

# Mikrobiološka analiza i utvrđivanje najčešćih uzročnika kontaminacije u Banci tkiva i stanica

---

**Pecko, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:743688>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lucija Pecko

**Mikrobiološka analiza i utvrđivanje najčešćih  
uzročnika kontaminacije u Banci tkiva i  
stanica**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lucija Pecko

**Microbiological analysis and identification of  
the most common causes of contamination in  
The Tissue and Cell Bank**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za transfuzijsku i regenerativnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, na Odjelu banke tkiva i stanica, unutar Laboratorija za tkivno inženjerstvo, pod voditeljstvom dr.sc. Marije Zekušić i suvoditeljstvom izv.prof.dr.sc. Inge Urlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

*Zahvaljujem mentorici dr.sc. Mariji Zekušić, mag.biol.mol. na strpljenju, izdvojenom vremenu i velikoj pomoći prilikom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem suvoditeljici izv.prof.dr.sc. Ingi Urlić, mag.biol.mol. na pruženim vrijednim savjetima i stručnim kritikama.*

*Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela Banke tkiva i stanica, a posebno Marini Bujić Mihica mag.ing.bioproc. na susretljivosti i izdvojenom vremenu.*

*Također, zahvaljujem prim. Ivanki Batarilo, specijalisti medicinske mikrobiologije sa parazitologijom iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na pomoći kod interpretacije mikrobioloških rezultata.*

*Najviše zahvaljujem svojim roditeljima i bližnjima na bezuvjetnoj podršci, ljubavi i vjeri koju su mi pružali tijekom cijelog studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Mikrobiološka analiza i utvrđivanje najčešćih uzročnika kontaminacije u Banci tkiva i stanica

Lucija Pecko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Banka tkiva i stanica (BTS) u Zavodu za transfuzijsku i regenerativnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice je organizirana klinička jedinica u kojoj se obavljaju djelatnosti prikupljanja, uzimanja, obrade, očuvanja, pohrane i raspodjele ljudskih tkiva i stanica namijenjenih za kliničku primjenu. Unutar BTS izgrađen je Laboratorij za tkivno inženjerstvo u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) i prema tehnologiji čistih prostorija. U laboratoriju gdje se radi sa stanicama/tkivima ljudskog porijekla ključno je kontinuirano uzorkovati zrak, kontaktne površine, laboratorijsku opremu, odjeću djelatnika, prste, vodu iz kritične laboratorijske opreme kao i hranjivi stanični medij, alikvote i bioptate tkivnih presađaka. Cilj je, kontinuiranim uzorkovanjem, utvrditi vrstu i broj kolonija najučestalijih mikroorganizama te utvrditi njihov značaj za sigurnost cijelog procesa aseptične proizvodnje tkiva i stanica. Laboratorijski djelatnici predstavljaju glavni izvor kontaminacije što potvrđuje činjenica da je u svim klasama čistog prostora najučestalije bakterije iz rodova *Staphylococcus* (koagulaza negativni stafilokoki, CoNS), *Micrococcus* i *Bacillus*. Mikrobiološka analiza uzoraka provodi se na Odjelu za mikrobiologiju pri Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu s ciljem detekcije prisutnosti aerobnih i anaerobnih bakterija te kvasaca i plijesni. Dozvoljen broj kolonija za čiste prostorije definiran je prema GMP standardu te ne smije biti prekoračen.

(65 stranica, 25 slika, 39 tablica, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: (čiste prostorije, praćenje okoliša, mikroorganizmi, tkivo, stanica)

Voditelj: dr.sc.Marija Zekušić, mag.biol.mol

Suvoditelj: izv.prof.dr.sc. Inga Urlič, mag.biol.mol.

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Inga Urlič

Doc. dr. sc. Romana Gračan

Doc. dr. sc. Ivan Radosavljević

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## Microbiological analysis and identification of the most common causes of contamination in The Tissue and Cell Bank

Lucija Pecko

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The Tissue and Cell Bank (TCB) at the Department of Transfusion and Regenerative Medicine of the Sestre milosrdnice University Hospital Center is an organized clinical unit in which the activities of collecting, taking, processing, preserving, storing and distributing human tissues and cells intended for clinical use are performed. Within TCB, a Tissue Engineering Laboratory was built in accordance with Good Manufacturing Practice (GMP) and clean room technology. In a laboratory working with cells / tissues of human origin, it is crucial to control the level of cleanliness of air, contact surfaces, laboratory equipment, staff clothing, water from critical laboratory equipment as well as nutrient cell medium, aliquots and tissue grafts. The aim is to determine the type and number of colonies of the most common microorganisms by continuous sampling and to determine their importance for the safety of the entire process of aseptic tissue and cell production. Laboratory workers are the main source of contamination, which is confirmed by the fact that in all classes of clean space, the most common bacteria are *Staphylococcus* (coagulase-negative staphylococcus, CoNS), *Micrococcus* and *Bacillus*. Microbiological analysis of samples is performed at the Department of Microbiology at the Croatian Institute of Transfusion Medicine with the aim of detecting the presence of aerobic and anaerobic bacteria and yeasts and molds. The permitted number of colonies for clean rooms is defined according to the GMP standard and must not be exceeded.

(65 pages, 25 figures, 39 tables, 29 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: (clean rooms, environmental monitoring, microorganisms, tissue, cell)

Supervisor: Marija Zekušić, PhD

Co-supervisor: Dr. Inga Urlić, Assoc. Prof.

Reviewers:

Dr. Inga Urlić, Assoc. Prof.

Asst. Prof. Romana Gračan

Asst. Prof. Ivan Radosavljević

Thesis accepted: 15<sup>th</sup> September, 2021.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Osnovne informacije i povijest čistih prostora.....	1
1.2. Klasifikacija čistih prostora .....	3
1.3. Klasifikacija i HEPA filteri.....	6
1.4. Mikrobiološko praćenje čistih prostora.....	8
1.5. Mikrobiološko uzorkovanje okoliša .....	9
1.5.1. Uzorkovanje zraka.....	10
1.5.2. Uzorkovanje kontaktnih površina .....	11
1.5.3. Uzorkovanje odjeće i rukavica kod osoblja .....	11
1.6. Mikrobiološko uzorkovanje bioloških uzoraka.....	12
1.6.1 Amnijska membrana .....	12
1.6.2. Keratinociti i limbalne stanice uzgojeni kao lijekovi za napredne terapije.....	14
1.7. Osoblje i zaštitna oprema .....	15
1.8. Čišćenje i održavanje čistih prostora .....	16
1.9. Analiza rizika.....	17
1.10. Najčešći mikroorganizmi i njihov značaj u čistim prostorijama .....	17
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	19
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	20
3.1. Materijali.....	20
3.1.1. Potrošni materijal i reagensi .....	20
3.1.2. Oprema .....	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Određivanje minimalnog broja uzorkovanja zraka u čistim prostorijama .....	21
3.2.2. Određivanje minimalnog broja uzorkovanja kontaktnih površina u čistim prostorijama ...	22
3.2.3. Određivanje minimalnog broja mjesta uzorkovanja unutar mikrobiološkog kabineta .....	24
3.2.4. Metode uzorkovanja .....	25
3.2.4.1. Uzorkovanje zraka .....	25
3.2.4.2. Uzorkovanje površina .....	26
3.2.4.3. Uzorkovanje prstiju .....	26
3.2.4.4. Uzorkovanje odjeće djelatnika.....	26
3.2.4.5. Uzorkovanje vode iz vodene kupelji i CO <sub>2</sub> inkubatora .....	27
3.2.4.6. Uzorkovanje tkiva/stanica .....	28



3.2.5. Priprema Gram preparata.....	30
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>31</b>
4.1. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi A.....	31
4.1.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka.....	31
4.1.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina.....	32
4.1.3. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja prstiju .....	33
4.1.4. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja tkiva/stanica .....	34
4.2. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine za zrak i površine u klasi B.....	36
4.2.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka.....	36
4.2.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina.....	37
4.3. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine za vodu iz kritične opreme u klasi B.....	39
4.3.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja vode iz kritične opreme .....	39
4.4. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine za odjeću djelatnika u klasi B.....	41
4.4.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja odjeće djelatnika .....	41
4.5. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi 1B.....	43
4.5.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka.....	43
4.5.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina.....	44
4.6. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi C.....	46
4.6.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka.....	46
4.6.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina.....	47
4.7. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi D.....	50
4.7.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka.....	50
4.7.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina.....	50
4.8. Makroskopski i mikroskopski prikaz najčešće detektiranih mikroorganizama.....	54
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>57</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>61</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>62</b>

## Popis kratica:

AM - Amnijska membrana (engl. *Amniotic Membrane*)

ATMP - Lijekovi za naprednu terapiju (engl. *Advanced Therapy Medicinal Products*)

BTS - Banka tkiva i stanica (engl. *Tissue and Cell Bank*)

CFU - Broj bakterijskih stanica (engl. *Colony Forming Unit*)

CoNS - Koagulaza negativni stafilokoki (engl. *Coagulase negative staphylococci*)

EDQM - (engl. *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe*)

EMA - Europska medicinska agencija (engl. *European Medicines Agency*)

EPA - (engl. *Efficient Particulate Air*)

FDA - Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FMEA - Analiza učinaka neuspješnog načina rada (engl. *Failure Mode and Effects Analysis*)

FTA - Dijagram analize stabla pogrešaka (engl. *Fault Tree Analysis*)

GMP - Dobra proizvođačka praksa (engl. *Good Manufacturing Practice*)

HACCP - Sustav analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point*)

HEPA - Visokoučinkoviti zračni filter (engl. *High Efficiency Particulate Air*)

HVAC - Sustav grijanja, ventilacije i klimatizacije (engl. *Heating, Ventilation and Air Conditioning*)

HZTM - Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

ISO - Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*)

LZTI - Laboratorij za tkivno inženjerstvo

MSC - Mikrobiološki zaštitni kabineti (engl. *Microbiological Safety Cabinets*)

PCR - Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

RODAC - Otkrivanje i brojanje organizama koji se repliciraju (engl. *Replicate Organism Detection And Counting*)

SDA - (engl. *Sabouraud Dextrose Agar*)

TSA - Triptonski sojin agar (engl. *Tryptone Soya Agar*)

ULPA - (engl. *Ultra Low Particulate Air*)

## 1. UVOD

### 1.1. Osnovne informacije i povijest čistih prostora

Čisti prostori ili čiste sobe (engl. *Clean room*) su područja s kontroliranim okolišnim uvjetima u kojima se obrađuju tkiva i stanice. Čisti prostori mogu biti označeni kao certificirane ako su u potpunosti u skladu s priznatim nacionalnim ili međunarodnim standardima. Regulatorne zahtjeve za čiste sobe u Europskoj uniji detaljno opisuje Europska medicinska agencija (EMA) kao dobru proizvođačku praksu (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) dok je u Sjedinjenim Američkim Državama za iste nadležna Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) (Tršan i sur., 2019).

Prema Međunarodnoj organizaciji za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) standard 14644-1 - čista soba je prostorija u kojoj se kontrolira broj i veličina čestica u zraku i koja je konstruirana i korištena na način da se minimalizira unošenje, stvaranje i zadržavanje čestica. Standard ISO14698 propisuje ocjenu i interpretaciju biokontaminacije (kontaminacija živim česticama) u čistim i kontroliranim prostorima. U čistim prostorima se kontroliraju i ostali relevantni parametri, kao na primjer, temperatura, vlažnost i tlak zraka (Whyte, 2001). Čisti prostori su neophodni za siguran rad u području regenerativne medicine (proizvodnja tkivnih presađaka), farmaceutske industrije (proizvodnja lijekova), prehrambene industrije (proizvodnja hrane) te u računalnoj industriji i nanotehnologiji.



Slika 1. Laboratorij s čistim sobama

(Preuzeto: <https://www.kcprofessional.com/en-us/workplace-insights/health-and-safety/reusable-cleanroom-apparel-contamination-risks>, pristupljeno 22.06.2021.)

Počeci korištenja čistih prostora u kliničkim bolnicama javljaju se 1890-ih godina, a zatim ih prate i ostale industrije. Lord Lister, britanski kirurg se smatra začetnikom ideje o čistim prostorima zbog njegove spoznaje da bakterije izazivaju infekciju rana te da ukoliko se uklone iz operacijske dvorane neće doći do infekcije. On je počeo koristiti fenol ili karbolnu kiselinu ( $C_6H_5OH$ ) kao sredstvo za dezinfekciju kirurških instrumenata i rana i tom metodom pridonio redukciji nastanka sepse. Ova metoda dezinfekcije uvedena je kao jedna od glavnih aseptičkih tehnika. Nadalje, 1900. godine uvedeno je i korištenje zaštitne laboratorijske opreme kao što su rukavice, maske i kute. To su bile osnove prema kojima su se dalje nastavile razvijati tehnologije čistih prostora kakve se danas koriste. Osim toga, nakon Drugog svjetskog rata (1945. god.) počinje se koristiti sustav ventilacije s filterima zraka. Tijekom 1960. godine, Blowers i Crew su pokušali dobiti nešto slično današnjem sustavu s jednosmjernim protokom zraka iz difuzora postavljenih preko cijelog stropa prostorije u operacijskoj dvorani, ali zbog toplinskih zračnih strujanja od svjetiljki u prostoriji i kretanja osoblja, nisu uspjeli osigurati jednosmjerni protok zraka istovjetan današnjem, već su dobili efekt klipa (engl. *Piston Effect*).

Nakon njih, profesor John Charnley, britanski ortoped tijekom transplantacije kuka, pokušao je poboljšati efekt klipa. Umjesto korištenja cijelog stropa, on uvodi smanjeni prostor, veličine  $7 \times 7$  m<sup>2</sup> tzv. „greenhouse“ i tako je postigao poboljšani silazni jednosmjerni protok zraka. Njegovi ventilacijski sustavi povećali su dovod zraka u prostoriju te na taj način reducirali brojnost mikroorganizama.

Međutim, 1961. je ipak bila ključna godina u povijesti čistih prostora zbog konačnog izuma „jednosmjernog“ ili „laminarnog“ protoka zraka u Sandia Laboratorijima, Albuquerque, New Mexico, SAD, gdje glavnu zaslugu nosi američki fizičar Willis Whitfield. Umjesto da se zrak dovodi stropnim difuzorima, dovodio ga je preko HEPA filtara. Na taj način je osiguran jednosmjerni protok zraka, a to postignuće objavljeno je u časopisu „Time“ (13.04.1962. godine) te je na taj način široj publici otkrivena važnost održavanja sterilnosti čistih prostora i na koji način se to uspješno postiže. Tim novitetom je smanjena učestalost postoperativnih infekcija s 10% na manje od 1%. Vijeće za medicinska istraživanja Ujedinjenog Kraljevstva je 1980-ih godina potvrdilo da korištenje jednosmjernog protoka zraka zajedno s ostalim ranije otkrivenim mjerama dezinfekcije, dovodi do značajnog smanjenja pojave sepse i postoperativnih infekcija.

Pojam „čista“ u definiciji čistih prostora prvenstveno znači strogu kontrolu onečišćenja zraka česticama unutar određenog raspona (Carlberg, 2004). Broj čestica obično se ispituju pomoću laserskog brojača čestica (Sandle, 2015). Što se tiče generalnog dizajna čistih soba, iste bi trebale biti izgrađene od nepropusne konstrukcije, a unutarnje površine istih trebaju biti prikladne za čišćenje te dovoljno čvrste i otporne na upotrebljavana sredstva za čišćenje i dezinfekciju (Sandle, 2015). Također, čisti prostori zahtijevaju korištenje laboratorijske opreme koja omogućuje sterilnije uvjete i smanjuje unošenje i stvaranje (produkciju) kontaminirajućih čestica unutar prostorija (Carlberg, 2004). Osim toga, parametri poput temperature i vlage trebaju biti kontrolirani kroz sustav grijanja, ventilacije i klimatizacije (engl. *Heating, Ventilation and Air Conditioning*, HVAC). Čiste sobe imaju viši tlak zraka od susjednih (manje čistih područja) kako bi se spriječio ulazak kontaminiranog zraka. Najvažniji dio u održavanju čistih prostorija je filtracija zraka kroz HEPA (engl. *High Efficiency Particulate Air*) i ULPA (engl. *Ultra Low Particulate Air*) filtre (Sandle, 2015).

Prema sustavu ventilacije, čiste prostorije se dijele na dva glavna tipa: prostorije s konvencionalnom, turbulentnom ventilacijom i prostorije s jednosmjernim, laminarnim protokom zraka. Kod prostorija s konvencionalnom ventilacijom čisti zrak koji ulazi u prostoriju miješa se s već prisutnim zrakom u kojem postoji određena razina onečišćenja i razrjeđuje ga (Whyte, 2001). Međutim, kretanje zraka u sobi s konvencionalnom ventilacijom obično doživljava turbulenciju. Turbulencija stvara „mrtva mjesta“ tj. područja u sobi gdje se brzina zraka znatno smanjuje, uzrokujući da se čestice u zraku slegnu na pod ili na radne površine (Carlberg, 2004). Stoga, ako je potrebno proizvesti čišći zrak unutar prostorije, koristi se sustav ventilacije s jednosmjernim protokom zraka.

## **1.2. Klasifikacija čistih prostora**

Čisti prostori se klasificiraju prema njihovoj namjeni, odnosno glavnoj djelatnosti koja se obavlja unutar prostorije, a klasifikacija se temelji na razini čistoće zraka. Svrstavanjem čistih prostora u razrede ili klase ta područja postaju „kontrolirani okoliš“. Kontrolirano okruženje je svako područje u aseptičnom procesnom sustavu za koje se razina čestica i mikroorganizama u zraku kontrolira do određene razine u odnosu na aktivnosti koje se provode u tom okruženju. Mjerenje broja čestica u zraku ključni je dio kontrole okoliša (Sandle, 2015). Razine onečišćenja

u zraku obično se određuju automatiziranim laserskim brojačima čestica. Ranija verzija klasifikacije čistih prostora temeljila se na Federalnom standardu 209 (klase od A do D) SAD-a objavljenom 1963. godine (Whyte, 2001). Standard su slijedile četiri revizije koje su izdane tijekom slijedećih 29 godina. Zadnja revizija (FS209E) objavljena je 1992. godine (Carlberg, 2004). U najnovijoj verziji Standarda 209 E, koncentracija čestica u zraku mjeri se po metru kubičnom, a klasifikacija je definirana kao logaritam koncentracije čestica veličine  $\geq 0,5 \mu\text{m}$  po  $\text{m}^3$  (Whyte, 2001).

Danas se čisti prostori klasificiraju nizom ISO standarda kao što je ISO 14644 grupa koja uključuje dva ISO standarda od kojih, dio 1 (ISO 14644-1) (Tablica 1.) postavlja opće standarde za klasifikaciju čistoće zraka, a dio 2 (ISO 14644-2) utvrđuje načine ispitivanja čistoće.

Tablica 1. Standardna klasifikacija ISO-14644-1

(preuzeto i prilagođeno: <https://www.portafab.com/what-is-a-cleanroom.html>)

Klasa	Maksimalna veličina čestica/ $\text{m}^3$						FED STD 209E EKVIVALENT
	$\geq 0,1 \mu\text{m}$	$\geq 0,2 \mu\text{m}$	$\geq 0,3 \mu\text{m}$	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$	
ISO 1	10	2					
ISO 2	100	24	10	4			
ISO 3	1000	237	102	35	8		Klasa 1
ISO 4	10000	2370	1020	356	83		Klasa 10
ISO 5	100000	23700	102000	3520	832	29	Klasa 100
ISO 6	1000000	237000		35200	8320	293	Klasa 1000
ISO 7				352000	83200	2930	Klasa 10000
ISO 8				3520000	832000	29300	Klasa 100000
ISO 9				35200000	8320000	293000	Sobni zrak

Prvi dokument objavljen 1999. godine je ISO 14644-1 i naziva se „Klasifikacija čistoće zraka“.

On se temelji na sljedećem izračunu:

$$C_n = 10^N \times \left[ \frac{0.1}{D} \right]^{2.08}$$

gdje je Cn najveća dopuštena koncentracija čestica u zraku, prikazana kao broj čestica/m<sup>3</sup> zraka. Simbol N je ISO klasifikacijski broj koji ne smije biti veći od broja 9. Simbol D je smatrana veličina čestica u μm. Broj 0,1 je konstanta prikazana u μm (Whyte, 2001). U farmaceutskoj industriji osim navedenog međunarodnog standarda, za klasifikaciju čistih prostorija usvojeni su još i Vodič Europske unije za dobru proizvođačku praksu GMP Guidelines, Eudralex i standard izrađen od strane FDA. Prema tim standardima se klasifikacija čistih prostora vrši na temelju abecednih zapisa. Dakle, klasa A je najviša razina čistoće dok je klasa D označena kao najniža. ISO standardi brojčano ocjenjuju čiste prostore, dakle što je niži broj (poput "5"), "soba je čistija", a ako je označena većim brojem (poput „9“) soba se smatra „manje čistom“. ISO razredi i EU GMP ocjene približno su jednaki osim malih razlika u broju dozvoljenih čestica određene veličine (Sandle, 2015).

