



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.9.2.006>
УДК [57.086.132:611.018.54]:615.076



Вяткина О.И.

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

Оценка аэрозольных частиц как косвенный индикатор микробиологической чистоты лиофилизации плазмосодержащих компонентов и препаратов крови

Конфликт интересов: не заявлен.

Благодарности. Автор выражает благодарность заведующему отделом клеточных биотехнологий РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, профессору Потапневу М.П. за значимые замечания и советы при проведении исследования и оформлении данной статьи.

Работа выполнена в рамках НИОКТР «Разработать нормативное обеспечение микробиологического контроля в организациях переливания крови Республики Беларусь (2018–2020 гг.)» (№ госрегистрации 20181376).

Подана: 24.04.2023

Принята: 26.05.2023

Контакты: baklab@blood.by

Резюме

Производство лиофилизированных компонентов плазмы крови требует сведения к минимуму риска контаминации микроорганизмами, аэрозольными частицами и пирогенами. Отсутствие конечной стадии стерилизации лиофилизированных компонентов плазмы крови увеличивает риски контаминации готовой продукции и повышает потенциальную значимость концентрации аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм, которые могут сорбировать на своей поверхности микроорганизмы.

Цель. Выявить влияние комплекса противомикробных мероприятий на содержание аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм и результаты микробиологического испытания воздушной среды производственных помещений группы лиофилизации отдела промышленного производства лекарственных средств РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

Материалы и методы. Материалом служили результаты микробиологического мониторинга и оценки содержания аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм в 1 м³ воздуха производственной среды группы лиофилизации отдела промышленного производства лекарственных средств за 2020–2022 гг., а также результаты оценки риска бактериальной контаминации криопреципитата лиофилизированного за аналогичный период.

Результаты. Установлено, что в результате проведенного комплекса корректирующих мероприятий было получено улучшение отдельных контролируемых показателей воздушной среды: количество превышений концентрации аэрозольных частиц размером 0,5 мкм снизилось с 70% в 2020 г. до 37% в 2022 г., уменьшилось количество превышений значений приемлемых величин уровня микробной контаминации воздушной среды с 5% в 2020 г. до 0 в 2022 г. В 2022 г. не было забраковано ни одной серии криопреципитата лиофилизированного в сравнении с 2020 г. и 2021 г.

Комплекс проводимых мероприятий не оказал существенного влияния на количество частиц размером 5,0 мкм в 1 м³ воздуха.

Заключение. Обеспечение должного уровня бактериальной безопасности лиофилизированных компонентов плазмы крови требует разработки комплекса мероприятий, учитывающего особенности производственного процесса, и не исключает необходимости мониторинга концентрации аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм.

Ключевые слова: лиофилизированные компоненты плазмы крови, бактериальная контаминация, аэрозольные частицы

Viatkina O.

Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology,
Minsk, Belarus

Evaluation of Aerosol Particles as an Indirect Indicator of the Microbiological Purity of Lyophilization of Plasmas Containing Components and Blood Products

Conflict of interest: nothing to declare.

Credits. The author expresses gratitude to the Head of the Department of Cellular Biotechnologies of Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology, Professor M. Potapnev for significant comments and advice during the research and the design of this article.

The work was carried out within the framework of the RTD "To develop regulatory support for microbiological control in blood transfusion organizations of the Republic of Belarus (2018-2020)" (State registration no. 20181376).

Submitted: 24.04.2023

Accepted: 26.05.2023

Contacts: baklab@blood.by

Abstract

The production of lyophilized blood plasma components requires minimizing the risk of contamination by microorganisms, aerosol particles and pyrogens. The absence of the final stage of sterilization of lyophilized blood plasma components increases the risks of contamination of the finished product and increases the potential significance of the concentration of aerosol particles of 0.5 and 5.0 microns in size, which can adsorb microorganisms on their surface.

Purpose. To reveal the effect of a complex of antimicrobial measures on the content of aerosol particles with a size of 0.5 and 5.0 μm and the results of microbiological tests of the air environment of the industrial premises of the lyophilization group of the department of industrial production of medicines of the Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies.

Materials and methods. The material was the results of microbiological monitoring and assessment of the content of aerosol particles of 0.5 and 5.0 μm in 1 m³ of air in the production environment of the lyophilization group of the industrial production of medicines department for 2020–2022, as well as the results of assessing the risk of bacterial contamination of lyophilized cryoprecipitate for the same period.



