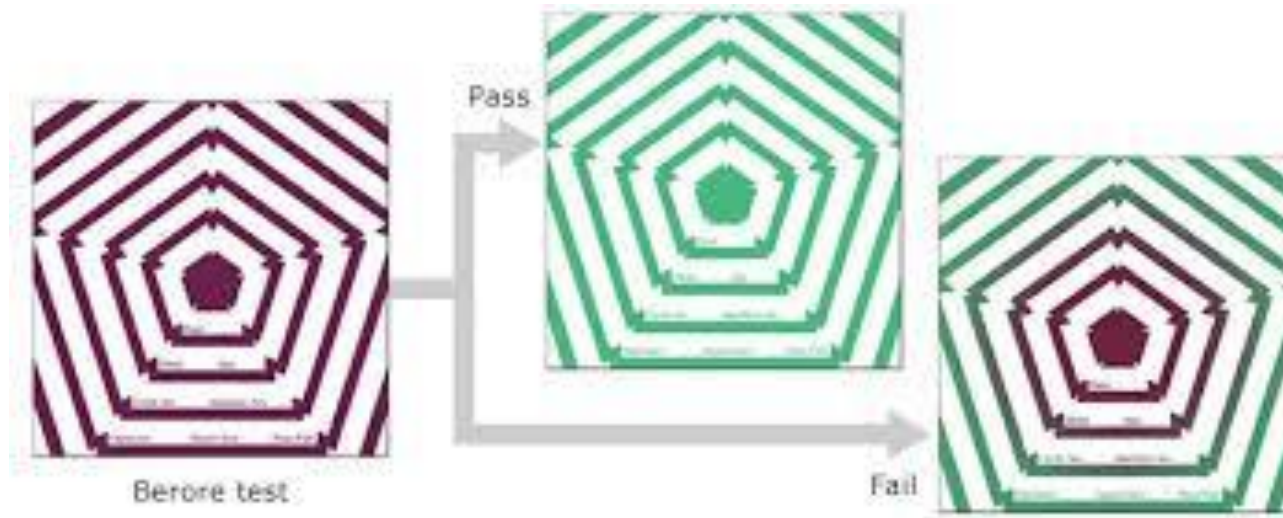
- Стерилизацијата може да се врши со една од методите што се опишани подолу.
- Модификациите или комбинации на овие методи може да се користат под услов одбраната постапката да е валидирана и во однос на нејзината ефикасност и во однос на зачувување на интегритетот на производот вклучувајќи го и неговото пакување.
- За сите методи на стерилизација критичните услови за работа се следат со цел да се потврди дека претходно утврдените потребните услови се постигнуваат во целата серија во текот на процесот на стерилизација.
- Ова се однесува во сите случаи вклучувајќи ги и оние каде што се користат референтни услови.

# Терминална стерилизација

- Важно е да се земат во предвид нееднаквите физички и хемиски услови во комората за стерилизација.
- Делот на комората за стерилизација во кој е најмалку достапен стерилизирачкиот агенс се утврдува за секоја конфигурација, за секој вид и големина на пакувањето (на пример, најладно место во автоклавот).
- Леталниот минимум на микроорганизмите добиен со еден стерилизирачки циклус и репродуцибилноста на циклусот, се детерминираат со цел да се се осигура дека сите пакувања ќе го добијат потребниот специфичен третман.
- Познавањето на утврдениот терминални стерилизациски процес и неговата ефикасност се контролира секогаш кога е можно, преку следење и соодветно евидентирање на физичките и хемиските својства постигнати во рамките на полнењето на комората во текот на еден стерилизирачки циклус.

# BOWIE-DICK

- Не е тест за успешност на стерилизацијата, туку само тест за исправноста на автоклавот, на температура од  $134^{\circ}\text{C}$  во тек на 3,5 минути
- Целта на овој тест е да го покаже присутниот воздух во комората, при што едноличната промена на бојата во зелено значи дека не е откриен воздух во комората
- Секоја промена на интензитетот на бојата или отсуство на промена на бојата докажуваат присуство на воздух и неисправност на стерилизаторот.



