

## **Załącznik nr 9 do SWZ**

Zgodnie z punktem 4.34, 4.35 (ang. “4.34 The disinfection process should be validated. Validation studies should demonstrate the suitability and effectiveness of disinfectants in the specific manner in which they are used and on the type of surface material, or representative material if justified, and should support the in-use expiry periods of prepared solutions. 4.35 Disinfectants and detergents used in grade A and grade B areas should be sterile prior to use. Disinfectants used in grade C and D may also be required to be sterile where determined in the CCS. Where the disinfectants and detergents are diluted / prepared by the sterile product manufacturer, this should be done in a manner to prevent contamination and they should be monitored for microbial contamination. Dilutions should be kept in previously cleaned containers (and sterilized where applicable) and should only be stored for the defined period. If the disinfectants and detergents are supplied “ready-made” then results from certificates of analysis or conformance can be accepted subject to successful completion of the appropriate vendor qualification.”) firmy farmaceutyczne są zobowiązane do walidacji procesów dezynfekcji. W NCBJ OR Polatom przeprowadzono walidację na wybranych środkach do dezynfekcji związaną z ekspozycją mikroorganizmów in vitro wg własnej procedury z użyciem próbek powierzchni własnych, wykorzystując lokalne szczepy (własne),

Środki do dezynfekcji zostały wybrane ze względu na różne rodzaje substancji aktywnych (zgodnie z GMP środki należy różnicować ponieważ niektóre mikroorganizmy odznaczają się naturalną odpornością na czynniki chemiczne lub wykształcają mechanizmy adaptacyjne warunkujące zmniejszoną wrażliwość na związki biobójcze) o zróżnicowanych właściwościach i mechanizmach działania (środki biobójcze, grzybobójcze, sporobójcze, wirusobójcze). Dwa dezynfektanty wybrano ze względu na ich sterylność. W pomieszczeniach farmaceutycznych o klasie czystości A i B można stosować tylko jałowe dezynfektanty.

Poniżej znajduje się procedura wg której należy przeprowadzić badanie skuteczności wybranych środków do dezynfekcji.

### **Procedura własna OR Polatom:**

#### **1. CEL**

Celem niniejszej instrukcji jest potwierdzenie, że środki dezynfekujące stosowane w obszarach produkcyjnych OR POLATOM odznaczają się pożądaną skutecznością określoną przez producenta.

#### **2. PRZEDMIOT I ZAKRES STOSOWANIA**

Przedmiotem instrukcji jest ocena skuteczności środków do dezynfekcji, rutynowo używanych w różnych strefach czystości w OR POLATOM.

#### **3. TERMINOLOGIA, INFORMACJE DODATKOWE**

*UWAGA! Przy operacjach z żywymi mikroorganizmami oraz przedmiotami wykorzystywanymi przy tych zabiegach należy używać jednorazowych rękawic oraz środków do dezynfekcji. Wszelkie odpady biologiczne lub przedmioty, które miały kontakt z mikroorganizmami należy umieścić w workach polietylenowych z napisem „odpady medyczne” (...)*

W zależności od wytwarzanej formy leku oraz wykonywanych czynności w OR POLATOM wyróżnia się następujące klasy czystości:

- strefa biała klasa A,
- strefa biała klasa B,
- strefa biała klasa C,
- strefa biała klasa D,
- strefa szara,
- strefa czarna.

**Dezynfekcja** (odkażanie) – czynności zmierzające do maksymalnego zmniejszenia liczby drobnoustrojów (form wegetatywnych i przetrwalnikowych) na danej powierzchni środkami chemicznymi do poziomu nie stwarzającego zagrożenia oraz zapobieżeniu ich dalszego rozprzestrzeniania.

**Mikroorganizmy lokalne** – mikroorganizmy pozyskane w OR POLATOM z monitoringu powietrza, powierzchni, personelu, półproduktów lub z badania jałowości produktów.

