

# Mikrobiologická kontrola kvality farmaceutických a kosmetických přípravků

Vendula Varad'ová

---

Bakalářská práce  
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vendula Varaďová**  
Osobní číslo: **T13046**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Mikrobiologická kontrola kvality farmaceutických a kosmetických přípravků**

Zásady pro vypracování:

- 1. Mikroorganismy kontaminující farmaceutické a kosmetické přípravky.**
- 2. Zdroje kontaminace ve farmaceutické a kosmetické výrobě.**
- 3. Mikrobiologická kontrola kvality. Legislativa. Postupy. Správná výrobní praxe.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. GEIS, P. A. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach*. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 295 p. ISBN 978-0-8493-1453-7.
2. ORTH, D. S., DENYER, S. P., KABARA, J. J. *Cosmetic and Drug Microbiology*. New York: Informa Health Care, 2006. 375 p. ISBN 978-0-8493-7266-7.
3. BAIRD, R. M., HODGES, N. A., DENYER, S. P. *Handbook of Microbiological Quality Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. Boca Raton: CRC Press, 2000. 280 p. ISBN 978-0-2033-0519-5 280.
4. DENYER, S. P., BAIRD, R. M. *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. Boca Raton: CRC Press, 2006. 504 p. ISBN 978-1-4200-2162-2.

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

**20. ledna 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**18. května 2016**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ..... VARDYŠOVÁ VERA .....  
.....

Obor: ..... TITK .....  
.....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ..... 19.5.2016.....  
.....

.....  
.....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takové dílo udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídáne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Cílem této bakalářské práce je přiblížit problematiku mikrobiální kontaminace v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu včetně legislativních úprav. V práci jsou popsány jednotlivé mikroorganismy, které mohou kontaminaci způsobit a dále rizikové faktory, které mohou být dalšími příčinami vzniku kontaminace. Následně jsou definovány jednotlivé zkušební metody, jež jsou používány pro identifikaci samotných mikroorganismů.

Klíčová slova: kosmetické přípravky, farmaceutické přípravky, mikrobiologická jakost, kontrola kvality, správná výrobní praxe

## **ABSTRACT**

The purpose of this bachelor's thesis is to approach the issue of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical industry, including legislative changes. In the work are described the individual microorganisms, which may be the reason for the contamination and further risk factors, which can be other causes of contamination. Further are described the individual test methods, which are used for the identification of microorganisms.

Keywords: cosmetic products, pharmaceutical preparations, microbiological quality, quality control, good manufacturing practice

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, kterou byla RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D. za cenné rady a vstřícný přístup při psaní práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za podporu během studia.

*Věnováno mamince...*

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
<b>1 MIKROORGANIZMY KONTAMINUJÍCÍ FARMACEUTICKÉ A KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY .....</b>	<b>12</b>
1.1 BAKTERIE VYSKYTUJÍCÍ SE V KOSMETICKÝCH A FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH.....	12
1.1.1 Rod <i>Pseudomonas</i> .....	13
1.1.2 Rod <i>Escherichia</i> .....	14
1.1.3 <i>Enterobacter</i> .....	15
1.1.4 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	16
1.1.5 Rod <i>Streptococcus</i> .....	17
1.1.6 Rod <i>Bacillus</i> .....	18
1.1.7 Rod <i>Clostridium</i> .....	19
1.2 MIKROSKOPICKÉ HOUBY VYSKYTUJÍCÍ SE V KOSMETICKÝCH A FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH .....	19
1.2.1 Rod <i>Candida</i> .....	20
1.2.2 Rod <i>Aspergillus</i> .....	21
<b>2 ZDROJE KONTAMINACE VE FARMACEUTICKÉ A KOSMETICKÉ VÝROBĚ.....</b>	<b>22</b>
2.1 VODA .....	22
2.2 SUROVINY .....	23
2.3 KONTAMINACE PRACOVNÍKY .....	24
2.4 VÝROBNÍ PROSTORY A JEJICH ZAŘÍZENÍ .....	25
<b>3 LEGISLATIVA .....</b>	<b>27</b>
3.1 LEGISLATIVA PRO KOSMETIKU .....	27
3.1.1 Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku.....	28
3.1.2 Informační dokumentace.....	28
3.1.3 Oznamovací povinnost – tzv. „notifikace“ .....	29
3.1.4 Náležitosti označení .....	29
3.2 LEGISLATIVA PRO FARMACII .....	30
<b>4 POSTUPY MIKROBIOLOGICKÉ KONTROLY .....</b>	<b>34</b>
4.1 ZÁKLADNÍ TECHNIKY IDENTIFIKACE .....	35
4.2 TECHNIKA PRO STANOVENÍ POČTU .....	36
4.3 MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA VODY.....	36
<b>5 MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA KVALITY FINÁLNÍCH VÝROBKŮ.....</b>	<b>37</b>
5.1 LIMITY PRO MIKROORGANIZMY.....	37
5.2 PRŮKAZ SPECIFICKÝCH A NESPECIFICKÝCH MIKROORGANIZMŮ .....	38
<b>6 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE .....</b>	<b>40</b>
6.1 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE VE FARMACII.....	40
6.1.1 Základní pojmy .....	40
6.1.2 Farmaceutický systém jakosti .....	40
6.1.3 Správná výrobní praxe ve farmacii (GMP).....	41



6.2	SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE V KOSMETICE .....	44
6.2.1	Termíny a definice .....	44
6.2.2	Pracovníci.....	44
6.2.3	Prostory a zařízení .....	45
6.2.4	Suroviny a obalové materiály.....	46
6.2.5	Výroba.....	47
6.2.6	Laboratoř kontroly kvality .....	47
6.2.7	Zacházení s výrobkem, který neodpovídá specifikaci .....	47
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>48</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>49</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>54</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>55</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>56</b>

## ÚVOD

Cílem této práce je přiblížit problematiku mikrobiální kontaminace v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Bakterie, plísně i kvasinky jsou běžnými organizmy, které se v prostředí vyskytují, a jejich růst je často podporován nedostatečnou hygienou. Ve výrobních je proto nutné dodržovat zásady, kterými se mikrobiální kontaminace sníží nebo zcela elimiňuje. Jedním z prostředků zamezení možné kontaminace je dodržování zásad správné výrobní praxe (SVP).

Mezi hlavní součásti SVP patří kontrola materiálu, který může být napaden mikroorganismy již během přepravy do výroby. Nedílnou součástí je i kontrola vody, která se při výrobě používá. Vodovodní rozvody umožňují vznik mikrobiálního biofilmu, který je ideálním prostředím pro přežívání a růst mikroorganismů. Proto se konstrukce dopravníku vyvíjí tak, aby byly eliminovány úseky se stojatou vodou. Budovy, prostory a výrobní zařízení také podléhají přísným pravidlům. Samotné vybavení musí být konstruováno tak, aby bylo snadno čistitelné a růst mikroorganismů byl tak významně omezen. Součástí výrobních prostor je i vzduchotechnika, která zajišťuje výměnu vzduchu ve výrobě.

Pro testování mikrobiologické kontaminace výrobního prostředí i pro kontrolu mikrobiologické kvality samotných kosmetických či farmaceutických výrobků je používána řada testovacích metod. Jednotlivé techniky jsou zaměřeny na průkaz určitých mikroorganismů nebo skupin mikroorganismů. Postup pro různá mikrobiologická stanovení je přesně definovaný a podléhá přísným hygienickým podmínkám.

Samotné dodržování podmínek Správné výrobní praxe a dalších opatření je upravováno legislativou. Pro kosmetickou výrobu je to Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích a norma ČSN EN ISO 22176 z roku 2008. Farmaceutický průmysl podléhá zákonu č. 378/2008 Sb., o léčivech ve znění pozdějších předpisů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 MIKROORGANIZMY KONTAMINUJÍCÍ FARMACEUTICKÉ A KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Mezi mikrobiální kontaminanty farmaceutických a kosmetických prostředků patří bakterie, plísňe i kvasinky. Jejich růst a množení v kosmetických a farmaceutických přípravcích může vést jednak k jejich znehodnocení či nežádoucí změně vlastností, ale také může představovat zdravotní riziko pro spotřebitele.

Mikroorganismy lze rozdělit do dvou základních skupin, které se liší strukturou buňky. U prokaryotických mikroorganismů je morfologie buňky výrazně jednodušší než u druhé skupiny, mikroorganismů eukaryotických. Prokaryota (bakterie, sinice a archea) nemají diferencováno pravé jádro, jejich genetickou informaci tvoří pouze kružnicová molekula DNA, která není od okolní cytoplazmy oddělena jadernou membránou. Mezi eukaryotické mikroorganismy s jádrem ohraničeným jadernou membránou patří mikroskopické houby (plísňe a kvasinky), řasy a prvoci. V dalším textu jsou blíže charakterizovány nejvýznamnější zástupci prokaryotických a eukaryotických mikroorganismů kontaminující kosmetické a farmaceutické přípravky [1, s. 11], [2, s. 12].

## 1.1 Bakterie vyskytující se v kosmetických a farmaceutických přípravcích

Bakterie hrají důležitou roli v celém světovém ekosystému. Jsou všudypřítomné a v důsledku širokého výskytu se stávají nežádoucími kontaminanty v mnoha průmyslových odvětvích. Jsou přítomné v půdě, vodě i jako symbionty jiných organismů, některé jsou patogenní. Jejich buněčná stěna je tvořena peptidoglykanem (mureinem). U pohyblivých druhů je pohyb realizován pomocí bičíků. Bakterie mají relativně jednoduchou intracelulární strukturu ve srovnání s eukaryoty, postrádají buněčné jádro a některé organely jako např. mitochondrie nebo chloroplasty. Chromozom bakterií je složen z propleteného řetězce DNA, buňky obsahují ribozomy případně i další specifické struktury jako jsou vnitrobuněčné membrány, plynné váčky nebo magnetozómy. Mohou tvořit kapsuly nebo slizový obal na povrchu buňky. Tyto struktury jim umožňují přilnutí k povrchu substrátu a tvorbu biofilmu. Některé bakterie jsou schopné produkovat endospory umožňující přežití v extrémních podmínkách vnějšího prostředí [2, s. 12-14].

Velikost a tvar bakteriálních buněk je různý u různých bakteriálních druhů, ale závisí také na stáří a fyziologickém stavu kultury. Tvar buněk je nejčastěji tyčinkovitý nebo kulovitý (kok), někdy ohnuté nebo stočené do šroubovice. Vlákňitý tvar se vyskytuje převážně u půdních bakterií. Tloušťka tyčinkovitých bakterií se pohybuje v rozmezí 0,3 - 2  $\mu\text{m}$ , délka bývá 1-7  $\mu\text{m}$ . Průměr koků je zhruba 0,5 – 5,5  $\mu\text{m}$ . Některé druhy však mají rozměry značně větší, např. délka spirochet je až 500  $\mu\text{m}$  [3, s. 103].

Jednou z nejdůležitějších charakteristik bakterií je struktura jejich buněčné stěny, na které závisí výsledek Gramova barvení. Gramovo barvení se používá při identifikaci bakterií. Grampozitivní bakterie mají řadu společných fyziologických znaků odlišujících je od gramnegativních bakterií (např. citlivost k některým antibiotikům, rozdíly v osmotických hodnotách, citlivost na zásaditá a kyselá barviva). Bylo zjištěno, že všechny tyto vlastnosti jsou odrazem rozdílů ve složení buněčné stěny bakterií. Buňky gramnegativního typu mají buněčnou stěnu složenou z vnější membrány a vnitřní relativně tenké peptidoglykanové vrstvy. U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu, která je prostoupena řetězci teichoových kyselin [2, s. 12-14], [3, s. 46].

### **1.1.1 Rod *Pseudomonas***

Pseudomonády jsou gramnegativní rovné nebo mírně zakřivené tyčky, pohyblivé pomocí jednoho nebo několika bičíků. Jsou to bakterie s respiratorním typem metabolismu, které ke svému růstu vyžadují kyslík. Patří mezi mezofilní mikroorganismy, které mají optimální teplotu růstu v rozmezí 25 - 30°C, dokáží ale růst i při teplotách od 4°C do 40°C. Většina druhů nevyžaduje žádné růstové faktory, jsou oxidáza pozitivní nebo negativní a kataláza pozitivní. Pseudomonády jsou široce rozšířené v prostředí, některé druhy jsou patogenní pro člověka, zvířata nebo rostliny. Mohou být multirezistentní, tedy odolávat působení široké škály antimikrobních látek [1, s. 126-127], [2, s. 116-117].