# Пакување на материјалот за стерилизација

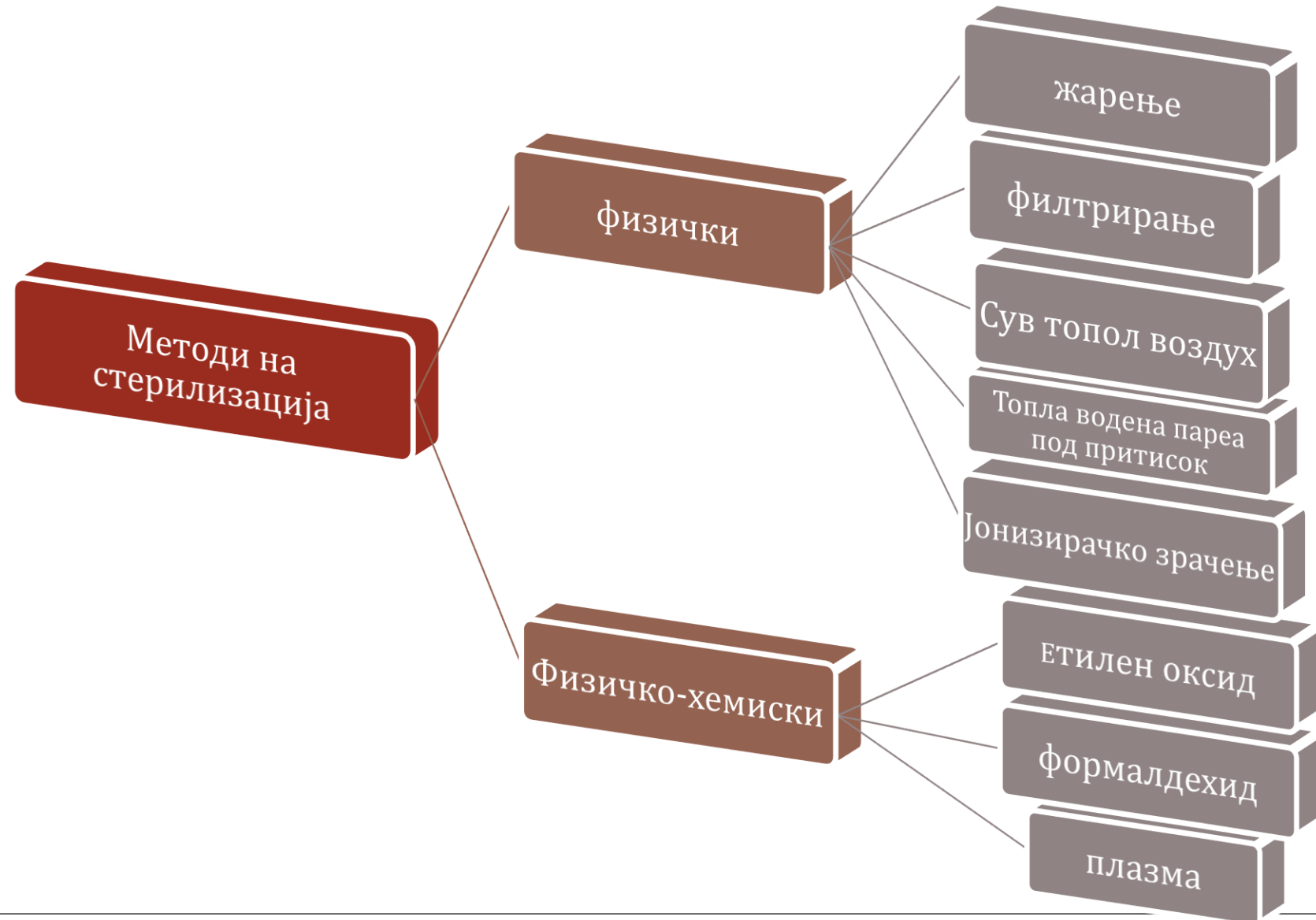
Пакување на  
материјал за  
повеќекратна  
употреба

- Контејнери
- Касети

Флексибилно  
пакување

- Текстил
- Прозирни кеси
- Прозирни обвивки во ролна
- Хартиени кеси
- Самолепливи хартиени кеси
- Хартија во листови

# Методи на стерилизација





# Физички постапки

## ЖАРЕЊЕ

- Метални предмети
- Последен избор на стерилизација

## ФИЛТРИРАЊЕ

- Раствори
- Механичко отстранување на микроорганизмите

## ТОПОЛ СУВ ВОЗДУХ

- материјали што не смее да се изложат на пара и/или притисок
- 150-170<sup>0</sup> С / 1,5 до 2 h

## ТОПЛА ПАРЕА

- Автоклав
- 121<sup>0</sup> С, 1,5 бара, 20 мин.
- 134<sup>0</sup> С, 2,5 бара, 5 мин

## ЈОНИЗИРАЧКО ЗРАЧЕЊЕ

- „ладна стерилизација“
- Електромагнетно зрачење, електронско зрачење со атомски честички
- Индустриска стерилизација

# Физичко – хемиски постапки

## ЕТИЛЕН ОКСИД

- за материјали што не поднесуваат високи температури
- Канцероген гас....
- Вентилација!!!!
- крв, импланти, материјал за шиење...

