



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

ENVIRONMENTÁLNÍ MONITORING PRO ZAJIŠTĚNÍ KVALITY VÝROBY

ENVIRONMENTAL MONITORING FOR PRODUCTION QUALITY ASSURANCE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klára Minářová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1950/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Klára Minářová**
Studijní program: Environmentální chemie, bezpečnost
a management
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Environmentální monitoring pro zajištění kvality výroby

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování základních literárních podkladů na téma environmentálního monitoringu pro zajištění kvality výroby ve firmě Hartmann – Rico a.s.
2. Představení využívaných laboratorních metod.
3. Přehledné zpracování a zhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Klára Minářová
studentka

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Jozef Krajčovič, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá tématem environmentálního monitoringu pro zajištění kvality výroby. Konkrétně byla pozornost zaměřena na sledování přítomnosti a vývoje počtu mikroorganismů ve vzduchu a na pracovních plochách v konkrétních výrobních prostorech v pravidelných intervalech. Počty mikroorganismů ve vzduchu byly určovány metodou pro stanovení mikrobiologické zátěže vzduchu a koncentrace mikroorganismů na povrchu byla zjišťována metodou otisku zkoušené plochy na agarovou destičku s následnou kultivací a odečtení kolonií dle vnitřních norem. Monitoring provádí kontrolní mikrobiologická laboratoř, která spadá pod oddělení kvality dané výrobní společnosti. Podklady k vypracování této bakalářské práce byly získány během mé odborné praxe v kontrolní mikrobiologické laboratoři.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the topic of environmental monitoring to ensure production quality. Specifically, the attention was paid to the monitoring of the presence and development of the number of microorganisms in the air and on work surfaces in specific production areas at regular intervals. The number of microorganisms in the air was determined by the method for determining the microbiological burden of the air, and the concentration of microorganisms on the surface was determined by the method of imprinting the tested area on an agar plate with subsequent cultivation and counting the bacterial colonies according to the internal regulations. Monitoring is carried out by the control microbiological laboratory, which falls under the quality department of the given manufacturing company. The basis for the preparation of this bachelor's thesis was obtained during my internship in the control microbiology laboratory.

KLÍČOVÁ SLOVA

environmentální monitoring ve firmách, správná výrobní praxe, monitorování povrchů, vzorkování vzduchu, mikroorganismy

KEY WORDS

environmental monitoring in companies, good manufacturing practice, surface monitoring, air sampling, microorganism

MINÁŘOVÁ, Klára. *Environmentální monitoring pro zajištění kvality výroby*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/154534>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí . Vedoucí práce Veronika Řezáčová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana VUT.

.....

Klára Minářová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Veronice Řezáčové, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky. Dále děkuji kontrolní mikrobiologické laboratoři za poskytnutí potřebných dat pro tuto práci.

OBSAH

ÚVOD	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 HARTMANN - RICO A.S.	8
1.2 MONITOROVÁNÍ	8
1.3 ENVIRONMENTÁLNÍ MONITORING VE FIRMÁCH	9
1.3.1 Cíle environmentálního monitoringu	9
1.4 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE	9
1.4.1 Kontrola jakosti	10
1.4.2 Přezkoumání kvality produktu	11
1.4.3 Systém řízení kvality	11
1.4.4 Dokumentace.....	12
1.4.5 Pracovníci.....	13
1.4.6 Výroba.....	13
1.4.7 Čisté prostory	14
1.4.8 Zdroje kontaminace.....	16
1.4.9 Kontrola oblastí náchylných ke kontaminaci	16
1.4.10 Vnitřní inspekce.....	16
1.5 PLÁN MONITORINGU.....	17
1.5.1 Výběr odběrových míst	17
1.5.2 Frekvence odběrů	17
1.5.3 Stanovení varovných a limitních hodnot	18
1.5.4 Nápravná opatření	18
1.6 MONITOROVACÍ METODY	18
1.6.1 Počet mikroorganismů ve vzduchu	18
1.6.2 Počet mikroorganismů na povrchu	20
1.7 TESTOVÁNÍ BIOZÁTĚŽE VÝROBKU	22
1.7.1 Metody testování biologické zátěže výrobků	22
1.8 ZÁKLADNÍ POJMY PRO MIKROBIOLOGICKÉ TESTY	23
1.8.1 Kultivace mikroorganismů	23
1.8.2 Optimální kultivační doba a teploty kultivace	24
1.8.3 Kultivační půdy	25
1.8.4 Očkování mikroorganismů	27
1.8.5 Metody očkování mikroorganismů.....	27
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
2.1 STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ VE VZDUCHU	29
2.1.1 Vybavení, materiály a kultivační média	29

2.1.2	Postup stanovení.....	29
2.2	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ NA POVRCHU	31
2.2.1	Vybavení, materiály a kultivační média	31
2.2.2	Postup stanovení.....	31
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	33
3.1	MONITORING VZDUCHU A PRACOVNÍCH POVRCHŮ VE VÝROBNÍM PROSTORU I.....	33
3.1.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu	33
3.1.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu	36
3.2	MONITORING VZDUCHU A PRACOVNÍCH POVRCHŮ VE VÝROBNÍM PROSTORU II.	38
3.2.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu	38
3.2.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu	40
3.3	MONITORING VZDUCHU A PRACOVNÍCH POVRCHŮ VE VÝROBNÍM PROSTORU III.....	44
3.3.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu	44
3.3.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu	46
3.4	MONITORING VZDUCHU A PRACOVNÍCH POVRCHŮ VE VÝROBNÍM PROSTORU IV.....	48
3.4.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu	48
3.4.1	Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu	50
4	ZÁVĚR.....	53
5	SEZNAM ZDROJŮ.....	54
6	PŘÍLOHY	57

ÚVOD

Environmentální monitoring ve firmách je klíčový pro zajištění vysoké kvality a bezpečnosti výrobků ve farmaceutickém průmyslu, při výrobě zdravotnických prostředků, ale i v dalších odvětvích. Je nedílnou součástí procesu, který určuje kvalitu čistých prostor prostřednictvím systematického sběru mikrobiologických dat. Jeho hlavním cílem je posoudit potenciální mikrobiologický dopad výrobního prostředí na produkty vyrobené ve výrobním prostředí s odpovídající třídou čistoty, zajistit tak dodržování stanovených kritérií a minimalizovat riziko kontaminace produktu. Tento proces poskytuje klíčové informace o čistých prostorech, ve kterých probíhá výrobní proces. Prostřednictvím mikrobiologických testů je zajištěna bezpečnost výrobků a minimalizují se rizika nepříznivých dopadů na kvalitu výrobků.

Monitoring je nedílnou součástí správné výrobní praxe a je nezbytný k tomu, aby konečný produkt mohl opustit výrobní závod. Správná výrobní praxe zahrnuje soubor postupů, požadavků a doporučení, které mají za cíl zajistit vysokou kvalitu a bezpečnost výrobků, aby nedošlo k ohrožení koncového spotřebitele. Zahrnuje minimální požadavky pro všechny složky výrobního procesu, které musí výrobci splnit.

Určení přítomnosti mikroorganismů ve vzduchu a na povrchu se provádí podle plánu zkoušek, který je přizpůsoben konkrétním prostorům s odpovídající třídou čistoty. Varovné a limitní hodnoty jsou stanoveny na základě analýzy a sledování trendu hodnot v rámci kvalifikační studie. Po určení trendu jsou limity stanoveny dle daných specifikací. Pokud je během vyhodnocení monitoringu zjištěno, že jsou varovné nebo limitní hodnoty překročeny, indikuje to nesoulad prováděných procesů a je třeba použít odpovídající nápravná opatření. Tato opatření obvykle zahrnují dodatečné čištění a dezinfekci, kontrolu účinnosti čisticích postupů a ověření, zda byly provedeny v souladu s písemnými postupy. Pokud dojde k překročení limitních hodnot je nutné provést testování biologické zátěže podezřelé šarže výrobku, která musí být po dobu mikrobiologického testování zadržena a nesmí opustit výrobní závod, dokud není ověřeno, zda nebyla kontaminována.

Tato bakalářská práce hodnotí, zda výrobní prostory splňují stanovené požadavky na mikrobiologickou čistotu a jsou tak zajištěny řádné podmínky pro výrobu a konzistentní bezpečnost a kvalitu výrobku v konkrétních případech výrobního závodu společnosti HARTMANN – RICO a.s.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 HARTMANN - RICO a.s.

HARTMANN – RICO a.s. patří mezi nejvýznamnější výrobce zdravotnických prostředků a hygienických výrobků v České republice. Historie společnosti Rico sahá až do roku 1891, kdy byla založena v Chomutově pod názvem Richter&Compagnon. V této době se společnost specializovala na výrobu obvazových materiálů. Akciová společnost Rico vznikla v roce 1914 ve Vídni a zanedlouho byl vybudován i závod ve Veverské Bítýšce. Společnost Rico obhajovala svoji pozici významného producenta obvazového materiálu, hygienických potřeb a vaty i po znárodnění v roce 1946. Významná příležitost k rozvoji společnosti Rico nastala až po roce 1989, kdy v roce 1991 vstoupila společnost PAUL HARTMANN AG do původního podniku Rico Veverská Bítýška. Tímto krokem vznikla společnost HARTMANN – RICO a.s. a během deseti let svého působení se stala největším výrobcem, význačným exportérem a jedním z nejvýznamnějších distributorů zdravotnických a hygienických výrobků v České republice. Firma klade důraz na dodržování principů dobrého řízení, díky kterým roste kvalita výrobků a také služeb. Kvalita je zajištěna integrovaným systémem managementu kvality, který stanovuje nejvyšší požadavky na čistotu, kvalitu a bezpečnost ve všech stupních výrobního procesu. Vývoj produktů a služeb je v souladu se standardy ISO 14000 a firma klade důraz na omezení dopadů svojí činnosti na životní prostředí. Systém řízení zahrnuje koncept HSE Management (Health, Safety & Environment Management), který požaduje odpovědný přístup k zaměstnancům, k životnímu prostředí a klade důraz na trvale udržitelný rozvoj [1], [2].

Logo společnosti HARTMANN-RICO a.s. v průběhu let prošlo mnoha změnami až k současné podobě zavedené v roce 2014, viz obr. 1.



Obrázek 1: Logo firmy HARTMANN - RICO a.s [3]

1.2 Monitorování

Monitorování je proces, při kterém se pravidelně systematicky shromažďují informace a následně se analyzují a vyhodnocují. Tyto informace se využívají k maximalizaci pozitivních dopadů a minimalizaci rizika a případných nepříznivých dopadů. Monitorování, dnes častěji označováno pojmem monitoring, je využíván v různých odvětvích včetně informačních technologií, zdravotnictví, průmyslu nebo při sledování životního prostředí [4].

1.3 Environmentální monitoring ve firmách

Environmentální monitoring ve firmách má zásadní význam pro udržení kvality a bezpečnosti výrobků. V mikrobiologii a farmaceutickém průmyslu je monitoring vnímán jako proces, který určuje kvalitu čistých prostor prostřednictvím sběru mikrobiologických dat. Environmentální monitoring ve firmách je využíván zejména k vyhodnocení potenciálního mikrobiologického dopadu výrobního prostředí na produkty v tomto prostředí vyrobené a slouží ke kontrole, zda prostředí splňuje stanovená kritéria. Tento proces poskytuje informace o kvalitě aseptického, tj. sterilního, prostředí, ve kterém probíhá výroba. Provedením mikrobiologického testování se zajišťuje bezpečnost výrobků a minimalizují se rizika nepříznivých dopadů. Výrobky kontaminované mikroorganismy mohou způsobit vážné poškození koncových uživatelů, resp. pacientů. Kontrolou daného prostředí lze snižovat pravděpodobnost kontaminace. V rámci environmentálního monitoringu je především prováděno rutinní monitorování mikroorganismů v čistých prostorech a jiných kontrolovaných prostředích, včetně výrobních prostředí a zkušebních laboratoří. Vzorky, ze kterých data pocházejí, jsou odebírány v čistých zónách ze vzduchu, povrchů, materiálů a personálu. Tímto jsou získány podklady k identifikaci možných zdrojů kontaminace. Monitorování čistého prostředí hraje rozhodující roli při vývoji a výrobě sterilních a v řadě případů také nesterilních výrobků [5], [6].

Environmentální monitoring poskytuje informace o kvalitě výrobního prostředí, sleduje trendy ve výrobní oblasti a dokáže identifikovat možné cesty vstupu kontaminace. Tento přístup umožňuje provést nápravu a zabránit vzniku a rozšíření kontaminace. Pokud dojde k překročení stanovených úrovní znečištění, jsou v programu environmentálního monitoringu ve firmách zahrnuta nápravná opatření. Aby byl program environmentálního monitorování účinný, musí být prováděn podle plánů, protokolů a zásad vhodných pro dané prostředí a musí vycházet z požadavků na hodnocení rizik v dané oblasti. Environmentální monitoring je součástí správné výrobní praxe a je podmínkou, aby konečný produkt mohl opustit výrobní závod [5], [6], [7], [8].

1.3.1 Cíle environmentálního monitoringu

- Monitoring čistých prostor, shromažďování dat a sledování trendů s cílem hodnocení stavu prostředí (sledování počtu mikroorganismů, identifikace konkrétních typů mikroorganismů).
- Zajištění konzistentní kvality výroby. Konkrétním cílem je ukázat, že se úroveň kontaminace během výroby nezvyšují.
- Posouzení rizika pro čisté prostředí, a především pro samotný produkt.
- Snížení rizika kontaminace výrobku z okolního prostředí. Při překročení úrovně znečištění je nutné provést nápravná opatření, určit zdroje kontaminace, určit možné dopady na daný produkt a zavést preventivní opatření.
- Poskytnutí informací o účinnosti čištění a dezinfekce výrobního prostředí [5], [6].

1.4 Správná výrobní praxe

Správná výrobní praxe neboli GMP (Good Manufacturing Practice) je soubor postupů, požadavků a doporučení, které slouží k zajištění vysoké kvality a bezpečnosti výrobků. Popisuje minimální požadavky na výrobní procesy, které musí výrobci splnit, aby byla zajištěna trvalá kvalita a bezpečnost výrobků. Výrobci musí dodržovat všechny požadavky obsažené v zásadách výrobní praxe. Hlavním účelem správné výrobní praxe je zabránění poškození nebo ohrožení spotřebitele. Správná výrobní praxe pokrývá všechny složky výrobního procesu, včetně konstrukce výrobního zařízení, školení zaměstnanců, zavedení postupů kontroly kvality,

monitorování výrobních prostor a zkoušky hotových výrobků. Pomáhá zajistit splnění kvality, standardů čistoty a účinnosti daných výrobků a předchází kontaminaci, tj. přítomnosti nežádoucích škodlivých látek. Správná výrobní praxe je z hlediska výše uvedených kritérií aplikována především u výroby farmaceutických produktů, kosmetiky, potravin a nápojů, potravinových doplňků a zdravotnických prostředků. Výrobci musí uplatňovat zásady správné výrobní praxe, aby se zajistila bezpečnost výrobků především pro koncového spotřebitele. Aby byly předpisy GMP dodrženy, musí daná společnost udržovat komplexní systém řízení kvality, který zahrnuje písemné postupy, vedení záznamů a školení zaměstnanců. Je nutné, aby společnost své procesy a činnosti neustále sledovala a hodnotila a aby se zajistil soulad procesů a konzistentní kvalita výroby. V každém odvětví se požadavky GMP liší [9], [10], [11], [12].

Nezbytná obecná kritéria pro dodržení přísných standardů správné výrobní praxe:

- Produkty – je nezbytné testování vstupních materiálů, materiálů v procesu výroby a výrobků, aby byla zajištěna konzistentní kvalita a zamezilo se kontaminaci ve všech fázích výroby.
- Pracovníci – je nutné, aby všichni zaměstnanci byli kvalifikovaní a vyškolení.
- Procesy – jsou jasně definovány, přezkoumávány a pravidelně hodnoceny, aby se zajistilo splnění standardů firmy a byla zajištěna ustálená výroba v požadované kvalitě.
- Prostory – musí být dodržována přísná pravidla, aby se zajistily bezpečné podmínky pro výrobu.
- Postupy – jsou názorné a jednoznačné, pro určitá pracoviště jsou vypracovány jednotlivě, aby odpovídaly požadavkům správné výrobní praxe.
- Dokumentace – pořizované záznamy během výroby prokazují, že byly dodrženy všechny definované postupy a instrukce a že jakost produktu odpovídá předpokladům [10], [11], [13].

1.4.1 Kontrola jakosti

Nezbytnou součástí správné výrobní praxe je kontrola jakosti, která se zabývá zejména odběrem vzorků, jejich testováním a specifikacemi. Významnou součástí je také dokumentace postupů a propouštění konečných produktů, které provádí kvalifikovaná osoba písemným souhlasem k jejich propuštění, kterým potvrzuje, že daná šarže produktu odpovídá požadavkům. Kontrola jakosti zajišťuje, že nebudou propuštěny žádné konečné produkty do té doby, než jejich kvalita nebude posouzena a shledána vyhovující. Posouzení jakosti produktu zahrnuje kontrolu výrobní dokumentace, předepsaných postupů a vyhodnocení odchylek. Pokrývá všechny složky procesu, které jednotlivě nebo společně ovlivňují kvalitu produktů. Referenční vzorky vstupních materiálů i konečných produktů jsou uchovávány, aby bylo v případě potřeby možné provést pozdější přezkoumání.

Oddělení kontroly jakosti musí být nezávislé na odděleních ostatních a musí být vedeno kvalifikovaným zkušeným pracovníkem, který má k dispozici kontrolní laboratoř a z důvodu odebrání vzorků má přístup do výrobních prostor [13], [14].

1.4.1.1 Kontrolní laboratoře

Kontrolní laboratoře a jejich prostory musí být odděleny od výrobních prostor a musí být navrženy a uspořádány podle činností, které jsou v nich prováděny. Mikrobiologické laboratoře by měly být uspořádány tak, aby riziko křížové kontaminace bylo minimalizováno.

Vybavení laboratoře by nemělo být přesouváno mezi prostory, kde hrozí vysoké riziko křížové kontaminace. V laboratořích mohou působit pouze kvalifikovaní pracovníci, kdy jejich počet by měl být přiměřený úkolům, které jsou určeny z rozsahu a povahy výrobní činnosti [13], [14].