## **4. OPIS POSTĘPOWANIA**

### **4.1. Urządzenia i materiały**

- szczep(y) mikroorganizmów przechowywane w -70°C (lokalna kolekcja szczepów);
- sterylne jednorazowe ezy;
- pożywki do wyboru (TSA, TSA z 5% krwią, podłoże Sabouraud itp.);
- sterylne jednorazowe głaszczki;
- 0,45% roztwór NaCl – jałowy;
- DensiCheck Plus ze standardami w skali McFarlanda;
- wybrane środki do dezynfekcji;
- wybrane próbki powierzchni 10 cm x 10 cm lub 5 cm x 20 cm;
- mikropipety automatyczne;
- sterylne końcówki do mikropipet automatycznych;
- pipety Pasteura;
- sterylne fiolki;
- woda peptonowa z neutralizatorami;
- jałowe wymazówki;
- fiolki 15 ml typu Falcon.
- jałowa woda
- karty identyfikacyjne VITEK 2 compact;
- 75 mm x 12 mm przezroczyste probówki z polistyrenu;
- karty do identyfikacji mikroorganizmów VITEK 2;
- dyspenser;

- VITEK 2 compact – zautomatyzowany system do identyfikacji mikroorganizmów (metoda biochemiczna).

#### 4.2. Mikroorganizmy lokalne

Mikroorganizmy lokalne pobrane z banku szczepów lokalnych należy rozmrozić (...). Mikroorganizmy użyte do inokulacji nie powinny być pasażowane więcej niż 5 razy począwszy od oryginalnej próbki, co oznacza, że z zamrożone drobnoustroje można pasażować dwukrotnie.

Tylko mikroorganizmy, które poprawnie zidentyfikowano poprzez barwienie Grama (...) i metodami biochemicznymi wykorzystując automatyczny system VITEK 2 compact (...) mogą być wykorzystane do badań skuteczności. Drobnoustroje, których nie zidentyfikowano poprawnie powyższymi testami należy wykluczyć z badań oceny skuteczności.

#### 4.3. Wykonanie

Wszystkie środki do dezynfekcji stosowane do badania oceny skuteczności powinny być rozcieńczone do stosowanego stężenia, jeżeli nie są od razu gotowe do użycia. Szczepy mikrobiologiczne przeznaczone do badań powinny zostać zawieszone w jałowym 0,45% NaCl do gęstości optycznej 0,5 McFarlanda w przypadku bakterii i 3,0-3,5 McFarlanda w przypadku drożdży. Sześć próbek (płytek) wybranej powierzchni o całkowitej powierzchni 100 cm<sup>2</sup> umyć i wyjałowić w sterylizatorze. Nanieść mikropipetą 1 ml zawiesiny mikroorganizmów na każdą z powierzchni płytki podzielonej na pół i pozostawić na ok 1-2 h do wyschnięcia. W przypadku drożdży i drożdżaków element suszenia jest pominięty ze względu na niewielką ich przeżywalność podczas tego etapu.

Na jedną z oznaczonych powierzchni (50 cm<sup>2</sup>) pipetą Pasteura nanieść 2 ml - 3 ml (w zależności od napięcia powierzchniowego roztworu) wybranego środka do dezynfekcji. Drugą połowę powierzchni należy pozostawić bez nanoszenia środka do dezynfekcji. Po czasie np. 1 min., 3 min., 5 min., 10 min czy więcej minut. Pobrać pipetą i wymazówką lub samą wymazówką z całej oznaczonej (odpowiednio ze środkiem do dezynfekcji i bez wprowadzonego dezynfektanta) powierzchni próby do badań. Wymazówkę wymieszać na wytrząsarce w 5 ml wody peptonowej z neutralizatorami (lub w innym czynniku neutralizującym) w probówce typu Falcon. Następnie dopełnić probówkę typu Falcon do 10 ml wodą peptonową z neutralizatorami (lub w innym czynnikiem neutralizującym). Badane próby w wodzie peptonowej z neutralizatorami rozcieńczyć kolejno jak następuje 1:10, 1:100, 1:1000. Rozcieńczenia wysiać na płytki z pożywką, np. TSA w objętości 0,1 ml w 2 powtórzeniach (metoda posiewu powierzchniowego). Materiał rozprowadzić jałową głaszczką na powierzchni całego podłoża. Płytki inkubować w 35°C przez 24 h - 48 h. Policzyć wyrosłe kolonie.