## ФОРМАЛДЕХИД

Метода еквивалентна на стерилизација со етилен оксид

## ПЛАЗМА

- Златен стандард
- Еколошки прифатлива
- непогодна за материјали што имаат способност за апсорпција

# Стерилизација со сув топол воздух

## ПРЕДНОСТИ

Не го еродира  
стаклото

Не е корозивна за  
метали и остри  
предмети

Голема моќ за  
пенетрација

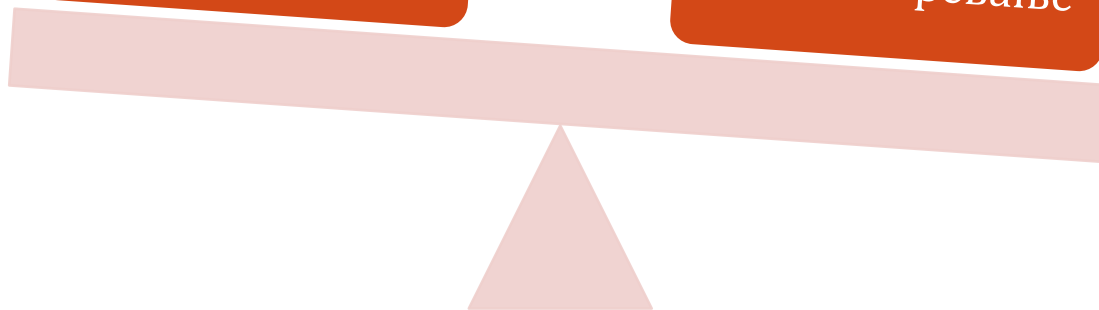
## НЕДОСТАТОЦИ

Ги оштетува  
материјалите

Се користат  
високи  
температури

Доло време на  
изложеност

Бавно загревање



# Стерилизација со водена пареа под притисок - автоклав

## ПРЕДНОСТИ

Економичност

Брзина

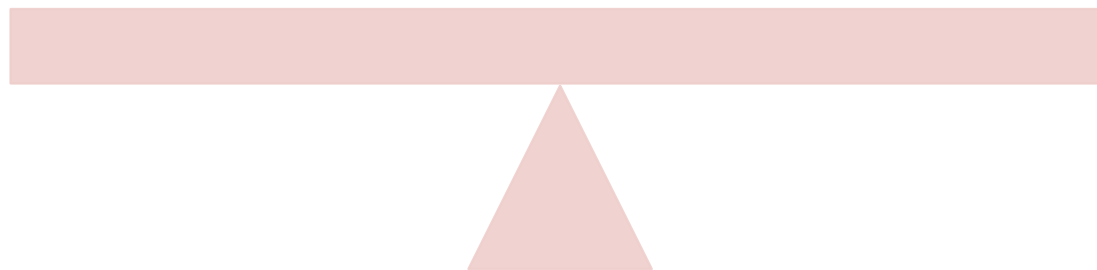
Едноставност

## НЕДОСТАТОЦИ

Можност за  
заостанување на  
воздух во  
комората

Не е погодна за  
материјали  
осетливи на  
влага

Не е погодна за  
термолабилни  
материјали



# Стерилизација со етилен оксид

## ПРЕДНОСТИ

Можност за прилагодување на пртисокот и на температурата

Голема продорност на гасот

Технолошки усовршена апаратура

## НЕДОСТАТОЦИ

Големи трошоци за инсталација на опремата

Долготрајна стерилизација и вентилација

Голема апсорпција во материјалите како PVC

Токсичност на гасот

# Плазма стерилизација

## ПРЕДНОСТИ

Еколошки  
прифатлива

Ниски  
температури

Нема  
вентилација

Брзи циклуси

## НЕДОСТАТОЦИ

Скап материјал  