1.4.1.2 Vzorkování

Vzorkování je prováděno podle předem určených schválených písemných postupů. Tyto dokumenty uvádí způsob vzorkování, zařízení a pomůcky používané při odběru, podmínky uchování vzorku, typ vzorkovnice, postup dělení vzorku a postup čištění vzorkovacích pomůcek a zařízení. Dále uvádí množství vzorku, které se odebírá a musí být dostatečné pro následující zkoušky. Písemné postupy dále zahrnují nutná opatření pro snížení rizika kontaminace či jiného poškození nebo znehodnocení vzorku [13], [14].

1.4.1.3 Zkoušení

Používané zkušební metody musí být validovány. Pokud je používána zkušební metoda, u které laboratoř neprováděla původní validaci, musí laboratoř ověřit, zda je tato metoda vhodná. Kvalifikovaní pracovníci všechny kontroly provádí postupy, které jsou schváleny útvarem kontroly kvality. Při zkoušení se postupuje podle písemných postupů pro zkoušení a je nutno je provést schválenými metodami. Všechny provedené zkoušky, včetně použitých postupů a výsledků, musí být zaznamenány. Výsledky zkoušek jsou porovnány s údaji uvedenými v tzv. specifikacích, dále jsou zkontrolovány, zda specifikacím odpovídají, a je hodnocen jejich trend. Záznamy o provedených zkouškách musí obsahovat základní údaje o materiálu nebo výrobku. Je nezbytné, aby zde byl uveden název a číslo materiálu nebo výrobku, číslo šarže a výrobce nebo dodavatel daného materiálu či výrobku. Dále je v záznamech uveden postup zkoušení, odkaz na příslušnou specifikaci a výsledek zkoušky, včetně výpočtů. V záznamech jsou uvedeny také použité pomůcky a přístroje, včetně data jejich kalibrace, jméno a podpis pracovníků, kteří zkoušku provedli, a také podpis vedoucího odpovědného pracovníka [13], [14].

1.4.2 Přezkoumání kvality produktu

Přezkoumání kvality výrobků je prováděno s cílem ověření účinnosti a konzistence stávajících postupů a sledování nežádoucích trendů. Je prováděno periodicky, obvykle jednou ročně, a bere v úvahu i předchozí testování výrobku. Pokud jsou při přezkoumání nalezeny významné odchylky, neshody nebo výrobek nevyhovuje stanoveným specifikacím, jsou přijata nápravná a preventivní opatření [13], [14].

1.4.3 Systém řízení kvality

Systém řízení kvality je integrovaný systém, který zahrnuje sadu postupů a principů, které pomáhají jednoduše řídit chod celé organizace. Díky systému řízení kvality jsou dodrženy nejvyšší požadavky na kvalitu, čistotu a bezpečnost ve všech stupních výrobního procesu. Zásady řízení kvality udává ISO 9001 neboli ČSN ISO 9001. Tato norma využívá procesní přístup, který v organizaci umožňuje plánovat procesy a jejich vzájemné vazby. Procesní přístup zahrnuje cyklus PDCA, v překladu „plánuj, dělej, kontroluj, jednej“, který dává možnost organizaci ujistit se, že pro její procesy jsou zajištěny a řízeny vhodné zdroje, že jsou určeny příležitosti ke zlepšování a postupuje se podle nich. Procesní přístup také zahrnuje zvažování rizik, kdy jsou v organizaci určeny faktory, které by mohly narušit procesy

nebo způsobit jejich odchýlení a způsobit odchýlení od plánovaných výsledků. Je nutné, aby organizace plánovala a realizovala opatření pro řešení rizik a aby splnila všechny požadavky dané touto normou. Tuto mezinárodní normu lze aplikovat ve všech oblastech podnikání, kdy systém řízení kvality pomáhá vymezovat všechny procesy v dané organizaci. Norma určuje požadované vstupy procesů a jejich očekávané výstupy a určuje jejich posloupnost a vazbu. Následně přiděluje pravomoci a odpovědnosti za řízení těchto procesů, vyhodnocuje je a případně v procesech zavádí změny, které jsou nutné pro dosažení zamýšlených výsledků. Přínosem certifikace ISO 9001 pro danou organizaci je zajištění, že organizace splňuje nejvyšší požadavky na kvalitu a je minimalizováno riziko výroby špatného produktu. Je tak zajištěna schopnost firmy trvale poskytovat produkty, které splňují příslušné požadavky zákonů a předpisů a požadavky zákazníka [2], [15].

1.4.4 Dokumentace

Dokumentace je nezbytnou součástí systému řízení jakosti a dodržení požadavků správné výrobní praxe. Hlavním cílem dokumentace je zaznamenávání, monitorování (sledování) a řízení všech činností, které přímo nebo nepřímo ovlivňují kvalitu konečného produktu. Všechny dokumenty musí být jasně definovány, dodržovány, kontrolovány a uchovávány. Doba uchování dokumentů závisí na typu dokumentu a na činnosti, kterou daný dokument dokládá. Dokumenty nesmí obsahovat chyby a musí být dostupné v písemné formě. Používaná dokumentace se dělí na záznamy/zprávy, instrukce (předpisy, požadavky) a specifikace [13], [14].

Záznamy obsahují informace o jednotlivých provedených činnostech a poskytují důkazy o tom, že byly provedeny v souladu s předepsanými instrukcemi. Obsahují také historii vyrobených šarží produktů, včetně jejich distribucí, a zahrnují primární data, která jsou používána k tvorbě dalších záznamů. Zprávy dokumentují historii provedení jednotlivých úkolů nebo projektů a obsahují šetření s výsledky, závěry a doporučeními. Mezi tento typ dokumentů se řadí také analytické certifikáty, které obsahují souhrn výsledků provedených zkoušek materiálů nebo produktů a hodnotí shodu výsledků se stanovenou specifikací [13], [14].

Instrukce zahrnují dokumenty pro specifikaci produktu, ve kterých jsou podrobně popsány podmínky, které musí produkty splňovat, včetně požadavků na obalové materiály. Do této skupiny se řadí také výrobní předpisy, pokyny pro výrobu, zkoušení a balení. Jsou v nich uvedeny podrobnosti o všech použitých výchozích materiálech a obsahují instrukce pro výrobu, balení výrobků, vzorkování a zkoušení [13], [14].

Další nezbytnou skupinou dokumentů jsou specifikace. Specifikace jsou vytvářeny pro výchozí látky, konečné produkty a obalové materiály. Specifikace pro obalové materiály a výchozí látky obsahují údaje, které se liší podle druhů materiálů. Dokumenty musí obsahovat popis materiálu, předepsané postupy vzorkování a také zkoušení, požadavky kvalitativní a kvantitativní, včetně limitů, a podmínky skladování, včetně nejdelší možné doby skladování. Specifikace pro konečný produkt musí zahrnovat název produktu, použité materiály nebo složení produktu, údaje o obalu, předepsaný postup vzorkování a také zkoušení, požadavky kvalitativní a kvantitativní, včetně limitů, podmínky skladování a dobu použitelnosti konečného produktu [13], [14].

Kontrolní laboratoře mají povinnost uchovávat laboratorní dokumentaci, aby byla snadno dostupná k případné kontrole. Mezi laboratorní dokumentaci se řadí specifikace, dokumenty uvádějící postupy vzorkování a zkoušení, včetně pracovních listů nebo laboratorních deníků, protokoly o provedených zkouškách, dokumenty o kalibraci a údržbě používaných přístrojů a zařízení, protokoly s údaji o environmentálním monitoringu a záznamy o validacích

používaných metod. Výsledky zkoušek a environmentálního monitoringu musí být zaznamenány tak, aby bylo možné hodnocení trendu [13], [14].

1.4.5 Pracovníci

K provedení všech úkolů, které patří k odpovědnosti výrobce, je nutné dostatek kvalifikovaných pracovníků, kteří musí postupovat podle zásad správné výrobní praxe. Pracovníci jsou pravidelně a opakovaně podrobováni školení a výcviku, který odpovídá prováděným činnostem. Školení se musí podrobit všichni pracovníci, jejichž činnost má vliv na jakost produktu, včetně personálu zajišťujících úklid, údržbu nebo technické služby. Pokud daný pracovník provádí činnosti v čistých prostorech, kde kontaminace představuje závažné ohrožení, musí absolvovat zvláštní školení. Pokud není daný pracovník dostatečně proškolen, nesmí vstupovat do prostor výroby a kontroly kvality. [13], [14].

Pro udržení jakosti produktu a zabránění kontaminace je nezbytná důkladná osobní hygiena personálu. Aby mohl pracovník nastoupit do pracovního procesu, musí se podrobit lékařské prohlídce, podle které je určeno, zda jeho zdravotní stav nemůže ovlivnit kvalitu výrobku. Před vstupem do výrobních prostor je nutné důkladné umytí a dezinfekce rukou. Ve výrobních prostorech je nutné se pohybovat v ochranném oděvu, který odpovídá povaze prováděných činností. V prostorech určených k výrobě a ke kontrole kvality je zakázáno konzumovat jakékoliv potraviny a nápoje [13], [14].

Vedoucí pracovníci odpovědní za výrobu nebo za kontrolu kvality jsou jmenováni vyšším vedením. Je nutné, aby tito pracovníci byli navzájem na sobě nezávislí. Vedoucí pracovník odpovědný za výrobu zajišťuje, aby výroba a následné skladování výrobků probíhaly podle patřičné dokumentace a bylo dosaženo požadované kvality. Dohlíží na dodržování všech instrukcí vypracovaných pro danou výrobní činnost a zajišťuje kontrolu záznamů o výrobě šarže. Musí dohlížet na výrobní prostory a zařízení a kontrolovat, zda jsou kvalifikovány, udržovány a čištěny. Zajišťuje provedení potřebných validací a vstupní a následná školení, které musí absolvovat pracovníci na daném oddělení. Vedoucí pracovníci odpovědní za kontrolu kvality schvalují nebo zamítají propouštění materiálů, meziproduktů i konečných produktů na základě zjištěného stavu. Kontrolují, zda jsou všechny potřebné zkoušky hotové a vyhodnocují záznamy o zkouškách. Mezi jejich povinnosti patří schvalování specifikací, zajištění vhodných postupů vzorkování, postupů zkoušek a všech dalších postupů, které souvisí s kontrolou kvality. Zajišťují kvalifikaci a údržbu zařízení a prostor, a také provedení příslušných validací [13], [14].

1.4.6 Výroba

Výroba se řídí jednoznačnými definovanými postupy, při kterých musí být zachovány zásady správné výrobní praxe, aby konečné produkty odpovídaly požadavkům na kvalitu. Dohled provádí kvalifikovaný pracovník. Podle písemných postupů a instrukcí se řídí veškerá činnost ve výrobě – manipulace s materiály, meziprodukty nebo konečnými produkty. Všechny vstupní a obalové materiály jsou kontrolovány, aby v případě závadného materiálu nebo obalu, který by mohl negativně ovlivnit konečný produkt, byla tato skutečnost zjištěna ještě před vstupem do výroby. Poškození nebo závada materiálu musí být prošetřena, zaznamenána a nahlášena oddělení kontroly kvality. Různé produkty by neměly být zpracovány ve stejné místnosti souběžně nebo hned po sobě, pokud není dokázáno, že takto nehrozí riziko křížové kontaminace nebo záměny materiálů. Všechny materiály, zásobníky a zařízení musí být umístěny na předepsaném místě a musí být jednoznačně čitelně označeny [13], [14].

1.4.7 Čisté prostory

Čisté prostory jsou využívány během průmyslové výroby v oblastech zdravotnictví, farmacie, potravinářského průmyslu, leteckého průmyslu a v dalších oblastech, kde jsou prováděny činnosti citlivé na kontaminaci. Pro výrobu sterilních produktů jsou rozlišeny čtyři třídy čistoty označované písmeny A, B, C a D. Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovuje, že příprava a výroba sterilních produktů musí být v čistých prostorech, které jsou navrženy dle pravidel správné výrobní praxe, kde je hlavním kritériem zabránit kontaminaci – částicové nebo mikrobiální. Maximální přípustný počet částic pro každou třídu čistoty je uveden v tabulce 1. Prostory musí být navrženy tak, aby byly dosaženy všechny požadované podmínky ve stavu **za provozu**. Proto jsou nejprve dosaženy definované úrovně čistoty ve stavu za klidu, kdy jsou nainstalována všechna provozuschopná výrobní zařízení, ale v prostoru není přítomen žádný personál. Pokud jsou výrobní zařízení v běžném provozu a v čistém prostoru je předepsaný počet pracovníků, jedná se o stav za provozu [16], [17].

Tabulka 1: Maximální přípustný počet částic na m³ [17]

Třída čistoty	Maximální přípustný počet částic na m ³			
	Za klidu		Za provozu	
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Nedefinováno	Nedefinováno

Aby byla možná výroba sterilních produktů, musí být čisté prostory udržovány podle vhodného standardu čistoty (ISO 14644, resp. ČSN EN ISO 14 644) a musí v nich být definována přísná pravidla pro hygienu personálu a sanitaci. Povrchy v těchto prostorech musí být hladké, neporézní a odolné, aby bylo usnadněno jejich čištění a dezinfekce. Musí vykazovat odolnost vůči dezinfekčním prostředkům, jakými mohou být etanol nebo ultrafialové záření. Tyto prostory jsou dostupné pouze propustmi pro personál nebo materiálovými propustmi a přiváděný vzduch musí být filtrován účinnými filtry. K odstranění částic ze vzduchu jsou nejčastěji používány vzduchové filtry přiměřené účinnosti [12].

Pro splnění všech požadavků je důležitá pravidelná kontrola. Proto se v pravidelných intervalech monitoruje počet částic, tlakové poměry mezi místnostmi, rychlost výměny vzduchu, teplota, vlhkost a mikrobiologická čistota. Kontrola čistých prostor je rozhodující pro zajištění vhodných podmínek pro výrobu a pro včasné zamezení kontaminace. Monitorování by mělo být prováděno za provozu a monitorovací místa by měla být určena na základě analýzy rizik a výsledků, které jsou získány během klasifikace čistých prostor. Klasifikace čistého prostoru je stanovena na základě činnosti, která je v daném prostředí vykonávána. Klasifikace čistých prostor je uvedena v ČSN EN ISO 14 644-1 [6], [7], [12], [16].

Mikrobiologickou kontrolu je nutné provádět v pravidelných intervalech, kdy je zjišťováno, zda nejsou překročeny předepsané průměrné počty mikroorganismů v daných třídách čistoty. Postupy vzorkování by neměly být v rozporu s příslušnými požadavky na ochranu prostor a produktů. Pro výsledky monitorování se určují varovné limity a měla by být stanovena následná nápravná opatření pro případ překročení daných limitů. Doporučené limity

pro mikrobiologickou kontaminaci čistých prostor ve stavu za provozu jsou uvedeny v tabulce 2 [7], [17].

Hodnota CFU udává počet jednotek tvořící kolonie a je používána k vyjádření počtu mikroorganismů v jednotkách CFU/m³, CFU/100 cm², CFU/g, CFU/ml a podobně.

Tabulka 2: Maximální přípustné hodnoty mikrobiologické kontaminace v čistých prostorech [17]

Třída	Limity přípustné mikrobiologické kontaminace		
	Vzorkování vzduchu CFU/m ³	Petriho miska (průměr 90 mm) CFU/4 hodiny	Kontaktní desky (průměr 55 mm) CFU/deska
A	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

1.4.7.1 Čištění čistých prostor

Čistota výrobních zařízení, nástrojů a vozíků, které jsou přesouvány do čistých prostor, je velice důležitá, protože pokud tyto předměty nejsou řádně dezinfikovány, může dojít ke snadnému transportu mikroorganismů do čistých prostor. Nečistoty, otisky prstů, ale i zbytky dezinfekčních prostředků mohou vytvářet vhodná stanoviště pro rozmnožování mikroorganismů. Čištění je prováděno za účelem snížení pravděpodobnosti mikrobiální kontaminace v čistých prostorech a snižuje riziko kontaminace výrobků během výroby. Postup čištění, dezinfekce a sanitace čistých prostor je prováděno podle písemných postupů a je kritickou součástí řízení procesu výroby především zdravotnických prostředků. Spolehlivost postupů sanitace se zjišťuje analýzou dat, která jsou získána v předem daných pravidelných intervalech během environmentálního monitoringu. Z povrchů a předmětů, které mají být dezinfikovány, musí být nejprve odstraněn jakýkoliv cizí materiál, aby dezinfekce byla účinná. Pokud není cizí materiál odstraněn, může zabránit kontaktu dezinfekce s mikroorganismy a znehodnotit tak celý proces dezinfekce. Je nezbytné, aby čištění bylo prováděno podle písemných postupů, aby se odstranily všechny zdroje nečistot. Sanitace musí být provedena za každých okolností i v případě, že nečistoty nejsou viditelné pouhým okem. Porézní a těžko dostupné povrchy jsou obtížnější na čištění a mohou tak obsahovat vyšší koncentrace mikroorganismů, proto je důležité tyto oblasti pravidelně a důkladně sledovat v rámci monitorování čistých prostor [6].

Před použitím musí být dezinfekční prostředek validován. Validace prokazuje účinnost dezinfekčních činidel a používaných postupů čištění. Pro každý dezinfekční prostředek jsou určeny následující parametry: koncentrace přípravku, která má být použita, doba kontaktu s povrchem, postup čištění daným prostředkem, toxicita přípravku a vliv organických látek na jeho účinnost. Testování se provádí na mikrobiologických kulturách a mikroorganismech, které jsou přítomny v prostředí, kde má být daný dezinfekční prostředek používán. Počet usmrcených mikroorganismů závisí na typu a koncentraci dezinfekčního prostředku, době působení, výchozím počtu neboli úrovni kontaminace, druhu mikroorganismů, ochranném vlivu prostředí a na teplotě [6].

1.4.8 Zdroje kontaminace

Zdroje kontaminace v čistém prostředí se dělí na primární a sekundární. Nejvýznamnějším primárním zdrojem kontaminace jsou zejména lidé. Tento zdroj je silně proměnlivý. Mikroorganismy se šíří vzduchem nebo přímým kontaktem, neboť se vylučují z kůže, sliznic, vlasů a očí. Pro minimalizaci rizika kontaminace člověkem je nezbytné dodržovat všechny předpisy, které zahrnují požadavky na oděv personálu a hygienu. Předpisy se liší na základě konkrétního čistého prostoru v závislosti na tom, k čemu příslušný čistý prostor slouží. Dalším primárním zdrojem kontaminace je voda, která je ideálním místem pro výskyt a množení mikroorganismů. Je proto důležité, aby byla pravidelně kontrolována. Mezi sekundární zdroje se řadí vzduch, povrchy, materiály a prostředí. Ve vzduchu se mohou mikroorganismy spojit s prachovými částicemi, v tomto případě jsou těžší a mohou se snadněji usazovat. V čistých prostorech je vzduch filtrován, aby se snížil počet mikroorganismů ve vzduchu a zamezilo se kontaminaci. Dalším významným zdrojem kontaminace jsou povrchy. Mikroorganismy se na ně přenáší z osob, které se jich dotýkají, nebo může dojít k depozici neboli usazování ze vzduchu. Pokud je povrch náročný na údržbu, nelze ho snadno dezinfikovat a čistit. Pak tento typ kontaminace představuje významné riziko [5], [6].