Results. It was found that as a result of the complex of corrective measures taken, an improvement in certain controlled indicators of the air environment was obtained: the number of exceedances of the concentration of aerosol particles with a size of 0.5 microns decreased from 70% in 2020 to 37% in 2022, decreased the number of exceedances of acceptable level values air microbial contamination from 5% in 2020 to 0 in 2022. In 2022, not a single batch of freeze-dried cryoprecipitate was rejected in comparison with 2020 and 2021.

The set of measures taken did not have a significant impact on the number of particles with a size of 5.0 microns in 1 m³ of air.

Conclusions. To ensure a sufficient level of bacterial safety of lyophilized blood plasma components, it is necessary to develop a set of measures that take into account the specifics of the production process and does not exclude the need to monitor the concentration of aerosol particles with a size of both 0.5 and 5.0 microns.

Keywords: lyophilized blood plasma components, bacterial contamination, aerosol particles

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время роль бактериальной контаминации продуктов крови повышается на фоне действующих высоких требований к обследованию доноров крови на возбудители вирусных инфекций, использованию вирусбезопасных технологий приготовления лекарственных препаратов из плазмы, внедрению патогенредуцирующих технологий обработки компонентов крови [1, 2].

Компонент крови Криопреципитат выпускают в замороженном виде или как лиофилизированный порошок для приготовления раствора для внутривенного введения. Лيوфилизированный криопреципитат получают, размораживая свежемороженную плазму при температуре от +1 °C до +6 °C, которую затем центрифугируют, ресуспендируют осажденные белки, повторно замораживают [3] и лиофилизируют [4]. Эта составляющая плазмы содержит основное количество фактора VIII и фибриногена. Также криопреципитат содержит фактор Виллебранда, фактор XIII и фибронектин [3].

Кроме криопреципитата, в лиофилизированной форме выпускают фибриноген и тромбин, которые являются лекарственными препаратами и используются для остановки капиллярных и паренхиматозных кровотечений для местного применения.

Лيوфилизация – это процесс мягкого высушивания материала из замороженного состояния, который позволяет сохранить белки и другие биологически активные вещества практически неизменными [4].

Производство лиофилизированных компонентов и препаратов плазмы крови требует соблюдения санитарно-гигиенических требований, соответствующих или близких к требованиям, предъявляемым к фармацевтическим производствам. Целью соблюдения данных требований является обеспечение микробиологической безопасности готовой продукции – компонента крови «криопреципитат лиофилизированный».

Таблица 1
Нормативы содержания аэрозольных частиц и микробиологическая чистота воздуха
производственных помещений группы лиофилизации
Table 1
Standards for the content of aerosol particles and microbiological purity of air in industrial premises
of the lyophilization group

Класс	Максимальное допустимое число частиц в 1 м³ воздуха при размере частиц равном или большем				Микробиологическая чистота воздушной среды, КОЕ/м³
	в оснащенном состоянии		в эксплуатируемом состоянии		
	0,5 мкм	5,0 мкм	0,5 мкм	5,0 мкм	
C/D	352 000	2 900	3 520 000	29 000	50

В большинстве случаев бактериальной контаминации компонентов крови источником инфицирования являются кожные покровы донора (реже медицинского персонала), однако для криопреципитата лиофилизированного, который получают в ходе многостадийного технологического процесса, микробиологическая чистота воздуха является более актуальным источником бактериальной контаминации и поэтому подлежит обязательному контролю. Повышение уровня микробиологического обсеменения воздуха увеличивает риск контаминации технологических продуктов переработки плазмы. Более того, конечные этапы производства криопреципитата лиофилизированного требуют создания условий для сведения к минимуму риска контаминации микроорганизмами, частицами и пирогенами, так как процесс лиофилизации является конечной технологической стадией производства [5].

Микробиологический мониторинг чистоты производственных помещений, используемых при производстве криопреципитата лиофилизированного, осуществляется с учетом критичности выполняемых операций и включает не только мониторинг микробиологической чистоты воздуха, но и определение концентрации аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм.

Потенциальная значимость контроля аэрозольных частиц определяется тем, что: 1) чем меньше их величина, тем дольше они находятся в воздухе, 2) частицы размером 1–5 мкм нередко несут на себе микроорганизмы [5].