за амбалажа

Инкомпатибилно  
со текстил и  
целулоза

Слаба  
пенетрација

# Преглед на материјалите според видот на стерилизација

Сува  
серилизација

Стакло

Лабораториски  
прибор, метал

Прашоци,  
масти

Автоклав

Текстил, гума

Инструменти

Стакло,  
хартија,  
раствори

Јонизирачко  
зрачење

Индустриски  
произведени  
материјали

Гасна  
стерилизација

Термолабилни  
материјали

Крв

Имплантанти

Материјал  
за шиење

Плазма

PVC

Силикон

Латекс

Полиуретан

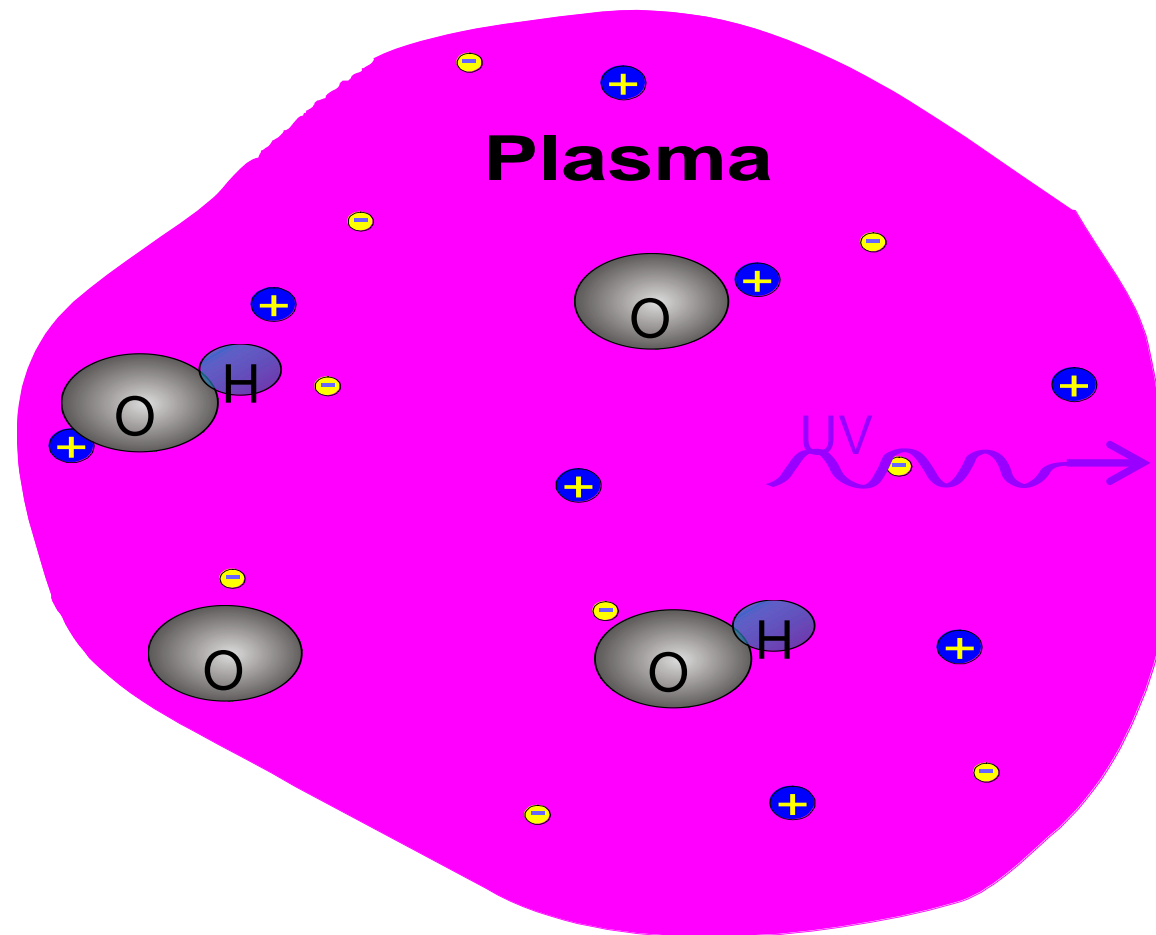
Стакло

# Плазма стерилизација

- $\text{H}_2\text{O}_2$  и високофреквентна електрична струја – за стерилизација на оптички инструменти, крути и флексибилни ендоскопи, материјали за анестезија
- Стерилизациски медиум е плазма развиена од водородниот пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) во поле на високофреквентни електромагнетни бранови
- Под дејство на брановите со висока фреквенција, водородниот пероксид се распаѓа во слободни радикали кои делуваат бактерицидно
- По престанокот на дејството на електромагнетните бранови плазмата се дисоцира на вода и кислород кои се потполно безопасни за луѓето и за околината
- Топлината што настанува во физико – хемиската реакција при плазма стерилизацијата не е повисока од  $45\text{ }^\circ\text{C}$