1.4.9 Kontrola oblastí náchylných ke kontaminaci

Primárním zdrojem kontaminace v čistých prostorech je personál, který vylučuje a šíří podstatné množství mikroorganismů, ale také neživých částic. Personál musí být řádně proškolen a musí dodržovat všechny dané požadavky určené správnou výrobní praxí.

Dodržování pokynů ohledně oblečení a hygieny personálu je pravidelně kontrolováno. V rámci mikrobiologického monitorování jsou odebrány vzorky z oděvů a otisků prstů. K odběru se používají kontaktní agarové destičky, které jsou následně kultivovány a vyhodnoceny. Cílem kontroly je vyhodnocení potenciálního rizika personálu ovlivnit kvalitu konečného produktu. Voda je dalším zdrojem mikrobiální kontaminace. Používá se k výrobním účelům, je přítomna i v systému vzduchotechniky a v některých případech se používá v procesech čištění a oplachování zařízení nebo k umývání rukou. Představuje vhodné místo pro množení mikroorganismů a riziko vzniku zdroje kontaminace. Proto je pravidelně odebírána a analyzována za účelem stanovení mikrobiologické kvality. Rozbor vody je prováděn v čistých prostorech, aby se zabránilo vzniku vnější kontaminace odebraného vzorku. Odběr vody je prováděn v pravidelných intervalech, které jsou určeny podle specifikace daného produktu. Vzduch je jedním z hlavních zdrojů sekundární mikrobiální kontaminace. Je kontrolován v rámci environmentálního monitoringu, kdy je v pravidelných intervalech sledována koncentrace živých i neživých částic ve vzduchu. Kontrola se provádí podle písemných plánů a její frekvence závisí na typu výroby, výrobních prostorech a specifikacích daného výrobku. Cílem kontroly vzduchu je minimalizovat riziko sekundární kontaminace výrobku. Další oblast náchylnou na kontaminaci představují povrchy, na kterých se lehce mohou usazovat mikroorganismy, ale také neživé částice. Jsou kontrolovány zejména ty povrchy, které přicházejí do styku s materiálem nebo produktem a mohly by v případě výskytu nežádoucích mikroorganismů negativně ovlivnit kvalitu hotových produktů [5], [6], [7].

1.4.10 Vnitřní inspekce

Vnitřní inspekce jsou pravidelně prováděny za účelem stálé kontroly dodržování a plnění zásad správné výrobní praxe. Slouží také k navržení potřebných nápravných opatření. Vnitřní inspekce posuzuje, jestli všechny oblasti splňují zásady správné výrobní praxe a jsou v souladu se zásadami zajištění kvality. Inspekce se řídí podle předem stanoveného plánu

a v pravidelných časových intervalech prověřuje pracovníky, dokumentaci, kontrolu zajištění kvality, všechny výrobní postupy, distribuci nebo případné stahování výrobků z trhu a vyřizování reklamací. Vnitřní inspekce musí být provedena nezávisle určenými pracovníky závodu nebo externími odborníky. V případě, že je inspekce provedena externími odborníky, jedná se o audit. O vnitřní inspekci musí být pořízeny záznamy, které obsahují všechna zjištění provedená během inspekce a návrhy nápravných opatření. Všechna uskutečněná opatření na základě inspekce musí být vedena ve formě písemných zpráv [13], [14].

1.5 Plán monitoringu

Plány monitoringu jsou nezbytné pro správné provedení environmentálního monitoringu a jsou sestaveny tak, aby bylo shromážděno dostatek informací pro zhodnocení počtu mikroorganismů ve vzduchu a na povrchu a pro hodnocení rizika kontaminace. V plánu jsou uvedeny následující parametry: bezpečnostní opatření a pokyny pro personál, vhodný typ monitorovací metody pro daný prostor, četnost monitorování (například jednou za měsíc, jednou za rok), výběr monitorovaných míst, mapa ukazující místa odběrů vzorků, materiály a pomůcky potřebné při monitoringu, podmínky při odběru a postup odběru vzorku a manipulace se vzorkem, podmínky laboratorního prostředí, vhodná kultivační média, inkubační podmínky a doba inkubace. V rámci plánu jsou uvedeny také limity, postup hodnocení získaných dat, dokumentace a vhodná nápravná opatření při překročení daných limitů [5], [12].

1.5.1 Výběr odběrových míst

Výběr míst, kde bude vzorek odebírán, je stěžejní pro minimalizaci rizika mikrobiální kontaminace a pro zajištění kvality konečného produktu. Místa jsou vybrána na základě hodnocení všech procesů a činností, které v daném výrobním prostoru probíhají. Je třeba určit, která místa mohou přispět k potenciální mikrobiální kontaminaci produktu, a také místa, která jsou v přímém kontaktu s materiálem nebo konečným produktem. Sledují se místa, která vykazují trvale vyšší výskyt mikroorganismů. Aby je bylo možné identifikovat, je potřeba zpočátku provést odběr dostatečného množství vzorků a hodnocení časově náročnou kvalifikační studií. Délka studie je určena potřebou získání dostatečných údajů o místech a četnosti odběru vzorků. Určené povrchy s vyšším výskytem mikroorganismů je třeba zahrnout do plánu monitoringu a pravidelně je kontrolovat. Vybraná odběrová místa jsou zapsaná do plánu se specifickým označením a musí být podrobně popsána a zdůvodněna, aby bylo umožněno opakované vzorkování daného místa. Místa jsou také zakreslena do mapy výrobního prostoru, která je nezbytnou součástí plánu monitoringu [6], [8].

1.5.2 Frekvence odběrů

Frekvence odběru vzorků v rámci environmentálního monitoringu je založena na klasifikaci prostoru a aktivitě, která v daném prostoru probíhá, a měla by odpovídat regulačním doporučením pro danou úroveň kontrolovaného prostředí. Četnost odběrů je určena na základě kvalifikační studie, kdy jsou sledována místa s trvale vyšším výskytem mikroorganismů. Frekvence se pohybuje od denních odběrů až po odběry, které jsou prováděny jednou za tři měsíce. Četnost odběrů závisí na výrobním procesu, specifikaci vyráběného produktu, konstrukci kontrolovaného prostoru, používaných zařízeních, přítomnosti lidského faktoru a historii monitorování. Po vyhodnocení všech faktorů je frekvence monitorování zaznamenána do plánů, kde musí být podrobně popsána a zdůvodněna. Denní kontroly jsou prováděny u produktů, které jsou náchylné k mikrobiální kontaminaci a je zapotřebí kontrolovat každou

šarži daného produktu. Monitorování sleduje vývoj mikrobiální kontaminace, snaží se identifikovat nepříznivé trendy a optimalizovat celé řízení procesu. Je sledováno, zda se počty mikroorganismů v průběhu času snižují nebo zvyšují, což může znamenat selhání procesů, a je třeba identifikovat, proč došlo ke vzniku těchto nepříznivých změn. Musí být vyhodnoceno, zda dané změny mají významný dopad na kvalitu produktu a zda nenarušují řízené procesy [6], [8].

1.5.3 Stanovení varovných a limitních hodnot

Varovné a limitní hodnoty jsou stanoveny po odběru vzorků, jejich analýze a sledování trendu hodnot získaných během kvalifikační studie. Údaje získané při studii jsou použity k určení trendu a následně jsou stanoveny limity pro environmentální monitoring na základě specifikací a regulací. Pokud je během environmentálního monitorování zjištěno, že jsou varovné nebo limitní hodnoty překročeny, indikuje to nesoulad systému a prováděných procesů a je třeba použít odpovídající nápravná opatření [6], [8].

1.5.4 Nápravná opatření

Při překročení varovných nebo limitních hodnot je třeba postupovat podle nápravných opatření. Tato opatření nejčastěji zahrnují dodatečné čištění a dezinfekci, přezkoumání čisticích postupů a jejich provedení v souladu s písemnými postupy, srovnání historických dat a dodatečné testování produktů. Dále jsou přezkoumány a opakovány sanitační postupy a v případě selhání pracovníků je provedeno odpovídající školení. Pokud nastane podezření, že byla ohrožena kvalita produktu, je třeba odebrat jeho vzorek a otestovat, zda došlo k jeho poškození nebo kontaminaci. V tomto případě jsou podezřelé šarže výrobku pozastaveny a dokud není dokončeno testování, nemůže být výrobek dále propuštěn [6], [8].

1.6 Monitorovací metody

Cílem monitorování čistých prostor je určit počet mikroorganismů nebo jiných neživých částic, které jsou zde přítomné. Monitorování je prováděno podle konkrétního plánu, který odpovídá daným prostorům, a vzorky jsou odebírány na místech určených v plánu monitoringu. Výběr metody a četnost monitorování závisí na typu provozu, který je kontrolován, a na množství potřebných dat ke kontrole. Vzorky jsou odebírány proškoleným personálem, aby bylo sníženo riziko falešně pozitivních výsledků a riziko kontaminace produktu [5], [6], [18].

1.6.1 Počet mikroorganismů ve vzduchu

Monitorování mikroorganismů přítomných ve vzduchu dokumentuje změny kvality ovzduší a případnou kontaminaci v průběhu času. Částice ze vzduchu jsou odebírány aktivním nebo pasivním vzorkováním, kdy výběr metody závisí na požadavcích a cílech monitoringu.

Při **aktivním vzorkování** je používáno několik typů vzorkovačů. Nejčastěji je používán vzorkovač, který pomocí čerpadla shromažďuje mikroorganismy přítomné v daném objemu vzduchu. Odebraný objem vzduchu obvykle odpovídá jednomu metru krychlovému a výsledky jsou vyjádřeny jako počet jednotek tvořících kolonie na jeden metr krychlový neboli CFU/m³. Mikroorganismy jsou na základě použitého vzorkovače zachytávány na sběrné médium, přesněji agarové proužky, nebo Petriho misky s kultivačním médiem. Po odebrání vzorku je sběrné médium inkubováno a jsou pozorovány vzniklé kolonie. K odběru vzduchu je

používán například aktivní vzorkovač Air Sampler od značky Millipore, viz obr. 2, který využívá odstředivou sílu. Vzduch je nasáván do rotační hlavice a je urychlován. Mikroorganismy, které se nachází v proudu vzduchu jsou zachyceny na agarové proužky neboli stripy, viz obr. 3, které jsou inkubovány, a po inkubační době jsou odečteny narostlé kolonie. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách CFU/m³ [5], [6], [7].



Obrázek 2: Millipore RCS High Flow Touch – přístroj používaný pro aktivní vzorkování [19]



Obrázek 3: Agarový strip pro stanovení počtu bakterií ve vzduchu [20]

Dalším typem vzorkovače, který je v čistých prostorech používán, je impaktní vzorkovač vzduchu, který je založený na principu vzorkování vzduchu štěrbinou. Tento typ vzorkovačů je obvykle používán pro nepřetržité vzorkování v čistých prostorech vysoké třídy čistoty. Vzorkovač vysokou rychlostí nasává vzduch velmi úzkou vstupní štěrbinou. Mikroorganismy a částice přítomné ve vzduchu poté dopadají na povrch Petriho misky, která je umístěna uvnitř vzorkovače. V některých případech se Petriho miska ve vzorkovači otáčí a zajišťuje se tak dopad vzduchu vždy na čistý povrch agarů. Tato technologie výrazně snižuje pravděpodobnost zdvojeného dopadu mikroorganismů. Jedná se o jev, kdy dva mikroby na plochu agarů v Petriho misce přistanou zároveň na stejné místo a poté se jeví jako jedna kolonie [6], [21].

K aktivnímu odběru vzorků v čistých prostorech může být použit také vzorkovač s želatinovým filtrem. Želatinové filtry jsou určeny výhradně k detekci a analýze mikroorganismů ze vzduchu. Tyto filtry zadržují bakterie a plísňe ze vzduchu a jsou účinné také pro sběr a detekci virů. Vzorkovač s želatinovým filtrem využívá vývěvu, která je napojena na prodlužovací hadici, na jejímž konci je umístěn adaptér s želatinovým filtrem. První možností je po odběru vzorků želatinový filtr umístit přímo na agarovou živnou plochu do Petriho misky, kdy se želatina na vlhkém povrchu agaru rozpustí, takže jsou mikroorganismy v přímém kontaktu s živinami. Následně se Petriho misky inkubují a po určené době se spočítají kolonie. Jedná se o přímou metodu. Druhou používanou metodou, nazývanou nepřímá metoda, je rozpuštění želatinového filtru ve sterilním roztoku (používán je například fyziologický roztok) a následné nanesení na agarové médium [6], [22].

Při **pasivním odběru vzorků** ze vzduchu jsou používány usazovací misky s agarem, které detekují mikrobiální kontaminaci přenášenou proudem vzduchu. Jedná se o pasivní metodu vzorkování, kdy jejím principem je sedimentace mikroorganismů ze vzduchu na otevřenou Petriho misku, která obsahuje živné médium. Otevřené usazovací misky jsou umístěny na určené místo podle plánu monitoringu. Během odběru je nezbytné chránit Petriho misku před náhodnou kontaminací, proto bývá umístěna na dno plastové roury s výškou minimálně 40 cm. Po skončení expozice je Petriho miska zakryta víčkem. Následně jsou usazovací misky inkubovány a je sledován růst a počet kolonií. Výsledek je uveden jako počet mikroorganismů usazených za jednotku času nebo počet mikroorganismů v dané usazovací misku [5], [7].

1.6.2 Počet mikroorganismů na povrchu

Monitorování mikroorganismů v čistých prostorech na povrchu, který je ve styku s materiály nebo přímo výrobky, je stěžejní pro zabránění kontaminace výrobků, snížení rizika kontaminace a zajištění kvality a bezpečnosti výrobků. V čistých prostorech jsou vzorky z povrchů odebírány různými metodami. Odběr vzorku je podle potřeby proveden buď za provozu, nebo po dokončení výroby, aby se minimalizovalo riziko kontaminace výrobků a materiálů při odběru. Vzorky z povrchů jsou odebírány otiskem nebo stěrem.

K odběru vzorků otiskem z povrchů se používají otiskové neboli kontaktní destičky, viz obr. 4, které obsahují sterilní kultivační médium. Stanovení počtu mikroorganismů funguje na principu otisku testované plochy na agarovou destičku. Destička je inkubována a po předepsané inkubační době jsou odečteny narostlé kolonie. Zjištěný počet kolonií je přepočítán podle plochy použité kontaktní destičky, kdy klasická kontaktní destička má povrchovou plochu 25 cm², a výsledek je vyjádřen jako počet kolonií na 100 cm². [5], [7], [8], [18].



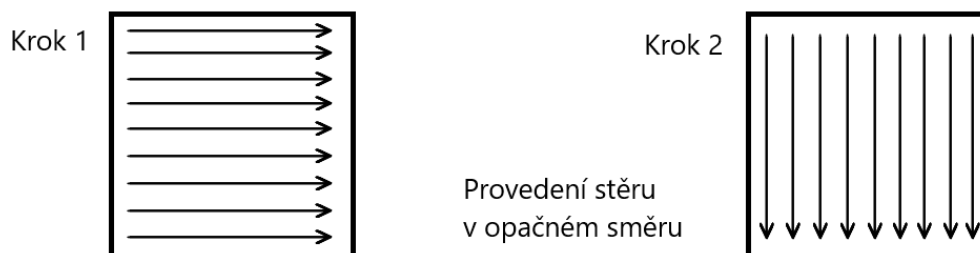
Obrázek 4: Kontaktní destička [23]

V případě odběru vzorků z nerovných a zakřivených povrchů nebo míst s malou povrchovou plochou jsou vzorky odebrány metodou stěru. Při této metodě jsou používány sterilní tampony z různých materiálů jako je bavlna, polyester, umělé hedvábí a dalších materiálů. Výběr vhodného tamponu závisí na vlastnostech povrchu, z kterého bude vzorek odebrán. Nejčastěji je používán tampon s hlavou vyrobenou z polyesteru, jelikož poskytuje nejnižší úroveň částic, které by se mohly při odběru uvolnit. Tampon je zobrazen na obrázku 5. Tampon je před odběrem navlhčen vhodným médiem, například fyziologickým roztokem, ale nesmí být nasycený, aby nedošlo k roznesení roztoku po povrchu, ze kterého je vzorek odebírán. Po navlhčení je proveden stěr z určené oblasti, obvykle oblasti o povrchové ploše 25 cm², lineárními překrývajícími se tahy podle plánu vzorkování, viz obr. 6. Následně je tampon extrahován pro další analýzu nebo je proveden roztěr na agar v Petriho misce [5], [7], [18], [25].

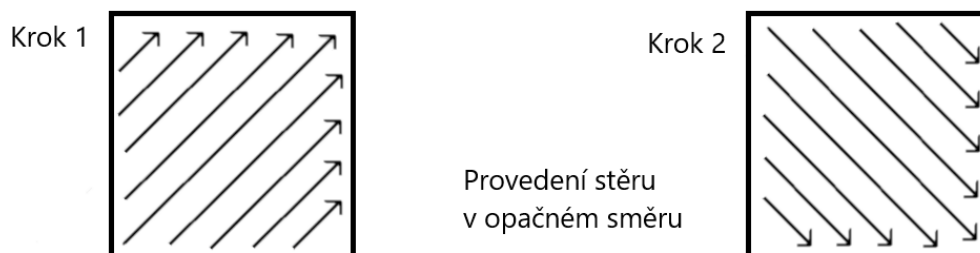


Obrázek 5: Tampon používaný při vzorkování povrchů stěrem [24]

Stěr 1



Stěr 2



Obrázek 6: Plán odebrání vzorků metodou stěru [25]

1.7 Testování biozátěže výrobku

Pojem biozátěž neboli bioburden vyjadřuje koncentraci nebo množství životaschopných mikroorganismů, které se vyskytují na výrobku nebo v něm, a používá se k popisu mikrobiální kontaminace produktů. Testování biologické zátěže je využíváno při průběžném monitorování, při kontrole výrobních procesů, při hodnocení účinnosti čisticích procesů, hraje důležitou roli při validaci sterilizačních procesů a je součástí programu monitorování prostředí. Pokud dojde k překročení limitních hodnot při environmentálním monitoringu je testování používáno k ověření, zda nedošlo také ke kontaminaci daného výrobku. Pojem biozátěž je nejčastěji spojován s testováním farmaceutických produktů za účelem kontroly kvality a ověření, zda produkty splňují všechny požadavky. Mikrobiální znečištění na výrobku může pocházet z více zdrojů, proto je kontrola mikroorganismů prováděna během výroby, zpracování a kontrolován je také hotový výrobek. K určení mikrobiálního znečištění nelze použít jednu univerzální metodu vzhledem k velkému množství a rozmanitosti materiálů a výrobků. Proto je vhodná metoda pro určení počtu mikroorganismů stanovena podle typu výrobku nebo materiálu a podle typu určovaných mikroorganismů. Cílem měření biologické zátěže je určení celkového počtu přirozeně se vyskytujících mikroorganismů na výrobcích před jejich konečnou sterilizací nebo použitím. Testování biologické zátěže zdravotnických výrobků se řídí podle normy ISO 11737, resp. ČSN EN ISO 11737-1:2018. Norma specifikuje požadavky, které je potřeba splnit pro stanovení biologické zátěže, a popisuje metody, které jsou vhodné pro splnění všech požadavků [11], [26], [27].