*Pseudomonas aeruginosa* je proslulý kontaminant farmaceutických a kosmetických výrobků, a to zejména očních přípravků (oční patogen), především kvůli jeho zvláštní odolnosti k biocidům, z nichž některé je schopen metabolizovat. Široce rozšířeny je v prostředí, vyhovující patogenům a může způsobit problémy zejména u citlivých skupin pacientů, jako jsou novorozenci a senioři. Je to bičíkatý organizmus ve tvaru tyčinek, který netvoří spóry a roste aerobně. Nezkvašuje tedy sacharidy, a proto neprodukuje plyny při pěstování v jejich přítomnosti. Za vhodných růstových podmínek, může produkovat modrý nebo zelený fluorescenční pigment. *Pseudomonas aeruginosa* roste rychle na běžných kultivačních půdách

včetně krevního agaru a Endova agaru. Typický je amoniakální zápach kolonií starších kultur, který při svém růstu *P. aeruginosa* vydává [4, s. 268], [5, s. 55-57], [6, s. 18], [7, s. 88].



Obrázek 1: *Pseudomonas aeruginosa* [8]

### 1.1.2 Rod *Escherichia*

Bakterie rodu *Escherichia* jsou gramnegativní zástupci významné čeledi *Enterobacteriaceae*. Pro čeleď je charakteristický tyčinkový tvar buněk, neschopnost tvorby endospor a optimální teplota růstu 37°C. Escherichie mohou být nepohyblivé nebo pohyblivé pomocí peritrichálních bičků. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní s respiratorním nebo fermentatorním typem metabolismu. Tyto bakterie rostou na běžných půdách a mají značnou biochemickou aktivitu, glukózu i jiné sacharidy okyselují s tvorbou plynu [2, s.125-126].

Pro kosmetiku a farmacii má největší význam druh *Escherichia coli*, pohyblivá, nesporulující tyčinka typických rozměrů 1 μm × 4 μm. Od *Pseudomonas* se liší tak, že je schopná růst i anaerobně. Při anaerobním způsobu života zkvašuje cukry a vytváří plynné látky. *E. coli* může růst i při nízkých teplotách, ale také při teplotě až 40 °C. Optimální teplota růstu se pohybuje na 37 °C. *E. coli* se jako užitečný komenzál vyskytuje ve střevní mikroflóře obratlovců. Kmeny *E. coli*, které produkují enterotoxiny nebo jiné faktory virulence, způsobují prujmová onemocnění. Tento druh je také hlavním původcem infekcí močových cest a nozokomiálních infekcí včetně septikemií a meningitid. Epidemiologicky patogenní kmeny jsou charakterizovány a identifikovány sérologicky na základě somatických (O), kapsulárních (K) a bičkových (H) antigenů. [2, s. 125-126], [6, s. 18] Vyskytuje se i ve starších vodních systémech, které mohou tvořit biofilm ve stojatých vodách v potrubí. V potravinářství a vodárenství je *E. coli* využívána jako indikátorový mikroorganismus sanitace a zachování a dodržování hygienických podmínek [4, s. 292], [5, s. 57], [6, s. 18], [9, s. 19].

Obrázek 2: *Escherichia coli* [10]

### 1.1.3 *Enterobacter*

Rod *Enterobacter* je dalším zástupcem čeledi Enterobacteriaceae, který může kontaminovat kosmetické či farmaceutické přípravky. Rod zahrnuje 12 druhů, z nichž *Enterobacter cloacae* a *Enterobacter aerogenes* a *Enterobacter sakazakii* jsou druhy nejčastěji izolované z humánního klinického materiálu. Jsou to gramnegativní nesporulující tyčinky, většinou pohyblivé pomocí peritrichálních bičků. Tyto bakterie jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu. Optimální teplota pro růst je 30 až 37°C. Rostou na většině mikrobiologických půd, i na některých selektivních či selektivně diagnostických půdách. Kolonie enterobaktrií vyrůstají zpravidla za 24 hodin. Na krevním agaru produkují velké, šedé a suché nebo slizovité kolonie. Na MacConkey agaru vytváří růžové kolonie díky schopnosti fermentovat laktózu. Bakterie dokáží zkvasit glukózu s produkcí kyseliny, produkují butandiol, ethanol a oxid uhličitý. Enterobaktery žijí ve střevě člověka a zvířat, buď jako součást mikroflóry nebo jako patogen. Jsou široce rozšířené prostředí, nacházejí se ve sladké vodě, v půdě, odpadní vodě, na rostlinách, zelenině, ve zvířecích výkalech i lidské stolici [2, s. 126], [4, s. 287], [5, s. 58], [11, s. 198-200].

Mezi nejvýznamnější a nejčastější druhy kontaminující kosmetické přípravky patří *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter gergoviae* a *Enterobacter cloacae*. Vyskytují se jako kontaminanty povrchově aktivních látek, častá je jejich izolace z vlasové kosmetiky, především z kondicionérů obsahujících kvartérní sloučeniny. Byly zjištěny i v přípravcích jako jsou tělová mléka nebo krémy na ruce a mohou růst ve špatně konzervovaných výrobcích [5, s. 58].



Obrázek 3: *Enterobacter aerogenes* [12]

#### 1.1.4 Rod *Staphylococcus*

Tyto grampozitivní organizmy jsou pravidelně kulaté koky vyskytující se jednotlivě, po dvou nebo v nepravidelných shlucích. Jsou nepohyblivé, nesporulující a fakultativně anaerobní. Kolonie stafylokoků jsou obvykle neprůhledné a mohou být bílé nebo krémové, občas žluté až žlutooranžové barvy. Kolem kolonií bývá beta-hemolýza, jejíž stupeň závisí na kombinaci hemolyzinů. *Staphylococcus* produkují řadu enzymů, jako je hyaluronidáza, proteináza, lipáza, koaguláza a penicillináza. Stafylokoky patří mezi poměrně odolné mikroby. Z dezinfekčních prostředků odolávají poměrně dobře fenolu a sloučeninám těžkých kovů [4, s. 301], [5, s. 58], [13, s. 66].

Významnou vlastností je jejich schopnost růstu při vysokých koncentracích solí, což je základní podmínkou pro kolonizaci kůže. Optimální růstová teplota stafylokoků je 30 až 37°C. Stafylokoky patří mezi všudypřítomné bakterie a jejich výskyt je primárně svázán s kůží, kožními žlázami a sliznicemi teplokrevných obratlovců. Dále jsou často izolovány z různých potravin živočišného původu (maso, mléko, sýr) a z nejrůznějších zdrojů v prostředí, jako je půda, voda, písek a prach [2, s. 241].

Vzhledem k tomu, že jsou stafylokoky součástí mikroflóry kůže, bývají často izolovány z kosmetických či farmaceutických přípravků. Nejčastěji jsou izolovány druhy *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii* nebo *S. hominis*. Z těchto druhů je nezávadný zejména zlatý stafylokok (*S. aureus*), protože je původcem takzvaných pyodermií, tedy hnisavých onemocnění kůže [14], [15].





Obrázek 4: *Staphylococcus aureus* [8]

### 1.1.5 Rod *Streptococcus*

Podobně jako stafylokoky i streptokoky patří mezi grampozitivní koky vyskytující se jednotlivě, ve dvojicích nebo v řetězcích. Jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní a nesporující. Některé druhy tvoří pouzdra. Metabolismus je chemoorganotrofní, k růstu vyžadují nutričně bohatá média a někdy i kultivaci v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Rostou v rozmezí teplot 25 až 45°C s optimem růstu při 37°C, nerostou při 10°C. Streptokoky jsou komenzály nebo parazity obratlovců, osídlují převážně ústní dutinu a horní část respiračního traktu. Některé druhy jsou vysoce patogenní pro člověka nebo zvířata. Řada druhů se vyskytuje běžně v prostředí, kde žijí jako saprofyty [2, s. 251].

Některé druhy rozkládají červené krvinky a vytváří alfa-hemolýzu (zelená zóna) na krevním agaru. Další jsou schopné beta-hemolýzy (vyčištění/vyčeření krve kolem kolonie) a jiné gama-hemolýzu (žádný efekt). Mezi beta-hemolytické streptokoky patří například *Streptococcus pyogenes*, který je nejčastějším původcem angín. Může být také nebezpečným infektem v ráně a může způsobit otravu krve po porodu. *St. pyogenes* je společně se zlatým stafylokokem považován za etiologické agens pyodermií a podílí se i na zánětlivém onemocnění zvaném růže (erysipelas) [5, s. 59], [16].

Pokud jsou streptokoky izolovány z kosmetických přípravků, jejich přítomnost by mohla být výsledkem nedostatku dobrých hygienických postupů u zaměstnanců, kteří se následně dotkli výrobku či obalu [5, s. 59].

Obrázek 5: *Streptococcus pyogenes* [17]

### 1.1.6 Rod *Bacillus*

Bakterie rodu *Bacillus* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní grampozitivní tyčinky. Patří mezi bakterie se schopností tvorby klidových stádií endospor. Endospory jsou výjimečně odolné struktury sloužící k přežití nepříznivých podmínek prostředí. Dokáží přežívat vysoké teploty, UV záření, vysychání i působení různých chemických dezinfekčních látek [1, s. 68-69], [5, s. 59], [13, s. 25]. Sporulace probíhá pouze za přítomnosti kyslíku. Většina druhů produkuje katalázu a na krevním agaru vytváří beta-hemolýzu. V kosmetickém průmyslu, mohou být některé surové materiály kontaminovány vegetativními buňkami nebo sporami rodu *Bacillus*. Jsou to převážně materiály, které obsahují aloe vera a různé tixotropní látky, jako kvartérní jíly [5, s. 59].

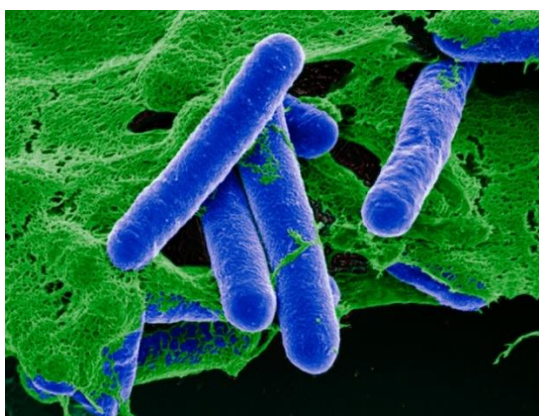
Bakterie rodu *Bacillus* byly izolovány z různých typů kosmetických i farmaceutických přípravků. Častá je přítomnost v různých typech krémů, z farmaceutických přípravků bývají často izolovány druhy *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* [18], [19].

Obrázek 6: *Bacillus subtilis* [8]

### 1.1.7 Rod *Clostridium*

Buňky klostridií mají tvar pleomorfních tyček. Patří mezi grampozitivní bakterie se schopností tvorby endospor. Většinou jsou pohyblivé peritrichálními bičíky a kataláza je negativní. Vytváří oválné nebo kulaté endospory, které obvykle vyklenují buňku. Bakterie tohoto rodu jsou obligátně anaerobní, i když některé druhy mohou vykazovat určitou toleranci ke kyslíku a patří mezi tzv. aerotolerantní anaeroby. Většina druhů je chemoorganotrofních, některé jsou chemoautotrofní nebo chemolitotrofní [2, s. 222], [13, s. 25], [5, s. 60].

Dobře rostou na VL-agaru. V přírodě se vyskytují jako saprofyty a účastní se hnilobných procesů. Jen pár druhů je schopno vyvolat infekci člověka. Jde pak převážně o intoxikace bakteriálními toxiny, které produkují neurotoxická klostridia jako *C. tetani* a *C. botulinum*. *C. tetani* infikuje rány, avšak zůstává jen v místě poranění. Vzhledem k jejich přítomnosti v prostředí, lze jejich spory nalézt jako kontaminanty ve farmaceutických výrobcích. V kosmetice jsou kontaminované produkty spojené především s holením a aplikací na kůži, jako jsou krémy na holení a po holení, kolínské vody, pleťové vody, antiperspiranty a deodoranty [4, s. 329], [6, s. 20].



Obrázek 7: *Clostridium botulinum* [20]

## 1.2 Mikroskopické houby vyskytující se v kosmetických a farmaceutických přípravcích

Houby (*Fungi*) jsou organizmy s eukaryotickým typem buňky, mezi které patří i dvě skupiny mikroorganismů kontaminujících kosmetické a farmaceutické přípravky, kvasinky a plísňe. Kvasinky jsou většinou jednobuněčné organizmy, které se rozmnožují pučením. Jako plísňe (vláknité mikromycety) označujeme mikroskopické vláknité vícebuněčné organizmy, které žijí paraziticky nebo saprofytsky. Pro obě skupiny platí, že mají pravé jádro oddělené od

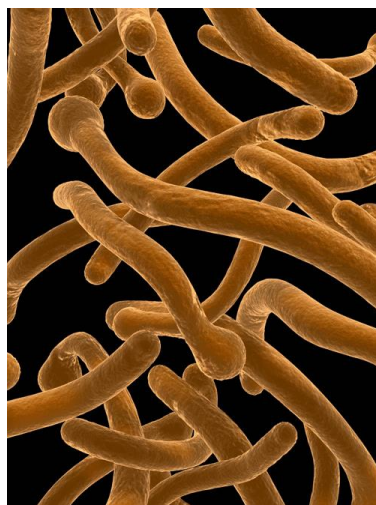
cytoplazmy membránou a mají také další membránové orgány, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát nebo endoplazmatické retikulum. Rozdílné je například složení buněčné stěny. Zatímco kvasinky mají buněčnou stěnu z polysacharidů glukanu a mananu, u plísní je základní složkou buněčné stěny chitin a chitosan. Další rozdíly lze nalézt v morfologii buněk nebo ve způsobu rozmnožování [3, s. 70-71], [5, s. 61].