Чистота помещений для производства стерильной продукции классифицируется в соответствии с требуемыми характеристиками производственной среды (табл. 1).

■ **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Выявить влияние комплекса противомикробных мероприятий на содержание аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм и результаты микробиологического испытания воздушной среды производственных помещений группы лиофилизации отдела промышленного производства лекарственных средств на примере РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

■ **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом служили результаты исследования содержания аэрозольных частиц размером 0,5 и 5,0 мкм и микробиологических испытаний воздуха производственных помещений группы лиофилизации, а также результаты оценки риска бактериальной контаминации криопреципитата лиофилизированного за 2020–2022 гг.



Исследования содержания аэрозольных частиц в воздухе проводили с использованием счетчика аэрозольных частиц AEROTRACK 9306 (TSI Inc., США) в соответствии с инструкцией по использованию аппарата. Минимальное количество точек отбора и объем пробы воздуха для определения концентрации аэрозольных частиц осуществлялось в соответствии с требованиями ТКП 435-2017 (33050) «Производство лекарственных средств. Квалификация чистых помещений». Расположение контрольных точек было репрезентативным для каждого из выбранных секторов производственного помещения. Счетчик частиц располагался на высоте проведения рабочей операции. Результат каждого измерения записывался как количество частиц в кубическом метре воздуха (концентрация частиц).

Микробиологические испытания воздушной среды проводили аспирационным методом с помощью аспиратора ПУ – 1Б (ЗАО «Химко», Россия). Количество контрольных точек определялось в соответствии с требованиями ТКП 441-2012. В каждой контрольной точке объем пробы составлял по 1 м³ воздуха на две чашки Петри (диаметр 90 мм) с питательной средой для выращивания бактерий (среда № 1) и на две чашки Петри со средой для выращивания грибов (среда № 2). После отбора проб воздуха чашки помещали в термостат для последующего культивирования в течение двух суток при температуре 32,5±2,5 °С (среда № 1) и 22,5±2,5 °С (среда № 2) в течение 5 суток. После окончания инкубации проводился подсчет количества колоний микроорганизмов, образовавшихся в каждой чашке Петри. Результаты представляли как концентрацию микроорганизмов в 1 м³ воздуха (значение наиболее вероятного числа осажденных микроорганизмов в зависимости от числа колоний в 1 м³ – расчет производился согласно Приложению к инструкции по эксплуатации аспиратора). Для последующего анализа данные представляли как показатель частоты неудовлетворительных результатов по отношению к проведенным. Как неудовлетворительные рассматривали значение 51 КОЕ/м³ и более, обращая особое внимание на микробный пейзаж изолятов.

Оценку риска бактериальной контаминации криопреципитата лиофилизированного проводили в соответствии с требованиями п. 23 и 29 приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08 апреля 2022 г. № 467 как с использованием автоматического анализатора гемокультур BacT/ALERT (BioMerieux, Франция), так и методом прямой инокуляции питательной среды. При работе с автоматическим анализатором гемокультур BacT/ALERT 3D использовали одноразовые флаконы SA Culture Bottles (для выделения аэробных гемокультур) и флаконы SN Culture Bottles (для выделения анаэробных гемокультур). Посев и учет результатов осуществлялись в соответствии с рекомендациями производителя.

При проведении прямой инокуляции питательной среды посев образцов криопреципитата лиофилизированного производили в жидкую тиогликолевую среду и жидкую среду Сабуро (по 2 пробирки каждого наименования питательной среды). Инокулированную жидкую тиогликолевую среду инкубировали при температуре 32,5±2,5 °С, среду Сабуро – при температуре 22,5±2,5 °С, длительность инкубации составила 14 суток. В течение всего периода инкубации, а также по его завершении оценивали наличие в питательных средах макроскопических признаков микробного роста. При отсутствии признаков микробного роста образцы криопреципитата лиофилизированного признавали выдерживающим испытание по оценке риска бактериальной контаминации. При обнаружении признаков микробного роста в жидких

питательных средах проводили пересев на неселективные плотные питательные среды с последующей идентификацией выросших колоний микроорганизмов общепринятыми методами.

Полученные данные рассчитывали как отношение положительных результатов к проведенному количеству исследованных серий.