Klasifikacija čistog prostora također ovisi o stanju uporabe. Prema ISO 14644-1 postoje sljedeća tri stanja uporabe: stanje nakon izgradnje (engl. *as built*) u kojem je soba kompletno izgrađena ali bez prisutne proizvodne opreme, materijala ili osoblja. U mirovanju/statično stanje (engl. *at rest*) u kojem je čista soba potpuno opremljena ali bez prisustva osoblja i treće stanje je operativno/dinamično stanje (engl. *operational*) za vrijeme rada u kojem je prisutno i osoblje. Za uvjete "u mirovanju" postoji razlika između europskih / ISO i američkih standarda. Europski standard kao što je GMP definira statičko stanje kao sobu bez prisutnog osoblja, ali s opremom koja normalno radi. Američki standardi opisuju to stanje kada oprema ne radi. Dok se kod europskih i ISO standarda uzimaju u obzir i „statička“ i „dinamična“ stanja, FDA standardi su usredotočeni samo na dinamično stanje (Sandle, 2015).

Razred A odgovara klasi 100 prema FS209 i ISO 5; razred B odgovara klasi 1 000 prema FS209 i ISO 6, razred C odgovara klasi 10 000 prema FS209 i ISO 7 dok je razred D izjednačen s 100 000 prema FS209 i ISO 8 (Tablica 2.).

Tablica 2. Klasifikacija EU GMP (Good Manufacturing Practice)

(preuzeto i prilagođeno:

<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/2430/cleanroom-standards/>)

Klasa/razred	Maksimalno dozvoljen broj čestica/m <sup>3</sup>			
	U mirovanju		U radu	
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm
A	3500 (3520)	1 ili 20 (29)	3500 (3520)	1 ili 20 (29)
B	3500 (3520)	1 (29)	350000 (352000)	2000 (2930)
C	350000 (352000)	2000 (2930)	3500000 (3520000)	20000 (29300)
D	3500000 (3520000)	20000 (29300)	Nije definirano	Nije definirano

### 1.3. Klasifikacija i HEPA filteri

Ukupna razina čistoće prostora ovisi prije svega o kvaliteti i čistoći zraka. Filtracija je najučinkovitiji način za dobivanje čistog zraka. Da bi se to postiglo, koriste se filteri koji s velikom učinkovitošću uklanjaju nečistoće i omogućuju dovod čistog zraka. Prvi korišteni filteri, a koji se i danas koriste u većini čistih prostorija, su HEPA filteri (engl. *High Efficiency Particulate Air filter*) s učinkovitošću uklanjanja čestica veličine 0,3 μm od 99,97%. Kasnije su proizvedeni još efikasniji, ULPA (engl. *Ultra Low Penetration Air filter*) filteri koji imaju sposobnost uklanjanja čestica veličine 0,1 - 0,2 μm s učinkovitošću 99,99% što osigurava još čišći zrak unutar čistih prostora. Filteri i pripadajući ventilacijski sustavi razlikuju se ovisno o klasi (Whyte, 2001). Filteri su podijeljeni u razrede E, H i U na temelju učinkovitosti filtriranja (Tablica 3.). Razred E tj. EPA (engl. *Efficient Particulate Air filter*) filteri (E10-E12) koriste se u čistim prostorima ISO klase 7/8. Za čiste prostore ISO klase 6 (1 000 000) i viših klasa koriste se filteri H razreda, HEPA filteri koji u potpunosti prekrivaju strop prostorije i omogućuju jednosmjerni protok zraka unutar prostorije. Za prostorije ISO klase 4 (10 000) i više klase koriste se filteri razreda U, ULPA filteri s jednosmjernim protokom zraka (Whyte, 2001).



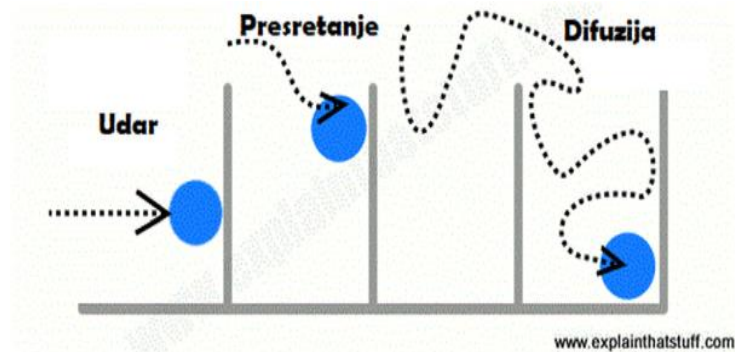
Tablica 3. Klasifikacija filtera prema EN 1822:2009 (preuzeto i prilagođeno:

<https://www.generalfilter.com/en/norms/en-1822/>)

Klasa/razred filtera	Integralna vrijednost		Lokalna vrijednost	
	Efikasnost %	Prodiranje %	Efikasnost %	Prodiranje %
E10	$\geq 85$	$\leq 15$	-	-
E11	$\geq 95$	$\leq 5$	-	-
E12	$\geq 99,5$	$\leq 0,5$	-	-
H13	$\geq 99,95$	$\leq 0,05$	$\geq 99,75$	$\leq 0,25$
H14	$\geq 99,995$	$\leq 0,005$	$\geq 99,975$	$\leq 0,025$
U15	$\geq 99,9995$	$\leq 0,0005$	$\geq 99,9975$	$\leq 0,0025$
U16	$\geq 99,99995$	$\leq 0,00005$	$\geq 99,99975$	$\leq 0,00025$
U17	$\geq 99,999995$	$\leq 0,000005$	$\geq 99,999975$	$\leq 0,0001$

Obično su HEPA filteri izrađeni od nasumično isprepletenih vlakana od borosilikatnog stakla a prema konstrukciji se dijele na dvije vrste: jako naborani ili slabo nabrani filteri. Kod jako naboranih filtera, filter papiri su presavijeni naprijed-natrag jedan do drugog u širini od 15-30 cm. Čvrstoću daje naborana aluminijska folija koja služi kao razdvajač. Kod slabo nabranih filtera umjesto aluminijske folije koriste se vrpce ili žice preko kojih je savijen papir što omogućuje više nabora i kompaktniju strukturu. Takvi filteri se koriste kod čistih soba s jednosmjernim protokom zraka. Cijela konstrukcija se nalazi unutar kućišta koje može biti izgrađeno od metala, plastike ili drveta, a konstrukcija je zabrtvljena na rubovima kako bi se spriječilo istjecanje nečistog zraka. Čestice u zraku su uglavnom zarobljene (lijepe se za vlakno filtera) jednim od sljedeća tri mehanizma (Slika 2.):

1. difuzija
2. udar
3. presretanje



Slika 2. Mehanizmi filtracije čestica u HEPA filteru (Preuzeto i prilagođeno: <https://www.explainthatstuff.com/hepafilters.html>, pristupljeno 24.06.2021.)

Proces hvatanja čestica difuzijom odnosi se na male čestice, promjera ispod  $0,1 \mu\text{m}$ , a također je poznat kao „Brownovo gibanje“ gdje se male čestice kreću nasumično zbog sudaranja s okolnim malim česticama i molekulama zraka. Tim nasumičnim gibanjem male čestice dodiruju se s vlaknima filtra ili s drugim malim već zarobljenim česticama. U procesu hvatanja udarom, gdje veće čestice ne mogu izbjeći vlakna slijedeći zavojite konture zračne struje i prisiljene su se izravno ugraditi u jedno od njih; što se povećava s većom brzinom protoka. Presretanje, gdje se čestice koje slijede liniju strujanja u zračnoj struji nalaze unutar jednog radijusa vlakna i prijanjaju uz njega. Uklanjanje čestica osim o veličini same čestice, ovisi i o gustoći čestice te vrsti medija filter papira.

#### 1.4. Mikrobiološko praćenje čistih prostora

Program praćenja okoliša (engl. *Environmental Monitoring Program*) se uspostavlja u skladu sa zahtjevima ISO normi (ISO14644-1; ISO14644-2) i dobre proizvođačke prakse, Saplement I u kojima su predložene vrste i intervali ispitivanja čistoće obzirom na klasifikaciju prostorije, a u svrhu postizanja zadanih uvjeta. To je program kojim se ocjenjuje čistoća procesnog okruženja temeljena na učinkovitosti čišćenja i dezinfekcije (Sandle, 2015). Usmjeren je na otkrivanje, smanjenje ili uklanjanje mikrobiološke kontaminacije u čistim prostorima (Carlberg, 2004). Za svaki čisti i kontrolirani prostor treba napraviti i dokumentirati analizu rizika te odrediti mjesta i učestalost uzorkovanja.

Tlak zraka, kao jedan od najvažnijih parametara, u prostoriji više klase mora biti veći od onog u prostoriji niže klase kako bi protok zraka išao u ispravnom smjeru, iz najčišćeg u manje čisto područje. Kada postoji razlika u tlaku između najčišćih područja i manje čistih područja smanjuje se rizik od vraćanja onečišćenog zraka. Ispitivanje diferencijalnog tlaka zraka pokazuje da su razlike u tlaku između područja prihvatljive i da zrak teče u ispravnom smjeru. Također, potrebno je provjeriti učinkovitost uklanjanja čestica iz zraka i dovod zraka visoke kvalitete u čistu sobu pomoću HEPA/ULPA filtra kako ne bi došlo do kontaminacije (Caselli-Fernandez i Terkola, 2006).

Praćenje okoliša temelji se na mikrobiološkim metodama uzorkovanja s ciljem otkrivanja promjenjivih trendova u broju i vrsti mikroorganizama unutar čistog prostora (Sandle, 2015). Nakon što se navedena ispitivanja provedu s prihvatljivim rezultatima, potrebno je izmjeriti koncentraciju čestica i razinu mikrobne kontaminacije u zraku, površinska mikrobiološka onečišćenja na opremi, kontaktnim površinama, zidovima/panelima, podovima i odjeći djelatnika. Osim navedenog potrebno je pratiti i mjeriti temperaturu i relativnu vlagu unutar prostora. Ukoliko rezultati praćenja čistih prostora prelaze propisane granice, potrebno je uvesti korektivne mjere.

## **1.5. Mikrobiološko uzorkovanje okoliša**

Unatoč strogim pravilima korištenja i održavanja čistih prostora, kontinuirani ulazak radnog osoblja predstavlja potencijalan izvor mikroorganizama. Zbog toga je u njima potrebno nadgledati i kontrolirati mikrobnu populaciju tzv. mikrobiološki profil. Da bi se otkrilo postojanje mikroorganizama u tom okruženju uobičajeno se vrši uzorkovanje zraka, kontaktnih površina i odjeće laboratorijskog osoblja (Whyte, 2001). Sve metode uzorkovanja temelje se na korištenju hranjivog medija za uzgoj, poput triptonskog sojinog agara (TSA) za bakterije ili npr. Sabouraud dextroznog agara (SDA) selektivnog za gljive (Sandle, 2015). Ovisno o korištenom mediju prilagođavaju se temperatura i vrijeme inkubacije. Bakterije se normalno inkubiraju 48 sati na 30 °C do 35 °C; daljnja 72 sata na 20 °C do 25 °C omogućit će rast gljiva (Whyte, 2001). Mikrobiološko uzorkovanje provodi se za vrijeme obavljanja uobičajenih aktivnosti uz prisutno laboratorijsko osoblje (Sandle, 2015). Dopuštene mikrobne koncentracije u čistim prostorima koje ne smiju biti prekoračene dane su u EU GMP-u Annex I Manufacture of sterile medicinal products i FDA „Smjernice o sterilnim lijekovima proizvedenim aseptičnom preradom“ (Whyte, 2001).

Očitavanje mikrobioloških ploča se provodi prema definiranom, standardiziranom postupku. Prema EU GMP-u, otkriveni CFU u područjima A i B razreda/klasa moraju se identificirati do roda i vrste (*European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe* (EDQM), 2019). Na temelju podataka dobivenih mikrobiološkom analizom uspostavljaju se razine upozorenja i djelovanja u svrhu smanjenja/uklanjanja mikrobiološke kontaminacije.

### **1.5.1. Uzorkovanje zraka**

Uzorkovanje zraka obavlja se aktivnom ili pasivnom metodom. Pasivna (kvalitativna) metoda podrazumijeva korištenje taložnih ploča postavljenih na mjesta s najvećim rizikom od onečišćenja, dok aktivna metoda koristi volumetrijske uređaje za uzorkovanje zraka koji dinamički prikupljaju čestice iz poznatih količina zraka, što omogućava kvantitativnu procjenu broja mikroorganizama po volumenu uzorkovanog zraka. Čestice u zraku, poput prašine ili ljuskica kože, gotovo uvijek sadrže mnogo mikroorganizama (Carlberg, 2004). Oni će na krutoj/polukrutoj hranjivoj podlozi, nakon propisane inkubacije, porasti u kolonije, veće ili manje, različitih oblika, konzistencije, boje, mirisa. Ta fenotipska svojstva pomažu u identifikaciji mikroorganizma. Porasle kolonije se prikazuju kao broj bakterijskih stanica koje su formirale kolonije (engl. *Colony Forming Unit*, CFU) po volumenu uzorkovanog zraka.

Pasivno uzorkovanje zraka temelji se na gravitacijskom taloženju mikroorganizama na površinu ploča za uzorkovanje. Najčešće korištena podloga za taloženje je TSA u Petrijevoj zdjelici promjera 90 mm. Ploče se postavljaju kroz određeni vremenski period na rizična mjesta unutar prostorije. Vrijeme izlaganja ploče za taloženje može varirati no prema EU GMP je preporučljivo vrijeme od maksimalno 4 sata. Obzirom da postoji rizik od isušivanja agara, navedeno vrijeme izlaganja ne smije se prekoračiti. Iz istog razloga količina agara mora ispuniti 2/3 Petrijeve zdjelice. Osim toga, na isušivanje agara utječu protok i vlažnost zraka unutar prostorije.

### **1.5.2. Uzorkovanje kontaktnih površina**

Mikrobiološko uzorkovanje površina najčešće se provodi korištenjem kontaktnih ploča i briseva. Kontaktne ploče koriste se kod uzorkovanja ravnih, pravilnih površina kao što su zidovi, stolovi, podovi i oprema dok se brisevi koriste za uzorkovanje nepravilnijih i teže dostupnih površina (Carlberg, 2004). Kontaktne ploče su plastične Petrijeve zdjelice promjera 50–55 mm i površine 25 cm<sup>2</sup>. Ispunjene su hranjivim agarom do razine iznad ruba ploče, a podignuta površina, po kojoj se razlikuju od standardnih Petrijevih zdjelica, omogućuje stvaranje zrcalne slike uzorkovane površine. Uzorkovanje se izvodi blagim pritiskom površine agara na kontaktnu podlogu. Mikroorganizmi s površine na taj način se prenose na agar te nakon određenog vremena inkubacije izrastu kolonije mikroorganizama koje se zatim mogu prebrojati. Zbog tog postupka takve se kontaktne ploče označavaju kraticom RODAC (engl. *Replicate Organism Detection And Counting*) što znači „Otkivanje i brojanje organizama koji se repliciraju“ (Sandle, 2015). Moguće je da uzorkovane površine sadrže zaostala sredstva za dezinfekciju koja mogu djelovati na zaustavljanje rasta mikroorganizama. Da bi se to spriječilo, hranjivi agar koji se nalazi unutar ploče trebao bi sadržavati odgovarajući neutralizator. Najčešće se koriste neutralizatori poput Tween 80 ili lecitina. Uzorkovanje površina brisevima podrazumijeva korištenje plastičnih štapića sa sterilnim mekanim vrškom sastavljenim od pamuka, alginata, viskoze ili rajona (Sandle, 2015). Uzorkovanje se izvodi povlačenjem vrhom brisa po ispitivanoj površini pri čemu je potrebno okretati bris kako bi se pokrili svi dijelovi. Postupak je potrebno ponoviti nekoliko puta u različitim smjerovima.

### **1.5.3. Uzorkovanje odjeće i rukavica kod osoblja**

Uzorkovanje osoblja provodi se kontaktnim pločama ili trakama za uzorkovanje, pri završetku rada unutar čistog prostora. Ruke djelatnika kontroliraju se otiskom svih pet prstiju lijeve i desne ruke laganim pritiskom donje strane prstiju o površinu hranjivog agara unutar kontaktnih ploča. Jedna kontaktna ploča se koristi za uzorkovanje prstiju jedne ruke (Caselli-Fernandez i Terkola, 2006). Za uzorkovanje odjeće osoblja češće se koriste trake za uzorkovanje koje se pritisnu o odjeću. Rukavice i odjeća se nakon toga dezinficiraju ili zamjenjuju novima.

## 1.6. Mikrobiološko uzorkovanje bioloških uzoraka

Mikrobiološka ispitivanja bioloških uzoraka provode se prije obrade tkiva te nakon obrade, prije kliničke primjene tkiva ili stanica kao lijeka za napredne terapije (engl. *Advanced Therapy Medicinal Products*, ATMP). U slučajevima kad nije moguće uzorkovati konačne presatke, umjesto primarnog tkiva može se uzorkovati npr. mediji za transport, mediji za uzgoj stanica ili puferi za ispiranje (EDQM, 2019). Mikrobiološka ispitivanja mogu se provesti i tijekom procesa obrade/proizvodnje ukoliko priroda tkiva to dopušta. Ljudsko tkivo koje se uzima nakon smrti (npr. kadaverična koža), potrebno je mikrobiološki analizirati na samom početku, tijekom uzimanja tkiva od preminulog darivatelja tj. prije obrade u laboratoriju jer je to ključni preduvjet za daljinu obradu.

### 1.6.1. Amnijska membrana

Amnijska membrana (AM) se koristi već dugi niz godina u različitim medicinskim područjima kao što su dermatologija, oftalmologija, transplantacijska i regenerativna medicina i slično. Klinički i eksperimentalni podaci pokazali su kako AM pruža kompatibilnu podlogu za rast stanica, olakšavajući migraciju i diferencijaciju epitelnih stanica, podržavajući održavanje izvornog fenotipa epitela, uz vrlo nisku antigenost. AM kao biološko tkivo ima protuupalne karakteristike, antibakterijski učinak, smanjuje stvaranje ožiljaka, smanjuje vaskularizaciju, pojačava zacjeljivanje rana i smanjuje bol. Postupak obrade posteljice tj. odvajanje amniona od koriona, dekontaminacija i ispiranje amnijske membrane provodi se u mikrobiološkom kabinetu klase II. Djelatnici se tijekom obrade moraju pridržavati pravila aseptičnog rada. Metode koje se primjenjuju za dekontaminaciju tkiva obično su bazirane na postupcima kojima se čuva vitalnost i/ili funkcionalnost tkiva. Postupkom dekontaminacije trebala bi se ukloniti sva onečišćenja s izvornog materijala (EDQM, 2019). Nakon koraka dekontaminacije treba provesti postupak ispiranja antibiotika na tkivima te ponoviti uzorkovanje hranjivog medija, briseve i bioptat tkiva za mikrobiološku analizu kako bi se izbjegli lažno negativni rezultati. Nakon odvajanja, dekontaminacije i ispiranja AM slijedi priprema amnijskih presađaka i njihovo zamrzavanje.

Kvantitativnim i kvalitativnim metodama određuje se broj mikroorganizama u uzorku tkiva te identificiraju prisutne vrste. Osjetljivost metode ovisi o količini uzorka i o tome sadrži li uzorak zaostale antibiotike koji mogu utjecati na rast mikroorganizama i dati lažno negativne rezultate

(EDQM, 2019). Nakon provedenog mikrobiološkog ispitivanja, ovisno o dobivenim rezultatima, postupa se prema zadanim kriterijima prihvaćanja/odbijanja tkiva amnijske membrane. Mikroorganizmi koji se smatraju patogenima i jako virulentnim su:

*Acinetobacter spp.*  
*Aspergillus spp.*  
*Bacillus spp.*  
*Bacteroides spp.*  
*Beta-haemolytic Streptococci*  
*Burkholderia cepacia complex*  
*Candida spp.*  
*Clostridium spp. (notably C. perfringens)*  
*Corynebacterium diphtheriae*  
*Enterobacteriaceae (coliforms)*  
*Enterococcus spp.*  
*Fusobacterium spp.*  
*Klebsiella rhinoscleromatis*  
*Listeria monocytogenes*  
*Mucor spp.*  
*Mycobacteria spp. (for at-risk donors)*  
*Neisseria gonorrhoea*  
*Nocardia spp.*  
*Penicillium spp.*  
*Porphyromonas spp.*  
*Prevotella spp.*  
*Pseudomonas spp.*  
*Salmonella spp.*  
*Shigella spp.*  
*Sphingomonas paucimobilis*  
*Staphylococcus aureus*  
*Stenotrophomonas maltophilia*  
*Streptococcus pyogenes*

Ukoliko se bilo koji od navedenih mikroorganizama detektira na tkivu ili u transportnom mediju i prije antibiotske/antimikotske dekontaminacije amnijske presatke je potrebno odbaciti i ne koristi ih za kliničku primjenu. Nakon dekontaminacije, ako tkivo ili medij pokazuju znakove bilo kakvog mikrobnog rasta, AM se ne smatra prikladnom za transplantaciju (Branski Ludwik K. i sur., 2008).