Z hlediska významu pro kosmetický a farmaceutický průmysl jsou nejdůležitějšími zástupci kvasinky rodu *Candida* a *Saccharomyces*, a plísně rodu *Aspergillus* a *Fusarium* [5, s. 67-68].

### 1.2.1 Rod *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* mají buňky různého tvaru a tvoří krémové až žlutě zbarvené kolonie. Jsou poměrně odolné k faktorům vnějšího prostředí, snášejí vyšší koncentrace etanolu a organických kyselin, nízké i vysoké teploty a vysoké koncentrace cukrů a solí. Jsou hojně přítomné v prostředí, vyskytují se zejména na hniající vegetaci, stoncích rostlin a v půdě [21, s. 367-368].

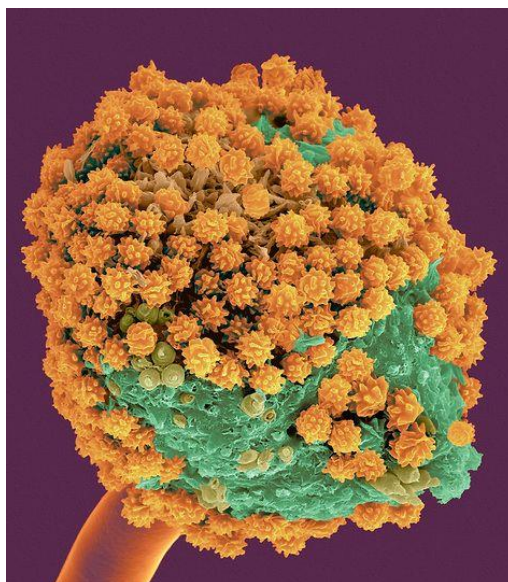
Z hlediska kosmetiky a farmacie je nejvýznamnějším druhem *Candida albicans*. Jedná se o patogenní kvasinku rostoucí na konvenčních mykologických médiích při pokojové teplotě (optimum růstu 24 °C), nebo při 37 °C. Je to dimorfní houba schopná růst jako kvasinková i vláknitá forma. *Candida albicans* je spíše oportunním patogenem, nejčastěji způsobuje infekce u jedinců s oslabeným imunitním systémem. Je původcem povrchových mykóz nehtů, vlasů a svrchních vrstev kůže, dále vyvolává celou řadu kandidóz různého typu a závažnosti [1, s. 949-950], [5, s. 68].



Obrázek 8: *Candida albicans* [12]

### 1.2.2 Rod *Aspergillus*

Plísně rodu *Aspergillus* jsou vláknité houby, které se běžně vyskytují v prostředí. Chovají se jako oportunní patogeny. V dnešní době je známo přes 200 druhů těchto hub. Morfologicky jsou tvořeny septovanými hyfami, které se větví. Mycelium je zakončeno vláknou – konidiofory. Aspergily rostou na běžných kultivačních půdách (Sabouraudův agar, krevní agar) a to velmi rychle. Optimální teplota je 30-37 °C. Během čtyř dní mohou vytvořit bělavé chmýřité kolonie, na kterých se dále vyskytují konidiofory s pigmentovanými konidii, které jsou typické pro zbarvení celé kolonie. *Aspergillus* se vyskytuje v půdě, na rostlinách a v rozkládající se organické hmotě. Jsou častými kontaminanty potravin. Konidie jsou velmi snadno přenášeny vzduchem. Bývají izolovány z různých typů kosmetických přípravků, kontaminace navíc může být spojena s produkcí aflatoxinů, protože aspergily patří mezi toxinogenní plísně [5, s. 67], [6, s. 20].



Obrázek 9: *Aspergillus niger* [22]

## 2 ZDROJE KONTAMINACE VE FARMACEUTICKÉ A KOSMETICKÉ VÝROBĚ

Kosmetické a farmaceutické přípravky je nutné neustále kontrolovat s ohledem na možnou mikrobiologickou kontaminaci. Moderní kosmetický, potravinářský i farmaceutický průmysl musí splňovat dané normy pro mikrobiologickou ochranu svých produktů z hlediska kažení výrobku na jedné straně a na straně druhé z hlediska možnosti infekce spotřebitele. Nepotravinářské výrobky, které jsou uchovávány v chladu, mají delší dobu trvanlivosti než produkty osobní péče. K mikrobiální kontaminaci produktů osobní péče, může dojít již v průběhu výroby, přes suroviny, přísady a manipulaci, nebo může dojít ke kontaminaci konečného výrobku používáním spotřebitelem.

Nejčastějšími zdroji či příčinami kontaminace jsou:

- Kontaminované suroviny, voda nebo jiné přísady
- Špatné výrobní podmínky
- Formulace přípravků podporující růst mikroorganismů
- Špatné balení výrobků
- Špatné přepravní a skladovací podmínky
- Kontaminace spotřebitelem

### 2.1 Voda

Voda patří mezi základní suroviny při výrobě kosmetických i farmaceutických přípravků. Může být součástí základu produktu nebo se využívá během výrobního procesu, při chemické syntéze, nebo jako čisticí prostředek pro oplach nádob a zařízení. Surová voda pochází z města nebo závodu a je používána pro vlastní použití v osobní hygieně, chlazení, na toaletu nebo pití. Pro výrobu produktů se využívá voda upravená. Tato voda je buď měkčená, deionizovaná, destilovaná nebo prošla reverzní osmózou. Požadavky na pitnou vodu jsou stanoveny vyhláškou č. 252/2004 Sb. Požadavky na kvalitu vod pro farmaceutické účely jsou zakotveny v Českém lékopisu 2009 [23]. Lékopis definuje tři základní druhy vod pro farmaceutický průmysl: vodu čištěnou (*Aqua purificata*), vodu na injekci (*Aqua pro iniectione*) a vodu vysoce čištěnou (*Aqua valde purificata*). Voda čištěná je určena pro výrobu farmaceutických přípravků a musí splňovat mikrobiologické limity stanovené lékopisem [7, s. 26], [24].

Vodu můžou kontaminovat různé mikroorganismy, mezi ty nejčastější patří například *Escherichia coli* a *Pseudomonas spp.* Ve skladovacích nádržích se může počet bakterií rychle zvýšit. K tomu dochází zejména v důsledku úbytku chloru hlavně během teplejších měsíců. Měkčené a deionizované vody obsahují především gramnegativní bakterie. Ve slané vodě může dojít k nárůstu bakterií rodu *Bacillus* a *Staphylococcus*. Destilovaná voda může být během skladování a distribuce kontaminována velice rychle, a to zejména gramnegativními bakteriemi [25], [26].

Ve skladovacích nádržích nebo v potrubí se často vytváří mikrobiální biofilm. Biofilm je strukturované společenstvo mikroorganismů, které vzniklo díky adhezi buněk na povrch umělých či nativních materiálů. Bakterie v biofilmu produkují velké množství extracelulární polysacharidové hmoty, která je chrání před vysycháním i různými antimikrobními látkami. Biofilm je také hůře odstranitelný běžnými postupy čištění. Cílem biofilmu je tedy chránit mikroorganismy před nepříznivými vlivy prostředí [7, s. 26]. Voda procházející přes potrubní systém s již vytvořeným biofilmem způsobuje jeho odlupování a následnou kontaminaci. Mikroorganismy mohou růst také v prostředí nepoužívaných úseků potrubí. Turbulence vody v okolí pak přenáší mikroorganismy do hlavních částí [25], [26].

## 2.2 Suroviny

Většina surovin, používaných ve výrobě kosmetiky jsou suché prášky, přírodní gely, nebo povrchově aktivní látky. Příkladem těchto látek jsou mastek, hlína, aloe vera, amonium lauryl sulfát (ALS). V suchých prášcích a přírodních gelech, jako je aloe vera, je možná kontaminace sporulujícími mikroorganismy rodu *Bacillus* a *Clostridium*. V zahušťovadlech a mastku může začít růst spor již během mokré části jejich výroby. Mytí mastku poskytuje ideální prostředí pro růst bakterií, které sporulují ve vlhkém prostředí. Povrchově aktivní látky jsou poměrně náchylné na mikrobiální kontaminaci a je tedy obtížné udržet jejich požadovanou mikrobiologickou kvalitu. Může zde růst široká škála gramnegativních bakterií. Výjimkou jsou ammonium xylen sulfonát a sodium lauryl sulfát, které nejsou vhodné ke kontaminaci z důvodu vysokého pH a obvykle nepotřebují žádnou další ochranu. Jiné povrchově aktivní látky, jako je ALS, jsou vysoce citlivé na napadení mikroorganismy a vyžadují ochranu. Někteří výrobci používají pro ochranu izothiazolinon v koncentraci 5-10 ppm. Další účinnou látkou je formaldehyd o koncentraci 100-150 ppm. V případě, že není ve vý-

robním procesu dodržena správná výrobní praxe a výroba je nečistá, může dojít ke kontaminaci povrchově aktivních látek bez ohledu na jejich dostatečnou vstupní kvalitu [5, s. 83-84], [27].

Kosmetické i farmaceutické přípravky obsahují často velké množství přírodních i syntetických ingrediencí, které mohou poskytovat vhodné podmínky pro růst mikroorganismů. Obecně lze říci, že riziko kontaminace je větší u ingrediencí přírodních, u synteticky vyráběných ingrediencí je snazší udržet standardní podmínky výroby a zajistit tak standardní kvalitu. V případě kosmetických přípravků je navíc rizikový vyšší obsah vody. Zvýšená obliba emulzních systémů, lotionů apod. znamená větší obsah vody ve výrobcích a zároveň vytváření příznivého prostředí pro množení mikroorganismů. To je jeden z hlavních důvodů nutné přítomnosti konzervantů v kosmetických přípravcích [28].

### 2.3 Kontaminace pracovníky

Jako primární kontaminace je označována kontaminace přípravku během procesu výroby. Kontaminace pocházející z lidských zdrojů je, vedle nevyhovujícího výrobního prostředí, nejčastějším zdrojem snížené mikrobiologické kvality konečného výrobku. Výrobci by se měli snažit o minimalizaci přímého kontaktu pracovníka s výrobkem, nebo alespoň zajistit dostatečné proškolení pracovníků a nastavit přísná hygienická pravidla ve výrobním prostoru [28], [29].

Mezi úkony osobní hygieny můžeme zahrnout mytí rukou, nošení čistého oblečení a pokrytí vlasů a vousů. Pro aseptické výroby, může výrobce použít předsterilizované jednodílné obleky, krytí nohou, krytí vlasů a vousů, obličejové masky a rukavice. Mytí rukou je často nejdůležitější a zároveň velmi levný způsob pro eliminaci rizika kontaminace. Zaměstnanci by neměli nosit šperky a ruce by si měli umýt pokaždé, když opustí výrobní prostor a po návratu do něj. Dokonce i krátké 15 sekundové mytí rukou způsobí významné poklesy v mikrobiální kontaminaci ve srovnání s nemytými rukami. Nicméně nejlepším způsobem je mytí rukou teplou vodou o teplotě 32-43 °C a použitím baktericidního mýdla po dobu alespoň jedné minuty. Aby se zabránilo kontaminaci lidskými vlasy a vousy, měly by být veškeré tyto části kryté a to ve všech oblastech výroby. Oblečení musí být čisté a bez přídatných ozdob. Nejlepší formou kontroly dodržování předpisů je používání světlých uniforem [27].

Kontaminující mikroorganismy, jejichž zdrojem je člověk, jsou nejčastěji ty, které se přirozeně vyskytují na lidské kůži. Kůže je prostředím hojně osídleným, navzdory tomu, že je



prostředím poměrně nepříznivým. Kůže jako celek tvoří bariéru, která omezuje růst patogenních bakterií. Mezi kožní antimikrobiální mechanismy lze zahrnout integritu stratum corneum a nízký obsah vlhkosti, lipidy rohové vrstvy a kyselé pH. Většina kůže vytváří nepříznivé prostředí pro bakteriální replikaci. Kůže je za normálních podmínek chladnější, než je normální tělesná teplota a mírně kyselá. Většina bakterií roste nejlépe při neutrální hodnotě pH a teplotě 37 °C [30, s. 211-213], [31].