1.7.1 Metody testování biologické zátěže výrobků

K určení biologické zátěže je použit celý výrobek nebo jeho vzorová část označovaná v angličtině zkratkou SIP, tj. podíl vzorku. Tato část vzorku musí být reprezentativní. Odběr směšného vzorku musí být proveden z různých částí výrobku a z několika stejných výrobků. První používanou metodou je metoda otisku na tuhé kultivační médium, kdy je

agarová destička přitisknuta na povrch vzorku tak, aby kultivační médium zachytilo životaschopné mikroorganismy přítomné na výrobku. Otisková neboli kontaktní destička je dále inkubována a po dané době je spočítán počet narostlých kolonií. Zjištěný počet kolonií je pře počítán podle plochy použité kontaktní destičky, kdy klasická kontaktní destička má povrchovou plochu 25 cm², a výsledek je vyjádřen jako počet kolonií na 100 cm². Další používanou metodou je zalévání kultivačním médiem. Prvním krokem je navážení určeného množství výrobku, kdy vzorky z výrobku jsou odebrány náhodně. Po vložení do sterilního sáčku je odebraný vzorek smíchán se suspenzí kapaliny (například fyziologický roztok) a je protřepán po dobu 180 sekund. Daný objem suspenze je pipetován na Petriho misku a je zalit rozehřátou agarovou půdou (45 °C). Používán je nejčastěji Sabouradův agar pro kvasinky a plísně, viz obr. 7, a CASO (Tryptic soy agar) agar pro bakterie. Po promíchání a zatuhnutí směsi jsou Petriho misky vloženy do inkubátoru a po dané době jsou spočítány vzniklé kolonie [26], [27].

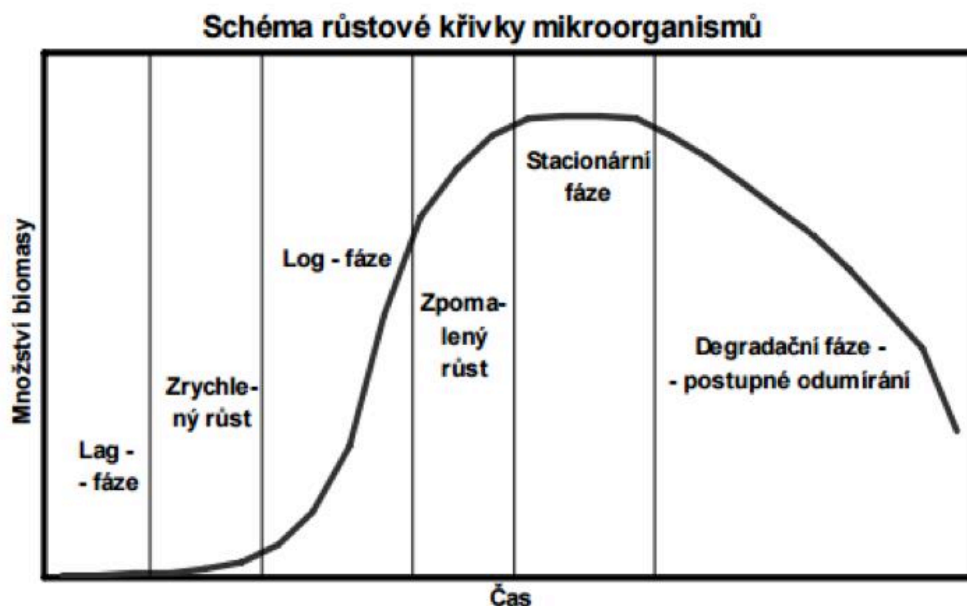


Obrázek 7: Zalévání vzorku agarem (Sabouradův agar)

1.8 Základní pojmy pro mikrobiologické testy

1.8.1 Kultivace mikroorganismů

Pojem kultivace je v mikrobiologii definován jako cílené rozmnožování, pěstování a udržování mikroorganismů na živných půdách za laboratorních podmínek. Kultivace patří mezi nejrozšířenější diagnostické metody přímého určení bakterií, kvasinek a plísni. Bakterie se v rámci kultivace nacházejí v uměle vytvořeném prostředí, ve kterém jsou totožné podmínky jako v jejich přirozeném prostředí, proto mají ideální podmínky k rozmnožování a růstu. Růst bakterií lze popsat tzv. růstovou křivkou, viz obr. 8. Růstová křivka je definována jako vztah různých stádií růstu bakterií v průběhu času a skládá se ze čtyř fází – klidová fáze, log fáze neboli fáze exponenciální, stacionární fáze a fáze odumírání [28], [29].



Obrázek 8: Růstová křivka [30]

K optimálnímu růstu a množení bakterií musí být splněny základní podmínky, mezi které patří dostatečný zdroj živin a látek potřebných k růstu buňky, dostatečná vlhkost půdy, vyhovující pH (většina bakterií potřebuje k růstu neutrální pH) a vhodná atmosféra pro příslušný typ bakterií - aerobní a fakultativně anaerobní, anaerobní, mikroaerobní. Použité živné půdy musí obsahovat využitelné zdroje energie a výživy a musí splňovat nároky daného mikroorganismu na výživu. Mezi další důležitá kritéria pro růst patří kultivační teplota a délka kultivace [28], [29], [31].

1.8.2 Optimální kultivační doba a teploty kultivace

Každý mikroorganismus má jiné požadavky na teplotu prostředí, při které roste. Při minimální růstové teplotě se mikroorganismus začíná rozmnožovat, k nejrychlejšímu množení a růstu dochází při optimální růstové teplotě a k zastavení růstu a dělení dochází při dosažení maximální růstové teploty. Optimální teplota kultivace bakterií je 33 - 38 °C a teplota pro kultivaci plísní odpovídá 22 - 28 °C. Některé bakterie rostou i při nižších teplotách, příkladem těchto bakterií jsou *Listerie* nebo *Pseudomonády*. Délka kultivace se liší podle daného mikroorganismu nebo skupiny mikroorganismů. Většina aerobních a fakultativně aerobních bakterií je kultivována po dobu 16 - 48 hodin. Plísně, kvasinky a anaerobní bakterie se kultivují po dobu 2 - 5 dnů. V závislosti na příslušném organismu, použité živné půdě a použité očkovací metodě jsou zvoleny podmínky kultivace (teplota, délka kultivace) a živná půda je inkubována v termostatu za optimální teploty růstu příslušného mikroorganismu. Při kultivaci je důležité, aby během očkování mikroorganismů do živné sterilní půdy práce v laboratoři probíhala za aseptických podmínek a předešlo se kontaminaci cizími mikroorganismy z okolního prostředí. Vniknutím nežádoucích mikroorganismů by došlo ke znehodnocení a zkreslení výsledků kultivace [28], [31], [32].

1.8.3 Kultivační půdy

Kultivační půdy jsou v mikrobiologických laboratořích používány ke kultivaci, při diagnostických metodách, k identifikaci mikroorganismů a určení jejich vlastností. Poskytují mikroorganismům vhodné podmínky a dostatek živin pro jejich růst a dělení. Vlastnosti kultivační půdy by se měly co nejvíce blížit k vlastnostem přirozeného prostředí, kde se mikroorganismus běžně vyskytuje, a poskytnout tak optimální podmínky pro jeho růst a dělení. Kultivační půdy lze rozdělit podle několika kritérií [32], [33].

Dělení podle původu

Podle původu se kultivační půdy dělí na přirozené a syntetické. Půdy přirozené byly ke kultivaci používány před mnoha lety, dnes je nahradily půdy syntetické neboli umělé [33].

Dělení podle konzistence

Tekuté – slouží k pomnožení bakterií, které mají kvůli konzistenci lepší přístup k živinám a vodě. Jejich přítomnost se projevuje základem půdy nebo sedimentem. Tento typ půd nelze využít k přímé identifikaci bakterií, jelikož nelze rozeznat, zda se jedná o směs nebo čistou kulturu. Do tekutých půd se řadí například bujon.

Pevné – tento typ půd je v mikrobiologických laboratořích využíván nejčastěji. Růst mikroorganismů se projevuje tvorbou kolonií, které lze dále identifikovat a pozorovat na nich jejich typické vlastnosti. Pevné půdy se využívají při diagnostice, identifikaci bakterií a určení morfologie bakterií. Jsou připravovány z půd tekutých přidáním 1 - 2 % agaru, který při teplotě kolem 40 °C tuhne.

Polotekuté – jedná se o půdy tekuté s malým podílem agaru. Využívají se k pomnožení bakterií, které jsou náročné na podmínky [29], [31], [33].

Dělení podle funkce

Základní – za základní půdu je považován masopeptonový bujon, ze kterého se připravují jiné typy půd. Bujon obsahuje masový extrakt, pepton (polypeptid) a NaCl. Základní půdy jsou využívány k pomnožování a růstu mikroorganismů.

Diagnostické – slouží k odlišení a identifikaci jednotlivých druhů nebo rodů bakterií a k určení jejich významných vlastností. Jsou vytvořeny ze základní půdy a ze složek, které podléhají přeměně vlivem metabolismu bakterií. Mezi půdy diagnostické patří například krevní agar.

Selektivní – v jejich složení jsou přítomny látky, které potlačují neboli inhibují růst určitých skupin bakterií, a naopak podporují růst vybraných bakterií.

Selektivně diagnostické – fungují na principu selektivních a diagnostických půd, jsou jejich kombinací. Obsahují selektivní složku, inhibitor, který brání růstu nežádoucích mikroorganismů, a složku diagnostickou, která slouží k identifikaci jednotlivých druhů nebo rodů bakterií. Selektivně diagnostické půdy podporují růst určených mikroorganismů a inhibují růst mikroorganismů nežádoucích.

Pomnožovací – tento typ půd slouží k pomnožení bakterií náročnějších na růst nebo k pomnožení bakterií, které jsou ve vzorku obsaženy v malém množství.

Transportní – slouží pro přepravu vzorků do laboratoře. Obsahují minimální množství živin potřebných pro přežití bakterií při přesunu do laboratoře [31], [32], [33].

Příklady používaných půd

Masopeptonový bujon tvoří základ většiny dalších půd a je používán k pomnožování a růstu mikroorganismů. Obsahuje masový extrakt, pepton a 0,5 % NaCl. Rozmezí pH masopeptonového bujonu se pohybuje mezi 7,2 - 7,4. Bujon má žlutohnědou barvu a je čirý. Růst mikroorganismů se v bujonu projevuje zakalením, sedimentem nebo blankou na povrchu [32], [33].

Caso agar je používán ke kultivaci středně náročných a nenáročných mikroorganismů. Obsahuje kaseinový a sojový pepton a má celou řadu využití, jelikož obsahuje dostatek živin pro růst široké škály mikroorganismů. Je používán například pro skladování kultur, určení počtu mikroorganismů nebo pomnožení mikroorganismů [34].

Sabouradova půda je agar světle žlutého zbarvení. Je určen pro kultivaci plísní a kvasinek, jelikož pro bakterie je příliš chudý na živiny. Obsahuje cukry, které jsou potřebným zdrojem energie pro růst mikroorganismů, a také antibiotika – chloramfenikol, který zabraňuje přerůstání bakterií [33].

Krevní agar je v mikrobiologických laboratořích nejužívanější půda při diagnostice. Krevní agar je vhodný pro kultivaci většiny bakterií a lze na něm rozlišit různé typy hemolýzy (rozpad červených krvinek, při kterém se uvolňuje krevní barvivo hemoglobin). Je složen z živné půdy, sterilní, 5 - 10 % defibrinované krve (ovčí, koňské, beraní) a agaru. Krevní agar je připravován z agarového základu, který se rozvaří a je sterilizován v autoklávu. Po sterilizaci a ochlazení na 45 - 55 °C je k agaru přidáno 5 – 10 % sterilní defibrinované krve a po homogenizaci je půda rozlita na Petriho misky, kde se nechá zatuhnout [32], [33].

Mosselova obohacená půda je selektivní médium používané pro detekci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, do které se zařazuje například *Escherichia coli*. Peptický rozklad živočišné tkáně a dextróza poskytují živiny pro růst těchto bakterií. Brilantová zeleň a hovězí žluč zabraňuje růstu jiných bakterií, proto se tato půda řadí mezi selektivní. Je používána při kontrolách zdravotnických výrobků, potravin, ale také krmiv pro zvířata [35].

Endova půda se řadí mezi selektivně diagnostické půdy. Obsahuje laktózu a barvivo fuschin, který slouží jako inhibitor grampozitivních bakterií. Tyto bakterie laktózu metabolizují a vytváří se aldehydy, které následně reagují s fuschinem a dochází k tmavorůžovému zbarvení kolonií. Pokud přítomné bakterie laktózu neštěpí kolonie zůstávají světlé [32], [33].

MacConkeyova půda funguje na podobném principu jako Endova půda a také patří mezi selektivně diagnostické půdy. Půda inhibuje růst grampozitivních bakterií pomocí krystalové violeti a žlučové soli. Jako indikátor slouží neutrální červeně, pomocí které je detekována přítomnost bakterií, které fermentují laktózu. Tyto bakterie vytváří kolonie tmavě růžové až červené barvy [32], [33].

Chromogenní agar slouží pro rychlou detekci a identifikaci mikroorganismů. Mikroorganismy se na nich typicky zabarvují a lze je tak jednoduše rozpoznat. Chromogenní půdy mají ve složení barevný substrát, který příslušný mikroorganismus umí metabolizovat, a dochází ke typickému zbarvení kolonií. Využívá se ke kultivaci a identifikaci *E. coli*, druhů rodu *Candida*, viz obr. 9, nebo zlatého stafylokoka (*Staphylococcus aureus*) [32], [33].



Obrázek 9: *Candida albicans* na chromogenním agaru

1.8.4 Očkování mikroorganismů

Očkování neboli inokulace znamená přenesení mikroorganismů z odebraného vzorku nebo dříve založené mikrobiální kultury do nového živného prostředí. Buňky, které jsou přenášeny, se nazývají inokulum. Během přenosu mikroorganismů nesmí dojít ke kontaminaci cizími mikroorganismy ze vzduchu, pracovních pomůcek, pracovní plochy, rukou nebo dýchacích cest. Proto se při očkování využívá aseptická metoda, při které se pracuje za sterilních podmínek. Tato aseptická metoda zahrnuje postupy, které jsou využívány k zamezení kontaminace sterilních předmětů, prostředí nebo omezení možnosti kontaminace kultury mikroorganismů a jejím cílem je zabránit jakékoliv kontaminaci. Očkování je prováděno v čistém prostředí a pracovní povrch je před prací důkladně dezinfikován. Během očkování je nutné práci provádět opatrně, rychle a v blízkosti plamene, očkovací pomůcky před i po nanesení buněk mikroorganismů ožehávat, Petriho misky a další pomůcky neodkládat na stůl a nádoby a misky nechávat otevřené jen na nezbytně dlouhou dobu. Pokud dojde ke kontaminaci pracovní plochy inokulem nebo živnou půdou, je nezbytné povrch vydezinfikovat vhodnou dezinfekcí nebo 70% ethanolem [33], [36]

1.8.5 Metody očkování mikroorganismů

1.8.5.1 Očkování na pevné půdy

Pevné půdy jsou při očkování mikroorganismů a jejich kultivaci využívány zejména k zakládání kultur nebo získání charakteristických kolonií, které následně slouží identifikaci, diagnostice, rozlišení, hodnocení kolonií nebo určení počtu jednotlivých druhů mikroorganismů. Teplota rozehřáté agarové půdy neovlivňuje inokula, takže se mohou vyskytovat ve vyšších počtech. V průběhu očkování na pevné půdy se nejčastěji používá kovová bakteriologická klička, kterou je nutné mezi jednotlivými kroky sterilizovat rozpálením v plameni a následně ji ponechat vychladnout ve stojanu umístěného v blízkosti plamene. Při nabírání inokula na kličku je zkumavku s příslušným inokulem otevírána jen na nezbytně dlouhou dobu [33], [36], [37], [38].

1.8.5.2 Očkování do tekutých půd

Tekuté půdy se používají zejména k pomnožení bakterií a pro následnou diagnostiku. Složení těchto půd podporuje růst daného mikroorganismu a zamezuje růstu jiných nežádoucích mikroorganismů. V tekutých půdách mají mikroorganismy snadný přístup vody a živin. Z tohoto důvodu snadněji rostou a jejich růst se projevuje zakalením tekutého média, přítomností sedimentu nebo povlaku na povrchu. Při očkování do tekutých půd je obvykle pipetován stanovený objem homogenizovaného vzorku do přesně určeného objemu tekuté půdy. Následně je vzorek protřepán pomocí laboratorní třepačky a inkubován [33].

1.8.5.3 Očkování přelivem

Na sterilní Petriho misku se napipetuje sterilní pipetou stanovený objem homogenizovaného vzorku. Obvykle je pipetován 1 ml suspenze. Při pipetování se víčko Petriho misky nadzvedne pouze na nezbytně dlouhou dobu potřebnou k převedení obsahu pipety do Petriho misky. Inokulum je přelito rozpuštěným agarovým médiem (15 - 20 ml) vytemperovaným na 45 °C. Médium je do částečně otevřené Petriho misky převedeno co nejrychleji, aby se zamezilo kontaminaci z okolního prostředí [37], [38].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Podklady k vypracování této bakalářské práce byly získány ve firmě HARTMANN – RICO a.s., kde mi bylo umožněno absolvovat svou odbornou praxi. V rámci praxe jsem se zabývala environmentálním monitoringem, konkrétně se jednalo o stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu a stanovení počtu mikroorganismů na povrchu ve výrobních prostorech s odpovídající třídou čistoty. Účastnila jsem se odběru vzorků podle plánu monitoringu, následného vyhodnocení, psaní protokolů a zaznamenávání získaných dat do statistických souborů.