## 1.6.2. Keratinociti i limbalne stanice uzgojeni kao lijekovi za napredne terapije

Već dugi niz godina primjenjuje se metoda liječenja opsežnih opekлина koju su 1975. godine razvili Rheinwald i Green, a 1980. godine klinički primijenili O'Connor i suradnici (O'Connor i sur., 1981). Oni su u laboratorijskim uvjetima uspjeli uzgojiti epidermalne presatke od pojedinačnih epitelnih stanica, a taj su postupak zatim usvojili mnogi medicinski laboratoriji u razvijenim zemljama. Kultivirane epidermalne stanice (keratinociti) obnavljaju novi epitel (epidermis) te na taj način zatvaraju ranu i tako pridonose preživljavanju teško opečenih pacijenata (EDQM, 2019). Obrada kože, postupci kontrole kvalitete, pohrana, pakiranje, distribucija i klinička primjena moraju biti obavljani u skladu s Direktivom 2004/23/EZ i Uredbom EZ 1394/2007 ([https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017\\_02\\_12\\_306.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017_02_12_306.html) ; <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj/hrv>).

U ljudskom oku, epitelne stanice rožnice i konjunktive odgovorne su za kontinuiranu regeneraciju i homeostazu prednjeg segmenta oka. Limbalne matične stanice nalaze se u korneoskleralnom limbusu (prstenu između rožnice i bjeloočnice), imaju mogućnost stalnog obnavljanja, odnosno mogu nadomjestiti epitelnu površinu rožnice. Uzgoju keratinocita i limbalnih stanica pridaje se poseban značaj jer se moraju proizvoditi u kontroliranim uvjetima u čistim sobama u GMP laboratorijima prema Eudralex-u ([https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4\\_es](https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_es)). Tijekom uzimanja bioptata, obrade, pohrane i prije kliničke primjene provode se mikrobiološka testiranja kao dio kontrole kvalitete zbog sigurnosti, kvalitete i djelotvornosti ATMP-a (EDQM, 2019); [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017\\_02\\_12\\_306.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017_02_12_306.html))

Odgovarajući hranjivi mediji u kojima se uzgajaju stanice šalju se na mikrobiološka ispitivanja radi provjere prisutnosti aerobnih i anaerobnih bakterija, gljiva, kvasaca i plijesni. Posebna pažnja posvećuje se analizi mikoplazmi budući da su otporne na antibiotike te ih se može detektirati pomoću lančane reakcije polimeraze, (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Prilikom filtriranja medija, mikoplazme mogu proći kroz filtere veličine pora  $\leq 0,2 \mu\text{m}$ , te se nalaziti u hranjivom staničnom mediju, a da pritom ne utječu na rast stanica i ne snižavaju pH (EDQM, 2019 ). Svi mikrobiološki rezultati nakon dekontaminacije i ispiranja, a prije kliničke primjene, moraju biti 100% sterilni.



## 1.7. Osoblje i zaštitna oprema

Ljudska koža predstavlja glavni izvor mikroorganizama. Prije rada potrebno je provesti obuku osoblja i uvesti higijensko-disciplinske mjere kojih se osoblje mora pridržavati. U čiste prostore ne smije ulaziti nitko tko nije prošao potrebnu obuku koja se odnosi na postupke ulaska i izlaska te kretanja unutar čistih prostora. Posebnu pažnju trebalo bi posvetiti načinu odijevanja i osobnoj higijeni (Slika 3.). Unutar čistih prostora stoga postoji niz propisanih pravila ponašanja kojih se treba pridržavati kako bi se širenje kontaminacije svelo na najmanju moguću razinu. Najstroža pravila odnose se na čiste prostore A i B klase (Sandle, 2015). Vrlo je važno pažljivo manipulirati proizvodima, ruke u rukavicama koje dolaze u doticaj sa sterilnim proizvodom nikada ne smiju dodirivati zidove, podove, vrata ili druge površine, a otpadni materijal treba sakupljati u posebne spremnike i često ga uklanjati iz čiste sobe. Zabranjeno je brzo kretanje kroz prostorije i unošenje bilo kakvih osobnih stvari uključujući hranu, piće, odjeću, mobitele ili bilo koje druge predmete. Potrebno je razviti mentalnu disciplinu kojom se svi okolni predmeti smatraju nesterilnim. Prije ulaska u čistu prostoriju osoblje se mora presvući u adekvatnu zaštitnu odjeću koja omogućuje što manje raspršivanje čestica koje unosi radno osoblje. Svu vlastitu odjeću i modne dodatke potrebno je skinuti i ostaviti u prostoriji za presvlačenje van čiste prostorije.



Slika 3. Osoblje u čistom prostoru

(Preuzeto: <https://www.laboratoire.com/fournisseur/kimberly.php>, pristupljeno 30.03.2021.)

Osim preko odjeće i kože, mikroorganizmi se raspršuju i preko usta i nosa pa ta područja moraju biti u potpunosti zaštićena. Izbor zaštitne opreme također ovisi o klasifikaciji čiste sobe. Odjeću adekvatnu za A i B klase (ISO klasa 5 i 6) čine jednokratni kombinezon s kapuljačom, dvostruke rukavice, nazuvci za klompe, maska za lice i naočale. Zaštitna odjeća trebala bi gotovo u potpunosti zadržavati čestice i onemogućiti njihovo raspršivanje. Tipična zaštitna oprema za niže klase, poput C i D (ISO klasa 7 i 8) sastoji se od maske za lice, kute, rukavica i nazuvaka za klompe. Tkanina koja se koristi pri izradi mora biti od sintetičkog materijala koji ne otpušta čestice, poput poliestera. Učinkovitost tkanine procjenjuje se mjerenjem propusnosti zraka i sposobnosti zadržavanja čestica (Whyte, 2001). Odjeća ne bi trebala sadržavati dodatne džepove i nabore koji bi mogli povećati nakupljanje nečistoća. Višekratna odjeća čisti se i priprema u posebnim praonicama za čiste prostore. One se sastoje od sušilica s filtriranim zrakom. Prije upotrebe, višekratna odjeća se sterilizira autoklaviranjem ili zračenjem. Za zaštitu područja lica koriste se jednokratne maske. One se razlikuju u dizajnu, ali su sve izrađene na način da prekrivaju dio usta i nosa i tako zadržavaju i filtriraju čestice (Whyte, 2001). Naočale pružaju dodatnu prepreku ljuskicama kože, obrvama i trepavicama. Za zaštitu ruku najčešće se koriste lateks rukavice.

## **1.8. Čišćenje i održavanje čistih prostora**

Da bi se ispunila regulatorna očekivanja u čistim prostorijama, potrebno je uvesti program čišćenja i dezinfekcije. Programom se uspostavljaju kriteriji za odabir sredstava za čišćenje, metode te učestalosti čišćenja (Sandle, 2015). Te programe potrebno je redovito pregledavati i mijenjati u skladu s podacima dobivenim mikrobiološkim praćenjem okoliša. Iako postoje manje razlike u metodama čišćenja, svako čišćenje provodi se suhim i vlažnim usisavanjem te brisanjem pomoću brisača. Suho usisavanje nije toliko učinkovito u uklanjanju manjih čestica kao što je to vlažno usisavanje, kod kojeg su zbog veće viskoznosti vode od zraka, sile koje odvajaju čestice od površine puno veće. Iz istog razloga je vlažno brisanje učinkovitije od suhog (Whyte, 2001). Dezinficijensi i ostala sredstva za čišćenje moraju biti što manje kemijski reaktivna ali ujedno toksična za mikroorganizme. Najčešće se kao dezinficijensi koriste spojevi na bazi klora i alkoholi (60%-70% etanol ili 70-100% izopropanol). Nakon čišćenja je potrebno ukloniti zaostale dezinficijense.

## 1.9. Analiza rizika

U mikrobiološkom praćenju okoliša, prema GMP-u, važno je koristiti sustav procjene rizika. Tim sustavom određuju se učestalost, tehnike i mjesta praćenja okoliša čistih prostorija (Sutton, 2010). Dva najčešće korištena sustava za procjenu rizika su HACCP sustav analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point*) koji je razvijen za prehrambenu industriju i FMEA, Analiza učinaka neuspješnog načinarada (engl. *Failure Mode and Effects Analysis*), razvijena za inženjersku industriju (Whyte i Eaton, 2004). Osim njih, postoji i rjeđe korišten sustav, Dijagram analize stabla pogrešaka, FTA (engl. *Fault Tree Analysis*).

Svi sustavi uključuju izradu dijagrama rizika kojim se prikazuju mogući izvori onečišćenja, njihovi putevi prijenosa te metode za smanjenje prijenosa onečišćenja. Nakon izrade dijagrama rizika potrebno je utvrditi područja s najvećim rizikom od onečišćenja. Čimbenicima rizika dodjeljuju se bodovi od 0 - 2, a konačna vrijednost (0 - 16) dobivena njihovim umnoškom prikazuje koliko je pojedino područje opasno i koliki rizik od onečišćenja predstavlja za konačni proizvod. Nakon toga se odlučuje o najprikladnijim metodama uzorkovanja, koje ovise o prethodno procijenjenom riziku. Učestalost uzorkovanja ovisi o riziku, što je veći rizik, to bi uzorkovanje trebalo biti češće (Whyte, 2001).

Važno je na kraju uspostaviti razine upozorenja i djelovanja s obzirom na rezultate praćenja koji nisu u skladu s postavljenim granicama onečišćenja. U tom slučaju, provode se korektivne mjere dok se ponovno ne uspostave normalni uvjeti. Dakle, sustavi koji se koriste pri procjeni rizika, prepoznaju rizik, ocjenjuju razinu rizika, a zatim utvrđuju plan za smanjenje, nadzor i praćenje rizika (Sandle, 2015). Metode uzorkovanja kao i odstupanja od očekivanih rezultata te poduzete korektivne mjere potrebno je dokumentirati i redovito ponavljati.

## 1.10. Najčešći mikroorganizmi i njihov značaj u čistim prostorijama

Mikroorganizmi koji se često mogu detektirati u čistim prostorima su gram pozitivne (Gr+) bakterije *Staphylococcus spp.* (koagulaza negativni stafilokoki-*CoNS*), *Micrococcus spp.* ili *Bacillus spp.*

Koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*) spadaju u porodicu *Staphylococcaceae*, rod *Staphylococcus*. Bakterije iz toga roda su Gr+ sferične stanice oko 1 µm u promjeru, te se pod mikroskopom vide u obliku nakupina grožđa. Otporni su na suhe uvijete i na toplinu (podnose temperaturu od 50 °C oko 30 minuta). Većina stafilokoka je fakultativno anaerobna. Na temelju testa na enzim koagulazu (enzim koji uzrokuje zgrušavanje i trombozu) rod *Staphylococcus* je podijeljen na koagulaza pozitivne vrste (npr. *S. aureus*) i koagulaza negativne vrste (npr. *S. epidermidis* i *S. saprophyticus*) (Gyles i sur., 2004). Koagulaza negativni stafilokoki spadaju u manje patogene stafilokoke. Normalan su dio fiziološke flore kože, te u pravilu ne uzrokuju infekcije kod čovjeka. Do infekcija može doći kada je vanjska barijera oštećena zbog rane ili implementacije stranog tijela, te kod imunokompromitiranih pacijenata (Türkyilmaz i Kaya, 2006).

Druga najzastupljenija bakterija je *Micrococcus spp.*, ona spada u porodicu *Micrococcaceae*, rod *Micrococcus*. Pojavljuje se kao dio fiziološke flore kože čovjeka, te se može naći na različitim mjestima u okolišu (voda, tlo, prašina). Navedene bakterije su asporogene, (Gr+), sferične stanice promjera od 0,5 µm do 3 µm, koje obično formiraju tetrade. Aerobne do fakultativno anaerobe bakterije, uglavnom termorezistentne, dobro rastu u okolini s malo vode i visokim koncentracijama soli. S obzirom da čine normalan dio flore, ne smatraju se patogenim za čovjeka.

Pored *CoNS* i *Micrococcus spp.*, često se detektira i *Bacillus spp.* koji spada u porodicu *Bacillaceae*, rod *Bacillus*. Rod *Bacillus* je heterogena skupina Gr+ štapićastih bakterija koje stvaraju spore. Neke vrste roda *Bacillus* mogu biti obligatni aerobi, a neke fakultativni anaerobi. U nepovoljnim uvjetima imaju sposobnost stvaranje endospora, te u takvom obliku mogu mirovati godinama. Većina vrsta roda *Bacillus* nisu patogene, te imaju ubikvitarnu prirodu. Dvije vrste roda *Bacillus* su patogene za čovjeka: *Bacillus anthracis* koji uzrokuje antraks (bedrenicu) i *Bacillus cereus* koji uzrokuje trovanje hranom. Ovaj mikroorganizam može u čiste prostore ući putem laboratorijskih materijala koji nisu učinkovito skladišteni i dezinficirani. Nakon pojave *Bacillus* u čistim prostorima vrlo ga je teško iskorijeniti.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je provesti mikrobiološku kontrolu u periodu od veljače do lipnja 2020. godine kontinuiranim uzorkovanjem radne okoline Laboratorija za tkivno inženjerstvo. Osim radne okoline provest će se mikrobiološka kontrola alikvota, bioptata te hranjivog medija koji je bio u kontaktu sa stanicama ili tkivima.

Specifični ciljevi su:

1. utvrditi najučestalije mikroorganizme (vrstu i broj kolonija) te njihov značaj za sigurnost cijelog procesa aseptične proizvodnje tkiva i stanice;
2. usporediti dobivene mikrobiološke rezultate s rezultatima iz 2019. godine;
3. utvrditi koji mikroorganizmi odstupaju od dozvoljenog broja u pojedinim klasama čistog prostora kao i najučestalija mjesta kontaminacije;
4. osmisliti i isplanirati mjesta uzorkovanja u skladu sa svim regulatornim standardima te na taj način doprinijeti kvalitetnijoj i sigurnijoj proizvodnji ATMP-a (*Advanced Therapy Medicinal Products*)

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Potrošni materijal i reagensi**

- TrypCase Soya 3P agar (TSA3) BioMérieux Craponne, Francuska, 90 mm su mikrobiološke ploče za uzorkovanje površina, zraka ili opreme. Trostruko su omotane te sterilizirane zračenjem između 13 i 22 kGy. Medij se sastoji od peptona i natrijevog klorida.

- COUNT-TACT® 3P® agar (CT3P) BioMérieux Craponne, Francuska, 55 mm su mikrobiološke ploče koje se koriste za uzorkovanje površina, zraka, opreme i osoblja. Pakirane su trostruko tako da unošenjem u čiste prostore zadrže potpunu sterilnost. Proizvod je steriliziran zračenjem između 8 i 12 kGy. Medij je smjesa peptona i natrijevog piruvata. Osim navedenih spojeva u mediju se još nalaze i 4 sredstva za neutralizaciju (lecitin, polisorbit 80, L-histidin i natrijev tiosulfat) koja inaktiviraju dezinficijense prisutne na površini koja se ispituje.

Kod navedenih ploča oznake se nalaze na poklopcu i na dnu ploče te su dizajnirani na način da zadovoljavaju specifične potrebe farmaceutske industrije (3P za farmaceutski dokazane izvedbe).

- Sterilne kultivacijske zdjelice za uzgoj adherentnih stanica s filterom, 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Njemačka)

- Sterilne pipete od 5 mL i 10 mL (Sarstedt, Njemačka)

- Jednokratni sterilni nastavci za automatske pipete (Eppendorf, Njemačka)

- Sterilne epruvete za centrifugiranje od 12 mL i 50 mL (Sarstedt, Njemačka)

- Filtri veličine pora 0,22 µm (TPP, Švicarska)

- Medij za dekontaminaciju tkiva (BASE 128, Achimia, Italija)

- Medij za ispiranje tkiva (BASE, Achimia, Italija)

##### **3.1.2. Oprema**

- Mikrobiološki zaštitni kabinet klase II (Klimaoprema d.d., Hrvatska)

- CO<sub>2</sub> inkubator za stanične kulture 150 L i 240 L HeraCell (Thermo Scientific, SAD)

- Fluorescentni mikroskop, TI-DH (Nikon Eclipse, Hrvatska)

- Svjetlosni mikroskop Primostar 3 (ZEISS, Njemačka)

- Vodena kupelj, VK1EN (Inkolab d.o.o., Hrvatska)

- Uzorkivač zraka, Airdeal 3P (Biomérieux, Francuska)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje minimalnog broja uzorkovanja zraka u čistim prostorijama

Prema međunarodnoj normi ISO 14644-1 određen je najmanji broj mjesta koja se uzorkuju za čestice u zraku, ovisno o površini čiste prostorije koja se klasificira (Tablica 4.). Formula po kojoj je određeno:

$$N_L = \sqrt{A}$$

$N_L$  = broj mjesta uzorkovanja

A = površina čiste prostorije u m<sup>2</sup>

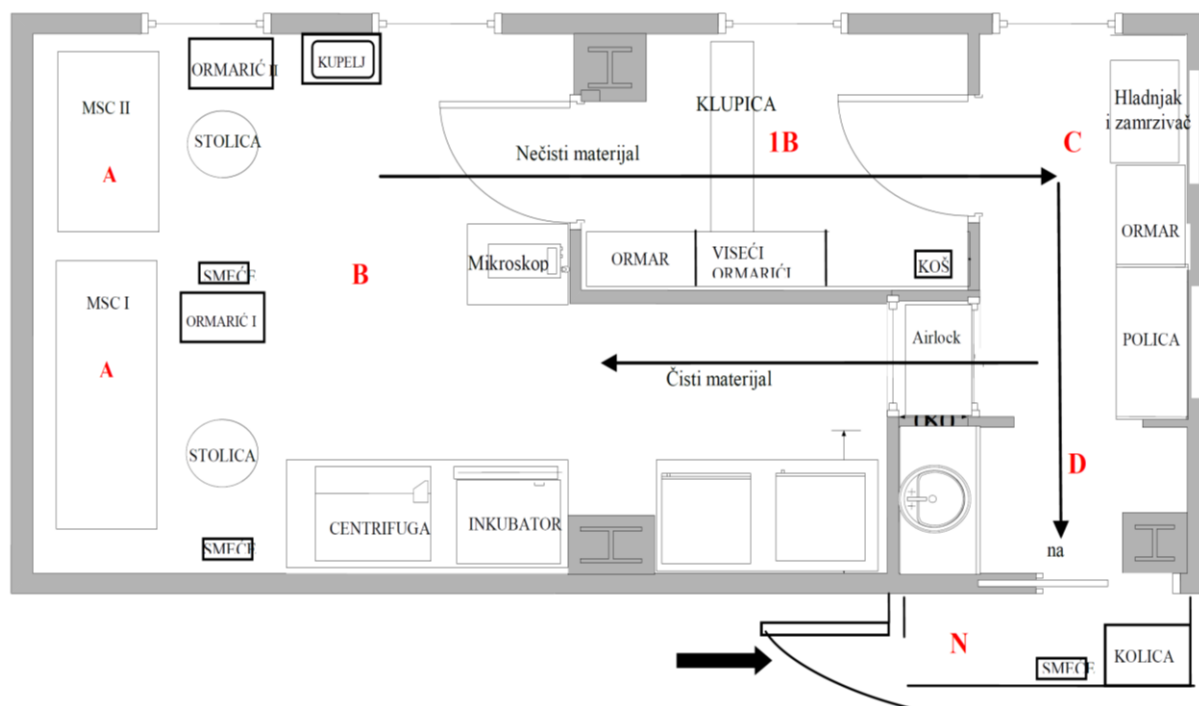
Napomena: Izračunati rezultat koji nije cijeli broj zaokružuje se na veći broj

Tablica 4. Prikaz ISO klasa/razreda, površina i minimalnog broja uzorkovanja unutar Laboratorija za tkivno inženjerstvo

ISO klasa	Razred čistih prostora	Površina u m <sup>2</sup>	Broj mjesta uzorkovanja
6	B	20,32	4,51=5
6	1B	4,57	2,14=2
7	C	4,17	2,04=2
8	D	2,14	1,46=2
Ukupno:		31,2 m <sup>2</sup>	11

### 3.2.2. Određivanje minimalnog broja uzorkovanja kontaktnih površina u čistim prostorijama

U mjesečnom planu uzorkovanja definirana su minimalno potrebna mjesta uzorkovanja te dodatna, opravdana mjesta i učestalost uzorkovanja istih ovisno o procesima koji se odvijaju u laboratoriju jer ne postoji međunarodni konsenzus za mikrobiološko uzorkovanje zraka. Prema smjernici US Pharmacopeia <1116> USP-a opisan je način na koji se odabiru mjesta uzorkovanja površina: Ulazna/izlazna mjesta tj. područja unutar i oko vrata i sigurnosni otvori kao što je airlock obavezno su uključena u sustav praćenja jer su to mjesta gdje se oprema i materijali kreću iz područja niže klase u područje više klase. Prilikom odabira mjesta uzorkovanja površina u kvalifikacijskoj studiji razmatrani su svi mogući izvori kontaminacije. Analiza provedena prilikom odabira mjesta za uzorkovanje površina je dokumentirana, a u obzir su uzeta mjesta visokog protoka osoblja, protok potrošnog materijala i laboratorijskog otpada (Slika 4.).