Mezi další faktory omezující možnosti osídlení patří i koncentrace iontů, fluktuace osmotického tlaku, UV záření, teplota a mechanický stres. Dále hrají svou roli i inhibiční látky produkované rezidentní flórou, které pomáhají udržet stávající rezidentní mikrobiální populaci. Mezi rezidentní, tedy stálou mikroflóru kůže lze zařadit celou řadu druhů. Především to jsou grampozitivní bakterie rodu *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Corynebacterium*. Z kvasinkových mikroorganismů jsou to pak především zástupci rodu *Malassezia* a *Candida*. Tranzitní (přechodná) flóra se skládá z nepatogenních nebo oportunně patogenních mikroorganismů, které osídlují kůži na několik hodin, dnů nebo týdnů. K hlavním zástupcům této flóry se řadí zástupci rodu *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Bacillus* nebo *Pseudomonas* [32], [33].

Z uvedených druhů vyskytujících se na kůži, jsou *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* řazeny mezi patogeny kůže. Mezi epidermální infekce způsobené *S. aureus* a *S. pyogenes* patří impetigo a ecthyma. Gramnegativní organizmy jako jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Bartonella* spp., *Klebsiella rhinoscleromatis* a *Vibrio vulnificus* nejsou typickou součástí kožní mikroflóry, ale mohou způsobit kožní infekce [30, s. 211-213], [31].

## 2.4 Výrobní prostory a jejich zařízení

Výrobní zařízení je častým zdrojem mikroorganismů. Proto je kladen důraz na to, aby byly výrobní prostory a zařízení prostorné, jednoduché, jasně osvětlené a čisté. Takto uspořádaný systém vytváří správné podmínky pro dodržování hygieny a správné výrobní praxe. Legislativní předpisy i zásady správné výrobní praxe vyžadují odpovídající oddělený prostor pro zařízení, materiály a skladování. Nutností jsou oddělené prostory pro operace, při kterých by mohlo dojít ke kontaminaci výrobků. Podlahy by měly být nepropustné pro vodu, bez jakýchkoliv prasklin a štěrbin a měly by být odolné vůči chemikáliím. Všechny stavby by měly být opatřeny vysoce účinným větracím systémem (HEPA filtry), které jsou schopny odstranit až 90% částic o průměru 1-5 mm [5, s. 84-85; 88], [27], [34, s. 191-197].

Velký význam má také konstrukce vodních rozvodů a dopravníků. Materiál pro výrobu potrubí přivádějící vodu by měl být hladký, aby se zabránilo nežádoucí tvorbě biofilmu. Nejvhodnějším materiálem je nerezavějící ocel. Ohyby by měly být hladké, bez ostrých pravých úhlů a mělo by být zajištěno, že se nevytvoří úsek, kde by mohlo dojít k zadržování tekutiny a tím k vytvoření ideálních podmínek pro vznik biofilmu. Vnitřní části rozvodů a tanků by neměly mít žádné ostré rohy, které by komplikovaly čištění. Sváry musí být v jedné rovině a kompatibilní s povrchovou úpravou zbytku nádrže. Střecha tanku by měla být klenutá a dno zaoblené [5, s. 89], [26].

Čištění a sanitace výrobních prostor a zařízení je pro mikrobiální kvalitu výrobků klíčovým faktorem. Už samotná volba čisticích prostředků je rozhodnutím, které by mělo být prováděno s patřičnou rozvahou a kvalifikací. Mezi faktory, které jsou důležité pro výběr čisticího prostředku, patří jeho bezpečnost, účinnost a kompatibilita s materiály, ze kterých je zařízení vyrobeno. Alkalické čisticí prostředky odstraňují nečistoty lipidové povahy. Ostatní čisticí prostředky mohou být na bázi kyselin nebo rozpouštědel. Čisticí prostředky pracují dobře v  $\text{pH} > 9$ . Chlorované přípravky mají vyšší účinnost a fungují dobře v rozmezí  $\text{pH} 4-7$ . Voda použitá k čištění je stejně důležitá jako výběr přípravku. Musí být pitná, nízké tvrdosti a měla by mít teplotu okolo  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro dokonalé odstranění mastných zbytků, nebo alespoň  $43-54\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pokud jsou následně aplikovány další čisticí operace. Kontrola tvrdosti vody může být provedena použitím změkčovačů nebo iontoměničů. Kontrola a servis těchto rutinních záležitostí předchází výskytu vysokého množství bakterií. Čisticí a dezinfekční prostředky je také nutné střídat, aby se eliminovalo riziko vzniku rezistence mikroorganismů. Detergenty na bázi kvartérních amoniových solí jsou zvláště náchylné ke vzniku rezistence bakterií rodu *Pseudomonas*. Pseudomonády jsou známy svou multirezistencí k antimikrobním a dezinfekčním látkám a obecně lze říci, že téměř všechny čisticí prostředky mohou ztratit účinnost na tyto mikroorganismy, pokud nejsou frekvenčně měněny [30, s. 170; 196-197].

### 3 LEGISLATIVA

#### 3.1 Legislativa pro kosmetiku

Kosmetický průmysl se řídí Nařízením Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009 Sb., které udává povinnosti odpovědným osobám, které uvádějí výrobek na trh. Současná legislativa umožňuje volný pohyb registrovaných KP po trhu EU. Členské státy nesmí omezit, zakázat a odmítnout KP, které splňují požadavky Nařízení 1223/2009. Ve všech členských státech jsou zřízeny kontrolní orgány, které jsou pověřeny kontrolou trhu s kosmetikou. KP jsou oprávněny kontrolovat nejen u výrobce, ale i v rámci celého spotřebního řetězce. V České republice jsou kontrolními orgány hygienické stanice. S hygienickými stanicemi spolupracuje Národní referenční centrum pro kosmetiku, které je součástí Státního zdravotního ústavu. Toto odborné pracoviště Ministerstva zdravotnictví ČR má za úkol provádět mikrobiologické, chemické, biologické a klinické metody zkoušení kosmetických přípravků [28], [35].

Kosmetický přípravek je jakákoliv látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla, zuby a sliznicemi dutiny ústní za účelem jejich čištění, parfemace, zlepšení vzhledu nebo ochrany. Obecně platí, že KP dodávaný na trh musí být bezpečný pro lidské zdraví, pokud je používán za obvyklých podmínek. Klíčovou roli z pohledu zajištění bezpečnosti v průběhu vývoje, výroby a distribuce přípravků hraje tzv. odpovědná osoba. Ta zajišťuje soulad každého kosmetického přípravku uvedeného na trh s požadavky, které jsou dané nařízením. Pro kosmetický přípravek vyráběný v rámci EU, který není následně vyvážen, je odpovědnou osobou výrobce v EU. Pro konkrétní kosmetický přípravek je odpovědnou osobou každý dovozce. Distributor je odpovědnou osobou pouze v případě, že uvádí přípravek na trh pod svým jménem nebo ochrannou známkou [36].

Povinností odpovědné osoby je zaručit, že přípravek, který je dodán na trh, je pro lidské zdraví bezpečný. Zaručuje také dodržení správné výrobní praxe při výrobě daného přípravku. Posuzuje bezpečnost přípravku a následně vypracuje zprávu o bezpečnosti kosmetického přípravku před uvedením na trh [28], [36].

### 3.1.1 Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku

Minimální požadavky na obsah zprávy o bezpečnosti jsou uvedeny v Příloze I Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. Zpráva by měla mít dvě části: část A je věnována informacím o přípravku, část B shrnuje závěry posouzení včetně odůvodnění, návod k použití a upozornění na obalu a údaje o posuzovateli.

Část A musí obsahovat:

1. Kvantitativní a kvalitativní složení kosmetického přípravku

Kvalitativní a kvantitativní složení kosmetického přípravku, včetně chemické identity látek (chemický název, název dle INCI, čísla CAS a EINECS/ELINCS, je-li to možné) a jejich zamýšlené funkce. V případě parfémových a aromatických kompozic se uvede název a číslo kódu příslušného složení a totožnost dodavatele.

2. Fyzikální a chemické vlastnosti a stabilita kosmetického přípravku

3. Mikrobiologická kvalita

Mikrobiologická specifikace látky nebo směsi v kosmetickém přípravku. Zvláštní pozornost je věnována přípravkům aplikovaným v okolí očí, na sliznice, poškozenou kůži, u dětí do tří let, starších osob a osob s narušenou imunitní reakcí. Hlavními parametry mikrobiologické kvality jsou počáteční úroveň kontaminace a možnost růstu mikrobů.

4. Nečistoty, stopová množství zakázaných látek, informace o obalovém materiálu

5. Běžné a rozumně předvídatelné použití

6. Expozice kosmetického přípravku

7. Expozice látkám

8. Toxikologický profil látek

9. Nežádoucí účinky a to včetně závažných

10. Informace o přípravku

### 3.1.2 Informační dokumentace

Při uvedení přípravku na trh, musí odpovědná osoba uchovávat informační dokumentaci, která obsahuje: popis kosmetického výrobku, zprávu o bezpečnosti, popis výrobní metody a prohlášení a dodržení správné výrobní praxe, údaje o jakýchkoliv zkouškách na zvířatech, event. důkazy o udávaných účincích kosmetického přípravku.

Dále je povinna zajistit, aby informační dokumentace byla pro příslušný orgán členského státu, ve kterém se dokumentace nachází snadno přístupná v elektronické podobě nebo jiném formátu na její adrese uvedené na etiketě. Kosmetické přípravky nesmí obsahovat látky CMR [36].

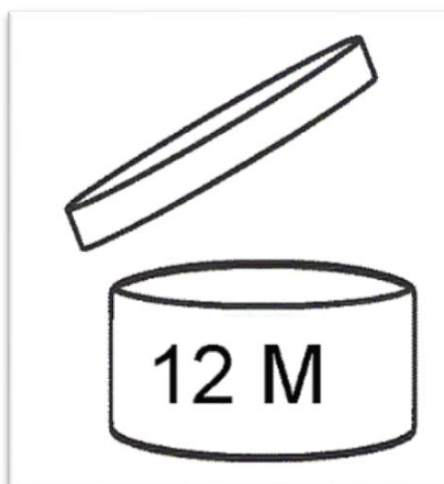
### 3.1.3 Oznamovací povinnost – tzv. „notifikace“

V souladu se zákonem č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících předpisů, je výrobce nebo dovozce povinen před uvedením přípravku na trh oznámit příslušnému orgánu ochrany veřejného zdraví firmu, sídlo, jde-li o právnickou osobu, nebo místo podnikání, jde-li o fyzickou osobu, místo výroby, místo uchovávání údajů, datum zahájení výroby a seznam kosmetických prostředků, které má v plánu vyrábět nebo dovážet [36].

### 3.1.4 Náležitosti označení

Povinností odpovědné osoby a distributora je zajistit, aby byl přípravek dodáván na trh pouze, pokud jsou na obalu uvedené potřebné informace a to nesmazatelně, čitelně a viditelně. Na obalu musí být uvedeno:

- ❖ Jméno nebo zapsaný název a adresa odpovědné osoby, v případě dovozu se také uvádí země původu
- ❖ Jmenovitý seznam ingrediencí dle INCI v době balení, dále hmotnost nebo objem v době balení
- ❖ Datum, do kterého kosmetický přípravek skladovaný za vhodných podmínek bude plnit svou původní funkci („datum minimální trvanlivosti“)
  - Údaj o minimální trvanlivosti není povinný u přípravků, jejichž minimální trvanlivost přesahuje 30 měsíců. U těchto se pak udává informace o době, po kterou je přípravek po otevření bezpečný a lze jej používat, aniž by ohrozil zdraví spotřebitele.



Obrázek 10: Označení trvanlivosti KP [36]

- ❖ Zvláštní upozornění týkající se použití
- ❖ Číslo šarže nebo odkaz umožňující identifikaci přípravku
- ❖ Funkci přípravku, pokud není zřejmá z obchodní úpravy
- ❖ Seznam přísad může být uveden pouze na vnějším obalu

Není-li z praktických důvodů možné uvést na etiketě informace o zvláštním upozornění a seznam přísad, je nutné zajistit, aby byly informace na přiloženém letáku, etiketě, pásce, visačce nebo kartičce.

Povinností distributora je, že v případě mýdla, koupelových kuliček nebo jiných malých přípravků, kde není možné uvést požadované informace zajistit, aby tyto informace byly v bezprostřední blízkosti obalu, do kterého je přípravek naplněn a ve kterém je prodáván.