2.1 Stanovení počtu mikroorganismů ve vzduchu

Metoda stanovení počtu mikroorganismů ve vzduchu slouží ke sledování biozátěže vzduchu ve výrobních prostorech s odpovídající třídou čistoty a provádí se podle přesně definovaných měřicích postupů pomocí přístroje RCS Air sampler (Obr. 2). Živé částice vyskytující se ve vzduchu, tzv. bioaerosoly, jsou nasávány z okolního vzduchu, zrychleny odstředivou silou a přichyceny na agarové stripy. Počet mikroorganismů je sledován v pravidelných intervalech každý měsíc a pro odběr vzorků vzduchu platí společná vnitřní metodika. Mikrobiologická metoda je prováděna za stanovených podmínek v kontrolovaném prostředí (třídy čistoty D), aby bylo zabráněno sekundární kontaminaci, a mohou ji provádět pouze proškolené osoby. Tato metoda splňuje požadavky pro GMP monitoring.

2.1.1 Vybavení, materiály a kultivační média

Při stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu byl použit RCS Air Sampler (Merck, Německo), inkubátor (Heraeus B) s nastavenou teplotou $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$, inkubátor (Friocell 222) s nastavenou teplotou $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$, chladnička Liebherr: $6,0\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$, laminární box a autokláv značky Stomacher. Jako pomocné materiály a předměty byly použity sterilní rukavice, vozíček, lihový fix na označení vzorků, ruční počítačka kolonií a košík na přenos materiálů do provozu. Jako kultivační média byly použity agarové stripy – YM pro stanovení plísní a kvasinek a TC pro stanovení celkového počtu mikroorganismů.

2.1.2 Postup stanovení

Počet mikroorganismů ve vzduchu je sledován ve výrobních prostorech o definované třídě čistoty dle konkrétního plánu zkoušek, kde jsou definována také odběrová místa a jejich umístění. Místa a četnost měření jsou založena na předem provedeném vyhodnocení rizik. Na každém určeném místě jsou odebrány dva vzorky. Jeden se stripem TC, který je používán ke stanovení celkového počtu mikroorganismů, viz obr. 10, a druhý se stripem YM, který slouží ke stanovení plísní a kvasinek, viz obr. 11.



Obrázek 10: Strip TC pro stanovení celkového množství mikroorganismů ze vzduchu



Obrázek 11: Strip YM pro stanovení plísní a kvasinek ze vzduchu

K odběru vzorků se používá přístroj RCS Air sampler, který musí být před začátkem měření dezinfikován a zkontrolován, jestli je dostatečně nabitý. Před začátkem měření je na přístroji nastaven sběrný objem vzduchu na 100 l. Agarový strip je vložen do rotační hlavice neboli rotoru, který je následně umístěn do přístroje a přikryt ochranným krytem rotoru přístroje. Přístroj je postaven na rovný povrch nebo je držen v ruce tak, aby horní část přístroje, kde je umístěna rotační hlavice, byla ve výšce 140 cm až 150 cm. Je spuštěno měření a po dokončení tohoto procesu je agarový strip vložen zpět do sterilního obalu, který je důkladně uzavřen a následně přemístěn do laboratoře. Po dokončení měření je nutné přístroj vyčistit a vydezinfikovat a rotor a jeho ochranný kryt také sterilizovat. Stripy TC jsou inkubovány při teplotě $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 2 až 3 dnů, stripy YM při teplotě $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 5 až 7 dnů. Po dostatečně dlouhé době inkubace jsou spočítány narostlé kolonie a jsou přepočítány na množství CFU v 1 m^3 .

Výsledek je uveden v CFU/m^3 , kdy faktor závisí na sběrném objemu.

$$\text{CFU}/\text{m}^3 = \text{počet narostlých kolonií na stripu} \times \text{faktor}$$

Pokud je při měření nastaven standardní objem 100 l je faktor 10. Odvození hodnoty faktoru vychází z následujících přepočtů:

$$1\text{ m}^3 = 1000\text{ dm}^3$$

$$1\text{ m}^3 = 100 \times F\text{ dm}^3$$

$$F = 10$$

Pokud je nastaven jiný sběrný objem, musí být faktor přepočítán. Příklad výpočtu pro stanovení počtu organismů ve vzduchu je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Přepoččet celkového počtu mikroorganismů ve vzduchu

Místo odběru	Bakterie		Plísně a kvasinky		Celkový počet mikroorganismů (CFU/ m ³)
	CFU/strip	CFU/ m ³	CFU/strip	CFU/ m ³	
A1	4	4 x 10 = 40	2	2 x 10 = 20	40 + 20 = 60
A2	1	1 x 10 = 10	0	0 x 10 = 0	10 + 0 = 10

Výsledky jsou uvedeny do protokolu a je ověřeno, zda odpovídají definovaným limitním hodnotám uvedených v tabulce č. 4. Výsledky zkoušek jsou zhodnoceny, zaznamenány do databáze kontrolní mikrobiologické laboratoře a rozeslány příslušným oddělením.

Pokud dojde k překročení limitních hodnot, uvedených v tabulce 4, musí o tom být neprodleně informovány příslušná oddělení a musí být přijata nápravná opatření.

Tabulka 4: Předepsané limity pro monitoring vzduchu pro výrobní prostory s třídou čistoty D

Vzorkovaná oblast	Celkový počet mikroorganismů (CFU/m ³)		
	Požadovaná hodnota	Varovná hodnota	Limitní hodnota
Monitoring vzduchu	≤ 200	201–399	400

2.2 Stanovení počtu mikroorganismů na povrchu

Metoda stanovení počtu mikroorganismů na povrchu slouží ke sledování případné mikrobiální kontaminace na zkoušených plochách ve výrobních prostorách s odpovídající třídou čistoty. Zkoušené plochy jsou otisknuty na agarovou destičku a po dané době jsou odečteny narostlé kolonie. Počet mikroorganismů je sledován v pravidelných intervalech každý měsíc a pro odběr vzorků ze zkoušených ploch platí společná metodika. Mikrobiologická metoda je prováděna za stanovených podmínek v kontrolovaném prostředí, aby bylo zabráněno sekundární kontaminaci a mohou ji provádět pouze proškolené osoby.

2.2.1 Vybavení, materiály a kultivační média

Ke stanovení celkového počtu mikroorganismů na povrchu bylo použito následující vybavení: Inkubátor (Heraeus B) s nastavenou teplotou 32,5 °C ± 2,5 °C, inkubátor (Friocell 222) s nastavenou teplotou 22,5 °C ± 2,5 °C, chladnička Liebherr: 6,0 °C ± 2,5 °C, laminární box a autokláv značky Stomacher. Jako pomocné materiály a předměty byly použity sterilní rukavice, vozíček, lihový fix na označení vzorků, ruční počítačka kolonií a košík na přenos materiálů do provozu. Kultivační médium pro určení celkového počtu mikroorganismu na povrchu byly následující: Contact Slides TC (Merc, Německo), viz Obr. 4.

2.2.2 Postup stanovení

Místa odběru vzorků v jednotlivých závodech jsou uvedena ve vnitřních předpisech neboli plánech zkoušek. K odběru vzorků z povrchu se používá otisková agarová destička o rozměru 25 cm², která je nejprve ve sterilních rukavicích vyjmuta z ochranného

obalu a mírným tlakem přitlačena ke zkoušenému povrchu po dobu 10 sekund. Následně je destička umístěna do sterilního obalu, na kterém je identifikační značka místa, ze kterého byl vzorek odebírán. Plocha, kde byl vzorek odebírán je důkladně vyčištěna a dezinfikována, aby zde nezůstal žádný zbytek živného média. Vzorky jsou následně přesunuty do laboratoře, kde jsou inkubovány při teplotě $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ po dobu 1 až 5 dnů. Po stanovené inkubační době jsou spočítány viditelné kolonie a tento počet je použit pro přepočet. Výsledek je vyjádřen jako počet kolonií na 100 cm^2 , viz tabulka 5. Faktor pro přepočet je určen z rozměru agarové plochy.

$$\text{Faktor} = \frac{100\text{ cm}^2}{25\text{ cm}^2} = 4$$

Tabulka 5: Přepočet celkového počtu mikroorganismů na povrchu

Místo odběru	Bakterie		Plísňe a kvasinky		Celkový počet mikroorganismů (CFU/100 cm ²)
	CFU/destička	CFU/100 cm ²	CFU/destička	CFU/100 cm ²	
A1	4	4 x 4 = 16	2	2 x 4 = 8	16 + 8 = 24
A2	1	1 x 4 = 4	0	0 x 4 = 0	4 + 0 = 4

Výsledky zkoušek jsou zhodnoceny, zda odpovídají předepsaným limitům uvedených v tabulce č. 6 a jsou zaznamenány do databáze kontrolní mikrobiologické laboratoře a rozeslány příslušným oddělením.

Pro monitorování jsou stanoveny limitní hodnoty, viz tabulka 6. Pokud dojde k překročení limitních hodnot musí o tom být neprodleně informovány příslušná oddělení a musí být přijata nápravná opatření.

Tabulka 6: Předepsané limity pro monitoring pracovních ploch

Vzorkovaná oblast	Celkový počet mikroorganismů (CFU/100 cm ²)		
	Požadovaná hodnota	Varovná hodnota	Limitní hodnota
Pracovní plocha	≤ 100	101–199	200

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí environmentálního monitoringu prokázat, že jsou dodržovány předepsané hygienické standardy pro dané výrobní prostředí s odpovídající třídou čistoty a jsou tak zajištěny řádné podmínky pro výrobu ve společnosti Hartmann – Rico a.s. Kritériem výrobního procesu je zajistit bezpečnost a dále nejvyšší kvalitu výrobku, proto musí být materiály a výrobky vyráběny v prostorech, které odpovídají riziku produktů.

Sledování výrobních prostor s odpovídající třídou čistoty bylo pravidelně prováděno každý měsíc po dobu šesti měsíců a byl sledován jejich vývoj, na základě, kterého bylo určeno, zda daný výrobní prostor splňuje předepsané standardy a jsou dodržovány definované postupy na údržbu, čištění a dezinfekci těchto prostor. Odběry vzorků probíhaly ve výrobních prostorech ve stavu za provozu. Ze všech výrobních prostor, kde byl monitoring prováděn byly pro účel této bakalářské práce vybrány 4 výrobní prostory se třídou čistoty D.

3.1 Monitoring vzduchu a pracovních povrchů ve výrobním prostoru I

Výrobní prostor byl označen číslem jedna kvůli vnitřním předpisům firmy a z důvodu zachování citlivých informací firmy. Monitoring probíhal ve výrobním prostoru ve stavu za provozu.

3.1.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu

Odběr vzorků vzduchu byl proveden celkem na šesti odběrových místech, dle plánů zkoušek, kde jsou tato místa přesně definována. Každé odběrové místo je označeno specifickou značkou, která byla kvůli uchování citlivých informací firmy a dle jejích vnitřních předpisů pro účel této bakalářské práce změněna.

Odběr vzorků probíhal na místech s nejvyšším rizikem možné kontaminace, včetně vstupu do výrobních prostor z personální propusti až po místa u materiálových propustí. Přesná místa odběrů nemohou být zveřejněna.

Odběr vzorků ve výrobním prostoru I v měsíci říjnu proběhl 16. 10. 2023, zkouška byla ukončena 23. 10. 2023. Teplota při odběru vzorků činila 21,3 °C a vlhkost odpovídala 33,3 % relativní vlhkosti. Mikroorganismy byly počas této doby zachytávány na TC a YM stripech.

Po ukončení expozice, byly stripy přemístěny do laboratoře, inkubovány a po dané inkubační době byly odečteny narostlé kolonie, které byly následně přepočteny dle postupu uvedeném v 2.1.2. Výsledné hodnoty měření byly zaznamenány do protokolů a bylo vyhodnoceno, zda všechna odběrová místa splňují požadované hodnoty. O výsledcích byla informována příslušná oddělení, kterým byl odeslán protokol o mikrobiologické zkoušce. Výsledné hodnoty měření v říjnu 2023 jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Monitoring vzduchu - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/m ³			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
A1		40	0	40	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A2		30	0	30			
A3		30	0	30			
A4		20	10	30			
A5		0	0	0			
A6		60	0	60			

Všechna odběrová místa odpovídala definovaným limitním hodnotám, a tímto bylo potvrzeno plnění řádných podmínek pro výrobu, včetně pravidelné údržby, čištění a dezinfekce výrobního prostředí. Žádné z odběrových míst nepřekročilo varovné hodnoty, ani se k nim nepřiblížilo, takže mikrobiologická zkouška byla uzavřena jako vyhovující.

Monitoring byl prováděn v pravidelných intervalech i v dalších měsících. Výsledné hodnoty měření jsou uvedeny příloze 1, tabulka 23. Výsledné hodnoty byly zadány do protokolů a bylo ověřeno, že všechny splňují definované limitní hodnoty.

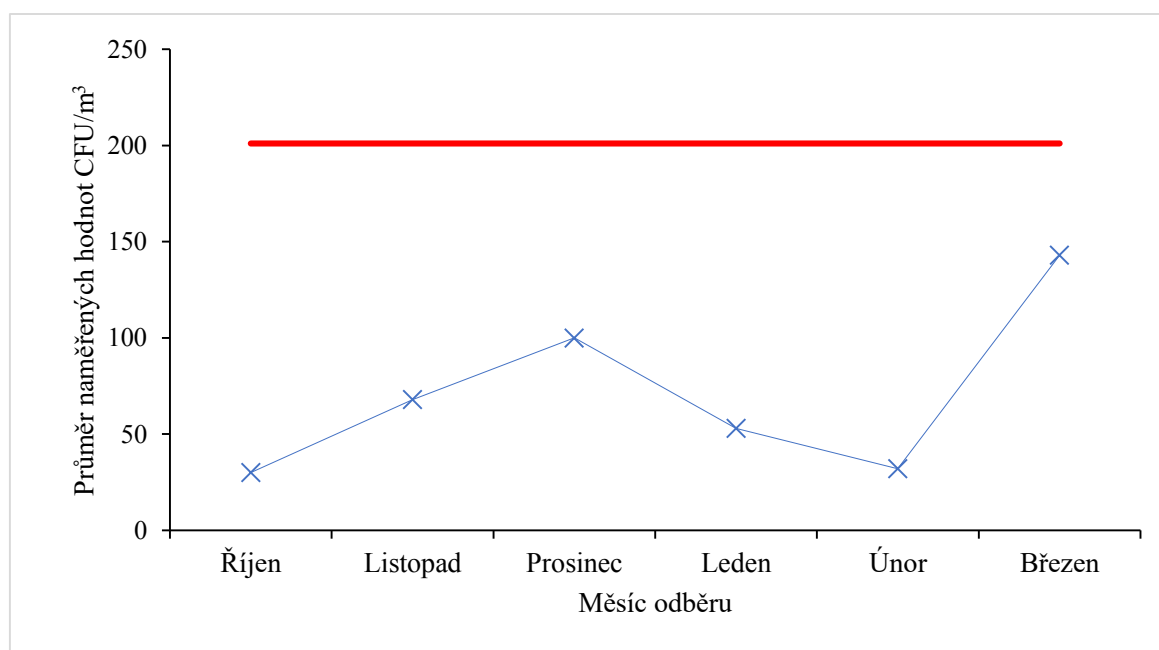
V prosinci se naměřená hodnota u odběrového místa A1 přiblížila varovným hodnotám (viz tab. 23), ale nepřesáhla je, proto bylo měření vyhodnoceno jako vyhovující. Následující měsíc při měření vzduchu na tomto odběrovém místě počet bakterií klesl. Znamená to, že všechny požadavky jsou dodržovány a produkt v daném výrobním prostoru není ohrožen.

Naměřené hodnoty byly průběžně zaznamenávány do statistiky, kde byly stanoveny průměry všech výsledných hodnot, které jsou uvedeny v tabulce 8, a byl sledován vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu ve výrobním prostoru I. Nejvyšší počet mikroorganismů ve vzduchu byl naměřen v prosinci, kdy výsledná hodnota odpovídala 190 CFU/m³ (viz tab. 8). Nejnižší počet mikroorganismů byl naměřen na odběrovém místě A5 v měsíci říjnu, kdy na stripem TC a YM při kultivaci nenarostly žádné kolonie, výsledek tedy odpovídá 0 CFU/m³ (viz tab. 8).

Tabulka 8: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/m ³					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
A1	40	90	190	150	60	120
A2	30	80	120	30	10	140
A3	30	40	100	50	10	180
A4	20	120	60	60	20	170
A5	0	20	100	10	10	150
A6	60	60	30	20	80	100
Průměr	30	68	100	53	32	143
Limitní hodnoty (CFU/m ³)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 200		201–399		400	

Vývoj počtu organismů ve vzduchu ve výrobním prostoru I je znázorněn na obrázku 12.



Obrázek 12: Vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu za období říjen 2023 až březen 2024

Všechna měření biozátěže vzduchu za období říjen 2023 až březen 2024 odpovídají daným limitům a byly vyhodnoceny jako vyhovující. Dle vývoje počtu mikroorganismů ve vzduchu můžeme předpokládat, že jsou všechna pravidla v čistých prostorech dodržována a riziko kontaminace materiálu nebo výrobků je minimální.

3.1.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu

Otisky z povrchů byly odebrány podle plánu zkoušek na odběrových místech s označením A1 a A2. Celkem bylo na těchto místech odebráno deset otisků. Přesná místa odběrů a označení vzorků nemůže být dle vnitřních předpisů firmy zveřejněno. Vzorky byly odebrány z míst, kde dochází ke kontaktu povrchu s materiálem nebo výrobkem a je zde vysoké riziko kontaminace výrobku daným povrchem, např. stoly, vozíky, boxy a součásti výrobních zařízení. Bylo kontrolováno, zda jsou všechny povrchy důkladně čištěny a dezinfikovány a zda zde není zvýšené riziko růstu mikroorganismů.

Při odběru vzorků v měsíci říjnu odpovídala teplota ve výrobním prostoru I 21,3 °C a vlhkost odpovídala 33,3 % relativní vlhkosti. Vzorky byly odebrány na agarové otiskové destičky, které byly následně inkubovány.