Slika 4. Tlocrt LZTI (Laboratorij za tkivno inženjerstvo)

Oznake prostora:

MSC I / II – A klasa čistog prostora

B, C, D – klase čistog prostora

N – nečisti/neklasificirani prostor



Tablica 5. Prikaz mjesta uzorkovanja zraka po klasama čistih prostora

Klasa	Mjesto uzorkovanja ZRAK
A	MSC I MSC II
B	Na ormariću I (B) Na ormariću II (B1) Na stolici kraj airlocka (B2) Kraj odsisne rešetke ispod MSC I (B3) Kraj odsisne rešetke kraj vrata (B4) Na inkubatoru 150 L (B5)
1B	Na ormaru (1B1) Kraj odsisne rešetke (1B2)
C	Na polici (C1) Kraj odsisne rešetke ispod prozora (C8)
D	Kraj odsisne rešetke (D1)

Tablica 6. Prikaz mjesta uzorkovanja površina po klasama čistih prostora

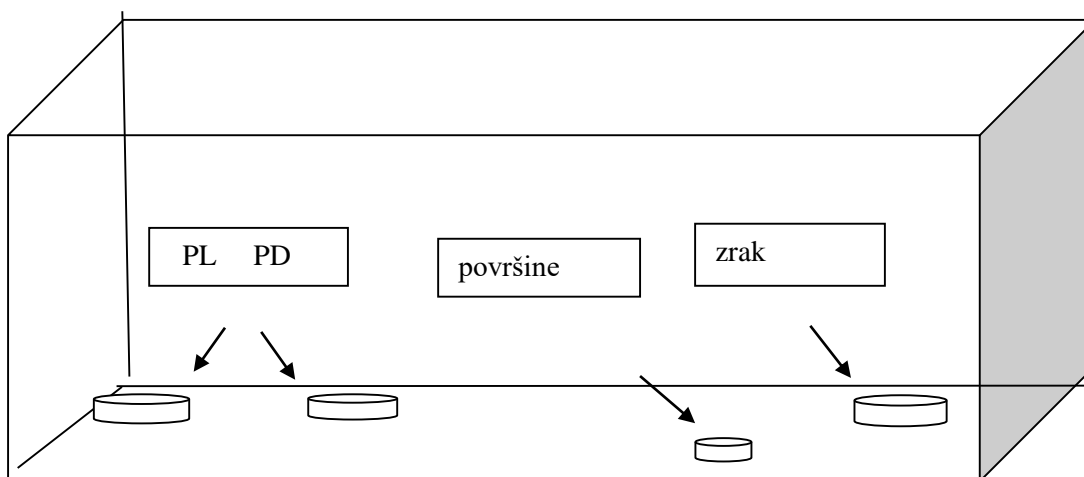
Klasa	Mjesto uzorkovanja POVRŠINE
A	MSC I MSC II
B	Stolić-kraj mikroskopa (B6) Stol-kraj inkubatora 150 L (B7) Pod kod vrata (B8) Kvaka (B9) Stolica I (B10) Stolica II (B11) Ormarić I (B12) Ormarić II (B13) Pod kod airlocka (B14) Unutrašnjost airlocka (B15) Vrata inkubatora 150 L (B16) Vrata inkubatora 240 L (B17) Vrata inkubatora 240 iL (B18) Pod kod stolice I (B19) Zid-kraj odsisne rešetke ispod prozora (B20) Na poklopcu centrifuge (B21) Kupelj (B22) Zid-kraj odsisne rešetke ispod inkub. 150L (B23)
1B	Pod kod vrata 1 (1B→C) (1B3) Kvaka vrata 1 (1B→C) (1B4) Pod kod vrata 2 (1B→B) (1B5)

	Kvaka vrata 2 (1B→B) (1B6) Vrata ormara (1B7) Klupica (1B8)
C	Vrata hladnjaka (C2) Kvaka vrata 1 (C→D) (C3) Pod kod vrata 1 (C→D) (C4) Kvaka vrata 2 (C→1B) (C5) Pod kod vrata 2 (C→1B) (C6) Vrata ormara (C7)
D	Pod kod vrata (D2) Kvaka (D3) Umivaonik (D4)

Nastavak tablice 6. Prikaz mjesta uzorkovanja površina po klasama čistih prostora

### 3.2.3. Određivanje minimalnog broja mjesta uzorkovanja unutar mikrobiološkog kabineta

U mikrobiološkom kabinetu (MSC) klase II na slici 5 prikazan je minimalan broj mjesta uzorkovanja tijekom rada (otisak kontaktne površine 1 put, uzorkovanje zraka 1 put te otisak prstiju (rukavica) lijeve i desne ruke).



Slika 5. Shema mikrobiološkog kabineta i mjesta uzorkovanja

Oznake uzorkovanja u MSC:

zrak TSA3 ploče (dijametar 90 mm),

kontaktne površine CT3P ploče (dijametar 55 mm),

PL i PD - prsti lijeve i prsti desne ruke TSA3 ploče (dijametar 90 mm)

### 3.2.4. Metode uzorkovanja

U svakoj čistoj prostoriji je potrebno provoditi praćenje okoliša. Ono se temelji na mikrobiološkom uzorkovanju zraka, površina, prstiju i odjeće djelatnika te samih proizvoda (tkiva ili staničnih kultura). Kako bi se točno prikazala mjesta uzorkovanja izrađen je tlocrt čistih soba i označena su mjesta uzorkovanja. Osim mjesta, vrlo je bitno odrediti učestalost uzorkovanja u čistim sobama različite klase. U čistim sobama visoke klase uzorkovanje se provodilo kontinuirano dok se u čistim sobama niže klase provodilo na mjesečnoj bazi, ovisno o riziku. Na Odjelu za mikrobiologiju pri Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) ploče se inkubiraju 5 dana na temperaturi od  $32,5 \pm 2,5$  °C za uzgoj aerobnih/anaerobnih bakterija te kvasaca i plijesni. Ukoliko je rezultat mikrobiološkog ispitivanja negativan i ne zahtijeva se dodatna identifikacija mikroorganizama, mikrobiološka analiza biološkog uzorka traje pet dana. Ukoliko dođe do mikrobnog porasta provodi se identifikacija do *species*. Rezultat mikrobiološke analize provedene u HZTM šalje se u BTS u obliku pismenog nalaza, elektroničkim putem na službeni email.

#### 3.2.4.1. Uzorkovanje zraka

Za ispitivanje postojećih mikroorganizama u zraku koristila sam aktivnu i pasivnu metodu uzorkovanja zraka. Za aktivno uzorkovanje zraka koriste se posebni uređaji (uzorkivači zraka) i ta metoda je kvantitativna jer mjeri broj mikroorganizama po kubičnom metru. Aktivno uzorkovanje traje 10 minuta. Pasivno uzorkovanje zraka je kvalitativna metoda, a zasniva se na taloženju mikroorganizama na mikrobiološkim pločama s agarom (Petrijeve zdjelice promjera 90 mm) izloženim na određenom području kroz maksimalno 4 sata, ne duže, zbog mogućnosti isušivanja podloge. Ukoliko proces obrade tkiva i/ili stanica traje duže od 4 sata izložene mikrobiološke ploče potrebno je zamijeniti novim neiskorištenim tako da se obuhvati cijeli proces obrade tkiva ili rada sa stanicama. Nakon uzorkovanja zraka zatvorila sam Petrijeve zdjelice s agarom, obilježila ih kodom, zapisala vrijeme uzorkovanja, obložila ih parafilmom te ih poslala na inkubaciju i analizu u HZTM.

#### **3.2.4.2. Uzorkovanje površina**

Za detekciju bakterija, gljiva i plijesni na ravnim površinama kao što su radni stolovi, ormarići, laboratorijska oprema, podovi i paneli koristila sam kontaktne ploče CT3P (dijametra 55 mm). Navedene ploče sadrže sloj agara koji se lagano pritisne na površinu (8 do 10 sekundi) pri čemu se mikroorganizmi sa površine prenesu na agar. Uglavnom sam nadzirala kritična područja koja se nalaze u neposrednoj blizini proizvoda (tkivo ili stanice) kao i susjedna područja. Nakon uzimanja uzorka zatvorila sam poklopac, obilježila kod uzorka, zaštitila parafilmom te poslala na inkubaciju i analizu.

#### **3.2.4.3. Uzorkovanje prstiju**

Za detekciju bakterija, gljiva i plijesni na prstima tj. rukavicama djelatnika koristila sam TSA mikrobiološke ploče tj. Petrijeve zdjelice s agarom (dijametra 90 mm). Vrlo je bitno napraviti mikrobiološku analizu rukavica tj. svih 5 prstiju lijeve i desne ruke zbog toga što su to područja koja dolaze u kontakt s radnim površinama i laboratorijskim materijalima, a u pojedinim procesima i sa samim tkivom. Otiske s rukavica se uzimaju da bi se nadzirala mogućnost kontaminacije tijekom obrade tkiva ili stanica. Uzorkovanje sam provodila prije rutinske dezinfekcije rukavica alkoholom ili prije promjene vanjskih rukavica (koriste se dvostruke rukavice) tj. po završetku rada. Tijekom uzorkovanja na zdjelice s agarom sam čvrsto i ravnomjerno pritisnula rukavice kroz 5-10 sekundi pazeći da se pritom ne ošteti površina agara ili da ne pukne sama zdjelica. Ta metoda je kvalitativna. Nakon uzimanja otiska na taložnim pločama sam zatvorila poklopac, obilježila kod uzorka, zaštitila ih parafilmom te poslala na inkubaciju i analizu.

#### **3.2.4.4. Uzorkovanje odjeće djelatnika**

Djelatnici predstavljaju najveći izvor kontaminacije unutar čistih prostora stoga je izuzetno važno uz rukavice uzorkovati i ostale odjevne predmete koji predstavljaju potencijalni rizik od onečišćenja i širenje kontaminacije na materijale i reagense koji se unose u čiste prostore. Prije ulaska u čistu sobu, u neklasificiranom prostoru N se skida šminka, odjeća, klompe, ostavlja nakit, mobitel, ključevi i oblači sterilna kapa. U klasi D se peru, suše i dezinficiraju ruke, stavlja kirurška maska i naočale, oblače rukavice, pododijelo i nazuvci prije nego se ulazi u klasu C. Dodatnu

sigurnost predstavlja obuvanje sterilne obuće/klompi te oblačenje sterilnog jednokratnog odijela na pododijelo i dvostrukih sterilnih rukavica u klasi 1B. Osim otisaka pet prstiju lijeve i desne ruke, odmah po ulasku u B klasu provodila sam i uzorkovanje sterilnih odijela na tri kritična mjesta (vrat, rukav, koljeno) metodom otiskivanja kao kod uzorkovanja površina (Slika 6.).



Slika 6. Prikaz djelatnika u sterilnim odijelima

#### **3.2.4.5. Uzorkovanje vode iz vodene kupelji i CO<sub>2</sub> inkubatora**

Mikrobiološku kontrolu vode iz vodene kupelji i dva HeraCell CO<sub>2</sub> inkubatora od 150 L i 240 L (Slika 7.) provodila sam na način da sam sterilnom pipetom uzorkovala 35 mL vode iz navedenih uređaja te ju u sterilnim epruvetama poslala na analizu u HZTM.



Slika 7. Prikaz kritične opreme, HeraCell CO<sub>2</sub> inkubatora od 150 L i 240 L

#### **3.2.4.6. Uzorkovanje tkiva/stanica**

Uzorkovanje tkiva provodili su djelatnici Banke tkiva i stanica na način da su tkivo/presadak prvo isprali medijem za dekontaminaciju koji se sastoji od koktela antibiotika (BASE 128, Alchimia, Italija). Nakon koraka dekontaminacije isprali su antibiotik kako ne bi došlo do lažno pozitivnih rezultata (BASE, Alchimia, Italija). Proveli su mikrobiološku kontrolu amnijske membrane te limbalnih stanica i keratinocita. U slučaju amnijske membrane uzorkovali su medij za dekontaminaciju i medij za ispiranje. Nakon toga uzimali su bris i bioptat amnijskog presatka. Provjeru sterilnosti limbalnih stanica i keratinocita radili su uzorkovanjem hranjivog medija za uzgoj i medija za zamrzavanje.

Uzorkovanja tijekom rutinskog rada provodila su se prema unaprijed definiranim mjestima uz dodatne točke koje prate procese u laboratoriju prema mjesečnom planu mikrobiološkog uzorkovanja radne okoline (Tablica 7.). U periodima kada se tkiva ili stanice ne obrađuju učestalo, bitno je uzorkovati dovoljan broj točaka u klasi A i B, dok se uzorci u klasama C i D mogu rjeđe

uzorkovati. Kod kratkotrajnih aktivnosti (npr. priprema staničnog medija i slično) preporučljivo je zrak uzorkovati aktivnim putem pomoću uzorkivača zraka. Također, postoje definirane granice odstupanja broja kolonija. Ukoliko dođe do porasta mikrobiološke kontaminacije iznad dozvoljenog broja nastaje akcija (Tablica 8.). Prije nego što se dosegne mikrobiološka kontaminacija koja izaziva akciju, prati se broj kolonija koji izaziva upozorenje (Tablica 9.). Na godišnjoj bazi se prati dozvoljeni postotak onečišćenja te se uspoređuje s prijašnjim godinama (Tablica 10.).

Tablica 7. Plan mikrobiološkog uzorkovanja minimalnog broja točaka kod rutinskog rada korištenjem Trypcase Soy 3P® agar (TSA) i COUNT-TACT® 3P® agar (CT3P) ploča

Razred/ klasa	Zrak TSA ploče aktivnim putem (90 mm)	Zrak TSA ploče (do 4h) pasivnim putem (90 mm)	Površine CT3P ploče (55 mm)	Prsti TSA ploče (90 mm)
A	Po potrebi	Tijekom obrade 1x	Tijekom obrade 1x	Tijekom obrade 2x
B	Po potrebi	Dnevno prema planu	Dnevno prema planu	Kod kvalifikacije 2x
1B	Po potrebi	2x mjesečno	2x mjesečno	/
C	Po potrebi	1x mjesečno	1x mjesečno	/
D	Po potrebi	1x mjesečno	1x mjesečno	/

Tablica 8. Granice odstupanja broja bakterijskih kolonija (*Colony forming units*, CFU) kod mikrobiološke kontaminacije (akcija), uzorkovanje Trypcase Soy 3P® agar (TSA) i COUNT-TACT® 3P® agar (CT3P) ploča

Razred/ klasa	Zrak TSA ploče aktivnim putem (90 mm)	Zrak TSA ploče (do 4h) pasivnim putem (90 mm)	Površine CT3P ploče (55 mm)	Prsti TSA ploče (90 mm)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
1B	10	5	5	/
C	100	50	25	/
D	200	100	50	/

Tablica 9. Granica odstupanja broja bakterijskih kolonija (*Colony forming units*, CFU) kod mikrobiološke kontaminacije (upozorenje), uzorkovanje Trypcase Soy 3P® agar (TSA) i COUNT-TACT® 3P® agar (CT3P) ploča

Razred/ klasa	Zrak TSA ploče aktivnim putem (90 mm)	Zrak TSA ploče (do 4h) pasivnim putem (90 mm)	Površine CT3P ploče (55 mm)	Prsti TSA ploče (90 mm)
A	-	-	-	-
B	5	3	3	3
1B	5	3	3	-
C	50	25	10	-
D	100	50	25	-

Tablica 10. Dozvoljeni postotak onečišćenja u aseptičkoj proizvodnji prema United States Pharmacopeia USP <1116> and Contamination Recovery Rates, uzorkovanje pomoću Trypcase Soy 3P® agar (TSA) i COUNT-TACT® 3P® agar (CT3P) ploča

Razred/ klasa	Zrak TSA ploče aktivnim putem (90 mm)	Zrak TSA ploče (90 mm)	Površine CT3P ploče (55 mm).	Prsti TSA ploče (90 mm)
A	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
B	< 3%	< 3%	< 3%	< 3%
1B	< 3%	< 3%	< 3%	< 3%
C	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
D	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%

### 3.2.5. Priprema Gram preparata

Postupak pripreme Gram preparata provodili su djelatnici Zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. Djelatnici su mikrobiološkom ezom uzimali pojedinačnu koloniju i napravili razmaz na navlaženom predmetnom stakalcu, osušili na zraku te fiksirali prelazeći nekoliko puta kroz plamen plamenika. Bojanje po Gramu provodili se redom: prvo su dodali kristalviolet (1-2 minute), nakon toga su odlili boju i fiksirali lugolovom otopinom (1 minutu). Nakon lugola primarno bojilo su isprali vodom, odbojali s 96% etanolom, ispirali vodom te dodatno obojili s karbofuksinom (1 minutu). Na kraju su preparat isprali vodom i osušili. Gr+ bakterije oboje se plavo-ljubičasto dok se gram-negativne (Gr-) bakterije oboje crveno.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi A

#### 4.1.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka

Mikrobiološko uzorkovanje zraka u klasi A provodilo se 207 puta tijekom 2019. godine dok je 2020. godine broj uzorkovanja smanjen na 106 uzorkovanja. Tijekom 2019. godine svi rezultat su bili 100% sterilni a 2020. godine primijećena su 2 pozitivna mikrobiološka rezultata što čini 1,8% odstupanja od preporučenog dozvoljenog broja kolonija (Tablica 11.). Oba pozitivna mikrobiološka rezultata zabilježena su u MSCI (mikrobiološki zaštitni kabinet I) u razmaku od 5 dana. Detektirane vrste mikroorganizama su u prvom slučaju *CoNS* (2 CFU) koje čine normalnu fiziološku floru kože, a u drugom slučaju vrste roda *Bacillus* (1 CFU) (Tablica 12.).

Tablica 11. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za zrak u klasi A

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	207	106	
<i>Broj pozitivnih mikrobioloških rezultata/akcija</i>	0	2	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultati</i>	100%	98,12%	>99%
<i>Odstupanja</i>	0	1,8%	<1%

Tablica 12. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja zraka u klasi A

<i>datum</i>	<i>kod uzorka</i>	<i>mjesto uzorkovanja</i>	<i>CFU</i>	<i>mikroorganizmi</i>
28.02.2020.	MSCITSA280220MJ	MSCI	2	<i>CoNS</i>
02.03.2020.	MSCITSA020320MJ	MSCI	1	<i>Bacillus spp.</i>

#### 4.1.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina

Mikrobiološko uzorkovanje površina u klasi A provodilo se 207 puta tijekom 2019. godine dok je 2020. godine broj uzorkovanja iznosio 106 puta. Tijekom 2019. godine zabilježena su 3 pozitivna mikrobiološka rezultata što čini 1,5% odstupanja od dozvoljenog broja kolonija. Tijekom uzorkovanja 2020. godine nisu zabilježena odstupanja odnosno dobiveni su 100% sterilni mikrobiološki rezultati (Tablica 13.).

Tablica 13. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za površine u klasi A

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	207	106	
<i>Broj pozitivnih mikrobioloških rezultata/akcija</i>	3	0	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultati</i>	98,5%	100%	>99%
<i>Odstupanja</i>	1,5%	0	<1%

Od 3 zabilježena pozitivna rezultata tijekom 2019. godine najveća odstupanja detektirana su u MSCII (mikrobiološki zaštitni kabinet II) gdje su detektirane dvije vrste mikroorganizama, *CoNS* i vrste roda *Micrococcus*. Iste godine u MSCI zabilježeno je samo jedno odstupanje kada je detektiran *CoNS* (Tablica 14.).

Tablica 14. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja površina u klasi A

<i>datum</i>	<i>kod uzorka</i>	<i>mjesto uzorkovanja</i>	<i>CFU</i>	<i>mikroorganizmi</i>
11.06.2019.	MSCIICT3P110619GZ	MSCII	8	<i>CoNS</i>
12.06.2019.	MSCICT3P120619MJ	MSCI	1	<i>CoNS</i>
17.07.2019.	MSCIICT3P170719GZ	MSCII	1	<i>Micrococcus spp.</i>

### 4.1.3. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja prstiju

Mikrobiološko uzorkovanje prstiju lijeve i desne ruke provedeno je 432 puta tijekom 2019. i 211 puta tijekom 2020. godine. Broj pozitivnih mikrobioloških rezultata za 2019. godinu iznosi 2 a za 2020. godinu 1 puta (Tablica 15.). Tijekom 2019. godine 2 puta je detektiran *CoNS* (svega po jedna kolonija) dok je 2020. godine jednom zabilježeno odstupanje od 2 CFU, *CoNS* (Tablica 16.) što čini 99,5% sterilnih mikrobioloških rezultata. Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja te su rezultati unutar očekivanog standarda.