Distributor je dále povinen zajistit, aby v době, kdy nesou za přípravek odpovědnost, skladovací a přepravní podmínky neohrožovaly soulad s požadavky v nařízení. Dále spolupracují s příslušnými orgány a na jejich žádost spolupracují ve snaze omezit a vyloučit možná rizika [36].

### 3.2 Legislativa pro farmacii

Farmaceutický průmysl je legislativně upraven zákonem č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů, který zpracovává příslušné předpisy Evropské unie v oblasti výzkumu, výroby, přípravy, distribuci, kontroly a odstraňování léčivých látek (dále jen léčiva). Zahrnuje pokyny pro registraci, předepisování a výdej samotných léčivých

přípravků. Dalšími nezbytnými dokumenty, podle kterých se musí farmaceutická výroba řídit je Správná výrobní praxe ve farmacii včetně farmaceutické jakosti a vyhláška 229/2008 Sb., o výrobě a distribuci léčiv. Splnění požadavků správné výrobní praxe pro léčivé látky se dokládá certifikátem správné výrobní praxe pro výrobce léčivých látek. Certifikát vydává Ústav nebo Veterinární ústav. SVP je podrobněji popsána v kapitole 6 [37].

### **Personál**

Zacházet s léčivy mohou pouze osoby starší 18 let, způsobilé k právním úkonům, bezúhonné, zdravotně a odborně způsobilé pro konkrétní činnost. V každém místě výroby má výrobce pro prováděné činnosti k dispozici dostatečný počet způsobilých a přiměřeně kvalifikovaných zaměstnanců vybavených potřebnými pravomocemi, aby bylo dosaženo cíle zabezpečení jakosti. Provozovatel je povinný zajistit, aby byly používány postupy a dodržovány požadavky Evropského lékopisu a Českého lékopisu. Při výskytu nežádoucího účinku léčivého přípravku nebo závady jakosti léčiva je nutné vyhodnotit jeho závažnost a v případě potřeby provést veškerá dostupná opatření směřující k zajištění nápravy a omezení nepříznivého účinku. V případě výskytu závady u humánního léčiva je tento stav oznámen Ústavu nebo Veterinárnímu ústavu, jde-li o veterinární léčivo. Provozovatel nesmí uvádět na trh a do oběhu léčiva s prošlou dobou použitelnosti a se závadou v jakosti [37].

### **Výroba a kontrola jakosti**

Výrobce zajišťuje, aby byly jednotlivé výrobní činnosti prováděny podle předem stanovených a schválených instrukcí a postupů v souladu se SVP. K dispozici musí být personální, materiální zdroje a podmínky dostatečné pro provádění kontrol v průběhu výrobního procesu. Všechny odchylky a závady léčivého přípravku jsou dokumentovány a důsledně prošetřeny. Výrobce musí zavést a udržovat kontroly jakosti, zahrnující odběr vzorků a jejich zkoušení, kontrolu shody léčivého přípravku se specifikacemi [37].

### **Označení na obalu léčivého přípravku a příbalové informace**

Údaje uváděné na vnějším a vnitřním obalu léčivého přípravku, s výjimkou homeopatických přípravků, musí být v souladu se schváleným souhrnem údajů o přípravku. Údaje uvedené na obalu léčivého přípravku musí být čitelné, srozumitelné a nesmazatelné. Jakékoli prvky reklamního charakteru nejsou přípustné. Název humánního léčivého přípravku musí být uveden na vnějším obalu také Braillovým písmem, není-li stanoveno jinak. Každý léčivý přípravek musí být vybaven příbalovou informací s výjimkou případů, kdy jsou veškeré údaje příbalové informace uvedeny přímo na obalu přípravku [37].

### Kontrolní laboratoř

Kontrolní laboratoři se rozumí laboratoř ověřující jakost léčivých přípravků, léčivých látek, pomocných látek, meziproductů či obalů, včetně dílčího zkoušení. Činnost kontrolní laboratoře podléhá povolení Ústavu nebo Veterinárního ústavu na základě žádosti. Provozovatel laboratoře je povinen předem požádat Ústav nebo Veterinární ústav o změnu povolení k činnosti kontrolní laboratoře v případě jakékoli zamýšlené změny. Po provedení kontroly je vystaveno ověření jakosti léčivé látky nebo pomocné látky, které obsahuje následující údaje:

- ❖ název látky
- ❖ odkaz na zkušební normu nebo předpis
- ❖ číslo šarže
- ❖ dobu použitelnosti
- ❖ údaje o reprezentativnosti vzorku
- ❖ rozsah zkoušení
- ❖ výsledky zkoušek
- ❖ závěr zkoušení
- ❖ datum vystavení
- ❖ identifikační číslo dokladu o ověření jakosti, včetně evidenčního čísla kontrolní laboratoře [37]

### Příprava a úprava léčivých přípravků

Léčivé přípravky lze připravovat pouze na základě lékařského předpisu a v souladu s Českým lékopisem. Poskytovatel zdravotních služeb, který připravuje léčivé přípravky je povinen zajistit jakost přípravků a při své činnosti dodržovat pravidla správné lékařské praxe. Pro samotnou přípravu léčivého přípravku lze použít pouze léčivé látky a pomocné látky uvedené v Českém lékopisu nebo v seznamu stanoveném a povoleném Ministerstvem zdravotnictví. Zvláštní předpisy platí pro léčivé přípravky s obsahem konopí pro léčebné použití [37].

### Odstranění nevyhovujících léčiv

Léčiva nevyhovující jakosti, s prošlou dobou použitelnosti, uchovávaná nebo připravená za jiných než předepsaných podmínek musí být odstraněna včetně jejich obalů tak, aby nedošlo k ohrožení života a zdraví lidí nebo zvířat. Při nakládání s nepoužitelnými léčivy se postupuje stejně jako při nakládání s nebezpečnými odpady, včetně jejich evidence podle zvláštního právního předpisu [37].



**Dokumentace a zpráva a bezpečnosti**

Výrobce vytvoří a udržuje systém dokumentace založený na specifických výrobních předpisech a instrukcích pro zpracování a balení, postupech a záznamech pro jednotlivé prováděné výrobní činnosti. Držitel rozhodnutí o registraci je povinen agentuře elektronicky zasílat pravidelně aktualizované zprávy o bezpečnosti, jejichž součástí jsou údaje o významné prospěšnosti a rizik daného přípravku, vědecké hodnocení poměru rizika a prospěšnosti daného léčivého přípravku a veškeré údaje týkající se objemu výdeje a prodeje daného léčiva. Ústav tyto zprávy průběžně vyhodnocuje a v případě, že dojde k závěru, že se objevila nová rizika, může přijmout nezbytná opatření spočívající ve změně, pozastavení nebo zrušení registrace [37].

## 4 POSTUPY MIKROBIOLOGICKÉ KONTROLY

Postup mikrobiologické kontroly kvality daného výrobku by se měl řídit určitými pravidly. Součástí těchto požadavků je i SVP jak v kosmetice, tak i ve farmaceutické výrobě. Prostory, ve kterých se provádí požadovaná mikrobiologická analýza, by neměly ovlivňovat konečný výsledek. Požadavky na situování laboratoře, její vybavenost a sanitační plán byly rozebírány výše a pro kosmetický a farmaceutický průmysl budou detailně rozebrány v následujících kapitolách [38].

Nejdůležitějším vybavením každého laboratorního centra jsou mikrobiologické boxy, které mohou být s čistým vzduchem nebo bezpečnostní. Dalším nezbytným vybavením pro provedení analýzy jsou váhy, homogenizátor, pH metr, autokláv, inkubátor, vodní lázeň, chladnička, mraznička, sterilizátor a laboratorní sklo, popř. plastové nádobky. Veškerý pracovní materiál musí být sterilní. Toho se dosáhne sterilizací suchým teplem při teplotách alespoň 170-180 °C po dobu 1 hodiny, nebo sterilizací vlhkým teplem po dobu 15 minut při 121 °C. Další možností je použití jednorázového vybavení, které musí být před likvidací dekontaminováno. [7, s. 13]. [38]

Důležitým krokem v analýze je příprava kultivačních médií. Pro přípravu se používá zásadně destilovaná nebo deionizovaná voda. Kultivační média jsou připravována ze základních složek, které jsou dehydrovány nebo z kompletních dehydrovaných médií. Po přípravě je médium rozplněno do vhodných nádob a následuje sterilizace buďto vlhkým teplem nebo filtrací. Každé balení kultivačního média musí být označeno, včetně data přípravy a expirace. Pokud není médium ihned používáno, musí být skladováno za předem definovaných podmínek, které zabraňují změně jeho složení. Při použití agarových kultivačních médií po určité době od přípravy je nutné rozehrátí, které je prováděno na vodní lázni. Takto připravené rozehráté médium je vyléváno do sterilních Petriho misek tak, aby se vytvořila alespoň 3-4 mm silná vrstva. Agarové médium se následně zchladí a ponechá se ztuhnout na vodorovném povrchu. Po ztuhnutí se mohou média ihned použít, nebo jsou uchována pro další použití.

Pro vzorkování kosmetického výrobku je důležité, aby byl dodaný výrobek reprezentativní a nebyl během přepravy nebo skladování poškozen. Po přijetí až do ukončení testování je celý proces dokumentován. Z testovaného výrobku je dále připravena výchozí suspenze a to

alespoň z 1 g nebo 1 ml daného výrobku. Ředění je následně prováděno podle normy a s ohledem na to, zda se jedná o výrobky mísitelné nebo nemísitelné s vodou. Při ředění výrobku nemísitelného s vodou je přidáváno určité množství detergentu, např. polysorbátu 50 [38].

#### 4.1 Základní techniky identifikace

Ze zaočkovaného agarového média se připraví čistá kultura a to tak, že se vybraná kolonie rozočkuje na neselektivní agarové kultivační médium. Vyočkování je provedeno sterilní kličkou, kterou se odebírá malé množství z povrchu izolované kolonie. Vrcholem kličky se materiál kolonie rozočkuje blízkými čarami na jedné třetině povrchu média. Klička se následně sterilizuje vyžiháním v plameni a ochladí se. Z okraje zaočkované části jsou vedeny další čáry, které jsou od sebe více vzdálené a to přes polovinu nezaočkovaného povrchu. Zbylý povrch se zaočkuje vlnitým tahem. Zaočkování může být provedeno i po předchozím zředění suspenze. Po zaočkování se plotny obrátí dnem vzhůru a umístí se do inkubátoru na předem zvolenou teplotu a danou dobu. Po inkubaci se z plotny vybere dobře izolovaná kolonie, která může být použita pro požadující testy, nebo znovu vyočkována. Při testování se používá Gramovo barvení založené na identifikaci buněk podle stavby buněčné stěny a následného rozdělení na Gram pozitivní a negativní buňky. Po provedení Gramova barvení se preparát prohlíží při vysokém zvětšení pod mikroskopem. Bakteriální buňky, které jsou modré, nebo fialové řadíme do skupiny Gram pozitivních bakterií, buňky zbarvené tmavě růžově až červeně jsou Gram negativní bakterie. Dalším identifikačním testem je katalázový test, který se provede přidáním 0,5 ml 3% roztoku  $H_2O_2$  k 1 ml kultury. Zde se posuzuje vznik kyslíkových bublinek. V oxidázovém testu je sledována přítomnost enzymu oxidázy, která se projeví fialovým nebo purpurovým zbarvením [38].

Tabulka 1: Kultivační podmínky pro vybrané mikroorganismy [39]

Mikroorganismus	Složení a množství	Teplota inkubace	Doba inkubace
<i>Enterobacter</i>	1 g/1 ml 10% homogenizovaný roztok, 100 ml pomnožovací bujón	35-37 °C	24-48 hodin
<i>Escherichia coli</i>	1 g/1 ml 10% homogenizovaný roztok, 100 ml MacConkey bujón	43-45 °C	18-24 hodin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 g/1 ml 10% homogenizovaný roztok, 100 ml Tryptic Soy bujón (TSB)	35-37 °C	24-48 hodin
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 g/1 ml 10% homogenizovaný roztok, 100 ml Tryptic Soy bujón (TSB)	35-37 °C	24-48 hodin

## 4.2 Technika pro stanovení počtu

Pro stanovení počtu buněk je připraveno médium, které je rozplněno v definovaném objemu do Petriho misek. Inokulum je následně přeneseno na střed Petriho misky, a co nejrychleji se rovnoměrně roztírá po povrchu média za použití skleněné nebo plastové tyčinky, nebo otáčením tak dlouho, dokud není viditelná žádná tekutina. Médium je dáno do inkubátoru na danou dobu a teplotu. Po inkubaci se počítá počet kolonií na misce [38].