# Плазма стерилизација



# Плазма стерилизација



## **Стерилизација со бактериолошко филтрирање**

- Ладна фармацевтско-технолошка постапка за добивање на течни стерилни препарати, посебно за раствори со термолабилни состојки, какви што се: разни биолошки активни супстанции, антибиотици, хормони, витамини, ензими итн.
- Брза, ефтина и лесно се изведува
- Во изработка на магистрални стерилни препарати во аптекарски услови, пр. капки за очи
- Во индустриски услови: филтри изработени од пластични маси, челик, нитроцелулоза....

Недостаток: несигурна при непрофесионално однесување → се надминува со додавање на антимикробни средства во готовиот препарат

## Предуслови:

- Стерилна средина
- Стерилен прибор, стерилна амбалажа
- Беспрекорна професионалност на изведувачот

## Постапка:

- Филтрирање на течниот раствор низ филтерски уред со дефинирана големина на филтер платното → зависи од квалитетот и квантитетот на препаратот што го филтрираме:
  - Водени раствори – максимум  $0,22\mu\text{m}$
  - Водено-колоидни раствори (белковини, плазма, имуносеруми, вакцини) –  $0,4$  до  $0,5\mu\text{m}$

## **Ультрафилтрација** – филтрирање со депирогенизација

- Воден раствор –  $0,1$  до  $0,001\mu\text{m}$

## Филтрација- Европска фармакопеја

- Одредени активни состојки и производи кои не може да се стерилизираат може да бидат подложени на филтрациона постапка со користење на типови на филтри со кој е докажано дека ги задоволуваат микробиолошките тестови:
  - Суспензија на *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19.146, NCIMB 11.091 или CIP 103.020) може да бидат соодветни →изложување на најмалку  $10^7$  CFU на  $\text{cm}^2$  на активна филтер површина и приготвена суспензијата во tryptone соја бујон, која по поминувањето низ филтерот се собира асептично и се инкубира аеробно на  $32^\circ\text{C}$ .
- Потребни посебни мерки на претпазливост.
- Производствениот процес и опремата се така дизајнирани за да се минимизира микробиолошката контаминација и се редовно подложени на соодветна постапки за следење.
- Опремата, паковниот материјал и затворувачите секогаш кога е можно, се предмет на соодветни стерилизација.

## Филтрација - Европска фармакопеја

- Операциите после филтрација се вршат под стерилни услови.
- Филтрирањето се врши со филтри со номинална големина на порите од 0,22  $\mu\text{m}$  или помалку или било кој друг тип на филтер со еднакви својства и можност за задржување на бактериите.
- се превземаат соодветни мерки за да се избегне загубата на растворот и можноста за контаминација на иститот од самиот филтер.
- Посебно внимание се посветува на бактериската концентрација пред филтрацијата, капацитетот на филтерот, големината на серијата што се филтрира и должината на филтрацијата.

## **Филтрација - Европска фармакопеја**

- Филтерот не се користи подолг период отколку што е одобрено со валидационата постапка.
- Интегритетот на филтерот за стерилизирање е потврден пред употребата и после употребата соодветно со користење на тестови зависно од типот на филтерот и фазата на тестирањето
- Поради евентуалните додатни ризици од методот за филтрација во споредба со другите процеси за стерилизација, префилтрацијата преку бактерии-инактивиращки филтер може да се препорача во случаи каде ниска бактериска концентрација не може да се обезбеди на ниту еден друг начин.

## Асептична работа

- Систем на работа кој во себе опфаќа различни постапки за стерилизација, како негови сегменти
- Доминантен систем во изработката на сите видови стерилни фармацевтски дозирани форми, како и за некои специфични препарати (имунобиолошки, радиофармацевтски...)
- **Цел** на стерилната обработка → да се задржи стерилитетот на производот составен од компоненти, кои што биле стерилизирани со една од горенаведените методи.
- Ова се постигнува во услови и капацитети кои се така дизајнирани да можат да обезбедат целосно спречување на микробиолошка контаминација.



- Асептичната обработка може да вклучи:
  - стерилно полнење на производите во амбалажа / систем со затворање,
  - стерилно мешање на формулациите проследено со стерилно полнење и
  - стерилно пакување
- За да се задржи стерилитетот на компонентите и производот за време на обработката, треба да се обрне внимание на:
  - околината,
  - персоналот,
  - критичните површини,
  - амбалажата / процес и систем на затворање и процедурите за трансфер,
  - максималниот период што производот може да се чува пред полнење во финалната амбалажа.