Устойчивость производственных изолятов к рабочим растворам дезинфицирующих средств, используемых при подготовке производственных помещений группы лиофилизации, определяли с помощью Тест-систем для определения устойчивости бактерий к дезинфектантам (ООО «НПЦ ХИММЕДСИНТЕЗ», Республика Беларусь) в соответствии с инструкцией к тест-системе.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего в течение 2020–2022 гг. проведено 420 исследований содержания аэрозольных частиц (в том числе 210 исследований количества аэрозольных частиц размером 0,5 мкм и 210 исследований размером 5 мкм) и 262 исследования микробиологической чистоты воздуха. Исследования проводились при каждой загрузке и выгрузке лиофилизированных флаконов в оснащенный и эксплуатируемом состоянии работниками лаборатории бактериологического контроля (табл. 2).

Проведенные исследования показали, что суммарно в 49,5% (104 из 210) случаев количество частиц размером 0,5 мкм и в 7,6% (16 из 210) случаев количество частиц размером 5,0 мкм превышали максимально допустимые значения, представленные в табл. 1. Превышение значения приемлемых величин уровня микробной контаминации воздушной среды было установлено в 2,2% случаев (6 из 262). За анализируемый период исследовано 73 серии (511 флаконов) криопреципитата лиофилизированного (2020 г. – n=25, 2021 г. – n=27, 2022 г. – n=21). В 2020 г. и 2021 г. по причине бактериальной контаминации были забракованы по одной серии криопреципитата лиофилизированного (2020 г. – 1/25 (4%), 2021 г. – 1/27 (3,7%)).

Каждый случай подлежал обязательному расследованию, в ходе которого было установлено, что наиболее вероятным источником контаминации являлся воздух

Таблица 2
Анализ частоты превышения допустимого числа частиц размером 0,5 и 5,0 мкм в 1 м³ воздуха и микробиологической чистоты воздушной среды при мониторинге группы лиофилизации за 2020–2022гг.
Table 2
Analysis of the frequency of exceeding the permissible number of particles with a size of 0.5 and 5.0 microns in 1 m³ of air and the microbiological purity of the air monitoring the lyophilization group for 2020–2022

Наименование контролируемого показателя	Годы		
	2020	2021	2022
Концентрация аэрозольных частиц размером 0,5 мкм	42/60 (70%)	38/85 (45%)	24/65 (37%)*
Концентрация аэрозольных частиц размером 5,0 мкм	5/60 (8,3%)	8/85 (9%)	3/65 (8%)
Микробиологические испытания воздушной среды	4/80 (5%)	2/96 (2%)	0/86 (0)

Примечания: данные представлены как отношение положительных результатов микробиологического посева к проведенным; * различия статистически значимы при сравнении 2020 г. и 2022 г. (по критерию χ^2 Пирсона; $p=0,07$).



производственного помещения (результаты микробиологических испытаний и содержание аэрозольных частиц, преимущественно размером 0,5 мкм, превышали приемлемые значения).

Выделенные производственные изоляты в ходе расследования случаев бактериальной контаминации криопреципитата лиофилизированного являлись грамположительными палочками (*Propionibacterium*), а также грамположительными спорообразующими палочками (*Bacillus*), в одном случае были выделены плесени (*Aspergillus*). Наиболее вероятными источниками вышеуказанных производственных изолятов могут быть персонал, а также пыль (аэрозольные частицы). В ходе расследования были проведены исследования по оценке устойчивости производственных изолятов к используемым при подготовке производственных помещений рабочим растворам дезинфицирующих средств: 0,5%-ный рабочий раствор «Аминосан» (вирулицидный режим, время экспозиции 30 мин.) и 3,0%-ный рабочий раствор «Аминосан» (фунгицидный режим, время экспозиции 45 мин.), 0,5%-ный рабочий раствор «Окси-плюс – мед» (фунгицидный и вирулицидный режим, время экспозиции 30 мин.), 0,25%-ный рабочий раствор «Санит-час» (вирулицидный режим, время экспозиции 30 мин.) и 0,5%-ный рабочий раствор (фунгицидный, время экспозиции 10 мин.), 6%-ный раствор пероксида водорода и синтетического моющего средства «Лотос». Использованы рабочие растворы по вирулицидному режиму вместо бактерицидного с учетом политики в области качества учреждения (профилактика передачи парентеральных вирусных гепатитов).