## 4.3 Mikrobiologická kontrola vody

Mikrobiologická kontrola vody je důležitá a je kontrolována jak kvantitativně, tak kvalitativně. Pro kvantitativní stanovení potenciální kontaminace vody je 100 nebo 10 ml vody filtrováno před bakteriologické filtry (póry velikosti 0,45 µm). Po filtraci jsou filtry vloženy na Petriho misku s Tryptic Soy agar a inkubovány při 30-35 °C po dobu 3-5 dní. Pro kvalitativní stanovení je 100 ml vody filtrováno přes 0,45 µm sterilní filtry. Filtry jsou posléze položeny na sterilní MacConkey agar pro koliformní bakterie a Cetrimide agar pro *Pseudomonas*. Následně jsou inkubovány při 30-34 °C po dobu 3-5 dní [39, s. 785].

## 5 MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA KVALITY FINÁLNÍCH VÝROBKŮ

### 5.1 Limity pro mikroorganismy

Všechny kosmetické produkty a suroviny, z nichž je vyráběno nemusí být sterilní, avšak výsledná kvalita výrobku a bezpečnost uživatele nesmí být během používání ovlivněna přítomností mikroorganismů. Pro každý hotový výrobek jsou stanovovány mikrobiologické limity a to kvalitativně nebo kvantitativně. Tyto mezní hodnoty pro kosmetiku udává norma ČSN EN ISO 17516. Pro lokální aplikace je limit  $\leq 1 \times 10^3$  KTJ na g nebo ml. Zvláštní pozornost musí být věnována přípravkům, které jsou určeny pro použití v oblasti očí, pro děti do tří let a sliznice. Zde je limit  $\leq 1 \times 10^2$  KTJ na g nebo ml. Samozřejmostí je, že výrobek nesmí v žádném případě obsahovat *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *C. albicans* a to v 1 g nebo v 1 ml hotového výrobku. Pro jednotlivá stanovení jsou používány mezinárodní standardní zkušební metody a jsou stanoveny mikrobiální limity pro kosmetiku, které jsou uvedeny v tabulce číslo 2.

Pro zajištění kvality výrobku a bezpečnosti je zásadní, aby počet nespecifických mikroorganismů ve výrobku zůstal stabilní nebo dokonce klesal. Přítomnost nespecifických mikroorganismů nesmí být považována za nepřijatelnou za podmínek, že nemají schopnost růst ve výrobku [40].

Tabulka 2: Mikrobiální limity [38]

Druhy mikroorganismů	Výrobky specificky určeny pro děti do tří let, pro oblast očí nebo sliznice	Jiné výrobky
Celkový počet aerobních mezofilních mikroorganismů (bakterie, kvasinky, plísně)	$\leq 1 \times 10^2$ KTJ na g nebo ml	$\leq 1 \times 10^3$ KTJ na g nebo ml
<i>Escherichia coli</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml
<i>Candida albicans</i>	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml	Nepřítomnost v 1 g nebo 1 ml

Mikrobiální limit pro konečný výrobek je maximálně 1000 mikroorganismů na 1 g nebo 1 ml s absencí *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterobacter* a *Pseudomonas aeruginosa* v 1 g/1 ml výrobku. Výjimkou jsou dětské, oční produkty a produkty pro intimní hygienu, kde je limit 100 mikroorganismů na 1 g/1 ml s absencí *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterobacter* a *Pseudomonas aeruginosa* v 1 g/1 ml výrobku. Limity pro surové materiály a vodu jsou 100 mikroorganismů na 1 g/1 ml s absencí *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterobacter* a *Pseudomonas aeruginosa* v 1 g/1 ml výrobku. Limit pro vodu a surové materiály jsou fixní. [30, s. 322], [40]

## 5.2 Průkaz specifických a nespecifických mikroorganismů

Pro zajištění kvality a bezpečnosti výrobku pro spotřebitele, je nutné provádět příslušné analýzy možného mikrobiologického rizika. Postup analýzy je dán normou ČSN ISO 18415. Výrobky s nízkou aktivitou vody, vodné roztoky alkoholu a výrobky s extrémními hodnotami pH představují riziko minimální. Testování se provádí většinou na tekutém médiu vhodném pro detekci mikrobiální kontaminace, kde dochází ke zvýšení počtu mikroorganismů. Pomnožovací půda může obsahovat i neutralizátory, pokud je vzorek určený ke zkoušení antimikrobiálních vlastností. Následuje izolace mikroorganismu na neselektivní agarová média. Určovanými mikroorganismy bývají nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*.

Ředící roztok se používá pro přípravu suspenzí bakterií, kvasinek. Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě za stálého míchání a záhřevu. Dále se rozplní do dvou nádob a sterilizují se v autoklávu při 121 °C cca 15 minut. Po sterilizaci by mělo být pH rovno  $7,0 \pm 0,2$ . Kultiivační média mohou být připravena dle daných receptur, nebo mohou být použita i hotová. Pomnožovací půda může mít různá složení, která jsou uvedena v tabulce 6 a 7. Jejich příprava je stejná jako v případě ředícího roztoku s tím rozdílem, že výsledné pH je  $7,3 \pm 0,2$ .

Veškeré přípravné procesy musí probíhat za sterilních podmínek. Pomnožení je připraveno z nejméně 1 g nebo 1 ml dobře promíchaného zkoušeného vzorku s nejméně 9 ml pomnožovací půdy. Pro filtrovatelné výrobky je možné použít membránový filtr o velikosti porů ne větším než 0,45  $\mu\text{m}$ . Po přefiltrování vznikne námi požadovaná výchozí suspenze, která je dále inkubována při  $32,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,5 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu alespoň 20 hodin. Po inkubaci se sterilní kličkou vyočkuje na povrch Petriho misky cca 15-20 ml neselektivního agarového média. Miska se otočí dnem vzhůru a inkubuje se při  $32,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,5 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 48-72 hodin [41].

Pro identifikaci *Pseudomonas aeruginosa* je provedeno Gramovo barvení, kde by měly být zjištěny Gram negativní tyčinky. Další průkazným testem je oxidázový nebo katalázový test. V tomto případě by měl vyjít oxidázový test pozitivní. Pro identifikaci se používá identifikační protokol pro daný zjištěný typ mikroorganismu s přiřazenou databází, která obsahuje typické charakteristiky. Lze použít i identifikační soupravu, kde jsou konečné výsledky opět porovnávány s databází. Při identifikaci dalších specifických mikroorganismů se postupuje stejně jako v případě *Pseudomonas aeruginosa*. Identifikační znaky vybraných mikroorganismů jsou uvedeny v tabulce 3. [41]

Tabulka 3: Vlastnosti vybraných mikroorganismů [41]

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Gramovo barvení</b>	<b>Oxidázový test</b>	<b>Katalázový test</b>
<i>Escherichia coli</i>	gramnegativní tyčinky	Negativní	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	grampozitivní koky	-	Pozitivní
<i>Candida albicans</i>	fialové ovoidní nebo prodloužené buňky	-	-

## 6 SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE

### 6.1 Správná výrobní praxe ve farmacii

Farmaceutické produkty by měly být vyráběny pouze od licencovaných výrobců, jejichž činnosti jsou pravidelně kontrolovány ze strany příslušných vnitrostátních orgánů.

#### 6.1.1 Základní pojmy

**Účinné léčivé látky** – jakákoliv látka nebo směs látek určená k použití při výrobě farmaceutické lékové formy. Tyto látky jsou určeny k poskytnutí farmakologické aktivity nebo dalšího přímého účinku v diagnostice, zmírnění, léčbě nebo prevenci onemocnění.

**Autorizovaná osoba** – osoba uznaná národním regulačním orgánem, která má odpovědnost za zajištění toho, že každá šarže hotových produktů byla vyrobena, testována a schválena pro vydání v souladu s právními se správními předpisy platnými v dané zemi.

**Šarže** – definované množství výchozího materiálu, obalového materiálu nebo výrobku, zpracovaného v jediném procesu nebo sérii procesů tak, že se očekává, že bude homogenní. Někdy může být nezbytné rozdělit dávku do několika dílčích dávek, které jsou později přenesené dohromady, aby vytvořily konečnou homogenní dávku.

**Číslo šarže** – kombinace čísel a písmen, které jednoznačně identifikují dávky na štítku, jeho dávkové záznamy a odpovídající certifikáty analýzy.

**Dávkové dokumenty** – všechny dokumenty související s výrobou a šarží volného výrobku nebo hotového výrobku. Poskytují historii každé šarže produktu a všechny okolnosti relevantní pro kvalitu konečného produktu.

**Kontaminant** – nežádoucí nečistoty chemické nebo mikrobiologické povahy. Dále výchozí materiál nebo meziprodukt při výrobě a dále kontaminant vzniklý při vzorkování, balení nebo přebalování, skladování nebo přepravě. [24], [42].

#### 6.1.2 Farmaceutický systém jakosti

Výrobce musí nést odpovědnost za kvalitu farmaceutických výrobků, aby se zajistilo, že jsou vhodné pro zamýšlené použití, v souladu s požadavky na registraci. Dosažení této kvality je cílem vedení firmy a vyžaduje účast zaměstnanců v mnoha různých odděleních a na všech úrovních jak v rámci firmy a společnosti, tak i mezi dodavateli a distributory. K dosažení



této kvality je potřeba komplexně navržený a správně prováděný farmaceutický systém jakosti (PQS) a správná výrobní praxe (SVP). Vedení má konečnou odpovědnost za dodržování celého jakostního systému.

Řízení kvality je široký pojem zahrnující záležitosti, které jednotlivě nebo společně ovlivňují jakost produktu. Zahrnuje přijatá opatření s cílem zajistit, že farmaceutické výrobky jsou z kvalitních zdrojů, potřebných pro použití. Řízení kvality obsahuje GMP a další faktory, včetně těch mimo rozsah opatření, jako je návrh a vývoj produktu. GMP se vztahuje na fázi od výroby hodnocených humánních léčivých přípravků, transferovou technologii a komerční výrobu, až po ukončení dodávky produktu. Všechny části farmaceutického systému kvality by měly mít odpovídající zdroje a měly by být udržovány, včetně dostatečně kompetentního personálu, vhodných prostor, vybavení a zařízení.

Na farmaceutickém systému kvality vhodnému k výrobě farmaceutických výrobků by mělo být zajištěno, že realizace produktu je dosaženo tím, že je navrhován, posuzován, plánován, zaveden, udržován systém, který umožňuje dodávky produktů s odpovídajícími požadavky na kvalitu. Farmaceutické výrobky by měly být navrženy a vyvinuty tak, že berou v úvahu požadavky na GMP, správnou laboratorní praxi (GLP) a správnou klinickou praxi (GCP). Během celého procesu jsou prováděna nezbytná opatření pro výrobu, dodávání obalových materiálů, výběr a monitorování dodavatelů a ověření, že každá dodávka je správná. Samozřejmostí jsou kontroly výchozích surovin, meziproductů a volně uložených produktů. Hotový výrobek musí být zpracován a kontrolován podle stanovených postupů. Je zajištěno pravidelné hodnocení kvality farmaceutických výrobků s cílem ověřit soulad procesu a zajištění, kde je potřeba zlepšení.

Pravidelné kontroly by měly být prováděny za účasti vedení v provozu a to především za účelem navrzení zlepšování produktů, procesů a systému. Pokud není stanoveno jinak, měla by být prováděna kontrola alespoň jednou ročně.

Systém kvality by měl být zdokumentován. Dokumentace by měla být stanovena a měla by obsahovat popis systému řízení jakosti včetně odpovědnosti za řízení [42].

### **6.1.3 Správná výrobní praxe ve farmacii (GMP)**

GMP je součástí řízení kvality, které zajišťuje, že výrobky jsou důsledně vyráběny a kontrolovány podle normy jakosti odpovídající jejich určenému použití a podle požadavků na registraci, povolení kritického hodnocení nebo specifikaci produktu. Je zaměřena především

na řízení a minimalizaci rizik spojených s farmaceutickou výrobou, k zajištění jakosti, bezpečnosti a účinnosti produktů [42].

Podle GMP by měly být všechny výrobní procesy jasně definovány, systematicky přezkoumávány pro související rizika na základě vědeckých poznatků a zkušeností, aby byly schopny důsledně vyrobit farmaceutické výrobky v požadované kvalitě a v souladu s jejich specifikací [24], [42].