Tablica 15. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za prste u klasi A

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	432	211	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	2	1	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultati</i>	99,5%	99,5%	>99%
<i>Odstupanja</i>	0,5%	0,5%	<1%

Tablica 16. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja prstiju u klasi A

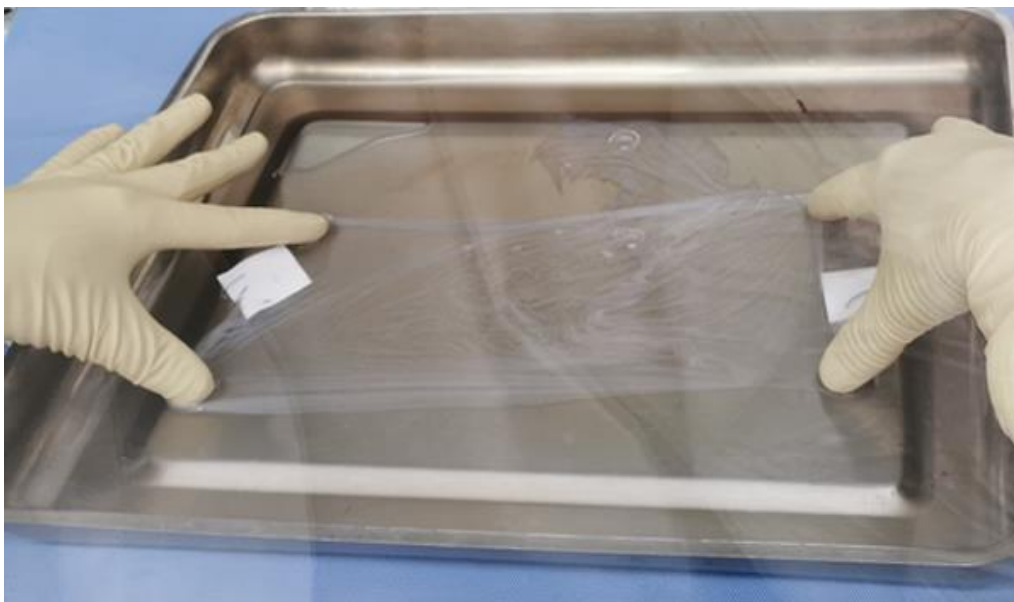
<i>datum</i>	<i>kod uzorka</i>	<i>mjesto uzorkovanja</i>	<i>CFU</i>	<i>mikroorganizmi</i>
13.05.2019.	PDTSA130519MJ	MSCI	1	<i>CoNS</i>
27.09.2019.	PLTSA270919MJ	MSCI	1	<i>CoNS</i>
30.12.2020.	PDTSA301220GZ	MSCI	2	<i>CoNS</i>

#### 4.1.4. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja tkiva/stanica

Mikrobiološka analiza tkiva/stanica provedena je na amnijskoj membrani (Slika 8.), limbalnim stanicama (Slika 9.) i keratinocitima (Slika 10.). Za navedena tkiva/stanice uz bris tkiva/stanica ispitivana je i sterilnost hranjivog medija za uzgoj i medija za zamrzavanje (Tablice 17., 18. i 19.). Kod amnijske membrane zbog nužnog postupka dekontaminacije uzorkovan je i medij za dekontaminaciju kao i medij za ispiranje tkiva (Tablica 17.). Svi dobiveni rezultati za 2019. i 2020. godinu su 100% sterilni.

Tablica 17. Evaluacija sigurne kliničke primjene amnijskih presadaka

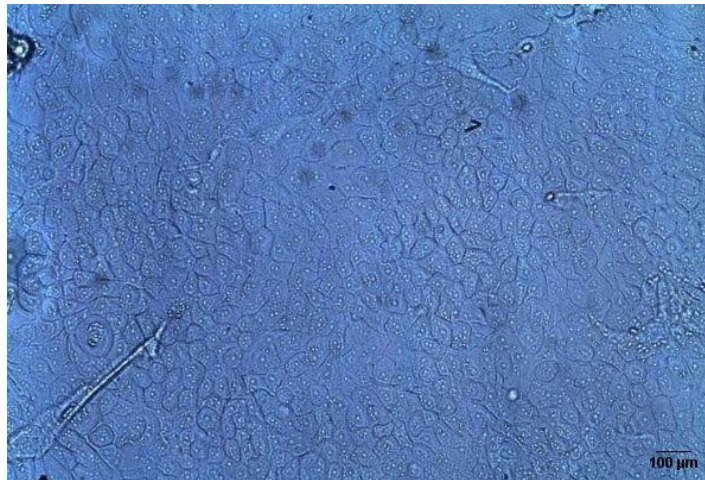
<i>Vrsta tkiva/stanica</i>	<i>Amnijska membrana</i>	
	<i>2019.</i>	<i>2020.</i>
<i>Godina</i>		
<i>Sterilnost medija za dekontaminaciju (BASE 128)</i>	100%	100%
<i>Sterilnost medija za ispiranje (BASE)</i>	100%	100%
<i>Bris amnijskog presatka (10% od ukupnog broja presadaka)</i>	100%	100%
<i>Bioptat amnijskog presatka (10% od ukupnog broja presadaka)</i>	100%	100%
<i>Sterilnost medija za zamrzavanje (10% DMSO)</i>	100%	100%



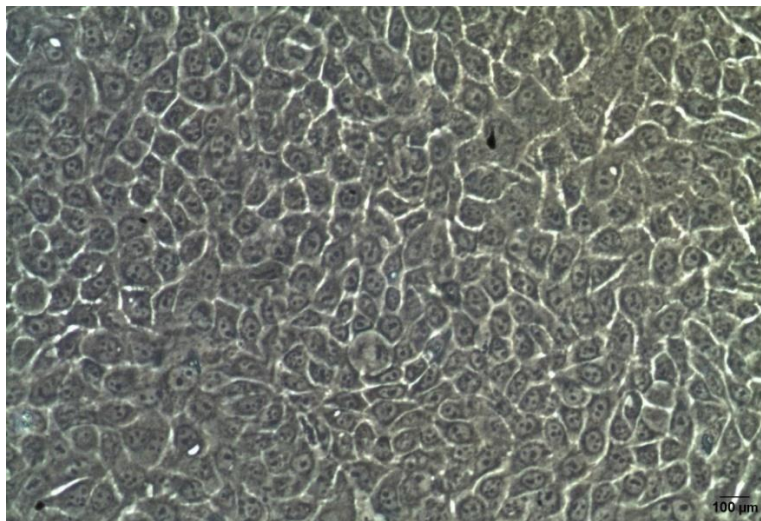
Slika 8. Prikaz pripreme amnijske membrane namijenjene za regeneraciju rožnice

Tablica 18. Evaluacija sigurne kliničke primjene limbalnog presatka

<i>Vrsta tkiva/stanica</i>	<i>Limbalni presadak</i>	
	<i>2019.</i>	<i>2020.</i>
<i>Godina</i>	<i>2019.</i>	<i>2020.</i>
<i>Sterilnost GM medija i kontrola sterilnosti limbalnih stanica</i>	100%	100%
<i>Kontrola limbalnih stanica na mikoplazme</i>	100%	100%
<i>Bris amnijske membrane koja je dio limbalnog presatka</i>	100%	100%
<i>Sterilnost medija za zamrzavanje (10% DMSO)</i>	100%	100%



Slika 9. Konfluentna stanična kultura limbalnih stanica (prva pasaža) uzgojenih na hranjivoj podlozi od 3T3 stanica. Slikala: dr.sc. Marija Zekušić, prije kliničke primjene, Nikon, Eclipse



Slika 10. Konfluentna kultura keratinocita s faznim kontrastom. Kultura je uzgojena na hranjivoj podlozi od 3T3 stanica. Slikala: dr.sc. Marija Zekušić, Nikon, Eclipse

Tablica 19. Evaluacija sigurne kliničke primjene suspenzije keratinocita u fibrinskom ljepilu

<i>Vrsta tkiva/stanica</i>	Keratinociti	
	2019.	2020.
<i>Godina</i>	2019.	2020.
<i>Sterilnost GM medija i kontrola sterilnosti keratinocita</i>	100%	100%
<i>Kontrola keratinocita na mikoplazme</i>	100%	100%
<i>Sterilnost FM medija i kontrola sterilnosti 3T3 stanica</i>	100%	100%
<i>Sterilnost medija za zamrzavanje (10% DMSO)</i>	100%	100%

#### 4.2. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine za zrak i površine u klasi B

##### 4.2.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka

Mikrobiološko uzorkovanje zraka u klasi B provedeno je 149 puta tijekom 2019. godine dok je 2020. godine broj uzorkovanja 91 put. Tijekom 2019. godine zabilježen je svega 1 pozitivan mikrobiološki rezultat što čini 0,7% odstupanja od dozvoljenog broja kolonija. Tijekom 2020. godine dobiveni su 100% sterilni mikrobiološki rezultati (Tablica 20.).

Tablica 20. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za zrak u klasi B

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	149	91	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	1	0	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultati</i>	99,3%	100%	>97%
<i>Odstupanja</i>	0,7%	0%	<3%

Mjesto na kojem je zabilježeno odstupanje je ormarić II gdje su detektirani mikroorganizmi *CoNS* (2 CFU), *Stenotrophomonas maltophilia* (7 CFU), *Rhizobium radiobacter* (2 CFU) i *Pantoea spp.* (1 CFU) (Tablica 21.). Od navedenih mikroorganizama, u 2020. godini pojavljuje se samo *CoNS* (Slika 12.). Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja i rezultat je unutar očekivanog standarda.

Tablica 21. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja zraka u klasi B

<i>datum</i>	<i>kod uzorka</i>	<i>mjesto uzorkovanja</i>	<i>CFU</i>	<i>mikroorganizmi</i>
22.08.2019.	B1TSA220819MJ	Na ormariću II	2/7/2/1	<i>CoNS/Stenotrophomonas maltophilia/Rhizobium radiobacter/Pantoea spp.</i>

#### 4.2.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina

Mikrobiološko uzorkovanje površina u klasi B provedeno je 219 puta tijekom 2019. godine i 186 puta 2020. godine. Rezultati za 2019. godinu bilježe 2 pozitivna mikrobiološka rezultata što sveukupno čini 99% sterilnih rezultata. Tijekom 2020. godine zabilježena su 3 pozitivna mikrobiološka rezultata što čini 1,6% odstupanja od dozvoljenog broja kolonija. Tijekom 2020. godine dobiveni su 98,4% sterilni mikrobiološki rezultati (Tablica 22.). Detektirane vrste mikroorganizama su *CoNS* i vrste roda *Micrococcus*. Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja i rezultat je unutar očekivanog standarda.

Tablica 22. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za površine u klasi B

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	219	186	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	2	3	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultati</i>	99%	98,4%	>97%
<i>Odstupanja</i>	1%	1,6%	<3%

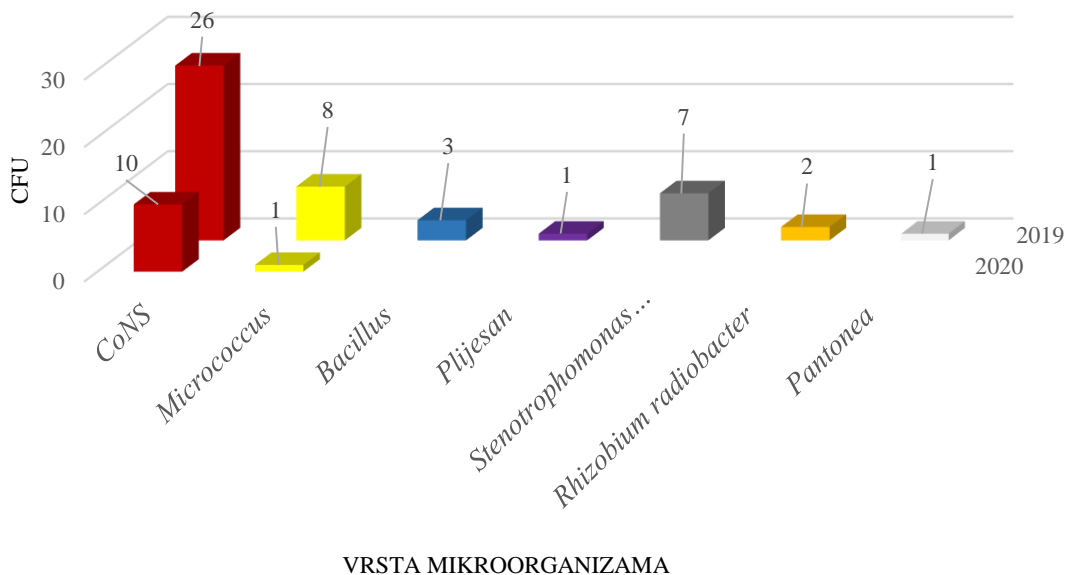
Mjesto na kojem je zabilježeno odstupanje tijekom 2019. godine je vodena kupelji na kojoj je detektiran mikroorganizam *Micrococcus spp.* (5 CFU). Dodatno je zabilježeno odstupanje i na poklopcu centrifuge *CoNS* (11 CFU) i *Micrococcus spp.*(1 CFU). Tijekom 2020. godine zabilježeno je dva puta granično odstupanje na podu ispod air-locka sa detektiranim *CoNS* (3 CFU) i *Micrococcus spp.* (4 CFU) (Tablica 23.). Dodatno je uočeno granično odstupanje na vratima CO<sub>2</sub>

inkubatora (4 CFU). Može se uočiti da brojnost navedenih mikroorganizama u 2020. godini pada u odnosu na 2019. godinu (Slika 11.)

Tablica 23. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja površina u klasi B

datum	kod uzorka	mjesto uzorkovanja	CFU	mikroorganizmi
28.02.2019.	B22CT3P280219GZ	Na vodenoj kupelji	5	<i>Micrococcus spp.</i>
27.12.2019.	B21CT3P271219IVZ	Poklopac centrifuge	11/1	<i>CoNS/</i> <i>Micrococcus spp.</i>
12.02.2020.	B14CT3P120220MBM	Pod kod air-locka	3	<i>CoNS</i>
12.02.2020.	B17CT3P120220MBM	Vrata inkubatora 240L	4	<i>CoNS</i>
16.03.2020.	B14CT3P160320MBM	Pod kod airlocka	4	<i>Micrococcus spp.</i>

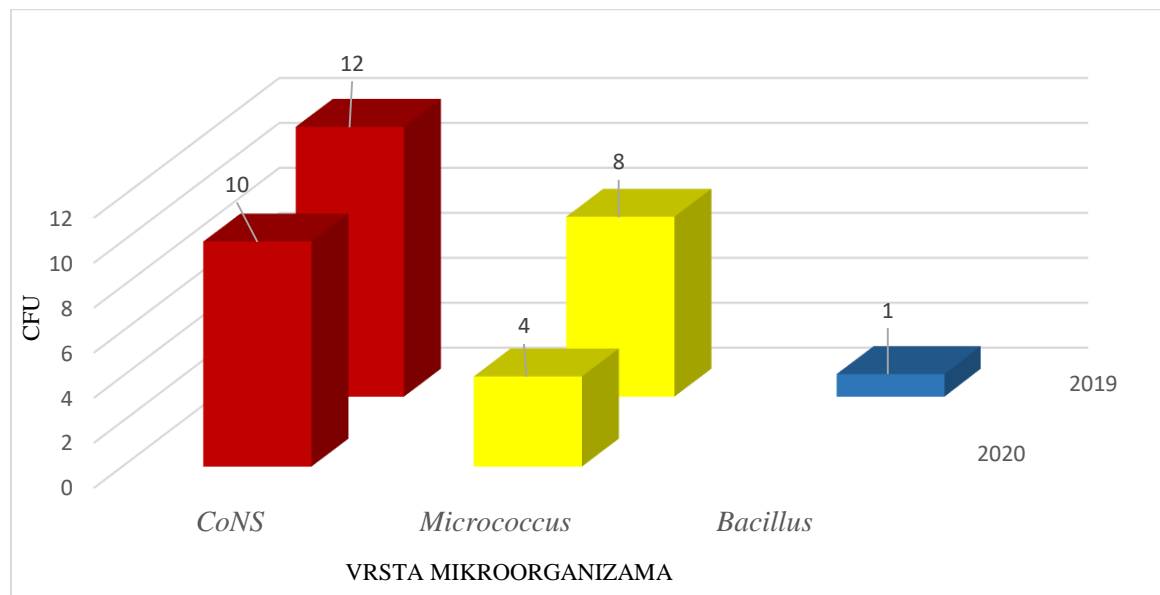
Tijekom 2019. godine samo je jednom zabilježen pozitivan rezultat u zraku B klase. Pretpostavlja se da je tijekom unosa potrošnog materijala najvjerojatnije došlo do kontaminacije prostora.



Slika 11. Mikrobiološki profil u klasi B (zrak) za 2019./2020. godinu. Prikazane vrste su koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus*, *Bacillus*, *plijesni*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter* i *Pantonea*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)



Osim toga, mikrobiološki profil između godina razlikuje se i po pojavljivanju vrsta iz roda *Bacillus* koje se u 2020. godini ne pojavljuju, dok se u 2019. godine pojavljuje samo jednom, 1 CFU (Slika 12.).



Slika 12. Mikrobiološki profil u klasi B (površine) za 2019./2020. godinu. Prikazane vrste su koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus* i *Bacillus*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)

#### 4.3. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine za vodu iz kritične opreme u klasi B

##### 4.3.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja vode iz kritične opreme

###### Analiza vodene kupelji

Unutar klase B 2019. godine je vodena kupelj uzorkovana 23 puta, a 2020. godine 10 puta. U obje godine dobiveni su 100% sterilni rezultati (Tablica 24.).

Tablica 24. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za vodenu kupelj u klasi B

Godina	2019.	2020.	Standard
Broj uzorkovanja	23	10	
Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija	0	0	
Sterilni mikrobiološki rezultati	100%	100%	>99%
Odstupanja	0	0	<1%

### Analiza CO<sub>2</sub> inkubatora od 150 L

CO<sub>2</sub> inkubator 150 L uzorkovan je 17 puta 2019. godine i 10 puta 2020. godine. U obje godine dobiveni su 100% sterilni rezultati (Tablica 25.).

Tablica 25. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za CO<sub>2</sub> inkubator od 150 L u klasi B

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	17	10	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	0	0	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultati</i>	100%	100%	>99%
<i>Odstupanja</i>	0	0	<1%

### Analiza CO<sub>2</sub> inkubatora od 240 L

CO<sub>2</sub> inkubator 240 L uzorkovan je 27 puta 2019. godine i 4 puta 2020. godine. U obje godine dobiveni su 100% sterilni rezultati (Tablica 26.).

Tablica 26. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za CO<sub>2</sub> inkubator od 240 L u klasi B

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	27	4	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	0	0	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultat</i>	100%	100%	>99%
<i>Odstupanja</i>	0	0	<1%

#### 4.4. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine za odjeću djelatnika u klasi B

##### 4.4.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja odjeće djelatnika

Mikrobiološko uzorkovanje odjeće djelatnika u klasi B provedeno je 30 puta 2019. godine i 15 puta 2020. godine. Rezultati za 2019. godinu bilježe 3 pozitivna mikrobiološka rezultata što sveukupno čini 90% sterilnih rezultata. Tijekom 2020. godine zabilježen je 1 pozitivan mikrobiološki rezultat što daje 93,3% sterilnih rezultata. Dakle tijekom 2020. godine zabilježeno je 3,3% manje odstupanje u odnosu na 2019. godinu (Tablica 27.).

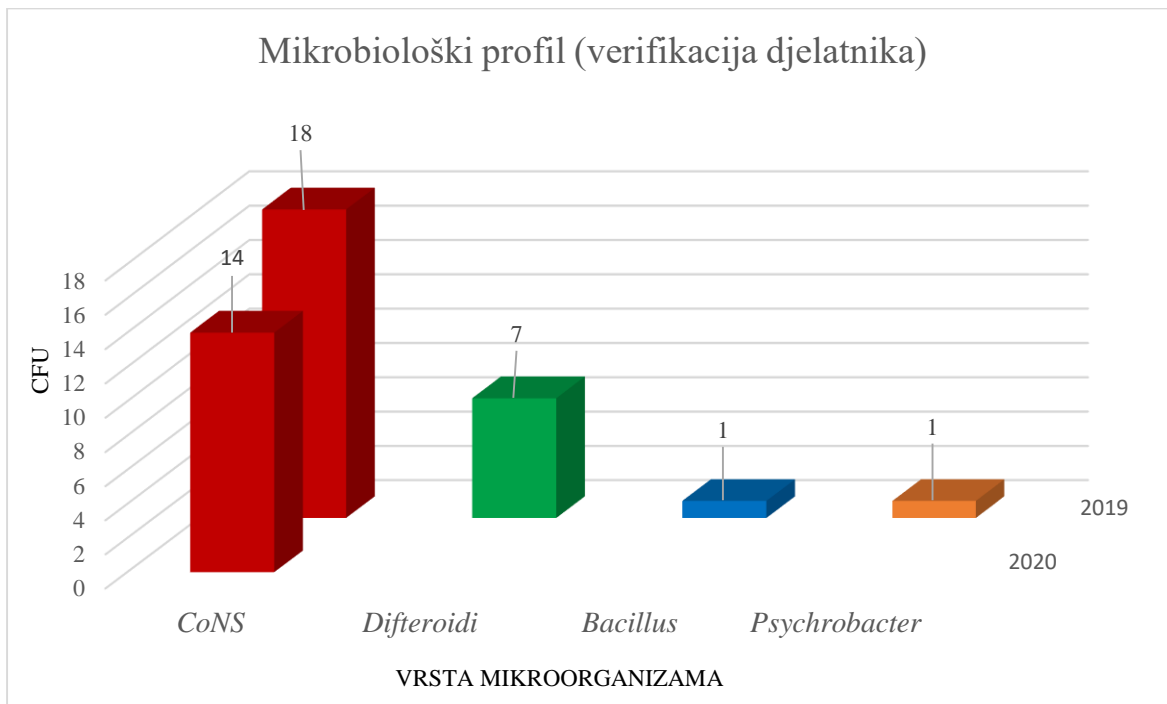
Tablica 27. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za odjeću djelatnika u klasi B (NP-nije primjenjivo)

Godina	2019.	2020.	Standard
Broj uzorkovanja	30	15	
Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija	3	1	
Sterilni mikrobiološki rezultati	90%	93,3%	NP
Odstupanja	10%	6,7%	NP

Najučestalije mjesto na kojem je uočena kontaminacija tijekom verifikacije djelatnika je koljeno. Prvi put su zabilježeni *difteroidi* (7 CFU) i *CoNS* (2 CFU), drugi put *CoNS* (7 CFU), vrste roda *Psychrobacter* (1 CFU) te *Bacillus* (1 CFU) (Tablica 28.) dok je treći put detektiran *CoNS* (4 CFU). Tijekom 2020. godine uočeno je poboljšanje te je kontaminacija zabilježena samo na laktu *CoNS* (4 CFU) uz manju brojnost i raznolikost detektiranih vrsta (Slika 13.).