- Процесот на валидација вклучува соодветни проверки на сите фази и редовна проверка на процесот со помош на симулациони тестови со користење на медиуми за раст на бактерии кои потоа се инкубираат и испитуваат за можна микробиолошка контаминација.
- Покрај тоа, на соодветен примерок од секоја серија на секој производ кој е стерилизиран со филтрација и / или асептично обработен се тестира за стерилитет пред серијата да биде пуштена во употреба.

## Можни извори за контаминација

- Просторот за производство
- Персоналот
- Опремата
- Постапките за стерилизација
- Документација (индиректно)

Треба да се сведат на минимум, при конципирањето на системот асептична работа

## Активности кои ја придружуваат асептичната работа

- Внесување на суровините како стерилни прашоци или течности, полуцврсти или цврсти препарати, кои пред полнењето во контактната амбалажа се стерилно обработени → со посебен начин на влез
- Внесување на контактен амбалажен материјал со претходна стерилизација со соодветна постапка и со посебен влез
- Излез на спакуваните препарати само во контактна амбалажа
- Влез/излез на персоналот

## Класификација на чисти простории според PIC

Кл.	внесување воздух	макс. број честички/m <sup>3</sup>		макс. број микроорган изми / m <sup>3</sup>
		> 0,5 μm	> 5 μm	
<b>А</b>	ламинарно струење, вертикално 0,3 m/s хоризонтално 0,45 m/s	3 500	0	< 1
<b>Б</b>	конвенционално внесување	3 500	0	5
<b>В</b>	внесување <sup>(2)</sup> сиромашно со микроби	350 000	2 000	100
<b>Г</b>	внесување со смален број микроби	3 500 000	20 000	500

<sup>(1)</sup> Pharmaceutical Inspection Convention

<sup>(2)</sup> Промени на воздухот 5 до 20 пати / час

## Класификација според присутни честички во чистите соби

Grade	At rest		In operation	
	<i>maximum permitted number of particles/m<sup>3</sup></i>			
	0.5 - 5.0 $\mu\text{m}$	> 5 $\mu\text{m}$	0.5 - 5.0 $\mu\text{m}$	> 5 $\mu$
<b>A</b>	3 500	0	3 500	0
<b>B</b>	3 500	0	350 000	2 000
<b>C</b>	350 000	2 000	3 500 000	20 000
<b>D</b>	3 500 000	20 000	not defined	not defined

## Споредба на стандарди

WHO GMP	US 209E	US Customary	ISO/TC (209) ISO 14644	EEC GMP
Grade A	M 3.5	Class 100	ISO 5	Grade A
Grade B	M 3.5	Class 100	ISO 5	Grade B
Grade C	M 5.5	Class 10 000	ISO 7	Grade C
Grade D	M 6.5	Class 100 000	ISO 8	Grade D

## Лимит на микроорганизми во чистите соби за производство

Grade	Air sample (CFU/m <sup>3</sup> )	Settle plates (90mm diameter) (CFU/4hours)	Contact plates (55mm diameter) (CFU/plate)	Glove print (5 fingers) (CFU/glove)
A	< 3	< 3	< 3	< 3
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

- Класа D – помалку критични фази на асептично производство како на пример манипулација на разни компоненти после перење
- Класа C - помалку критични фази на асептично производство како на пример подготовка на раствори пред филтрација
- Класа B – позадина на A на пример чиста соба каде е сместен laminar flow

# Контрола на стерилизацијата

## Физички постапки

- Температура, време, притисок
- Концентрација на гасот
- Доза на радиоактивното зрачење

## Хемиски постапки

- Хемиски индикатори

## Биолошки постапки

- Бактериски спори



# „Златен“ стандард на контрола на стерилноста

Биолошката контрола на стерилизацијата со спори кои се култивираат 7 до 14 дена треба да се спроведува:

- Еднаш неделно
- После секој дефект на стерилизаторот
- После долго неработење на стерилизаторот
- Секогаш кога се стерилизира материјал за имплантација

Организмите се во форма на ендоспори бидејќи истите се најотпорни на стерилизација

organisms	D-value
Geobacillus stearothermophilus (most common)	1 – 2.8
Bacillus coagulans	0.3
Clostridium sporogenes	0.8 – 1.4
Bacillus atrophaeus	0.5

# Заклучок