Výsledky počtu mikroorganismů přítomných na povrchu za měsíc říjen jsou uvedeny v tabulce 9. Všechny hodnoty jsou vyhovující a nepřekračují varovné hodnoty, proto byla mikrobiologická zkouška ukončena jako vyhovující.

Tabulka 9: Monitoring povrchů - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/100 cm ²			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
A1		0	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A1		8	0	8			
A1		64	0	64			
A1		100	0	100			
A2		0	0	0			
A2		0	0	0			
A2		0	0	0			
A2		0	0	0			
A2		4	0	4			
A2		4	0	0			

Nejvyšší počet mikroorganismů byl zjištěn na odběrovém místě s označením A1 (viz tab. 9), kdy výsledná hodnota po odečtení kolonií a následného přepočtu odpovídala 100 CFU/100 cm². Tato hodnota je velmi blízko varovné hodnotě, proto bylo dané odběrové

místo důkladně kontrolováno při monitoringu v dalším měsíci, kdy na agarových destičkách nenarostly žádné kolonie, takže výsledná hodnota odpovídá 0 CFU/100 cm² (viz tab. 24).

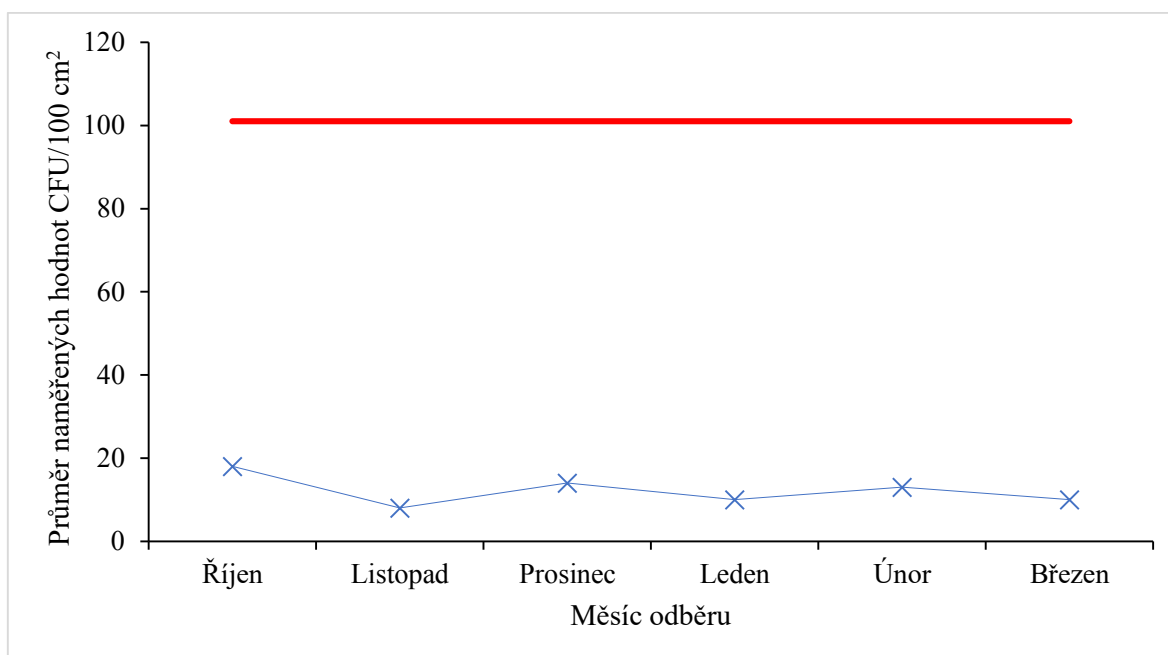
Výsledky monitoringu povrchů za období říjen 2023 až březen 2024 jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 24. Za dané období všechna odběrová místa splňují dané limity a jsou vyhodnocena jako vyhovující.

Počet mikroorganismů na povrchu ve sledovaném období byl zaznamenán do statistiky a byly určeny průměry za každý měsíc. Vývoj počtu mikroorganismů za dané období uvedený v tabulce 10 je vyhovující a splňuje dané požadavky.

Tabulka 10: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/100 cm ²					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
A1	0	0	24	0	0	20
A1	8	8	36	28	4	0
A1	64	0	0	8	8	8
A1	100	0	--	--	0	--
A2	0	0	4	0	40	4
A2	0	4	0	24	4	24
A2	0	52	16	12	8	8
A2	0	0	20	0	12	4
A2	4	8	--	--	52	--
A2	4	12	--	--	4	--
Ostatní	--	4	--	--	--	--
Průměr	18	8	14	10	13	10
Limitní hodnoty (CFU/ 100 cm ²)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 100		101–199		200	

Vývoj počtu organismů na povrchu ve výrobním prostoru I je zaznamenán na obrázku 13. Dle vývoje počtu organismů na povrchu lze soudit, že jsou všechna pravidla v čistých prostorech dodržována – čištění a dezinfekce povrchů, hygiena a řádné oblékání pracovníků a další. Riziko kontaminace materiálu nebo výrobku je minimální a nehrozí tak poškození koncového spotřebitele.



Obrázek 13: Vývoj počtu organismů na povrchu za období říjen 2023 až březen 2024

3.2 Monitoring vzduchu a pracovních povrchů ve výrobním prostoru II.

Výrobní prostor byl označen číslem dva kvůli vnitřním předpisům firmy a z důvodu zachování citlivých informací firmy. Monitoring probíhal ve výrobním prostoru ve stavu za provozu.

3.2.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu

Odběr vzorků vzduchu ve výrobním prostoru II byl proveden dle plánů zkoušek celkem na 3 odběrových místech. Odběry vzorků byly provedeny dle plánu na místech s nejvyšším rizikem možné kontaminace a ohrožení materiálu nebo výrobku. Přesná místa odběrů nemohou být zveřejněna kvůli zachování citlivých informací firmy.

Monitoring za měsíc říjen proběhl 16. 10. 2023 a zkouška byla následně ukončena 23. 10. 2023. Teplota při odběru vzorků činila 21,3 °C a vlhkost odpovídala 33,3 % relativní vlhkosti. Mikroorganismy byly zachyceny na agarové stripy TC a YM, pomocí přístroje RCS značky Merc a následně byly přesunuty do laboratoře a inkubovány po danou dobu. Následně byly odečteny narostlé kolonie, které byly přepočítány dle postupu uvedeným v 2.1.2.

Stanovené počty mikroorganismů ve vzduchu v říjnu 2023 jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Monitoring vzduchu - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/m ³			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
B1		50	0	50	☒	☐	☐
B2		0	30	30			
B3		150	0	150			

Nejvyšší koncentrace mikroorganismů ve vzduchu v měsíci říjnu byla naměřena na odběrovém místě B3, kde výsledná hodnota činila 150 CFU/m³ (viz tab. 11). Tato hodnota však splňuje předepsané limity, takže byla mikrobiologická zkouška uzavřena jako vyhovující.

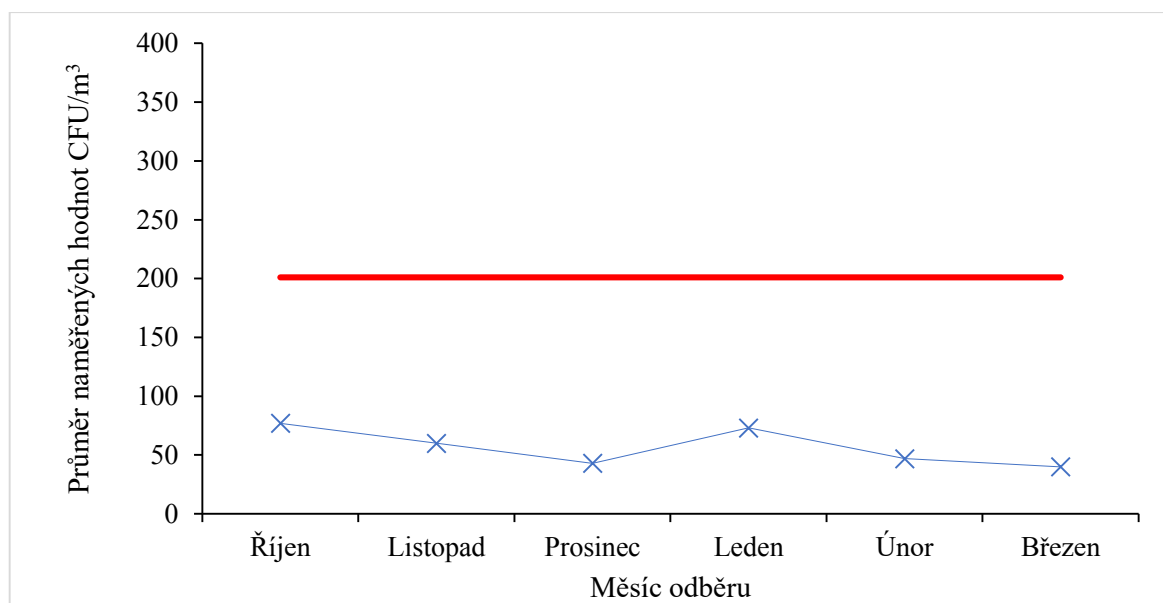
Naměřené hodnoty za následující měsíce jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 25. Po celou dobu měření nedošlo k nárůstu počtu mikroorganismů ve vzduchu, lze tedy předpokládat, že jsou všechny požadavky na čisté prostory řádně dodržovány a nehrozí tak kontaminace materiálů nebo výrobků.

Stanovené počty mikroorganismů ve vzduchu byly zaznamenány do statistiky a byly určeny průměry za jednotlivé měsíce, viz tabulka 12.

Tabulka 12: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/m ³					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
B1	50	20	40	100	30	10
B2	30	120	0	80	70	10
B3	150	40	90	40	40	100
Průměr	77	60	43	73	47	40
Limitní hodnoty (CFU/m ³)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 200		201–399		400	

Dle vývoje počtu mikroorganismů ve vzduchu, viz obr. 14, lze vidět, že nehrozí ohrožení materiálů nebo výrobku, jelikož stanovené hodnoty se nachází dlouhodobě pod varovnou hodnotou. Riziko kontaminace výrobku mikroorganismy přenášenými vzduchem je minimální.



Obrázek 14: Vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu za období říjen 2023 až březen 2024

3.2.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu

Vzorky z povrchů ve výrobním prostoru II byly odebrány na odběrových místech s označením B1, B2, B3 a B4, kde bylo celkem odebráno deset otisků. Na těchto místech hrozí zvýšené riziko kontaminace materiálu nebo výrobku. Tato místa jsou pravidelně kontrolována, aby nedošlo ke kontaminaci výrobku a ohrožení koncového spotřebitele. Přesná poloha odběrových míst je definována v plánech zkoušek. Přesná místa odběrů vzorku nemohou být z důvodu zachování citlivých informací firmy zveřejněna. Dle plánu zkoušek byla odebrána také místa s označením „ostatní“, kterými jsou rozuměna místa, která jsou odebrána nad rámec označených míst, a pověřený pracovník, který odběr vzorků prováděl, tato místa vyhodnotil jako nejvíce riziková.

Výsledné hodnoty počtů mikroorganismů v říjnu 2023 jsou uvedeny v tabulce 13. Všechny stanovené hodnoty splňují předepsané limity, proto byla tato mikrobiologická zkouška vyhodnocena jako vyhovující.

Tabulka 13: Monitoring povrchů - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/100 cm ²			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
B1		0	0	0	☒	☐	☐
B1		0	0	0			
B1		0	0	0			
B2		0	0	0			
B2		4	0	4			
B2		8	0	8			
B3		68	0	68			
B3		8	0	8			
B4		0	0	0			
B4		0	0	0			
Ostatní		20	0	20			
Ostatní		4	0	4			

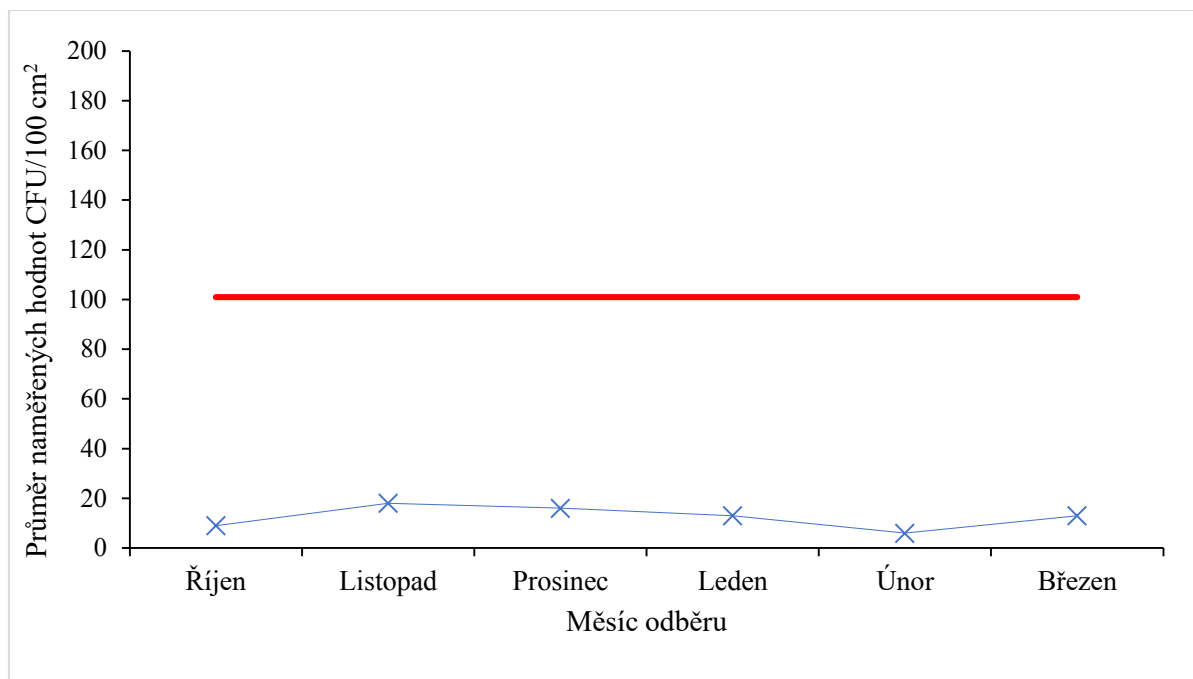
Hodnoty počtu mikroorganismů na povrchu ve výrobním prostoru II za období listopad 2023 až březen 2024 jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 26. V měsíci listopadu došlo k nárůstu počtu mikroorganismů na odběrovém místě s označením B3 (viz tab. 26). Hodnota 100 CFU/100 cm² se vyskytuje těsně pod varovnou hodnotou, proto o této skutečnosti byla informována příslušná oddělení a bylo doporučeno, aby dané místo bylo pečlivě vyčištěno a dezinfikováno. Při monitoringu povrchů v následujícím měsíci byla na odběrovém místě B3 stanovena hodnota 96 CFU/100 cm² (viz tab. 26). Pokles počtu mikroorganismů byl velmi nízký, proto bylo dané místo sledováno i na dále, kdy v měsíci lednu celkový počet mikroorganismů byl 60 CFU/100 cm² (viz tab. 26). Z dlouhodobého hlediska nedošlo k navýšení počtu mikroorganismů na daném odběrovém místě, lze tedy předpokládat, že jsou všechny požadavky splněny, místo je řádně udržováno a nehrozí kontaminace materiálu nebo výrobku.

Všechny stanovené počty mikroorganismů ve výrobním prostoru II za období listopad 2023 až březen 2024 odpovídají předepsaným hodnotám. Všechny stanovené hodnoty za dané období byly zaznamenány do statistiky, byl určen průměr pro každý měsíc a byl sledován vývoj. Průměry naměřených hodnot jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/100 cm ²					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
B1	0	--	--	4	--	--
B1	0	--	--	4	--	--
B1	0	--	--	0	--	--
B2	0	0	0	--	0	0
B2	4	12	0	--	12	0
B2	8	8	20	--	24	4
B3	68	100	96	60	0	72
B3	8	0	4	--	4	0
B4	0	0	0	4	0	16
B4	0	--	0	0	0	0
Ostatní	20	8	4	16	8	12
Ostatní	4	--	--	--	--	--
Průměr	9	18	16	13	6	13
Limitní hodnoty (CFU/ 100 cm ²)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 100		101–199		200	

Vývoj počtu mikroorganismů na površích ve výrobním prostoru II je zobrazen na obrázku 15. Vývoj ukazuje, že jsou všechny podmínky ve výrobních prostorech s odpovídající třídou čistoty splněny a nehrozí tak riziko kontaminace výrobku.



Obrázek 15: Vývoj počtu mikroorganismů na povrchu za období říjen 2023 až březen 2024

3.3 Monitoring vzduchu a pracovních povrchů ve výrobním prostoru III

3.3.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu

Odběr vzorků vzduchu ve výrobním prostoru III byl proveden dle plánů zkoušek celkem na 3 odběrových místech, kde na každém místě byly provedeny dva odběry. Při prvním odběru byl použit strip TC a při druhém strip YM. Monitoring probíhal ve výrobním prostoru III ve stavu za provozu.

V měsíci říjnu při odběru vzorků odpovídala teplota 21,6 °C a vlhkost odpovídala 36,4 % relativní vlhkosti. Vzorky byly odebrány pomocí aktivního vzorkovače a po odběru byly přesunuty do laboratoře a byly inkubovány. Po dané době inkubace byly odečteny narostlé kolonie, které byly následně přepočteny dle postupu uvedeném v 2.1.2.

Stanovené počty mikroorganismů ve vzduchu ve výrobním prostoru III v měsíci říjnu jsou uvedeny v tabulce 15. Všechny stanovené hodnoty splňují předepsané limity a je tak vyloučena křížová kontaminace výrobku.