Tablica 28. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja odjeće djelatnika u klasi B

datum	oznaka	mjesto uzorkovanja	CFU	mikroorganizmi
07.03.2019.	OK	Odjeća koljeno	7/2	<i>difteroidi/CoNS</i>
07.03.2019.	OK	Odjeća koljeno	7/1/1	<i>CoNS/Psychrobacter spp./Bacillus spp.</i>
30.08.2019.	OK	Odjeća koljeno	4	<i>CoNS</i>
16.07.2020.	OR	Odjeća rukav	4	<i>CoNS</i>

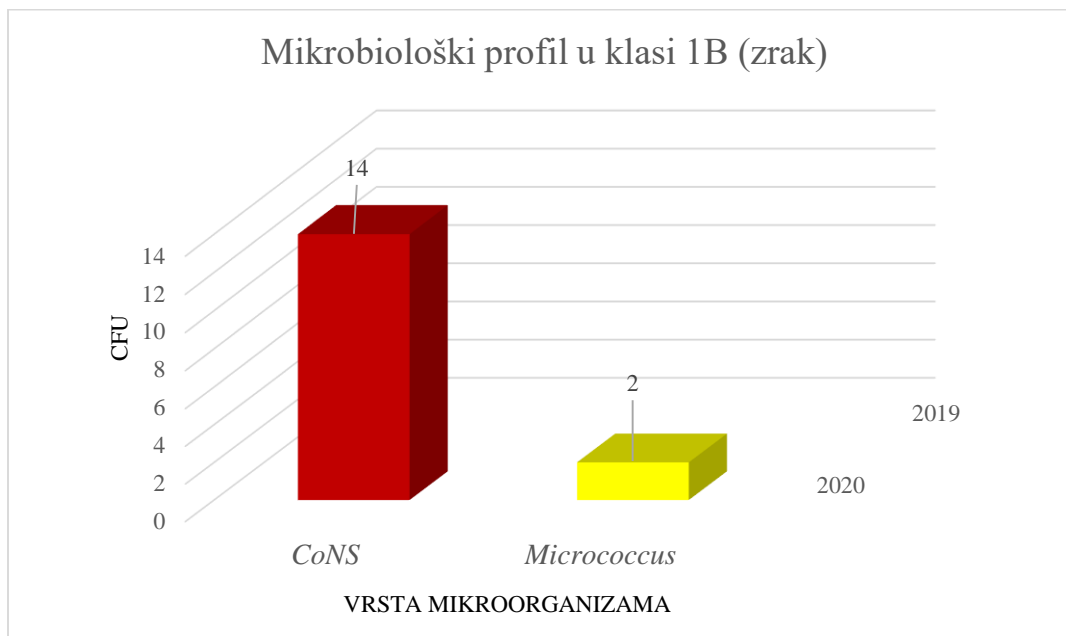


Slika 13. Mikrobiološki profil u klasi B (verifikacija djelatnika) za 2019./2020. godinu. Prikazane vrste su koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), *Difteroidi*, vrste roda *Bacillus* i *Psychrobacter*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)

#### 4.5. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi 1B

##### 4.5.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka

Mikrobiološko uzorkovanje zraka u klasi 1B provedeno je 26 puta tijekom 2019. godine i 30 puta 2020. godine. Rezultati za 2019., kao i za 2020. godinu su 100% sterilni (Tablica 29.). Tijekom 2020. godine u zraku detektirani su mikroorganizmi koji su bili unutar dozvoljenog broja kolonija (*CoNS*, *Micrococcus spp.*) dok su rezultati tijekom 2019. godine svi bili sterilni (Slika 14.).



Slika 14. Mikrobiološki profil u klasi 1B (zrak) za 2019./2020. godinu. Prikazane vrste su koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*) i vrste roda *Micrococcus*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)

Tablica 29. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za zrak u klasi 1B

Godina	2019.	2020.	Standard
Broj uzorkovanja	26	30	
Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija	0	0	
Sterilni mikrobiološki rezultati	100%	100%	>97%
% odstupanja	0	0	<3%

#### 4.5.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina

Mikrobiološko uzorkovanje površina u klasi 1B provedeno je 87 puta 2019. godine i 89 puta 2020. godine. Rezultati dobiveni 2019. godine bilježe 6 pozitivnih mikrobioloških rezultata što čini 93,1% sterilnih rezultata. Tijekom 2020. godine zabilježena su 3 pozitivna mikrobiološka rezultata što čini 96,6% sterilnih rezultata, odnosno 3,5% manje u odnosu na 2019. godinu (Tablica 30.).

Tablica 30. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za površine u klasi 1B

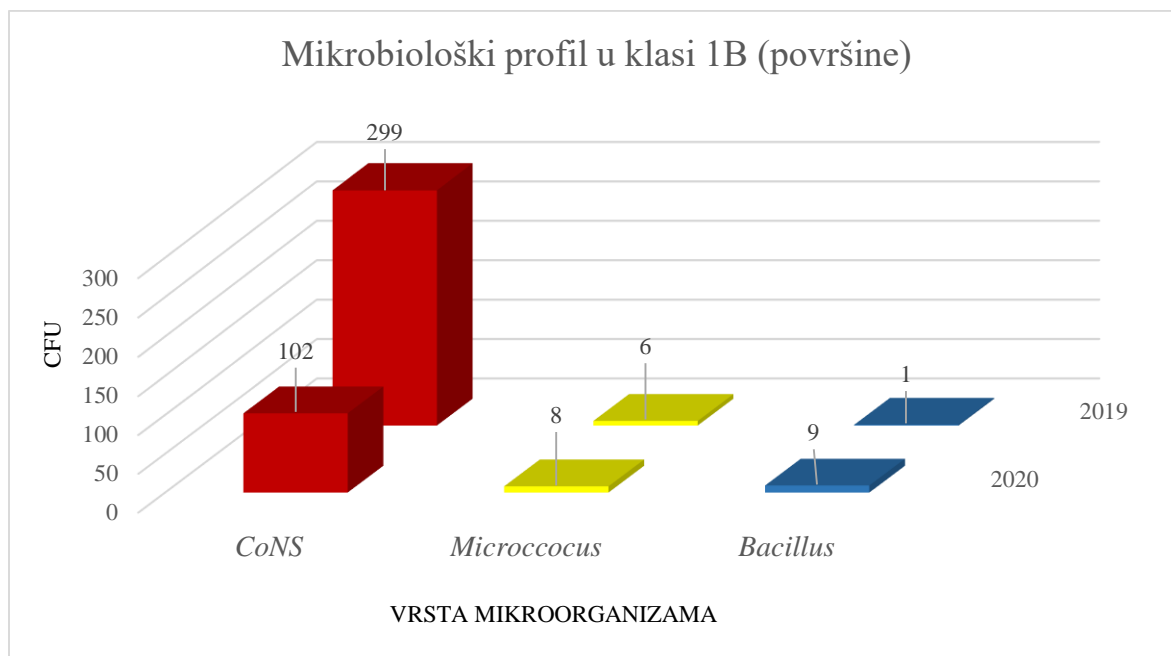
Godina	2019.	2020.	Standard
Broj uzorkovanja	87	89	
Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija	6	3	
% sterilnih mikrobioloških rezultata	93,1%	96,6%	>97%
% mikrobiološki pozitivnih rezultata	6,9%	3,4%	<3%

Najčešće mjesto tijekom 2019. i 2020. godine na kojem se pojavljuje kontaminacija je pod kod vrata u klasi 1B prema klasi C (1B3) te je 3 puta uočen pozitivan rezultat. Prilikom prvog odstupanja detektirane su vrste roda *Micrococcus spp.* (6 CFU) i *CoNS* (15 CFU), drugi puta *CoNS* (134 CFU) te treći puta *CoNS* (8 CFU) i *Bacillus spp.* (6 CFU).

Drugo najčešće mjesto na kojem se pojavljuje kontaminacija je kvaka vrata 1 u klasi 1B prema klasi C (1B4). Zabilježena su dva odstupanja od kojih je jedno veće s detektiranim *CoNS* (116 CFU), a drugo manje s istim uzročnikom (6 CFU). Dva puta se pojavljuje kontaminacija i na podu kod vrata 2 koji se nalazi u klasi 1B prema klasi B (1B5) s detektiranim *CoNS* (prvi puta 9 CFU a drugi put 17 CFU). Dodatno, dva puta je zabilježena kontaminacija i na klupici. Prvi put sa detektiranim mikroorganizmima *CoNS* (4 CFU), *Bacillus spp.* (1 CFU), a drugi put *CoNS* (8 CFU) i *Micrococcus spp.* (4 CFU) (Tablica 31.). Za obje godine detektiran je isti mikrobiološki profil no u 2020. godini je došlo do znatnog smanjenja brojnosti *CoNS* (Slika 15.).

Tablica 31. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja površina u klasi 1B

datum	kod uzorka	mjesto uzorkovanja	CFU	mikroorganizmi
01.06.2019.	1B8CT3P010619GZ	Klupica	4 /1	<i>CoNS/Bacillus spp.</i>
04.06.2019.	1B4CT3P040619GZ	Kvaka vrata 1 1B→C	116	<i>CoNS</i>
06.09.2019.	1B5CT3P060919MJ	Pod kod vrata 2 1B→B	9	<i>CoNS</i>
19.09.2019.	1B5CT3P190919MJ	Pod kod vrata 2 1B→B	17	<i>CoNS</i>
08.11.2019.	1B3CT3P081119MJ	Pod kod vrata 1 1B→C	6/15	<i>Micrococcus spp./CoNS</i>
19.11.2019.	1B3CT3P191119GZ	Pod kod vrata 1 1B→C	134	<i>CoNS</i>
09.01.2020.	1B4CT3P090120MJ	Kvaka vrata 1 1B→C	6	<i>CoNS</i>
03.02.2020.	1B3CT3P030220MJ	Pod kod vrata 1 1B→C	8/6	<i>CoNS/Bacillus spp.</i>
17.02.2020.	1B8CT3P170220MJ	Klupica	8/4	<i>CoNS/Micrococcus spp.</i>



Slika 15. Mikrobiološki profil u klasi 1B (površine) za 2019./2020. godinu. Prikazane vrste su koagulaza negativni stafilocoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus* i *Bacillus*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)

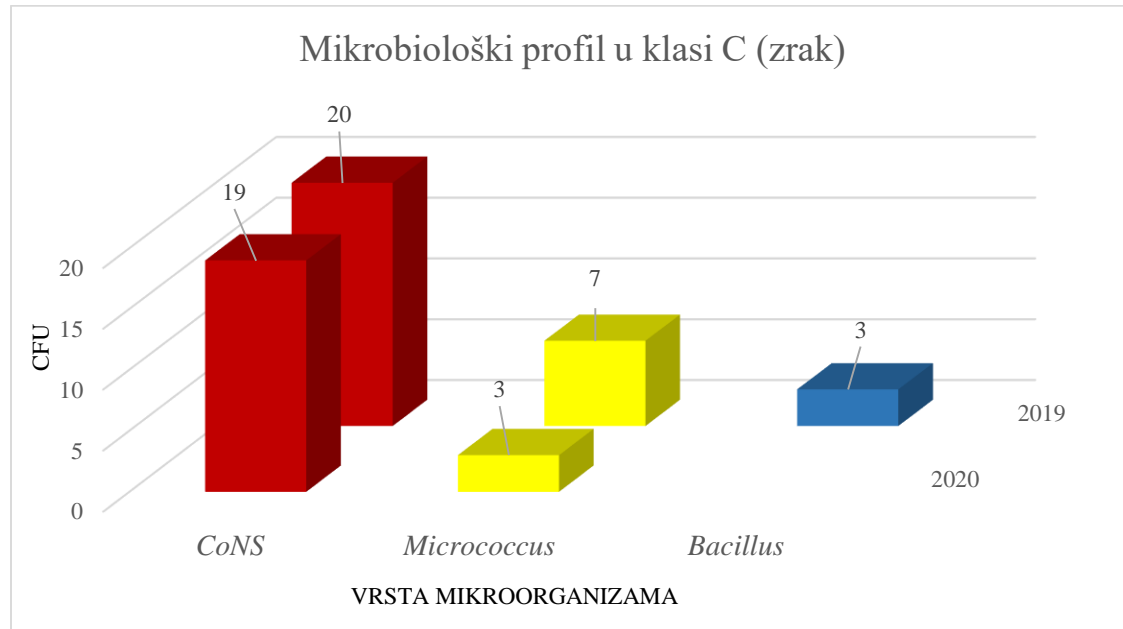
#### 4.6. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi C

##### 4.6.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka

Mikrobiološko uzorkovanje zraka u klasi C provedeno je 25 puta 2019. i 22 puta 2020. godine. Nema zabilježenih pozitivnih mikrobioloških rezultata koji odstupaju od dozvoljenog broja kolonija. Sterilnost rezultata je 100% za obje godine (Tablica 32.). Uspoređujući mikrobiološki profil za obje godine, 2020. godine nema pojave vrsta roda *Bacillus* (Slika 16.).

Tablica 32. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za zrak u klasi C

Godina	2019.	2020.	Standard
Broj uzorkovanja	25	22	
Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija	0	0	
Sterilni mikrobiološki rezultat	100%	100%	>95%
Odstupanja	0	0	<5%



Slika 16. Mikrobiološki profil u klasi C (zrak) za 2019./2020. godinu. Prikazane vrste su koagulaza negativni stafilocoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus* i *Bacillus*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)



#### 4.6.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina

Mikrobiološko uzorkovanje površina u klasi C provedeno je 82 puta 2019. godine i 72 puta 2020. godine. Rezultati dobiveni 2019. godine bilježe 3 pozitivna mikrobiološka rezultata što čini 96,3% sterilnih rezultata. Tijekom 2020. godine zabilježen je samo 1 pozitivan rezultat što čini 98,6% sterilnih rezultata (Tablica 33.). Detektirane vrste mikroorganizama 2019. godine su *CoNS* i vrste roda *Micrococcus* dok se 2020. godine pojavljuju i vrste roda *Bacillus*.

Tablica 33. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za površine u klasi C

<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	82	72	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	3	1	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultat</i>	96,3%	98,6%	>95%
<i>Mikrobiološki pozitivni rezultat</i>	3,7%	1,4%	<5%

Uspoređujući mikrobiološki profil za obje godine, 2020. godine je došlo do smanjenja brojnosti mikroorganizama ali i pojave novih vrsta kao što su *difteroidi* kojih nema u 2019. godini (Slika 17.). Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja i rezultat je unutar očekivanog standarda.

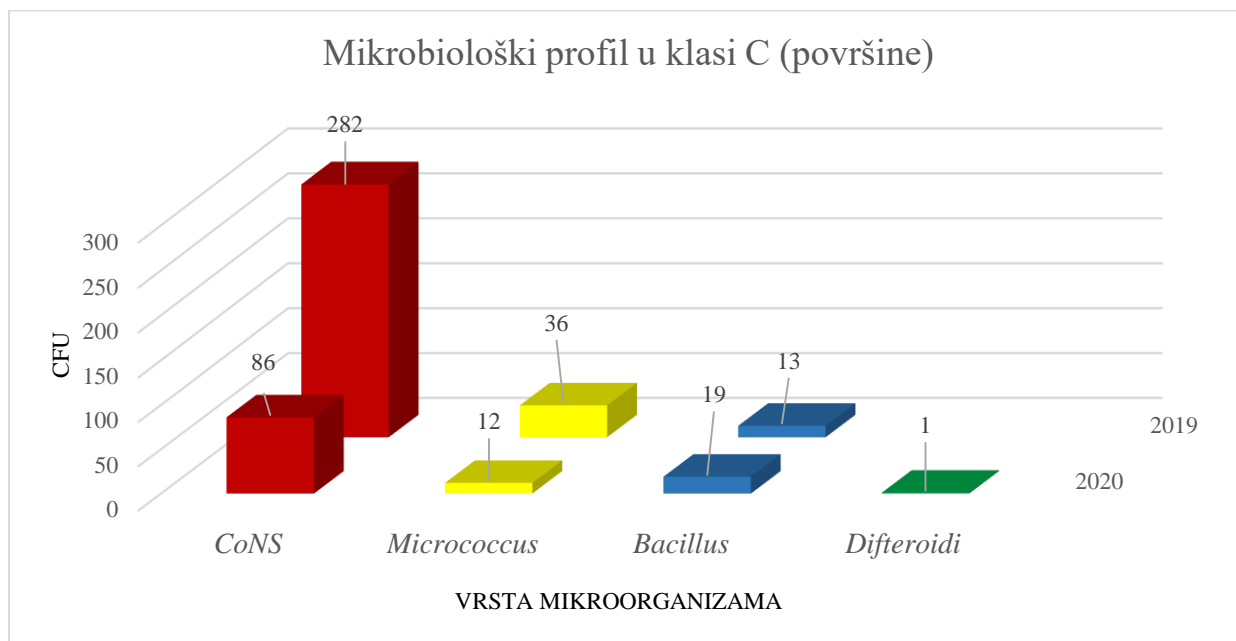
Najučestalije mjesto na kojem se odstupanja od dozvoljenog broja ponavljaju je pod kod vrata (na prijelazu iz klase C u D) (Tablica 34.). Prvi put detektiran je *CoNS* (72 CFU), drugi put *CoNS* (43 CFU) i *Micrococcus spp.* (9 CFU), treći put *CoNS* (57 CFU) te četvrti put *CoNS* (34 CFU), *Micrococcus spp.* (6 CFU) i *Bacillus spp.* (3 CFU). Ostala mjesta na kojima su pronađeni mikroorganizmi čiji broj ne odstupa od dozvoljenog su na polici, kvakama vrata i kraj odsisne rešetke ispod prozora (Tablica 35., Slika 18.). Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja i rezultat je unutar očekivanog standarda.