#### 4.3.1. Wyniki

Do analizy statystycznej policzyć średnią z 6 powtórzeń. Do odczytu wybrać płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 15 do 300 kolonii. Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 ml obliczyć wg wzoru:

$$L = C \cdot d \cdot a / (N_1 + 0,1N_2)$$

gdzie:

*C* - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia;

*N<sub>1</sub>* - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia;

*N<sub>2</sub>* - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia;

*d* - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu;

*a* - współczynnik posianej ilości materiału przy posiewie np. 0,1 ml, *a*=10.

Log redukcji oblicz używając następującego wzoru

Log<sub>10</sub> współczynnika redukcji = Log<sub>10</sub> ilości mikroorganizmów naniesionych - Log<sub>10</sub> ilości mikroorganizmów naniesionych po użyciu dezynfektanta.

Policzyć w % ilość zabitych mikroorganizmów po zastosowaniu środka do dezynfekcji.

Bakteriobójcze działanie środka do dezynfekcji jest zdefiniowane jako jest zmniejszenie liczby cfu o co najmniej 5 log<sub>10</sub>.

Grzybobójcze działanie środka do dezynfekcji jest zdefiniowane jako jest zmniejszenie liczby cfu o co najmniej 4 log<sub>10</sub>

#### 4.3.2. Zapisy

Po otrzymaniu wszystkich wyników Wykonawca wypełnia Raport. Ocena skuteczności środków do dezynfekcji

Poniżej znajduje się forma raportu w jakim opisuje się przeprowadzone badanie wraz z wynikami.

#### Raport:

##### 1. Temat

Ocena skuteczności środków do dezynfekcji

##### 2. Zasada metody

Działanie biobójcze jest oceniane na podstawie dodania środka do dezynfekcji na wybraną próbkę powierzchni z naniesioną określoną liczbą mikroorganizmów. Wszystkie środki do dezynfekcji do badania oceny skuteczności powinny być rozcieńczone do stosowanego stężenia, jeżeli nie są od razu gotowe do użycia.

Mikroorganizmy użyte w teście są pozyskane w OR POLATOM z monitoringu powietrza, powierzchni, personelu, półproduktów lub z badania jałowości produktów.

##### 3. Metoda

Liczba mikroorganizmów w roztworze jest oznaczana metodą posiewu powierzchniowego. Izolaty wykorzystane do testu są identyfikowane i weryfikowane poprzez wykonanie barwienia Grama i biochemiczną ocenę z zastosowaniem testów Vitek 2 compact.

Metoda rozcieńczenia - neutralizacji – czynnik neutralizujący jest używany do neutralizacji biobójczego działania środka do dezynfekcji.

**4. Środek do dezynfekcji**

**5. Wybrany(e) szczep(y) do badań**

**6. Czas oddziaływania dezynfektanta**

**7. Warunki inkubacji**

**8. Wyniki badań**

**9. Kryteria akceptacji**

Bakteriobójcze działanie środka do dezynfekcji jest zdefiniowane jako jest zmniejszenie liczby mikroorganizmów o co najmniej  $5\log_{10}$  a grzybobójcze jako jest zmniejszenie liczby mikroorganizmów o co najmniej  $4\log_{10}$

**10. Podsumowanie**

**Do raportu należy dołączyć certyfikaty użytych materiałów.**

„W przypadku zgłoszenia oferty środków, spełniających wymagania równoważne, lecz innych niż środki, dla których zostały wykonane badania w OR POLATOM (wymienione w formularzu asortymentowo- cenowym- Załącznik nr 5 do SWZ, Wykonawca zobowiązany jest do wykonania na swój koszt analogicznych badań, zgodnie z opisanym wyżej protokołem i dostarczenia raportu z wykonanych badań. Badania powinny zostać przeprowadzone w akredytowanym laboratorium, w celu zagwarantowania kompetencji i wysokiej jakości badań. Badania należy przeprowadzić z użyciem próbek powierzchni własnych OR POLATOM oraz z wykorzystaniem wymienionych w protokole szczepów wzorcowych i szczepów lokalnych (szczepy własne OR POLATOM).