Выделенные производственные изоляты бактерий продемонстрировали чувствительность к рабочим растворам дезинфицирующих средств, приготавливаемых по вирулицидному режиму (0,5%-ный рабочий раствор «Аминосан» и «Окси-плюс – мед», 0,25%-ный «Санит-час»). В отношении производственного изолята плесневых грибов 0,5%-ный рабочий раствор «Окси-плюс – мед» оказался неэффективным (устойчивая культура), 3%-ный рабочий раствор «Аминосан» и 0,5%-ный рабочий раствор «Санит-час» оказались эффективны в отношении данного изолята (культура чувствительна).

Все выделенные производственные изоляты бактерий и грибы продемонстрировали устойчивость к 6%-ному раствору пероксида водорода и синтетического моющего средства (дезинфектант неэффективен). До 2021 г. данный рабочий раствор являлся основным при проведении подготовки производственных помещений к работе.

В связи с необходимостью смены не реже одного раза в квартал рабочих растворов дезинфицирующих средств (предотвращение выработки устойчивости) для производственных помещений группы лиофилизации был разработан отдельный алгоритм с учетом полученных результатов тестирования производственных изолятов. Начиная с 2020 г. для улучшения контролируемых показателей воздушной среды в группе лиофилизации был проведен комплекс корректирующих мероприятий (табл. 3).

Как видно из табл. 3, проведение дополнительных организационных мероприятий и лабораторных исследований позволило выявить новые возможности повышения микробиологической безопасности производственных процессов (лиофилизация плазмосодержащих компонентов и препаратов крови). При этом дополнительным информативным критерием безопасности выступает концентрация аэрозольных частиц размером 0,5 мкм.

Таблица 3
Корректирующие мероприятия, разработанные для группы лиофилизации за 2020–2022 гг.
Table 3
Corrective measures developed for the lyophilization group for 2020–2022

Годы	Наименование мероприятия	Эффективность
2020	Корректировка логистики движения персонала в производственном помещении	Снижение количества превышений концентрации аэрозольных частиц размером 0,5 мкм с 70% в 2020 г. до 37% в 2022 г.
2021–2022	Оптимизация алгоритма подготовки производственных помещений к работе	Уменьшение количества превышений значений приемлемых величин уровня микробной контаминации воздушной среды с 5% в 2020 г. до 0 в 2022 г.
2021–2022	Разработка и внедрение системы типирования производственных изолятов	
2022	Определение чувствительности производственных изолятов к рабочим растворам дезинфицирующих средств	В 2022 г. ни одна серия криопреципитата лиофилизированного не была забракована по причине бактериальной контаминации

Примечания: комплекс проводимых мероприятий не оказал существенного влияния на количество частиц размером 5,0 мкм в 1 м³ воздуха.

■ **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Обеспечение должного уровня бактериальной безопасности лиофилизированных компонентов плазмы крови требует разработки комплекса мероприятий, учитывающего особенности производственного процесса и мониторинга концентрации аэрозольных частиц размером как 0,5, так и 5,0 мкм.

Благодаря разработанному в 2020–2021 гг. и оперативно корректируемому комплексу корректирующих мероприятий в 2022 г. был обеспечен выпуск 21 серии безопасного в отношении бактериальной контаминации криопреципитата лиофилизированного.

■ **ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES**

1. Chebotkevich V.N., Kaytandzhan E.I., Kiseleva E.E. et al. Problemyi bakterialnoy bezopasnosti gemotransfuziy. *Rus. Transfuziologiya*. 2015;16(3): 14–24. (in Russian)

2. Potapnev M.P., Eremin V.F. Infektsionnaya bezopasnost donorskoy krovi. *Problemy i resheniya Hematology and Transfusiology*. 2015;8(3):49–56. (in Russian)

3. Zhiburt E.B., Chemodanov I.G., Shestakov E.A. Cryoprecipitate production in Russia: past, present and future. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019;64(1):16–20. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-1-16-20. (in Russian)

4. Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V. et al. Preparing lyophilized plasma with the preserved activity of coagulation factors. *Russian journal of hematology and transfusiology*. 2016;61(4):204–208. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-4-204-208. (in Russian)

5. Viatkina O.I., Potapnev M.P. Aerosolic particle content and microbial contamination of air in the working areas of blood transfusion institutions. *Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*. 2018;4(4):497–505. (in Russian).