Tablica 34. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja površina u klasi C

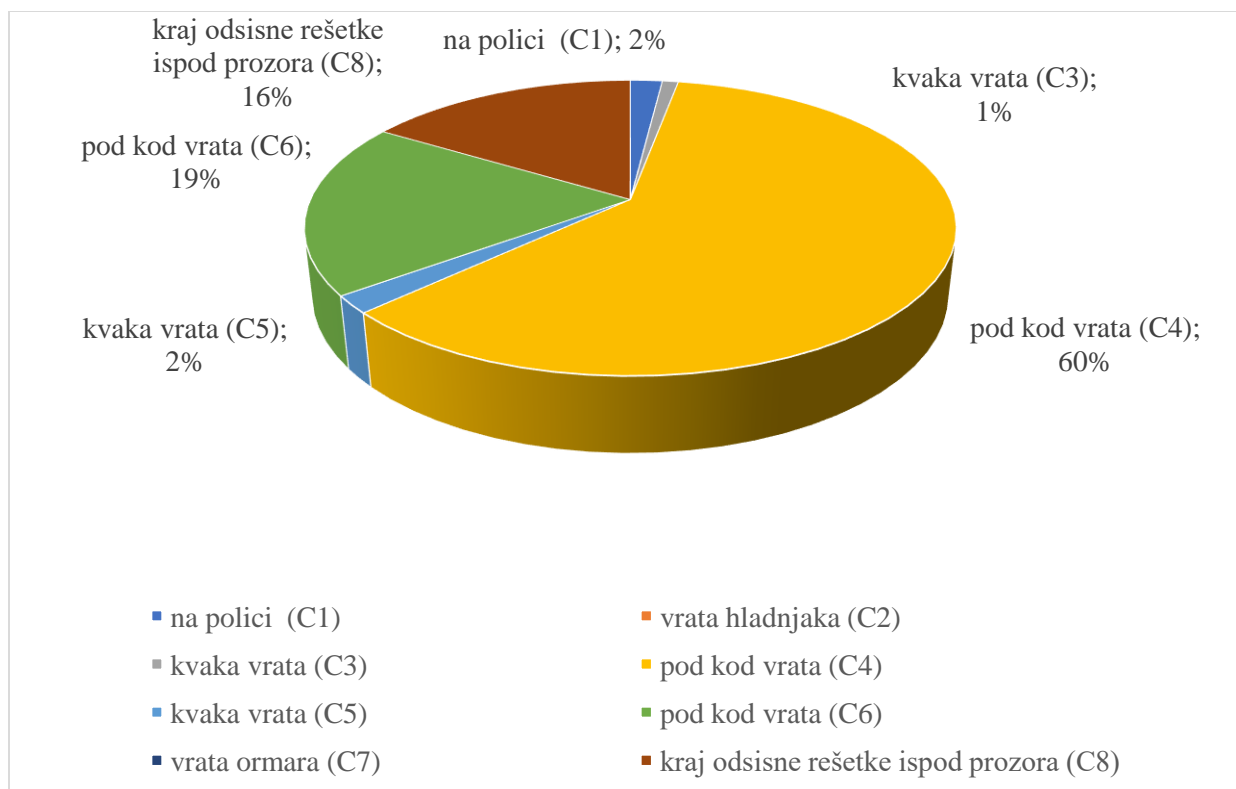
<i>datum</i>	<i>kod uzorka</i>	<i>mjesto uzorkovanja</i>	<i>CFU</i>	<i>mikroorganizmi</i>
10.06.2019.	C4CT3P100619MJ	Pod kod vrata C→D	72	<i>CoNS</i>
24.09.2019.	C4CT3P240919MJ	Pod kod vrata C→D	43/9	<i>CoNS/Micrococcus spp.</i>
07.10.2019.	C4CT3P071019MJ	Pod kod vrata C→D	57	<i>CoNS</i>
13.03.2020.	C4CT3P130320MBM	Pod kod vrata C→D	34/6/3	<i>CoNS/Micrococcus spp./Bacillus spp.</i>

Tablica 35. Prikaz mjesta i brojnosti detektiranih mikroorganizmima u klasi C

<i>Mjesto</i>	Na polici (C1)	Vrata hladnjaka (C2)	Kvaka vrata (C3)	Pod kod vrata (C4)	Kvaka vrata (C5)	Pod kod vrata (C6)	Vrata ormara (C7)	Kraj odsisne rešetke ispod prozora (C8)
<i>Broj mikroorganizama</i>	3	0	1	89	2	26	0	19



Slika 17. Mikrobiološki profil u klasi C (površine) za 2019./2020. godinu. Prikazane su vrste koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus*, *Bacillus*, i *Difteroidi*. CFU-broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)



Slika 18. Prikaz mjesta i postotak mikroorganizama detektiranih u klasi C

#### 4.7. Rezultati mikrobiološke analize za 2020. godinu i usporedba s rezultatima iz 2019. godine u klasi D

##### 4.7.1. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja zraka

Mikrobiološko uzorkovanje zraka u klasi D provedeno je 12 puta 2019. i 14 puta 2020. godine. Nema zabilježenih pozitivnih mikrobioloških rezultata koji odstupaju od dozvoljenog broja kolonija. Sterilnost rezultata je 100% za obje godine (Tablica 36.).

Tablica 36. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za zrak u klasi D

Godina	2019.	2020.	Standard
Broj uzorkovanja	12	14	
Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija	0	0	
Sterilni mikrobiološki rezultat	100%	100%	>90%
% odstupanja	0%	0%	<10%

##### 4.7.2. Rezultati mikrobiološkog uzorkovanja površina

Mikrobiološko uzorkovanje površina u klasi D provedeno je 41 put 2019. godine i 37 puta 2020. godine. Rezultati dobiveni 2019. godine bilježe 1 pozitivan mikrobiološki rezultat što čini 97,6% sterilnih rezultata. Tijekom 2020. godine zabilježen je također 1 pozitivan rezultat što čini 97,3% sterilnih rezultata (Tablica 37.). Detektirane vrste mikroorganizama 2019. godine su *CoNS*, vrste roda *Micrococcus spp.* i *difteroidi* dok se 2020. godine pojavljuju vrste roda *Bacillus spp.*. Tijekom 2019. godine odstupanja rezultiraju s *CoNS* (46 CFU), *Micrococcus spp.* (10 CFU) i *difteroidi* (5 CFU). Međutim tijekom 2020. godine uočava se smanjena brojnosti *CoNS* (41 CFU), *Micrococcus spp.* (3 CFU) i *Bacillus spp.* (4 CFU) (Tablica 38.).

Mikroorganizmi koji odstupaju od dozvoljenog broja u klasi D nalaze se na podu kod vrata kao i u klasi C (Tablica 39.). Ostala mjesta na kojima su pronađeni mikroorganizmi koji ne odstupaju od dozvoljenog broja su umivaonik i kvaka vrata.

Tablica 37. Prikaz broja uzorkovanja, pozitivnih i negativnih mikrobioloških rezultata za površine u klasi D

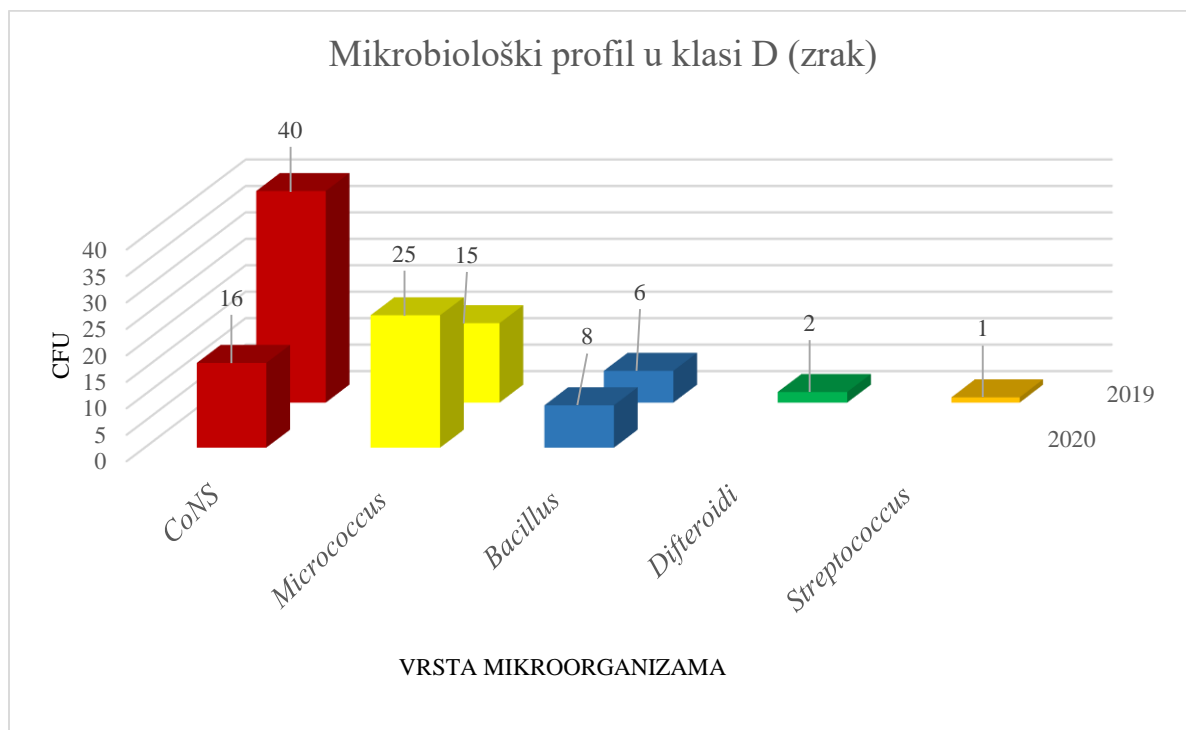
<i>Godina</i>	2019.	2020.	Standard
<i>Broj uzorkovanja</i>	41	37	
<i>Broj pozitivnih mikrobiološki rezultata/akcija</i>	1	1	
<i>Sterilni mikrobiološki rezultat</i>	97,6%	97,3%	>90%
<i>Odstupanje</i>	2,4%	2,7%	<10%

Tablica 38. Prikaz datuma, koda, mjesta uzorkovanja, broja bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*, CFU) i vrste mikroorganizama kod uzorkovanja površina u klasi D

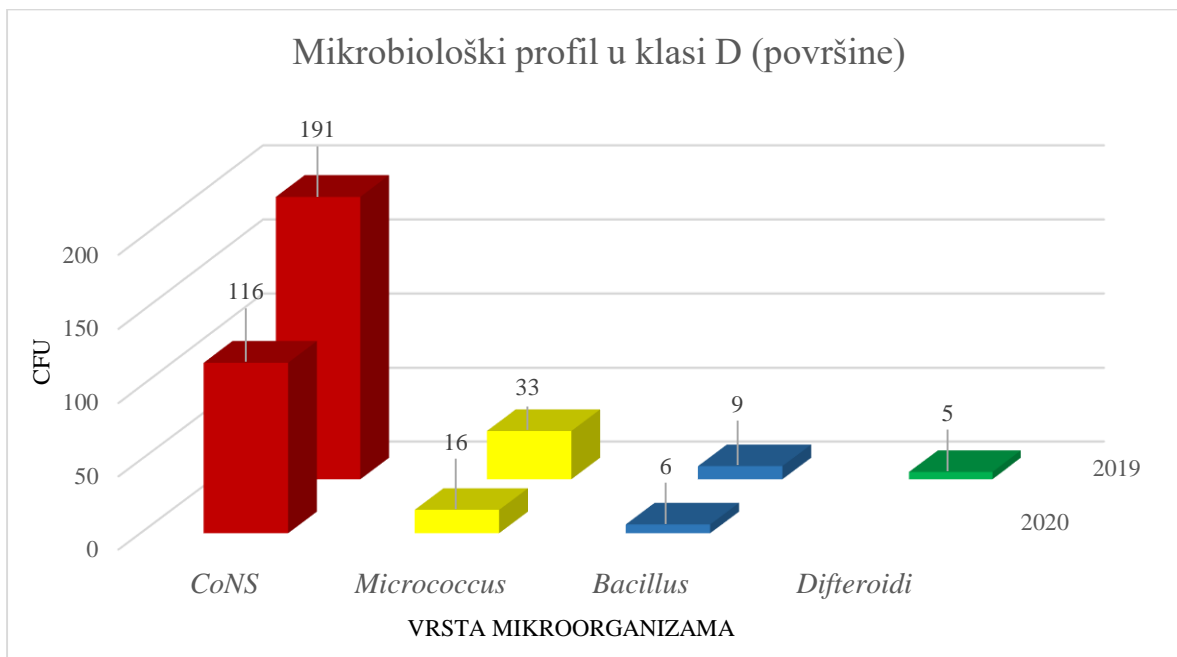
<i>datum</i>	<i>kod uzorka</i>	<i>mjesto uzorkovanja</i>	<i>CFU</i>	<i>mikroorganizmi</i>
28.11.2019.	D2CT3P281119MJ	Pod kod vrata	10/46/5	<i>Micrococcus spp./CoNS/difteroidi</i>
23.03.2020.	D2CT3P230320MBM	Pod kod vrata	41/4/3	<i>CoNS/Bacillus spp. Micrococcus spp.</i>

Uspoređujući mikrobiološki profil zraka u klasi D za obje godine, tijekom 2019. godine pojavljuju se vrste roda *Streptococcus* i *difteroidi* kojih nema unutar 2020. godine (Slika 19.). Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja i rezultat je unutar očekivanog standarda.

Uspoređujući mikrobiološki profil površina u klasi D za obje godine uočava se smanjenje brojnosti svih mikroorganizama u 2020. godini te izostanak *difterioda* (Slika 20.). Najčešće mjesto na kojem je uočen porast bakterija je D2 što je pod kod vrata (Slika 21.). Tijekom obje godine zabilježena su minimalna odstupanja i rezultat je unutar očekivanog standarda.



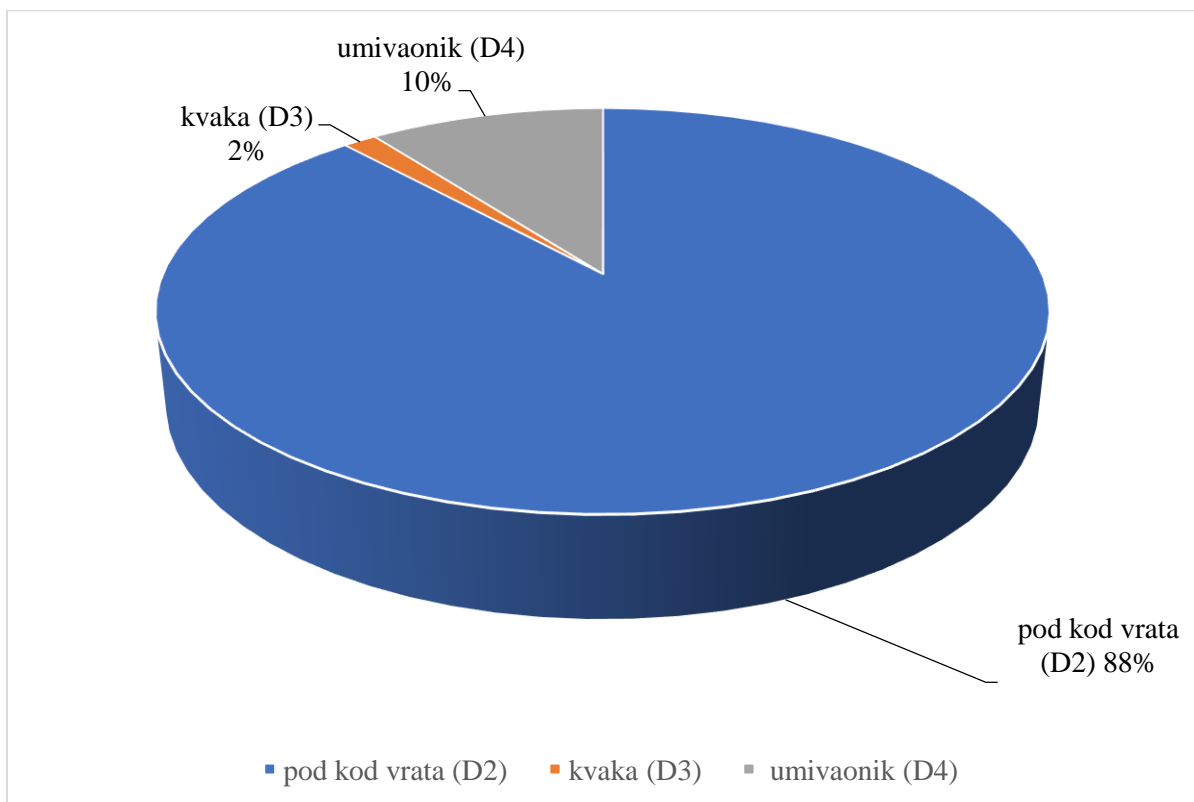
Slika 19. Mikrobiološki profil u klasi D (zrak) za 2019./2020. godinu. Prikazane su vrste koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* i *Difteroidi*. CFU- broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)



Slika 20. Mikrobiološki profil u klasi D (površine) za 2019./2020. godinu. Prikazane su vrste koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), vrste roda *Micrococcus*, *Bacillus* i *Difteroidi*. CFU-broj bakterijskih stanica (*Colony Forming Unit*)

Tablica 39. Prikaz mjesta i brojnosti detektiranih mikroorganizama u klasi D

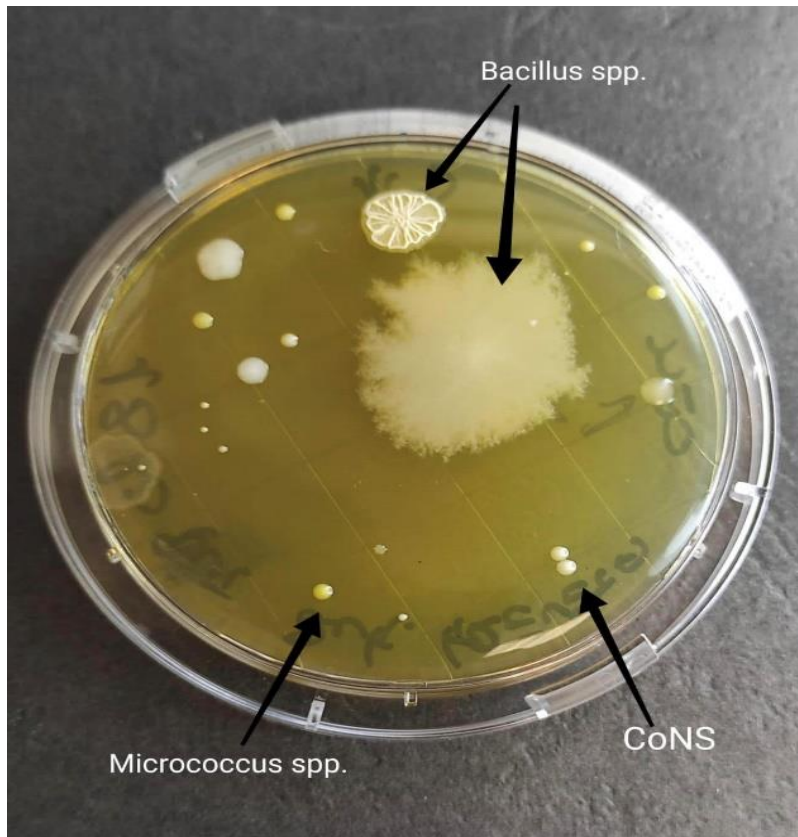
<i>Mjesto</i>	Pod kod vrata (D2)	Kvaka (D3)	Umivaonik (D4)
<i>Broj mikroorganizama</i>	122	2	14



Slika 21. Prikaz mjesta i postotak mikroorganizama detektiranih u klasi D

#### 4.8. Makroskopski i mikroskopski prikaz najčešće detektiranih mikroorganizama

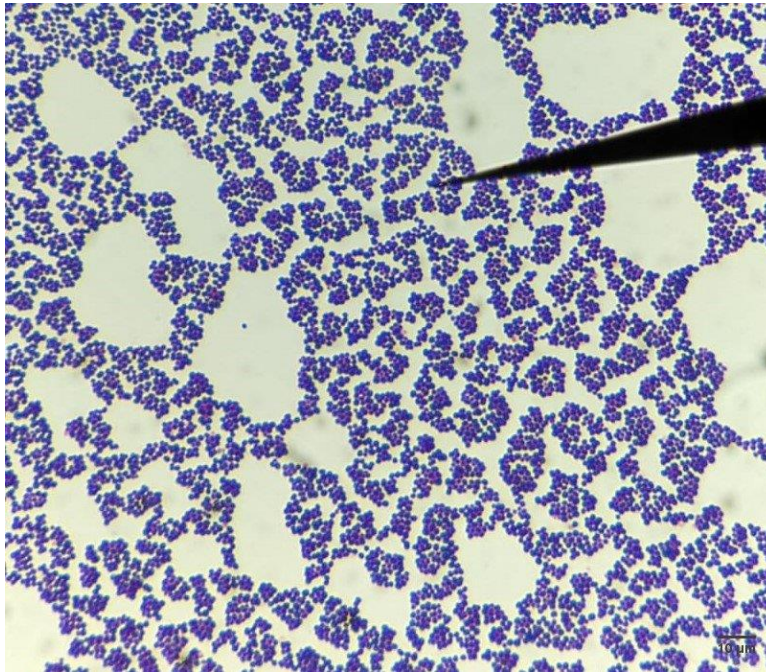
Prikaz rezultata mikrobiološke analize okoline Laboratorija za tkivno inženjerstvo nakon inkubacije 48 sati dana pri 36 °C. Na slici 22. su makroskopski prikazani rezultati porasta kolonija na hranjivoj podlozi.



Slika 22. Prikaz kolonija bakterija *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* i koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*)

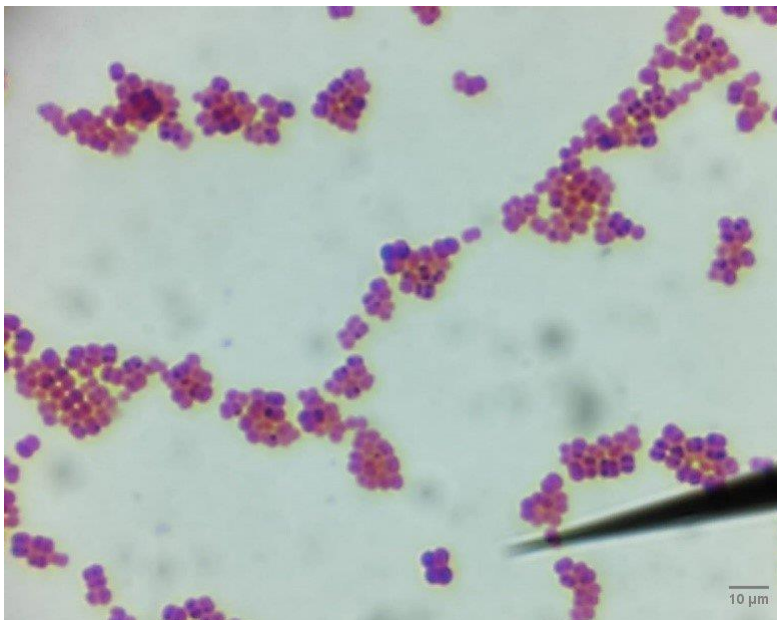
Najzastupljenija vrsta bakterija su koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*). Na Gram preparatu su obojene plavo-ljubičasto, sferičnog su oblika te se pod mikroskopom vide u obliku nakupina grožđa (Slika 23.).