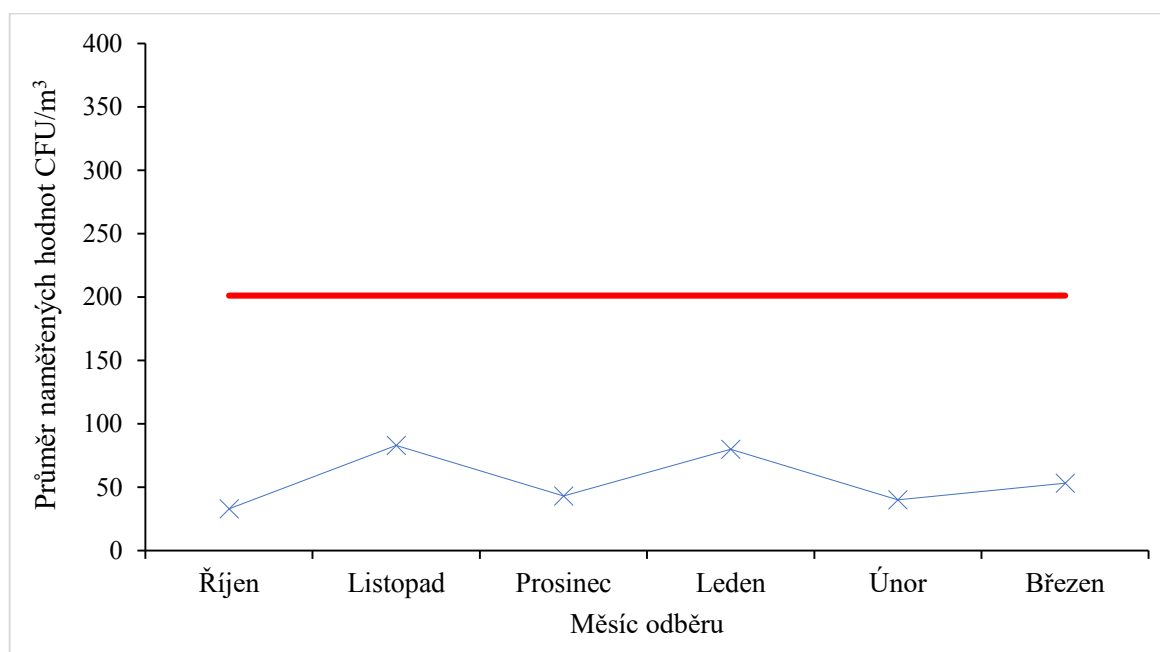
Tabulka 15: Monitoring vzduchu - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/m ³			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
C1		60	0	60	☒	☐	☐
C2		40	0	40			
C3		0	0	0			

Počet mikroorganismů ve vzduchu ve výrobním prostoru III byl pro účel této bakalářské práce sledován v období od října 2023 do března 2024, stanovené hodnoty jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 27. Ze všech stanovených hodnot byly vypočítány průměry za dané měsíce uvedené v tabulce 16 a byl sledován vývoj počtu mikroorganismů za dané období, viz obr. 16.

Tabulka 16: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/m ³					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
C1	60	150	70	120	70	60
C2	40	60	30	60	20	90
C3	0	40	30	60	30	10
Průměr	33	83	43	80	40	53
Limitní hodnoty (CFU/m ³)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 200		201–399		400	



Obrázek 16: Vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu za období říjen 2023 až březen 2024

Stanovené hodnoty za dané období se nachází hluboko pod varovnými hodnotami, lze tedy konstatovat, že jsou v daném výrobním prostoru zajištěny řádné podmínky pro výrobu a jsou dodržovány nejvyšší požadavky pro tuto zónu čistoty. Nehrozí tedy riziko kontaminace materiálů nebo výrobků mikroorganismy obsaženými ve vzduchu.

3.3.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu

Vzorky z povrchů ve výrobním prostoru III byly odebrány celkem na čtyřech odběrových místech, kde hrozí zvýšené riziko kontaminace materiálu nebo výrobku. Tato místa jsou určena na základě předem provedeného důkladného vyhodnocení rizik. Místa jsou pravidelně kontrolována, aby nedošlo ke kontaminaci výrobku a ohrožení koncového spotřebitele. Přesná poloha odběrových míst je definována v plánech zkoušek. Dle plánu zkoušek byla odebrána také místa s označením „ostatní“, kterými jsou rozuměna místa, která jsou odebrána nad rámeček označených míst, a pověřený pracovník, který odběr vzorků prováděl, tato místa vyhodnotil jako nejvíce riziková.

V měsíci říjnu všechny stanovené hodnoty uvedené v tabulce 17 odpovídaly limitním hodnotám. Mikrobiologická zkouška tak byla vyhodnocena jako vyhovující.

Tabulka 17: Monitoring povrchů - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/100 cm ²			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
C1		12	0	12	☒	☐	☐
C2		0	0	0			
C3		0	0	0			
C4		8	0	8			
C4		0	0	0			
C4		--	--	--			
Ostatní		--	--	--			

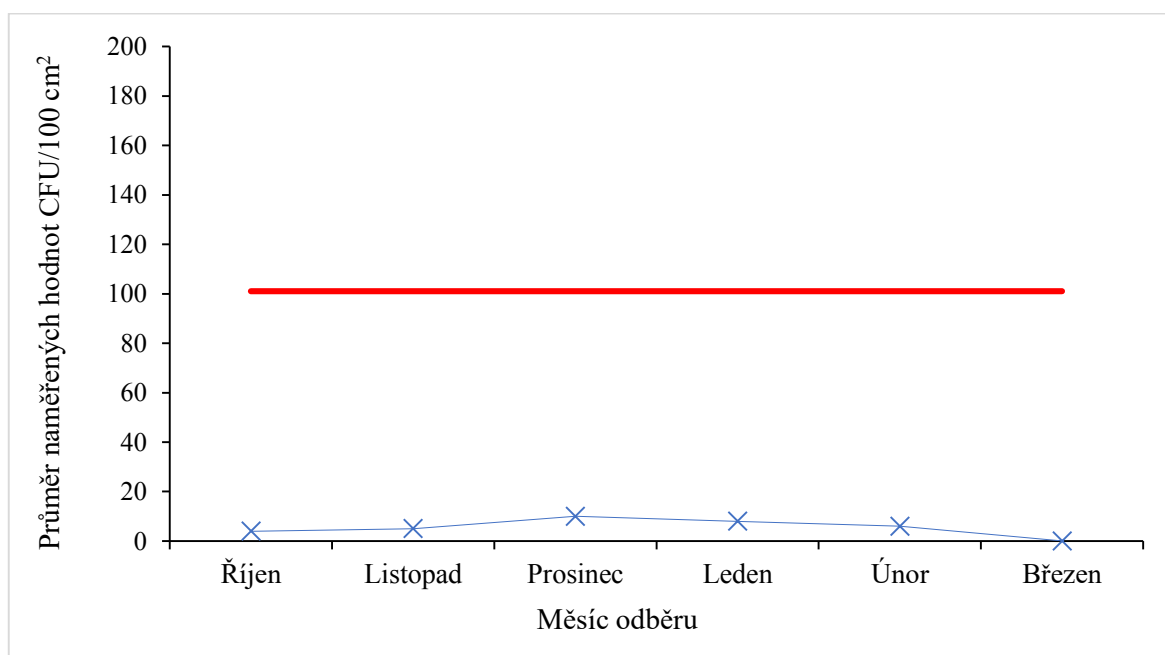
Stanovené počty mikroorganismů na povrchu ve výrobním prostoru III za období listopad 2023 až březen 2024 jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 28. Dle všech stanovených hodnot můžeme vidět, že jsou ve výrobním prostoru plněny všechny požadavky, prostory jsou řádně dezinfikovány a čištěny a je zachována bezpečnost výrobku.

Stanovené počty mikroorganismů na jednotlivých odběrových místech za dané měsíce byl zadán do statistiky a byly určeny průměry počtu mikroorganismů na povrchu za každý jednotlivý měsíc, uvedené v tabulce 18. Na základě těchto údajů byl sledován vývoj počtu mikroorganismů na povrchu za období říjen 2023 až březen 2024.

Tabulka 18: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/100 cm ²					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
C1	12	--	4	--	12	--
C2	0	12	4	16	12	--
C3	0	4	32	0	12	--
C4	8	4	0	0	8	0
C4	0	0	--	0	0	0
C4	--	4	--	12	0	--
Ostatní	--	4	--	20	0	--
Ostatní	--	--	--	--	--	--
Průměr	4	5	10	8	6	0
Limitní hodnoty (CFU/100 cm ²)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 100		101–199		200	

Vývoj počtu mikroorganismů ve výrobním prostoru III je zobrazen na obrázku 17, na kterém můžeme vidět, že jsou stanovené hodnoty hluboko pod varovnou hodnotou. Mikrobiologická kontaminace na povrchu je zde tedy minimální a je prokázáno, že jsou dodržovány nezbytné hygienické standardy definované pro daný výrobní prostor. Riziko kontaminace výrobku je tedy minimální.



Obrázek 17: Vývoj počtu mikroorganismů na povrchu za období říjen 2023 až březen 2024

3.4 Monitoring vzduchu a pracovních povrchů ve výrobním prostoru IV

Výrobní prostor byl označen číslem čtyři kvůli vnitřním předpisům firmy a z důvodu zachování citlivých informací firmy. Monitoring probíhal ve výrobním prostoru ve stavu za provozu. Cílem monitoringu bylo stanovení mikrobiologické kontaminace ve vzduchu a površích v daném výrobním prostoru, aby bylo prokázáno, že jsou zajištěny řádné podmínky pro výrobu a riziko kontaminace výrobku je minimální.

3.4.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu

Vzorky vzduchu byly odebírány celkem na třech odběrových místech s označením D1, D2 a D3. Monitoring probíhal ve výrobním prostoru IV ve stavu za provozu.

Teplota ve výrobním prostoru při odběru vzorků v měsíci říjnu činila 22,2 °C a vlhkost odpovídala 54,3 % relativní vlhkosti. Vzorky vzduchu byly odebrány pomocí aktivního vzorkovače vzduchu RCS na stripy TC a následně YM. Po odběru byly přesunuty do laboratoře a po dané inkubační době byly odečteny narostlé kolonie, které byly přepočteny dle postupu uvedeného v 2.1.2.

V tabulce 19 jsou uvedené stanovené počty mikroorganismů pro daná odběrová místa. Nejvyšší stanovený počet odpovídá 140 CFU/m³, nejnižší počet 10 CFU/m³.

Tabulka 19: Monitoring vzduchu - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/m ³			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísňe a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
D1		140	0	140	☒	☐	☐
D2		50	20	70			
D3		10	0	10			

Mikrobiologická kontaminace vzduchu ve výrobním prostoru č. 4 byla sledována po dobu šesti měsíců. Stanovené počty mikroorganismů za období říjen 2023 až březen 2024 jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 29.

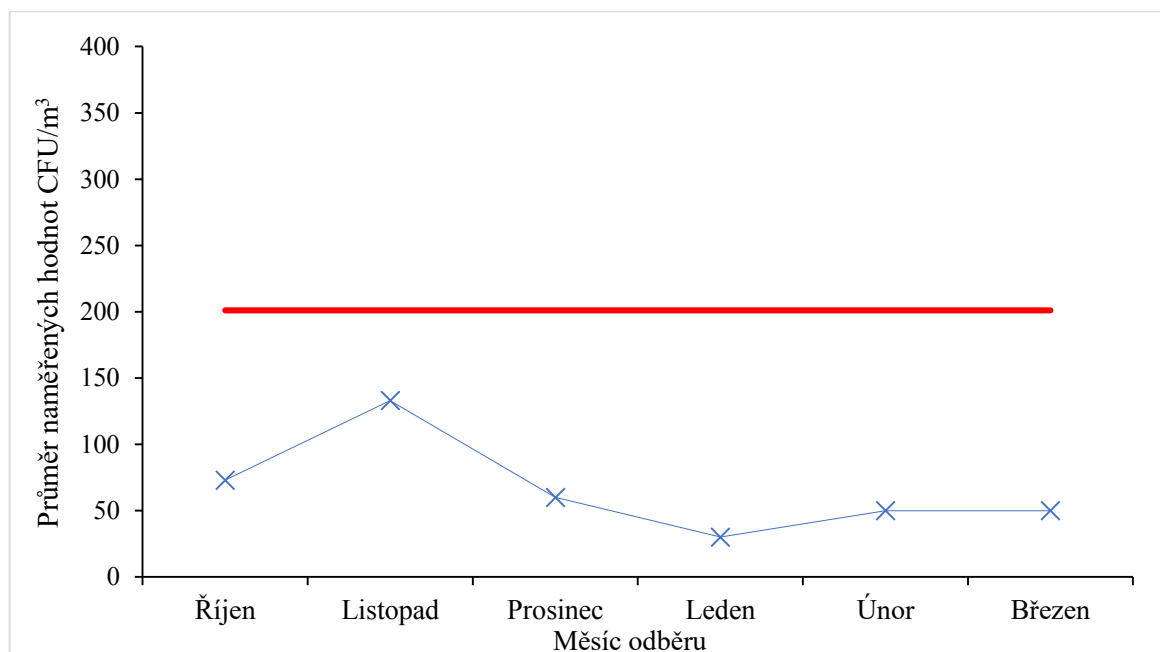
V měsíci listopadu došlo ke zvýšení mikrobiologické kontaminace na odběrovém místě s označením D3 (viz tab. 29). Stanovený počet mikroorganismů se nachází těsně pod varovnou hodnotou. Bylo tedy doporučeno provést čištění a dezinfekci daného výrobního prostoru a zkontrolovat vzduchotechniku. V následujících měsících byl vývoj počtu mikroorganismů na daném místě pečlivě sledován, ale zvýšení se už neopakovalo. Lze tedy vyhodnotit, že jsou ve výrobním prostoru zajištěny řádné podmínky pro výrobu a nehrozí ohrožení výrobku.

Všechny stanovené hodnoty za daný měsíc byly zadány do statistiky, byly určeny jejich průměry, které jsou uvedeny v tabulce 20 a byl hodnocen vývoj mikrobiologické kontaminace ve vzduchu v daném výrobním prostoru.

Tabulka 20: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/m ³					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
D1	140	100	140	30	80	90
D2	70	100	0	50	30	60
D3	10	200	40	10	40	0
Průměr	73	133	60	30	50	50
Limitní hodnoty (CFU/m ³)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 200		201–399		400	

Vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu za období říjen 2023 až březen 2024 je zobrazen na obrázku 18. V grafu můžeme vidět nárůst mikrobiologické kontaminace v měsíci listopad z důvodu zvýšení počtu mikroorganismů na odběrovém místě s označením D3 (viz tab. 20), kde se stanovená hodnota nacházela těsně pod varovnou hodnotou. Dané místo bylo pečlivě sledováno a v dalších měsících můžeme vidět pokles mikroorganismů přítomných ve vzduchu.



Obrázek 18: Vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu za období říjen 2023 až březen 2024

Všechny stanovené hodnoty odpovídají předepsaným limitům a dle vývoje počtu mikroorganismů, kde se všechny hodnoty nachází pod varovnou hodnotou můžeme vyhodnotit, že jsou dodržovány všechny standardy pro dané výrobní prostředí.

3.4.1 Vyhodnocení stanovení počtu mikroorganismů na povrchu

Ve výrobním prostoru IV byly odebrány vzorky z povrchů na odběrových místech s označením D1 až D9, kde bylo odebráno celkem 12 otisků z povrchu. Místa jsou definována v plánu zkoušek a jsou určena na základě předem provedeném hodnocením rizik. Na místech dochází ke kontaktu materiálu nebo výrobku s povrchem a hrozí tak zvýšené riziko kontaminace výrobku daným povrchem. Cílem stanovení počtu mikroorganismů na površích v daném prostoru bylo určit, zda jsou splněny všechny dané předpisy a jsou zajištěny řádné podmínky pro výrobu.

Všechny stanovené počty mikroorganismů na pracovních površích za měsíc říjen, uvedené v tabulce 21, odpovídají předepsaným limitům. Lze tedy říci, že je v daném prostoru omezena přítomnost a usazování mikroorganismů na povrchu.

Tabulka 21: Monitoring povrchů - naměřené a výsledné hodnoty v říjnu 2023

Označení vzorku	Místo odběru	Výsledky CFU/100 cm ²			Vyhodnocení		
		Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Vyhovuje	Varovná hodnota	Nevyhovuje
D1		0	0	0	☒	☐	☐
D2		28	0	28			
D3		12	0	12			
D4		0	0	0			
D5		0	0	0			
D6		0	0	0			
D7		68	0	68			
D7		40	0	40			
D8		--	--	--			
D8		--	--	--			
D9		8	0	8			
D9		80	0	80			

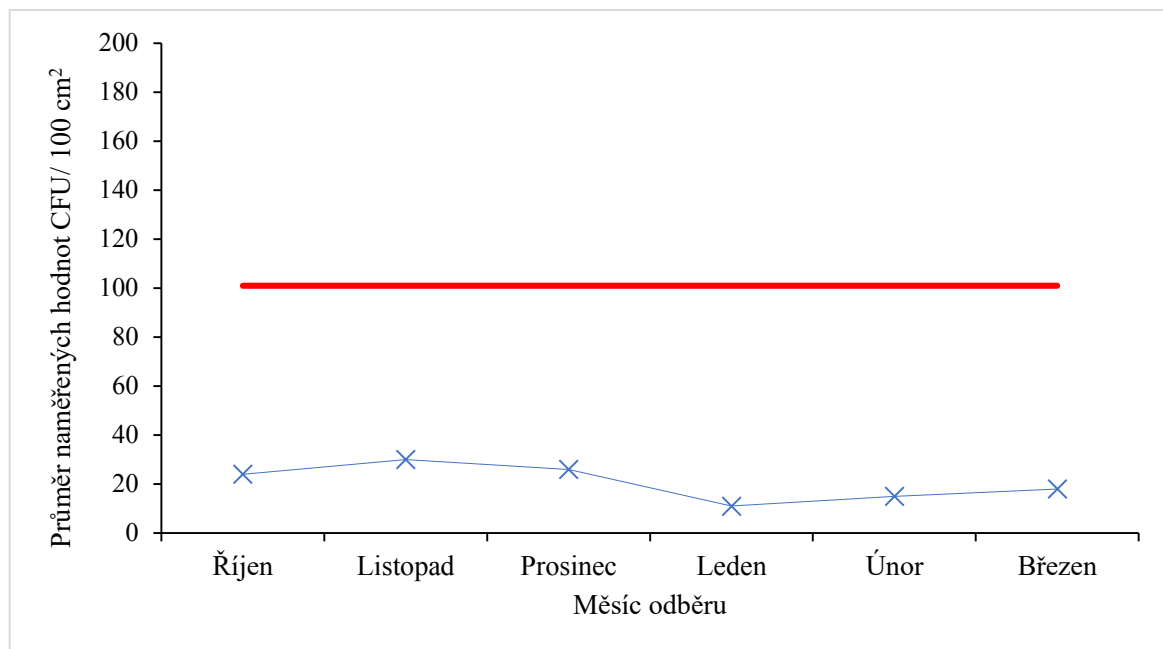
Kontrola počtu mikroorganismů na povrchu v daném výrobním prostoru byla prováděna pravidelně každý měsíc po dobu šesti měsíců. Stanovené hodnoty za dané období jsou uvedeny v příloze 1, tabulka 30. V tabulce můžeme vidět, že v měsíci listopadu došlo k nárůstu počtu mikroorganismů na dvou odběrových místech. Na místech D1 a D4 stanovená hodnota činila 100 CFU/100 cm² (viz tab. 30) a nacházela se těsně pod varovnou hodnotou. Daná oddělení na tuto skutečnost byla upozorněna a bylo doporučeno vyčistit a dezinfikovat daná místa, aby nedošlo ke zvýšení mikrobiologické kontaminace na daných místech. V následujících měsících došlo ke snížení počtů na daných místech na 0 CFU/100 cm² a 52 CFU/100 cm² (viz tab. 30), kdy tyto hodnoty odpovídají předepsaným hodnotám. Můžeme tedy vyhodnotit, že jsou ve výrobním prostoru IV zajištěny řádné podmínky pro výrobu.