### **Pracovníci**

Správná výroba léčiv je závislá na lidech, proto musí být zajištěn dostatek kvalifikovaných pracovníků k provádění daných úkonů. Všichni pracovníci musí bezpodmínečně dodržovat zásady správné výrobní praxe. Každý pracovník musí být podroben úvodnímu i pravidelně se opakovanému školení a výcviku, který zahrnuje i hygienické předpisy. Vyšší vedení musí jmenovat vedoucí pracovníky včetně vedoucího pracovníka odpovědného za výrobu a vedoucího pracovníka odpovědného za kontrolu jakosti. Vedoucí pracovník odpovědný za výrobu zajišťuje, aby výroba a skladování výrobků probíhaly podle příslušné dokumentace tak, aby se dosáhlo požadované jakosti. Nezbytnou součástí jeho práce je schvalovat instrukce vypracované pro jednotlivé části výroby a dohlížet na jejich dodržování. Je také odpovědný za provádění kvalifikací a údržby výrobních prostor a zařízení. Vedoucí pracovník odpovědný za kontrolu jakosti schvaluje a zamítá propuštění výchozích látek, obalových materiálů, meziproduktů, nerozplněných produktů a konečných produktů. Musí zajistit, aby byly provedeny veškeré potřebné zkoušky a s nimi spojené záznamy. Další kompetencí je schválení specifikací, postupů pro odběr vzorků a následného zkoušení [43, kapitola 2], [44].

### **Výrobní prostory**

Prostory a zařízení musí být umístěny, konstruovány a udržovány tak, aby to odpovídalo požadavků na SVP, tedy předcházení křížové kontaminaci, usazování prachu nebo nečistot. Samotné budovy mají být umístěny v prostředí, jež by společně s opatřeními provedenými k ochraně výroby představovalo nejmenší riziko možné kontaminace. Prostory musí být řádně udržovány, aby se neohrozila jakost výrobku. Výrobní zařízení a jednotlivá pracoviště musí být navrženy tak, aby se zabránilo křížové kontaminaci všech produktů. K posouzení a kontrole rizik mají být použity principy řízení rizik pro jakost. Nároky na osvětlení, odvětrávání, potrubí a další ovlivňující faktory byly uvedeny v kapitole 2. Laboratoře pro kontrolu jakosti by měly být oddělané od výrobních prostor. Tento požadavek je zvláště důležitý

u laboratoří, kde je prováděna kontrola biologických a mikrobiologických materiálů [43, kapitola 3], [44].

### **Dokumentace**

Ke každé prováděné činnosti musí být pečlivě vedená dokumentace, ve které musí být jasně definováno, jaký záznam se vztahuje k výrobní činnosti a kde je tento dokument uchován. Doba uchování závisí na činnosti, kterou daná dokumentace dokládá. Tzv. kritická dokumentace obsahující včetně primárních dat a informací o registraci je uchovávána po dobu platnosti registrace. Specifické požadavky jsou kladeny na dokumentaci šarže, která musí být uchovávána jeden rok po uplynutí doby použitelnosti šarže. V případě hodnocení léčivých přípravků musí být dokumentace šarže uchovávána alespoň pět let po ukončení hodnocení [43, kapitola 4], [44].

### **Výroba**

Jednotlivé výrobní operace musí probíhat ve shodě s definovanými postupy a musí být zachovány zásady SVP, aby se dosáhlo požadované jakosti a požadavků k povolení činnosti, včetně požadované registrace daného léčiva. Samotná výroba musí být prováděna a kontrolována kompetentními pracovníky. Veškerá manipulace s materiály má probíhat za podmínek, které brání kontaminaci. Před zahájením výroby je potřebné ověřit, že pracoviště a výrobní zařízení jsou čistá a nevyskytují se zde jiné výchozí suroviny. Meziproduct a nerozplněné výrobky musí být uchovávány za vhodných podmínek [43, kapitola 5].

### **Kontrola jakosti**

K úkonům kontroly patří vzorkování, sestavování specifikací, provádění zkoušek a organizační činnosti spojené s propuštěním na trh. Samotná kontrola se neomezuje pouze na laboratorní činnost, ale musí být zapojena při rozhodování v průběhu výroby, které může mít vliv na jakost samotného výrobku. Prostory pro kontrolu musí splňovat obecné i speciální požadavky, zvláště pak mikrobiologické laboratoře. Vzorkování se musí provádět podle písemných postupů. K provedené zkoušce musí být řádně uchovávána dokumentace o jednotlivých úkonech [43, kapitola 6], [44].

### **Reklamace, závady v jakosti a stahování přípravků**

V případě, že je potvrzena závada v jakosti léčivého přípravku či hodnoceného léčivého přípravku, která může vyústit ve stahování nebo omezení dodávky, musí být informovány

všechny příslušné orgány, jichž se problém týká. Po obdržení reklamace musí být vypracovány písemné postupy zaznamenávající jednotlivé kroky v řízení. V případě, že byla objevena závada v jakosti celé šarže, musí být věnována pozornost i jiným šaržím, a to zvláště těm, které mohou obsahovat část závadné šarže nebo závadné složky [43, kapitola 8].

## 6.2 Správná výrobní praxe v kosmetice

Správná výrobní praxe v kosmetice se řídí normou ČSN EN ISO 22716, která je platná jak v ČR, tak i v Evropě. Podle této normy se musí řídit veškerá kosmetická výroba, bez jakéhokoliv rozdílu.

### 6.2.1 Termíny a definice

**Šarže** – množství suroviny, obalového materiálu nebo výrobku, které je přesně definované.

**Čištění** – odstraňování veškerých nečistot z povrchů postupy, které zajistí danou úroveň čistoty.

**Kontaminace** – výskyt nežádoucích látek ve výrobku.

**Hotový výrobek** – přípravek, který prošel všemi stupni výroby.

**Prostory** – místa a budovy, které jsou používány k provádění veškerých úkonů v rámci výroby.

**Zajištění kvality** – plánované a systematické činnosti, které zajistí splnění daných kritérií.

**Sanitace** – operaci za účelem redukce mikroorganismů.[44]

### 6.2.2 Pracovníci

Jsou osobami, které jsou zapojené do provádění činností popsanych v normě ČSN EN ISO 22716 a mají odpovědný výcvik k provádění výroby, kontrole a následnému skladování výrobků přesně definované kvality

Organizační struktura má být definována s ohledem na organizaci a správný chod firmy. Musí být vhodná vzhledem k velikosti firmy a rozsahu výroby. Každá společnost musí opatřit odpovídající úroveň pracovníků podle druhu činnosti a v souladu s rozsahem výroby. Firma by měla mít odpovídající počet pracovníků, kteří budou řádně vyškoleni s ohledem na vykonávanou činnost [44].

Odpovědností každého pracovníka je:

- ❖ Znat svoji pozici v organizační struktuře,
- ❖ Znat své definované odpovědnosti a činnosti,
- ❖ Mít přístup k dokumentům týkající se rozsahu jeho odpovědnosti a musí se jimi řídit,
- ❖ Dodržovat požadavky osobní hygieny,
- ❖ Mít odpovídající vzdělání, výcvik a dovednosti k prováděné činnosti

Pracovníci zapojeni do výroby, kontroly, skladování a dodávání by měli mít odborné zkušenosti. U všech pracovníků by měl být prováděn odborný výcvik správné výrobní praxe. Každý nový pracovník by měl projít kromě základního výcviku v teorii a praxi SVP také proškolením s ohledem na přidělenou činnost.

V provozu je velmi důležitá hygiena všech pracovníků. Hygienický program má být vytvořen a přizpůsoben potřebám výrobního závodu. Požadavky na hygienu musí být srozumitelné a musí být dodržovány všemi osobami, jejichž činnost probíhá v prostorách výroby, kontroly nebo skladování. Každá osoba vstupující do prostor výroby, kontroly nebo následného skladování musí být oblečena ve vhodném ochranném oděvu, aby se zabránilo kontaminaci kosmetického prostředku. Jídlo, pití, žvýkání, kouření nebo jakékoliv skladování potravin či osobních léků je v prostorách výroby zakázáno. Jakékoliv nehygienické činnosti v prostorách výroby, kontroly a skladování nebo v jakýchkoli jiných prostorách, kde by mohl být výrobek nepříznivě zasažen je zakázáno. Ve výrobě musí být přijaty a zavedeny takové kroky, které zajistí, že jakákoliv nemocná osoba nebo osoba s otevřenou ránou na odkryté části těla bud vyloučena z přímého kontaktu s výrobkem, dokud nedojde k uzdravení, nebo pokud není rozhodnuto kontrolním orgánem, že kvalita výrobku nebude ohrožena [44].

### 6.2.3 Prostory a zařízení

Prostory mají být situovány, navrženy a konstruovány tak, aby:

- ❖ Zabezpečily ochranu výrobku,
- ❖ Umožnily efektivní čištění, sanitaci a údržbu
- ❖ Minimalizovaly riziko promíchání výrobků, surovin a obalových materiálů

Volba návrhu prostor by měla být založena na typu vyráběného kosmetického prostředku, skutečných podmínkách a požadavcích na čištění a sanitaci.

Pro provádění operací jako jsou příjem, skladování a výroba musí být zajištěn dostatečný volný prostor. Při pohybu materiálu, výrobků a pracovníků budovami, musí být pohyb vymezen tak, aby se zabránilo jejich promíchání

Podlahy, stěny, stropy a okna ve výrobních prostorech mají být navrženy a zkonstruovány tak, aby se usnadnilo čištění a sanitace. Při výstavbě výrobních prostor se má brát v úvahu potřeba řádného mytí a celkové údržby. Musí zahrnovat hladké povrchy, pokud jsou vhodné, má být zajištěno odpovídající zařízení pro sprchování a výměnu oděvů. Vzhledem k zamýšleným výrobním operacím musí být zajištěna dostatečná ventilace, popřípadě musí být zavedena další specifická opatření k ochraně výrobku. Potrubí, výlevky a další vývody musí být nainstalovány tak, aby odkapáváním nebo kondenzací nedošlo ke kontaminaci materiálu, výrobku, povrchu nebo zařízení. Provozovny používané k výrobě musí být udržovány v čistém stavu. Používané čisticí a sanitační prostředky by měly být přesně specifikovány a měly by být dostatečně účinné.

Zařízení by mělo být navrženo tak, aby při výrobě nedocházelo k jakékoliv kontaminaci. Zásobníky na nerozplněný výrobek by měly podléhat taktéž podmínkám proti nežádoucí kontaminaci prachem a vlhkostí. Údržba musí být prováděna pravidelně a nesmí mít vliv na kvalitu výrobku.

Pracovníci ve výrobě musí mít k dispozici zařízení pro očistu, umývárny a toalety. Umývárny a toalety musí být oddělené, ale přístupné z výrobních prostor [44].

#### **6.2.4 Suroviny a obalové materiály**

Suroviny a obalové materiály musí vyhovovat stanoveným přijímacím kritériím odpovídajícím kvalitě hotových výrobků. Při přijetí materiálu je nezbytná kontrola neporušenosti přepravních obalů. Obaly se surovinami a s obalovým materiálem musí být označeny etiketou s identifikací daného materiálu a šarží. Pokud je zjištěna nějaká nesrovnalost, která by mohla ovlivnit kvalitu výrobku, musí být neprodleně izolována. Podmínky pro skladování musí být vhodné i pro skladovaný materiál. V případě potřeby specifického skladování je nezbytné tak učinit.

Nezbytnou součástí SVP je kvalita vody, která je používána ve výrobě. Systém úpravy vody musí dodávat vodu přesně definované kvality, která je dále ověřována testováním nebo monitorováním procesu její úpravy. Zařízení na samotnou úpravu vody musí být sestaveno tak, aby se zabránilo stání vody a riziku následné kontaminace [44].

### 6.2.5 Výroba

V každém stupni výrobních a balících procesů musí být dodržována opatření, která zajistí, aby byl vyroben výrobek, který splňuje definované vlastnosti. Před zahájením výroby musí být zajištěna veškerá potřebná dokumentace, suroviny a vhodné zařízení, které je dle nařízení čisté a po sanitaci. Výrobní prostory musí být uklizeny, aby nedošlo k promíchání s materiály z předchozích operací.

Ve shodě s recepturou, musí být suroviny odměřovány nebo navažovány do vhodných, čistých a řádně označených nádob. Při výrobě jsou prováděny mezioperační kontroly, které mají zajistit SVP [44].

### 6.2.6 Laboratoř kontroly kvality

Laboratoř kontroly kvality je odpovědná za zabezpečení toho, že jsou provedeny všechny nezbytné kontroly, že bylo provedeno vzorkování a že jsou uvolňovány pouze výrobky, které odpovídají přijímacím kritériím. Výsledky mimo specifikaci musí být přezkoumány oprávněnou osobou a řádně vyšetřeny. Po vyšetření učiní oprávněná osoba rozhodnutí ve smyslu: odchylka, zamítnuto nebo pozastaveno.

Vzorkování musí být prováděno oprávněnou osobou a je definováno na základě:

- ❖ vzorkovací metody,
- ❖ používaného zařízení,
- ❖ odebíraného množství,
- ❖ dodržování opatření, která zabrání kontaminaci,
- ❖ označení vzorku,
- ❖ četnosti vzorkování.