Slika 23. Prikaz okruglih bakterija roda *Staphylococcus*, koagulaza negativni stafilokoki (*CoNS*), Gram obojeni preparat, slika na svjetlosnom mikroskopu ZEISS, Primostar 3 .Slikala: dr. Ivanka Batarilo

Druga najzastupljenija bakterija je *Micrococcus spp.* Na Gram preparatu su obojene plavo-ljubičasto, sferičnog oblika te obično formiraju tetrade (Slika 24.).



Slika 24. Prikaz tetrada bakterija roda *Micrococcus*, Gram obojeni preparat, slika na svjetlosnom mikroskopu ZEISS, Primostar 3. Slikala: dr. Ivanka Batarilo

Treća često detektirana bakterija je iz roda *Bacillus* spp. Ove bakterije na Gram preparatu su obojene plavo-ljubičasto, štapićastog oblika i stvaraju spore (Slika 25.).



Slika 25. Prikaz štapićastih bakterija roda *Bacillus*, Gram obojeni preparat, slika na svjetlosnom mikroskopu ZEISS, Primostar 3. Slikala: dr. Ivanka Batarilo

## 5. RASPRAVA

Laboratorij za tkivno inženjerstvo (LZTI) u kojemu se obrađuju tkiva i stanice je izveden, organiziran i održavan na način kojim se opasnost od zagađenja, uključujući križno zagađenje, svodi na najmanju moguću mjeru. Učinkovitost izvedbe, organizacije i održavanja mora se validirati i nadzirati. Laboratorij za tkivno inženjerstvo, izrađen je prema tehnologiji čistih prostora odnosno na način da je postojeći sustav HVAC definiran kroz 4 klase čistog prostora – A (ISO 5), B (ISO6), C (ISO 7) i D (ISO 8). Izvedena instalacija udovoljava projektnim zahtjevima te zahtjevima normi vezanim uz čiste prostore.

Uzorkovanjem zraka u mikrobiološkim kabinetima (MSCI i MSCII, klasa A) tijekom 2019. godine nije zabilježen niti jednom pozitivan mikrobiološki rezultat dok su 2020. godine zabilježena samo 2 pozitivna rezultata (2 puta *CoNS* i 1 puta *Bacillus*) što čini 98,12% sukladnih rezultata. U zraku B klase čistog prostora detektirane su samo jednom Gr- bakterije *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter* i *Pantoea spp.*, CFU 7/2/1. Gr - bakterije imaju sposobnost pričvršćivanja na površinu, gdje formiraju biofilm, vrlo otporan oblik rasta mikroorganizama, koji se teško uništava čak i dezinfekcijom (Resnik i Kerč, 2010). Površine na kojima se može naći biofilm jesu metal, plastika, kamen, čestice zemlje, medicinski implantati te tkiva (Vraneš i Leskovar, 2009). Biofilm može činiti samo jedna bakterijska vrsta, no češće se sastoji od više vrsta bakterija, ili bakterija i gljiva. Jednom pričvršćeni za površinu, mikroorganizmi biofilma mogu, svojim aktivnostima, doprinosti ili štetiti zbivanjima u okolišu. Unutar biofilma, pojedine vrste su se dobro prilagodile životu u zajednici. Biofilmovi mogu nastati na živim ili neživim površinama i mogu prevladati u prirodnim, industrijskim i bolničkim okruženjima. Oni štite mikroorganizme od isušivanja. Najčešće nastaju na granici između dva agregatna stanja (gotovo na svakoj granici vode i zraka, te zemlje i vode) (Vraneš i Leskovar 2009, Donlan 2002). Najveći izvor navedenih Gr- mikroorganizama je voda (Tršan i sur., 2019). Stoga posebnu pažnju treba posvetiti vodi koja se koristi za pripremu otopina i vodi koja se stavlja u vodenu kupelj i inkubatore. Također, sva sredstva za čišćenje i dezinfekciju te ostale tekućine koje se koriste u prostorima laboratorija moraju biti sterilne i s namjerom korištenja u čistim prostorima. Za razliku od Gr- bakterija, Gr+ bakterije se izuzetno rijetko nalaze u vodi jer zahtijevaju veću koncentraciju organske tvari. Zrak nije normalno životno okruženje za mikroorganizme već on

prije svega predstavlja samo prijenosni medij pa izvor kontaminacija detektiranih uzorkovanjem zraka vjerojatno čini unošenje potrošnog materijala ili reagensa u čiste prostore.

Uzorkovanjem površina u klasama A i B detektirane su bakterije *Micrococcus spp.* i *CoNS*. U klasama 1B, C i D osim *Micrococcus* i *CoNS* pojavljuju se i bakterije roda *Bacillus*, a 2019. godine zabilježeni su samo jednom *difteroidi*. To su Gr+ nepokretni, nesporogeni bacili iz roda *Corynebacterium*. Rod *Corynebacterium* broji puno članova koji se zajedničkim imenom nazivaju difteroidni bacili. To su *C. pseudodiphthericum s. hofmani*, *C. diphtheriae var. ulcerans*, *C. xerosis*, *C. renale*, *C. minutissimum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. pyogenes*, *C. haemoliticum*, *C. jeikeum* i *C. kutscheri*. Samo neki od nabrojanih difteroida imaju značaja u medicini (<http://produzizivot.com/difteroidni-bacili-difteroidi/>). Prisutnost Gr+ koka u čistim prostorima najvjerojatnije je povezano s osobljem koje radi u navedenim prostorima. Laboratorijski djelatnici najveći su izvor bakterija, a neke od tih bakterija su fakultativni patogeni. Dakle, samo na 1 cm<sup>2</sup> kože na ljudskoj ruci nalazi se oko 32 000 bakterija; prema tome, kad osoba sjedi, ispušta u okolinu oko 10 000 čestica, a kada se kreće otpušta i do 1 000 000 čestica (Sandle, 2014). Ljudska koža se stalno obnavlja i pri tom procesu gubi mrtve epidermalne stanice, a oko 10% tih stanica nose sa sobom mikroorganizme. Nadalje kada te mrtve stanice padnu na površine predstavljaju izvor hrane za druge mikroorganizme pa se oni mogu dalje razmnožavati. Zbog svih ovih razloga vrlo je važno površinu kože zaštititi sterilnom odjećom (kapama, naočalama, obućom, maskom, pododjelom, jednokratnim skafanderom i dvostrukim rukavicama) (Tršan i Pečar, 2010).

Najviše zabilježenih pozitivnih mikrobioloških rezultata nalazi se u klasi D kao što je i očekivano s obzirom da se radi o najmanje čistom prostoru u laboratoriju. Najmanji broj nesukladnih rezultata zabilježen je u klasi A čistog prostora (zrak i kontaktne površine MSC I i MSC II te prsti djelatnika) što je i poželjno jer se tu odvijaju aseptični procesi pripreme tkivnih proizvoda i rad sa stanicama. Podaci na koje treba obratiti pažnju su učestala pojava većeg broja *CoNS* u klasama 1B, C i D. U klasi 1B, gdje se ne očekuje toliki broj detektiranih kolonija, najveći broj kolonija 2019. godine zabilježen je u uzorku na poziciji 1B3 (pod kod vrata 1 1B→C) kada je detektirano 134 CFU *CoNS*. Inače se na navedenoj poziciji 3 puta tijekom 2019. godine pojavljuje nesukladan rezultat. Mogući razlog ovako visokog broja kolonija na podu kod vrata (1B3) 2019. godine je taj što je na tom mjestu popustio silikon na panelima/zidovima te je prolazio nefiltrirani zrak iz konstrukcije zgrade direktno u laboratorij. Na istoj poziciji 2020. godine

zabilježeno je samo 8 CFU *CoNS*. Ukoliko uspoređujemo rezultate, primijećeno je da su zajedničke pozicije na kojima su detektirani mikroorganizmi u 2019. i 2020. godini 1B4 (kvaka vrata 1 1B→C) i 1B8 (klupica). Na poziciji 1B4 tijekom 2019. godine zabilježen je veći broj kolonija 116 CFU *CoNS*. Taj broj u 2020. godini smanjen je na samo 6 CFU *CoNS* jer je uveden novi način čišćenja i dezinfekcije laboratorija. U odnosu na 2019. godinu, na poziciji 1B5 (pod kod vrata 2 (1B→B)) nisu detektirani mikroorganizmi. Navedena mjesta uzorkovanja direktno ne utječu na kvalitetu i sigurnost tkiva i stanice jer se u navedenom prostoru ne obavljaju manipulacije s tkivima i stanicama već se provodi oblačenje djelatnika za rad i predstavlja prolaz prema glavnom B prostoru. Međutim ovi su rezultati vrlo važni za procjenu učinkovitosti čišćenja i oblačenja. Najvjerojatniji razlog pojave ovako velikog broja kolonija na poziciji (1B4) kvake vrata je taj što je djelatnik zaboravio skinuti vanjske rukavice nakon skidanja nazuvaka prilikom izlaska iz klase 1B u klasu C. U klasi C najučestalija pozicija sa odstupanjima na kontaktnim površinama je C4 (pod kod vrata (1 C→D)) isto kao i 2019. godine. Mogući razlog učestalog pozitivnog mikrobiološkog rezultata na podu C klase je oštećenje poda i stvaranje pora u koje su ušle bakterije koje se teško mogu ukloniti standardnim načinom čišćenja i dezinfekcije. Stoga je vrlo važno da oprema bude izgrađena od nehrđajućih materijala sa što više ravnih površina. Pozicije kao što su C2 (vrata hadnjaka), C3 (kvaka vrata 1) i C7 (vrata ormara) nisu imale pozitivan mikrobiološki rezultat tijekom cijele 2019. godine dok se u 2020. Godini pojavljuje samo 1 CFU. Pozicije na kontaktnim površinama u D klasi čistog prostora su D2 (pod kod vrata), D3 (kvaka) i D4 (umivaonik). Od te tri pozicije najučestalija je D2 (pod), a nakon nje pozicija D4 (umivaonik). Rezultati vezani uz najučestalije mjesto pojavljivanja najvećeg broja bakterija ne odstupaju od rezultata 2019. godine gdje su također zabilježene iste pozicije. Dakle uspoređujući obje godine u klasi D, uočava se smanjenje brojnosti svih mikroorganizama u 2020.

Uzorkovanjem vode iz kritične opreme (vodene kupelji i inkubatora) nije zabilježen pozitivan rezultat što je u skladu s mjerama opreza. Broj odstupanja od dozvoljenog broja kolonija u 2020. godini je pao u odnosu na 2019. godinu vjerojatno zbog uvedene validacije čišćenja i dezinfekcije. Također, jedan od razloga smanjenja brojnosti mikroorganizama u odnosu na 2019. godinu smatra se uvođenje jednokratnih plastičnih boca s filterom za pripremu hranjivog medija umjesto do sada korištenih staklenih boca. Uporaba višekratnog staklenog suđa treba se minimalizirati zbog sumnje da su se kroz godine korištenja na stjenkama istog razvili biofilmovi sa Gr- bakterijama.

Najzastupljeniji mikroorganizmi u čistim prostorima pretežno su nepatogeni, te većinom čine fiziološku floru čovjeka. Ukoliko je sustav uređen na način da su fizikalni parametri u čistim prostorima unutar dozvoljenih granica, te se ispravno provode validirani postupci čišćenja i aseptičnog rada, najveći izvor kontaminacije su djelatnici. Iz tog razloga potrebno je djelatnike Banke tkiva i stanica kontinuirano educirati o svim postupcima koji mogu utjecati na mikrobiološki profil radne okoline LZTI. Također je bitno i planski provjeravati dosljednost u poštivanju spomenutih postupaka redovitim provođenjem samoinspekcije ili audita i kvalifikacija oblačenja. Prilikom ulaska u čiste prostore djelatnici moraju skinuti šminku sa lica i preporučljivo koristiti naočale ili vizir. Većina bakterija koje se mogu naći u zračnoj struji čistog prostora, rezultat su izravnog ispuštanja čestica tijekom ljuštenja stanica s višeslojnog epitela djelatnika. Nakon dugotrajnog pranja i sterilizacije pododjela, tekstilna vlakna oslabe, smanjujući tako učinkovitost filtriranja bakterija. Kao korektivna radnja zamjenjeno je 37 pododjela. Potrebno je smanjiti nepotreban broj ulazaka kao i kretanje u čistim prostorima. Poznato je da nije moguće jasno razlikovati pozadinsku kontaminaciju česticama nastalu uslijed unosa bioloških uzoraka, potrošnog materijala, kemikalija u odnosu na onečišćenje kojem doprinose samo osoblje. Ljudski mikrobiom je agregat mikroorganizama koje se nalaze na površini i u dubokim slojevima kože, u slini i usnoj sluznici, u konjuktivi i u gastrointestinalnom traktu kod zdravih i bolesnih osoba. Više je razloga za varijacije bakterija u odnosu na anatomske dijelove a odnose se na fizikalno-kemijska svojstva kože. To posebno vrijedi za temperaturu, pH, količine masnoće i vlage.

Voditelj kontrole kvalitete odgovoran je za nadzor pristiglih mikrobioloških rezultata, izradu plana, učestalost uzorkovanja i interpretaciju rezultata te njihov utjecaj na staničnu i tkivnu terapiju. Osoblje koje nadzire mikrobiološke rezultate mora imati temeljna znanja iz mikrobiologije kako bi adekvatno protumačili rezultate i procijenili utjecaj istih na tkiva i stanice.

Uočeni su manji rizični faktori koji su mogli utjecati na mikrobiologiju čistih prostora. Za sve rizike napravljena su analize, rizici su svrstani u kategorije te su poduzete korektivne i/ili preventivne mjere. Najbitnije je istaknuti da se stanice, tkiva i mediji tijekom rutinskog rada i obrade ne izlažu okolini klase B, C ili D nego ostaju isključivo zatvorene u prostoru mikrobiološkog kabineta (klasa A) gdje su uvijek rezultati bili 100% sterilni. Relativni rizik od

razvijanja kontaminacije u MSC sveden je na najmanju moguću mjeru a uz redovitu validaciju od strane ovlaštenog serviseru, učestalo čišćenje i uzorkovanje nije zabilježena kontaminacija.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Mikrobiološkom kontrolom utvrđeno je da su često detektirani mikroorganizmi u čistim prostorima bakterije *CoNS*, *Micrococcus spp* i *Bacillus spp*. Najčešća bakterija u Laboratoriju za tkivno inženjerstvo je *CoNS* koja spada u manje patogene stafilokoke. Normalan je dio fiziološke flore kože, te u pravilu ne uzrokuje infekcije kod čovjeka.
2. Navedeni mikroorganizmi učestalo se pojavljuju kroz sve klase čistih prostora što rezultati potvrđuju, te se zbog toga zaključuje da je glavni izvor kontaminacije usko povezan s laboratorijskim djelatnicima.
3. Kako bi se smanjio izvor kontaminacije povezan s laboratorijskim djelatnicima, definiran je maksimalan broj djelatnika koji smije biti prisutan istovremeno u laboratoriju. Kod pripreme hranjivog medija ili čišćenja opreme dovoljna je jedna osoba. Za aseptičan rad sa stanicama potrebne su dvije sobe, dok se kod obrade tkiva dozvoljava ulazak do tri osobe.
4. Rezultati uzorkovanja tkiva i stanica su 100% sterilni što je u skladu sa zahtjevima i međunarodnim standardima.
5. Nakon provedenog istraživanja detaljnom analizom uvedeno je smanjenje broja točaka uzorkovanja na način da su isključene točke na kojima nije zabilježen mikrobiološki porast tijekom 2019. i 2020. godine. Također je uveden veći broj uzorkovanja površina povezanih s obradom tkiva/stanica ili sa unosom potrošnog materijala.
6. Aseptičnim se smatra rad u niskoj razini onečišćenja okoliša gdje je potrebno dokazati da su konačni tkivni presadci i stanice sterilni. Očekivanje nulte kontaminacije na svim mjestima uzorkovanja tijekom svakog postupka aseptične obrade tehnički je teško, a samim tim je i nerealno očekivati 100% sterilne rezultate. Stoga je niska razina onečišćenja tijekom određenog vremenskog razdoblja očekivana pretpostavka i treba je prihvatiti kao takvu, posebno u situacijama u kojima je prisutno osoblje BTS.

## 7. LITERATURA

Branski Ludwik K., Herndon David N., Celis Mario M., Norbury William B., Masters Oscar E., Jeschke Marc G., 2008. Amnion in the treatment of pediatric partial-thickness facial burns. *Burns*, 34(3), pp.393–399.

Caselli-Fernández, L.M., Terkola, R., 2006. Clean room environment, personnel, quality assurance and their monitoring. *European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice*, 12, pp.29-34.

Carlberg, D.M., 2004. *Cleanroom Microbiology for the Non-microbiologist*. CRC Press.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), p.881.

European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM), 2019. The Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. Fourth edition.

Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, J. G., Thoen, C. O., 2004. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley

O'Connor, N., Mulliken, J., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O., Green H., 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, 1(8211), pp.75-8.

Resnik, M., Kerč, J., 2010. Microbiological quality of pharmaceutical products. *Farmaceutski Vestnik*. 61, pp.23-29.

Sandle, T., 2014. People in Cleanrooms: Understanding and Monitoring the Personnel Factor. *Hand*, 10, pp.100-100.

Sandle, T., 2015. *Pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control*. Woodhead Publishing.



Sutton, S., 2010. The environmental monitoring program in a GMP environment. *Journal of GXP Compliance*, 14(3), pp.22-30.

Tršan, M., Seme, K., Srčić, S., 2019. The environmental monitoring in hospital pharmacy cleanroom and microbiota catalogue preparation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(4), pp.455-462.

Tršan, M., Srčić, S., 2016. The implementation of the automatic test system for pyrogenicity testing in hospital parenteral production. University of Ljubljana, 67, pp.25-37.

Tršan, M., Pečar, S., 2010. Dobra proizvodna praksa sterilnih izdelkov v bolnišnični lekarni s poudarkom na testiranju bakterijskih endotoksinov.

Türkyilmaz, S., Kaya, O., 2006. Determination of some virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 30, pp.127-132.

USP, 2012. USP Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments. USP 35 (1), pp. 697-707

Vraneš, J., Leskovar, V., 2009. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Medicinski glasnik*, 6(2), pp.147-165.

Whyte, W., 2001. *Cleanroom technology: Fundamentals of Design, Testing and Operation*. Wiley

Internetski izvori:

[https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4\\_es](https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_es), pristupljeno 20.07.2021.

<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj/hrv>, pristupljeno 20.07.2021

[https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017\\_02\\_12\\_306.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2017_02_12_306.html), pristupljeno 19.07.2021.

<http://produzizivot.com/difteroidni-bacili-difteroidi/>, pristupljeno 20.04.2021.

Izvori slika:

Slika 1: <https://www.kcprofessional.com/en-us/workplace-insights/health-and-safety/reusable-cleanroom-apparel-contamination-risks>, pristupljeno 22.06.2021.

Slika 2: <https://www.explainthatstuff.com/hepafilters.html>, pristupljeno 24.06.2021.

Slika 3: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/RCS-High-Flow-Touch,MM\\_NF-C147856?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/RCS-High-Flow-Touch,MM_NF-C147856?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1), pristupljeno 20.05.2021.

Slika 4 : <https://www.laboratoire.com/fournisseur/kimberly.php>, pristupljeno 30.03.2021.

Izvori tablica:

Tablica 1: <https://www.portafab.com/what-is-a-cleanroom.html>

Tablica 2: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/2430/cleanroom-standards/>

Tablica 3: <https://www.generalfilter.com/en/norms/en-1822/>

## **ŽIVOTOPIS**

Moje ime je Lucija Pecko. Rođena sam 02.09.1995. godine u Zagrebu. Odrasla sam u Ivanić Gradu gdje sam završila osnovnu školu. Srednjoškolsko obrazovanje nastavila sam u XVI. gimnaziji Zagreb. Nakon završene srednje škole upisala sam Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek. Tijekom studiranja sudjelovala sam u brojnim edukativno istraživačkim djelatnostima u sklopu Udruge studenata biologije „BIUS“. Zahvalna sam i na sudjelovanju u provedbi i organizaciji znanstveno popularne manifestacije „Noć biologije“. Također, sudjelovanjem na projektima u sklopu laboratorijske studentske prakse stekla sam iskustvo rada u laboratoriju. Cjelokupno studiranje na Prirodoslovno matematičkom fakultetu opisala bih kao neprocjenjivo iskustvo koje bih poželjela svakom budućem studentu.