Stanovené hodnoty byly zaznamenány do statistiky, byly určeny průměry za jednotlivé měsíce a byl pozorován vývoj počtu mikroorganismů na povrchu. Průměry za jednotlivé měsíce jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22: Průměry naměřených hodnot za období říjen 2023 až březen 2024

Označení vzorku	Výsledky CFU/100 cm ²					
	Říjen	Listopad	Prosinec	Leden	Únor	Březen
D1	0	100	0	0	20	8
D2	28	16	40	36	60	32
D3	12	4	28	0	40	12
D4	0	100	52	0	4	0
D5	0	20	40	4	0	20
D6	0	4	4	0	8	8
D7	68	20	32	0	0	40
D7	40	--	36	0	8	16
D8	--	8	--	--	--	--
D8	--	--	--	--	--	--
D9	8	24	--	0	0	--
D9	80	8	4	0	4	--
Ostatní	--	--	--	28	16	28
Ostatní	--	--	--	60	--	--
Průměr	24	30	26	11	15	18
Limitní hodnoty (CFU/100 cm ²)	Požadovaná hodnota		Varovná hodnota		Limitní hodnota	
	≤ 100		101–199		200	

Vývoj počtu mikroorganismů za období říjen 2023 až březen 2024 je zobrazen na obrázku 19, kde můžeme pozorovat, že se všechny hodnoty nachází hluboko pod varovnými hodnotami. Můžeme tedy vyhodnotit, že jsou v daném výrobním prostoru zajištěny řádné podmínky pro výrobu, je tak zajištěna bezpečnost výrobku a nehrozí ohrožení koncového spotřebitele.



Obrázek 19: Vývoj počtu mikroorganismů na povrchu za období říjen 2023 až březen 2024

4 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce hodnotí, zda výrobní prostory splňují stanovené požadavky na mikrobiologickou čistotu a jsou tak zajištěny řádné podmínky pro výrobu a konzistentní kvalitu a bezpečnost výrobku. Mikrobiologická kontaminace ve vzduchu a na pracovních površích byla sledována po dobu šesti měsíců ve výrobních prostorech s odpovídající třídou čistoty. Pro účel této bakalářské práce byly vybrány celkem čtyři výrobní prostory společnosti HARTMANN – RICO a.s. ve Veverské Bítýšce s třídou čistoty D, které byly označeny jako výrobní prostory I., II., III. a IV.

Hodnoty získané během monitoringu daných prostor byly porovnány s definovanými limity a bylo ověřeno, zda všechny výsledky odpovídají těmto limitním hodnotám. V rámci všech čtyř výrobních prostor, které byly kontrolovány nedošlo za dané období k překročení definovaných varovných nebo limitních hodnot. Všechna odběrová místa odpovídala požadovaným hodnotám.

Nejvyšší počet mikroorganismů ve vzduchu byl stanoven v měsíci listopadu ve výrobním prostoru II, kdy odpovídal 200 CFU/m^3 . Tato hodnota leží těsně pod varovnou hodnotou, proto bylo doporučeno zkontrolovat, jestli všechny procesy probíhají podle daných požadavků a bylo doporučeno provést příslušná opatření.

Nejvyšší počet mikroorganismů na povrchu byl stanoven v měsíci listopadu ve výrobních prostorech II a IV, kdy stanovené hodnoty odpovídaly 100 CFU/100 cm^2 a nacházely se tak těsně pod definovanou varovnou hodnotou, proto byla přijata příslušná opatření.

Pro každý výrobní prostor byl sledován vývoj počtu mikroorganismů ve vzduchu a na pracovních plochách za dané období, dle kterého bylo následně určeno, zda jsou dlouhodobě dodrženy řádné výrobní podmínky a je tak zajištěna konzistentní kvalita a bezpečnost výrobku. Z vývoje počtu mikroorganismů ve vzduchu a na pracovních plochách můžeme vidět, že se všechny stanovené hodnoty nachází hluboko pod varovnou hodnotou a nedošlo k výraznému vychýlení, které by ukazovalo na selhání vnitřních procesů.

Bylo vyhodnoceno, že jsou v daných výrobních prostorech splněny všechny předepsané požadavky a jsou tak zajištěny řádné podmínky pro výrobu, konzistentní kvalita a bezpečnost výrobku a nehrozí ohrožení koncového spotřebitele.

5 SEZNAM ZDROJŮ

- [1] HARTMANN - RICO A.S. *Kdo jsme*. Online. Hartmann. Dostupné z: <https://www.hartmann.info/cs-cz/kdo-jsme>. [cit. 2023-10-15].
- [2] HARTMANN - RICO A.S. *Naše odpovědnost*. Online. Hartmann. Dostupné z: <https://www.hartmann.info/cs-cz/kdo-jsme/l/cz/nase-odpovednost>. [cit. 2023-10-15].
- [3] *Loga ke stažení*. Online. In: HARTMANN-RICO A.S. HARTMANN. 2024. Dostupné z: <https://www.hartmann.info/cs-cz/pro-media/l/cz/ke-stazeni/loga-ke-stazeni>. [cit. 2024-02-24].
- [4] INTRAC FOR CIVIL SOCIETY. *Monitoring*. Online. 2017. Dostupné z: <https://www.intrac.org/wpcms/wp-content/uploads/2017/01/Monitoring.pdf>. [cit. 2023-10-20].
- [5] SANDLE, Tim. *Best practices in environmental monitoring*. Online. 2020. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/342883006_Best_practices_in_environmental_monitoring. [cit. 2023-10-20].
- [6] JIMENES, Luis. *Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry*. 1. CRC Press, 2019. ISBN 9780367393946.
- [7] SORMUNEN, Samuli. *Utilization of environmental monitoring in pharmaceutical manufacturing*. Online, Diplomová práce. Tampere: Master's Thesis in Technology Tampere University Master's Degree Education in Management and Information Technology, 2022. Dostupné z: <https://trepo.tuni.fi/bitstream/handle/10024/145129/SormunenSamuli.pdf?sequence=2>. [cit. 2023-10-20].
- [8] The Environmental Monitoring Program In a GMP Environment. Online. *Journal of GXP Compliance*. 2010, roč. 14, č. 3, s. 22-30. Dostupné z: http://www.microbiologynetwork.com/doc/sutton.jgxp_.14.3.pdf. [cit. 2023-10-20].
- [9] GOUVEIA, Bruno G.; RIJO, Patrícia; GONÇALO, Tânia S. a REIS, Catarina P. Good manufacturing practices for medicinal products for human use. Online. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2015, roč. 7, č. 2, s. 87-96. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.154424>. [cit. 2023-11-25].
- [10] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Good manufacturing practice*. Online. 2008. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-manufacturing-practice>. [cit. 2023-10-20].
- [11] EUROPEAN COMMISSION. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. In: . 2022. Dostupné také z: https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825_gmp-an1_en_0.pdf.
- [12] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products: Annex 2. In: . 2022. Dostupné z: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/production/trs1044-annex-2-gmp-for-sterile-pharmaceutical-products.pdf?sfvrsn=d924ed65_1&download=true. [cit. 2023-10-25].
- [13] Pokyny pro správnou výrobní praxi: Část 1: Správná výrobní praxe pro léčivé přípravky. In: . 2015. Dostupné také

z: https://www.uskvbl.cz/attachments/814_Pokyny%20SVP%20-%20Část%20I%20-%20LP_2015%20130515%201.pdf.

- [14] EU GUIDE TO GOOD MANUFACTURING PRACTICE FOR MEDICINAL PRODUCTS: Část 1: Medicinal Products for Human and Veterinary Use. In: . 2013. Dostupné také z: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/Part%20I%20EU_GMP_GUIDE.pdf.
- [15] ČESKÁ AGENTURA PRO STANDARDIZACI. ČSN EN ISO 9001 OPRAVA 1, *Systém managementu kvality - Požadavky*. 2018.
- [16] ČESKÁ AGENTURA PRO STANDARDIZACI. ČSN EN ISO 14644-1, Čisté prostory a příslušná řízená prostředí - Část 1: Klasifikace čistoty vzduchu podle koncentrace částic. 2019.
- [17] SÚKL. VYR-36 ČISTÉ PROSTORY. In: . 2009. Dostupné také z: https://www.sukl.cz/file/1182_1_1/.
- [18] VWR. *Basic information about microbial monitoring of cleanrooms*. Online. 2015. Dostupné z: https://no.vwr.com/mno.vwr.com/no_NO/images/Basic_Information_About_Microbial_Monitoring_of_Cleanrooms.pdf. [cit. 2023-11-20].
- [19] RCS® *High Flow Touch*. Online. In: MERCK. 2023. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/products/industrial-microbiology/environmental-monitoring/environmental-monitoring-for-food-and-beverage-industry/active-air-monitoring-systems/rcs/E2Cb.qB.IxQAAAFacQE.1Zwo,nav>. [cit. 2023-11-20].
- [20] *Agarové stripy TC*. Online. In: MERCK. 2023. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Agar-Strips-TC,MDA_CHEM-144253. [cit. 2023-11-20].
- [21] BIOING. *ImpactAir® vzorkovače*. Online. Bioing. 2022. Dostupné z: <https://bioing.cz/mikrobiologie-cistych-prostor/mikrobiologicky-monitoring/aktivni-mikrobiologicke-vzorkovace-vzduchu/impactair-vzorkovace/>. [cit. 2024-02-25].
- [22] Tady prostor na jeden odkaz k želatinovým vzorkovačům.
- [23] HYCON® *Contact Slides*. Online. In: MERCK. 2023. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/HYCON-Contact-Slides,MM_NF-C143718?CatalogCategoryID=. [cit. 2023-11-20].
- [24] ICR *Swab*. Online. In: MERCK. 2023. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/ICR-Swab,MM_NF-C143146?CatalogCategoryID=. [cit. 2023-11-26].
- [25] *How to Swab Cleanroom Surfaces in a Reproducible Manner*. Online. In: GERBIC clean rooms. 2018. Dostupné z: <https://www.gerbig.com/how-to-swab-cleanroom-surfaces-in-a-reproducible-manner/>. [cit. 2024-02-25].
- [26] ČESKÁ AGENTURA PRO STANDARDIZACI. ČSN EN ISO 11737-1:2018, Sterilizace výrobků pro zdravotní péči - Mikrobiologické metody - Část 1: Stanovení populace mikroorganismů na výrobcích. 2018. [cit. 2023-11-10].
- [27] SANDLE, Tim. *Pharmaceutical Microbiology*. Online. In: *Pharmaceutical Microbiology*. Woodhead Publishing, 2016, s. 81-91. ISBN 978-0-08-100022-9. Dostupné

- z: <http://182.160.97.198:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1014/Chapter%207-Bioburden-determination.pdf?sequence=9&isAllowed=y>. [cit. 2023-11-20].
- [28] NĚMEC, Miroslav a MATOULKOVÁ, Dagmar. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita Brno, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [29] GREENWOOD, David; SLACK, Richard C. B.; PEUTHERER, John F. a SCHINDLER, Jiří. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění : patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
- [30] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [31] VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 2000. ISBN 80-238-5058-X.
- [32] KOUKALOVÁ, Dagmar. *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I. 3.*, nezměněné vydání. Skripta. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3395-0.
- [33] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita, 2003. ISBN 80-210-2272-8.
- [34] *CASO Agar (Soybean Casein digest Agar, Casein-peptone Soymeal-peptone Agar)*. Online. In: Sigma-aldrich. 2018. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/211/989/22095dat.pdf>. [cit. 2023-11-23].
- [35] *Broth, Mossel*. Online. In: Exodocientifica. 2015. Dostupné z: https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M287.pdf. [cit. 2024-03-23].
- [36] *Metody sterilní práce, očkování a uchovávání mikroorganismů*. Online. 2017. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html. [cit. 2023-11-15].
- [37] BURDYCHOVÁ, Radka a SLÁDKOVÁ, Pavla. *Mikrobiologická analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [38] BURSOVÁ, Šárka; RENÁTA, Karpíšková; MARTA, Dušková a LENKA, Necidová. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání. 2*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-683-4.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1: Stanovené hodnoty počtu organismů ve vzduchu a na povrchu za období listopad 2023 až březen 2024

Tabulka 23: Monitoring vzduchu ve výrobním prostoru I - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu: výsledky (CFU/m ³)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
A1	50	40	90	190	0	190	140	10	150	60	0	60	110	10	120
A2	70	10	80	120	0	120	30	0	30	10	0	10	140	0	140
A3	40	0	40	100	0	100	50	0	50	10	0	10	180	0	180
A4	120	0	120	60	0	60	60	0	60	20	0	20	170	0	170
A5	20	0	20	100	0	100	10	0	10	10	0	10	130	20	150
A6	60	0	60	30	0	30	20	0	20	80	0	80	100	0	100
	21,4 °C, 33,8 % RH			23 °C, 33,5 % RH			21,2 °C, 32,3 % RH			21,2 °C, 36,2 % RH			21,5 °C, 34,7 % RH		

Tabulka 24: Monitoring povrchů ve výrobním prostoru I - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů na povrchu: výsledky (CFU/100 cm ²)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
A1	0	0	0	24	0	124	0	0	0	0	0	0	20	0	20
A1	8	0	8	36	0	36	28	0	28	4	0	4	0	0	0
A1	0	0	0	0	0	0	8	0	8	8	0	8	8	0	8
A1	0	0	0	--	--	--	--	--	--	0	0	0	--	--	--
A2	0	0	0	4	0	4	0	0	0	40	0	40	4	0	4
A2	4	0	4	0	0	0	24	0	24	4	0	4	24	0	24
A2	52	0	52	16	0	16	12	0	12	8	0	8	8	0	8
A2	0	0	0	20	0	20	0	0	0	12	0	12	4	0	4
A2	8	0	8	--	--	--	--	--	--	52	0	52	--	--	--
A2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4	0	4	--	--	--

Tabulka 25: Monitoring vzduchu ve výrobním prostoru II - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu: výsledky (CFU/m ³)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
B1	10	10	20	40	0	40	100	0	100	30	0	30	10	0	10
B2	120	10	120	0	0	0	80	0	80	60	10	70	10	0	10
B3	40	0	40	90	0	90	40	0	40	20	20	40	80	20	100
	22,1 °C, 53 % RH			22,2 °C, 52,4 %			22,2 °C, 51,1 % RH			22,6 °C, 53,9 % RH			22,9 °C, 51 % RH		

Tabulka 26: Monitoring povrchů ve výrobním prostoru II - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů na povrchu: výsledky (CFU/100 cm ²)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
B1	--	--	--	--	--	--	4	0	4	--	--	--	--	--	--
B1	--	--	--	--	--	--	4	0	4	--	--	--	--	--	--
B1	--	--	--	--	--	--	0	0	0	--	--	--	--	--	--
B2	0	0	0	0	0	0	--	--	--	0	0	0	0	0	0
B2	12	0	12	0	0	0	--	--	--	12	0	12	0	0	0
B2	8	0	8	20	0	20	--	--	--	24	0	24	4	0	4
B3	100	0	100	96	0	96	60	0	60	0	0	0	72	0	72
B3	0	0	0	4	0	4	--	--	--	4	0	4	0	0	0
B4	0	0	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0	16	0	16
B4	--	--	--	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ostatní	8	0	8	4	0	4	16	0	16	8	0	8	12	0	12

Tabulka 27: Monitoring vzduchu ve výrobním prostoru III - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu: výsledky (CFU/m ³)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
C1	140	10	150	70	0	70	120	0	120	60	10	70	60	0	60
C2	60	0	60	30	0	30	60	0	60	20	0	20	90	0	90
C3	40	0	40	30	0	30	60	0	60	30	0	30	10	0	10
	20,9 °C, 38,3 % RH			21,1 °C, 31,2 % RH			21,4 °C, 21,1 % RH			20,9 °C, 33,4 % RH			21,4 °C, 25,0 % RH		

Tabulka 29: Monitoring vzduchu ve výrobním prostoru IV - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů ze vzduchu: výsledky (CFU/m ³)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
D1	90	10	100	140	0	140	30	0	30	60	20	80	90	0	90
D2	30	70	100	0	0	0	50	0	50	10	20	30	60	0	60
D3	150	50	200	40	0	40	10	0	10	40	0	40	0	0	0
	24,4 °C, 33,8 % RH			22,2 °C, 38,6 % RH			21,8 °C, 35,7 % RH			21,4 °C, 38,4 % RH			21,3 °C, 44,5 % RH		

Tabulka 30: Monitoring povrchů ve výrobním prostoru IV - výsledné hodnoty měření za období listopad 2023 až březen 2024

Stanovení počtu mikroorganismů na povrchu: výsledky (CFU/100 cm ²)															
Označení	Listopad			Prosinec			Leden			Únor			Březen		
	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem	Bakterie	Plísně a kvasinky	Celkem
D1	100	0	100	0	0	0	0	0	0	20	0	20	8	0	8
D2	16	0	16	36	4	40	36	0	36	60	0	60	32	0	32
D3	4	0	4	12	16	28	0	0	0	40	0	40	12	0	12
D4	100	0	100	0	52	52	0	0	0	4	0	4	0	0	0
D5	20	0	20	40	0	40	4	0	4	0	0	0	20	0	20
D6	4	0	4	4	0	4	0	0	0	8	0	8	8	0	8
D7	20	0	20	32	0	32	0	0	0	0	0	0	40	0	40
D7	--	--	--	36	0	36	0	0	0	8	0	8	16	0	16
D8	8	0	8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
D8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
D9	24	0	24	--	--	--	0	0	0	0	0	0	--	--	--
D9	8	0	8	4	0	4	0	0	0	4	0	4	--	--	--
Ostatní	--	--	--	--	--	--	28	0	28	16	0	16	28	0	28
Ostatní	--	--	--	--	--	--	60	0	60	--	--	--	--	--	--