Vzorek hotového výrobku je uchováván vhodným způsobem a v definovaných prostorách. Velikost hotových výrobků má umožnit analýzy prováděné s předpisy [44].

### 6.2.7 Zacházení s výrobkem, který neodpovídá specifikaci

Po zamítnutí hotového výrobku, nerozplněného výrobku, suroviny a obalového materiálu je rozhodnuto o jeho likvidaci. Jestliže celá šarže výrobku nespĺňuje definované přijímací kritéria, odpovědná osoba rozhodne o jeho eventuálním přepracování. Přepracované hotové nebo nerozplněné výrobky musí být opět zkontrolovány odpovědnou osobou [44].

## ZÁVĚR

Zabránění vzniku mikrobiální kontaminace je jedním z hlavních cílů všech výrobců. Pro dosažení odpovídající kvality výrobku se snaží výrobci zabezpečit dostatečnou hygienu při příjmu materiálu, během výroby i následného skladování. Jejich postupy a dodržování SVP jsou pravidelně kontrolovány příslušnými kontrolními orgány. Ke kontaminaci může dojít také při používání samotným konečným spotřebitelem a to z důvodu přítomnosti mikroorganismů na kůži. Trendem dnešní doby je výroba přípravků s minimem konzervačních prostředků, ovšem tento výrobní postup snižuje trvanlivost daného výrobku a je více náchylný ke zmiňované kontaminaci.

V případě porovnání výroby kosmetických a farmaceutických přípravků s potravinářskou výrobou je mnoho zásad velmi podobných. V potravinářství je hlavním ochranným prostředkem systém HACCP, který definuje možná rizika, jejich rozsah, stanovení následných opatření a řešení. Systém HACCP je používán také ve farmaceutickém průmyslu. Kosmetický průmysl tento systém přesně definovaný nemá, ale v menším rozsahu si ho osvojil.

V dalších směrech se potravinářská výroba od kosmetické a farmaceutické výroby neliší. Hlavním cílem je snížení počtu mikroorganismů na limitní hodnoty nebo jejich úplná eliminace. Pro získání konečného výrobku, který odpovídá požadované kvalitě, je tedy nutné zabezpečit optimální podmínky výroby. Jedná se především o výrobní prostory a výrobní zařízení, které musí být snadno udržovatelné podle sanitačního plánu. V případě zaměstnanců je bezpodmínečně nutné dodržení hygienických postupů, jako je mytí rukou při každém vstupu do výroby, nošení předepsaného oblečení a ochranných pomůcek. Následné skladování hotového výrobku musí odpovídat nárokům jednotlivých výrobků, aby nedošlo ke změnám ve složení, které by mohlo vést i ke vzniku kontaminace. Ke každé prováděné činnosti musí být taktéž vedena dokumentace a to deset let po uvedení poslední šarže daného výrobku, ke kterému se daná dokumentace vztahuje.

Samotná mikrobiologická kontrola se pak řídí určitými pravidly. Požadavek na vysoký stupeň hygieny je nárokován především v laboratoři, která by měla mít i odpovídající vybavení. Pro průkaz daných mikroorganismů se používají různé testovací metody a to z toho důvodu, že každý mikroorganismus má jiné nároky jak na kultivační médium, tak i na dobu kultivace a jeho následný průkaz. Průkaz specifických a nespecifických mikroorganismů je specifikován v normě ČSN ISO 18415, všeobecné pokyny pro mikrobiologické vyšetření pak v normě ČSN ISO 21148.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LANSING, M., John P. HARLEY a Donald A. KLEIN. 2002. *Microbiology*. 5th edition. McGraw-Hill Higher Education, 1026 s. ISBN 0072829052.
- [2] SEDLÁČEK, Ivo. 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 267 s. ISBN 9788021042070.
- [3] Obecná mikrobiologie I – Struktura mikrobiální buňky. Distanční text 2007. UTB ve Zlíně. 2007.
- [4] VOTAVA, Miroslav. 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 495 s. ISBN 9788086850047.
- [5] BRANNAN, Daniel K. 1997. *Cosmetic microbiology: A Practical Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 336 s. ISBN 0849337135.
- [6] DENYER, Stephen a Rosamund M. BAIRD. 2007. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices*. 2. přepracované vydání. London: CRC Press, 504 s. ISBN 9781420021622.
- [7] BAIRD, Rosamund M., Norman A. HODGE a Stephen P. DENYER. 2003. *Handbook of Microbiological Quality Control Pharmaceuticals and Medical Devices*. London: CRC Press, 280 s. ISBN 9780203305195.
- [8] *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus* [online] <https://cz.pinterest.com/>
- [9] Potravinářská mikrobiologie I: Mikroorganizmy v potravinářství. Distanční text [online]. UTB Zlín: CEPAC-Morava, 2007 [cit. 2016-05-15].
- [10] *Escherichia coli* [online] <http://www.fhshh.com/>
- [11] DWORKIN, Martin, Stanley FALKOW, Eugene ROSENBERG, Karl-Heinz SCHLEIFER a Erko STACKEBRANDT. 2006. *The Prokaryotes: A Handbook on the biology of bacteria*. 3rd. London: Springer Science & Business Media, 1193 s. ISBN 9780387334882.
- [12] *Enterobacter, Candida albicans*. [online] <http://www.bioquell.com>
- [13] SCHINDLER, Jiří. 2010. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing a.s., 223 s. Sestra (Grada). ISBN 9788024731704.

- [14] Orth, D. S., Kabara, J. J., Denyer, S. P., Tan, S. K. (2006). *Cosmetic and Drug Microbiology*. Informa Health Care, New York. 375 s
- [15] DEKIO, I., M. SAKAMOTO, H. HAYASHI, M. AMAGAI, M. SNEMATSU a Y. BENNO. 2007. Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis. *Journal of Medicinal Microbiology* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47268-0#tab2>
- [16] NOBLE, W. C. 2004. *The Skin microflora and microbial skin disease*. Cambridge [England]: Cambridge University Press, 404 s. ISBN 0521612063.
- [17] *Streptococcus pyogenes* [online]. <https://www.flickr.com/photos/37488016@N08/7154565887>
- [18] HUGBO, Peter G., Anthony O. ONYEKWELI a Ijoma IGWE. 2003. Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.bioline.org.br/pdf?pr03015>
- [19] ZEITOUN, Hend, Mervat KASSEM, Dina RAAFAT, Hamida ABOUSHLIEB a Nourhan FANAKI. 2015. Microbiological testing of pharmaceuticals and cosmetics in Egypt. *BMC Microbiology* [online]. [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1186/s12866-015-0609-z. ISSN 14712180. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/275>
- [20] *Clostridium botulinum* [online] <http://www.nature.com/news/researchers-keep-mum-on-botulism-discovery-1.14019>
- [21] BATT, Carl A. a Richard K. ROBINSON. 2014. *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd edition. Academic Press, 3248 s. ISBN 0123847338.
- [22] *Aspergillus niger* [online]. <http://visualsunlimited.photoshelter.com/gallery-image/Aspergillus/G0000q6TDGJGZWaI/I0000brE2UTgvT8I>
- [23] *Český lékopis 2009: (ČL 2009) = Pharmacopea bohemica MMIX : (Ph.B.MMIX)*. 2009-. Praha: Grada. ISBN 9788024729947

- [24] *Jištění kvality technologických procesů* [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://tresen.vscht.cz/kot/blog/studium/bakalarske/jisteni-kvality-technologickyh-procesu>
- [25] LI, Yifei, Guibing ZHU, Wun Jern NG a Soon Keat TAN. 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of The Total Environment* [online]. [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.018. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713010462>
- [26] RIVERA-UTRILLA, José, Manuel SÁNCHEZ-POLO, María Ángeles FERRO-GARCÍA, Gonzalo PRADOS-JOYA a Raúl OCAMPO-PÉREZ. 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* [online]. [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.059. ISSN 00456535.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513010436>
- [27] BRANNAN, D. K. a P. A. GEIS. 2009. Cosmetics Microbiology. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, 270. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00142-5. ISBN 9780123739445. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445001425>
- [28] KREJČÍ, Jiří. Kosmetika a kosmetologie. Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů. FT UTB Zlín. Registrační číslo CZ. 1.07/2.2.00/28.0132
- [29] GEIS, PHILIP A. 2006. *Cosmetic Microbiology: A Practical Approach: a practical approach*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 312 s. ISBN 0849314534.
- [30] ORTH, Donald S. 2010. *Insights into cosmetic microbiology*. Carol Stream: Allured Books, 336 s. ISBN 9781932633627.
- [31] CHILLER, Katarina, Bryan A. SELKIN a George J. MURAKAWA. 2001. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* [online]. [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x. ISSN 10870024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15529011>
- [32] BOJAR, R. A. a K. T. HOLLAND. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 889-903 [cit. 2016-05-15]. DOI:

- 10.1023/A:1021271028979. ISSN 09593993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1021271028979>
- [33] GÖPFERTO VÁ, D., K. DOHNAL a D JANOVSKÁ. 2002. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. Triton, 148 s. ISBN 80-7254-223-0.
- [34] SANDLE, Tim. 2013. *Sterility, Sterilisation and Sterility Assurance for Pharmaceuticals: Technology, Validation and Current Regulations*. UK: Woodhead Publishing Limited, 362 s. ISBN 9781908818381.
- [35] KRAJÁK, Vladimír, Petr BEDROŠ a Ivo ŠRÁMEK. 2005. *Aktuální problematika hygienických laboratoří: sborník přednášek z 3. ročníku konference : 17.-19.5.2005 Pec pod Sněžkou*. Český Těšín: 2 Theta. ISBN 8086380289.
- [36] *Narizení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné také z [http://www.khskk.cz/khsdata/hv/pbu/narizeni\\_es\\_1223\\_2009.pdf](http://www.khskk.cz/khsdata/hv/pbu/narizeni_es_1223_2009.pdf)
- [37] *Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů* [online]. [cit. 2016-05-12]. Dostupné také z: <https://portal.gov.cz/app/zakony/zakon.jsp?page=0&nr=378~2F2007&rpp=15#seznam>
- [38] *ČSN EN ISO 21148 - Všeobecné pokyny pro mikrobiologické vyšetřování*. 2008. Praha: Český normalizační institut.
- [39] BAREL, A. O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. 2001. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 904 s. ISBN 0824702921.
- [40] *ČSN ISO 175165 – Kosmetika – Mikrobiologie – Mikrobiologické limity*. 2015. Praha: Český normalizační institut.
- [41] *ČSN ISO 18415 - Průkaz specifických a nespecifických mikroorganismů*. 2008. Praha: Český normalizační institut.
- [42] *WHO Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles* [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/TRS986annex2.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TRS986annex2.pdf)
- [43] *Výroba léčiv* [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/leciva/vyroba-leciv>

- 
- [44] *Good manufacturing practice (GMP) Guidelines* [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm)
- [44] ČSN EN ISO 22716 - *Správná výrobní praxe v kosmetice (SVP)*. 2008. Praha: Český normalizační institut.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

<b>SVP</b>	Správná výrobní praxe
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>např.</b>	například
<b>CO<sub>2</sub></b>	oxid uhličitý
<b>ALS</b>	amonium lauryl sulfát
<b>KP</b>	kosmetický přípravek
<b>INCI</b>	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service
<b>EINECS</b>	European Inventory of Existing Chemical Substances
<b>ELINCS</b>	European List of Notified Chemical Substances
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxid vodíku
<b>TSB</b>	Tryptic Soy bujón
<b>KTJ/g</b>	kolonii tvořící jednotka na 1 gram
<b>PQS</b>	Pharmaceutical Quality System
<b>GMP</b>	Good Manufacturing practices
<b>GLP</b>	Good Laboratory practice
<b>GCP</b>	Good Clinical practice

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

OBRÁZEK 1: <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> [8].....	14
OBRÁZEK 2: <i>ESCHERICHIA COLI</i> [10] .....	15
OBRÁZEK 3: <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i> [12].....	16
OBRÁZEK 4: <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> [8].....	17
OBRÁZEK 5: <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i> [17].....	18
OBRÁZEK 6: <i>BACILLUS SUBTILIS</i> [8] .....	18
OBRÁZEK 7: <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i> [20].....	19
OBRÁZEK 8: <i>CANDIDA ALBICANS</i> [12].....	20
OBRÁZEK 9: <i>ASPERGILLUS NIGER</i> [22].....	21
OBRÁZEK 10: <i>OZNAČENÍ TRVANLIVOSTI KP</i> [36].....	30

**SEZNAM TABULEK**

TABULKA 1: KULTIVAČNÍ PODMÍNKY PRO VYBRANÉ MIKROORGANIZMY [40] .....	36
TABULKA 2: MIKROBIÁLNÍ LIMITY [38] .....	37
TABULKA 3: VLASTNOSTI VYBRANÝCH MIKROORGANIZMŮ [41] .....	39