



## STERILIZACIJA

- ♦ uništavanje ili uklanjanje vegetativnih i sporogenih m.o.
- ♦ injekcije, infuzije, pripravci za oči i kožu → posude za izradu i spremnici
- ♦ oznaka sterilno: ispitano prisustvo m.o.  
inače: navod metode sterilizacije
- ♦ 1860. Pasteur: suhi vrući zrak  
1880. Koch: zasićena vodena para

## OSIGURANJE KVALITETE U POSTUPKU STERILIZACIJE

- ♦ Izbor sirovina niske zagađenosti
- ♦ Obrazovanost osoblja
- ♦ Kontrolirani i praćeni uvjeti postupaka
- ♦ Izbor najprihvatljivije vrste sterilizacije
- ♦ Poznavanje tipa rezistencije, kontaminacije te rizika za postizanje sterilnosti
- ♦ Selektivnost metode sterilizacije
- ♦ Odgovarajuća in procesna kontrola, te završni test sterilnosti
- ♦ Odgovarajuće uskladištenje pripravaka

## IZVORI KONTAMINACIJE MIKROORGANIZMIMA

- ♦ Sirovine
  - biljnog podrijetla: saprofitske bakterije, gljivice, plijesni
  - životinjskog podrijetla: patogene bakterije
  - pročišćena voda (demineralizirana ili destilirana)
- ♦ Zrak:
  - proizvođač čovjek (govor, koža → oskudna osobna higijena, otvorene rane: stafilokoki, streptokoki, enterobakterije, salmonele, gljivice)

## POSLJEDICE

- ♦ nije pokvareno i ne šteti bolesniku (spore plijesni Mucor)
- ♦ nezamjetljivo kvarenje ali ozbiljni zdravstveni problemi (Salmonelle)
- ♦ bakterije i plijesni → pirogeni i mikotoksini

## ODABIR METODE STERILIZACIJE

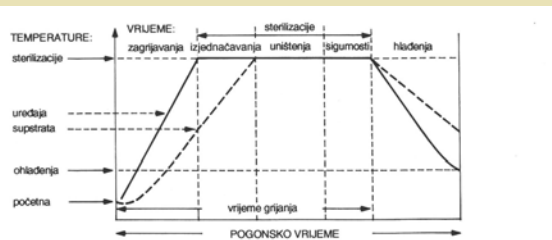
- ♦ Odabir: najprihvatljiviji rizik neuspješne sterilnosti i najviše dopustiva oštećenja materijala (temperatura, reaktivnost)
- ♦ Vrsta priprava (volumen, sastav)
- ♦ Mogućnost oštećenja (toplina, radijacija, korozivnost – oksidacijska sredstva)
- ♦ Toksičnost/sigurnost (etilenoksid, formaldehid, radijacija)

- ♦ Postupci
  - fizički: toplinski, mehanički, zračenje
  - kemijski: etilenoksid i dr.

## TOPLINSKA STERILIZACIJA

- ♦ plamen, suhi vrući zrak (denaturacija) vodena para uz povišeni tlak (koagulacija)
- ♦ činitelji: toplina, trajanje; starost, količina i toplinska rezistencija m.o., pH, kemijske tvari
- ♦ ukupno vrijeme toplinske sterilizacije: zagrijavanje, izjednačavanje (vrsta, pojedinačni volumen, količina i raspodjela materijala), uništavanje, sigurnost, hlađenje

## DIJAGRAM STERILIZACIJE



Sl. 3. Vremena toplinske sterilizacije i temperaturno-vremenski dijagram postupka

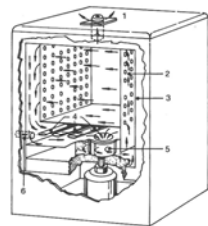
## SUHI VRUĆI ZRAK

- ♦ Više temperature, dulja izloženost
- ♦ Temperature 140, 160 i 180 °C
- ♦ Transfer topline spor
  - Dugotrajan proces – spora penetracija zraka
  - mali volumeni ulja, i tanki slojevi prašaka koji se steriliziraju
- ♦ Provedba sterilizacije u sterilizatorima (sušionici, termostati, sa ili bez ugrađenih ventilatora koji omogućuju mehaničku konvekciju zraka)
- ♦ Koagulacija proteina u stanici mikroorganizma

## STERILIZACIJA SUHIM VRUĆIM ZRAKOM

- ♦ staklo, porculan, metal, masnoće, termostabilni prašci; sterilizatori: 2 sata  $160 \pm 5^\circ\text{C}$  ili 3 sata  $140 \pm 5^\circ\text{C}$

- 1 - odušak
- 2 - stijene s propustima za zrak
- 3 - termoizolacija
- 4 - grijači
- 5 - turboventilator
- 6 - regulator dovoda zraka



Sl. 4. Sterilizator s mehaničkom konvekcijom vrućeg zraka

## STERILIZACIJA ZASIĆENOM VODENOM PAROM

- ♦ Metoda izbora ako sustav odgovara
- ♦ Prisustvo vlage razara mikroorganizme pri nižim temperaturama u odnosu na suhi vrući zrak

### Prednosti

- ♦ Brzo, jeftino efektivno
- ♦ Mogućnost sterilizacije većih volumena

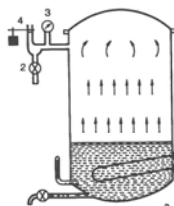
### Nedostaci

- ♦ Ne mogu se sterilizirati ulja i masti te na vlagu osjetljivi pripravci

## STERILIZACIJA ZASIĆENOM VODENOM PAROM

- ♦ staklo, porculan, metal, tekstil, guma, termostabilne otopine;
- ♦ autoklavi (termometar, manometar, sig. ventil, ventil za zrak, grijač) 20 min.  $120 \pm 1^\circ\text{C} \sim 100 \text{ kPa}$  ili 20 min.  $135 \pm 1^\circ\text{C} \sim 200 \text{ kPa}$

- b
- 1 - termometar
  - 2 - ventil za zrak
  - 3 - manometar
  - 4 - sigurnosni ventil
  - 5 - električni grijač
  - 6 - pokazivač razine vode
- a
- 1 - perforirana ploča



Sl. 5. Shematski prikaz autoklava s jednostrukim (a) i dvostrukim stijenkama (b)

## STERILIZACIJA BAKTERIOLOŠKOM FILTRACIJOM

- ♦ Fizičko uklanjanje mikroorganizama adsorpcijom na filteru
- ♦ Filtriraju se termolabilne otopine
- ♦ Pozitivni ili negativni tlak ubrzava filtraciju
- ♦ Otopine niskih viskoznosti prikladnije

## BAKTERIOLOŠKA STERILIZACIJA

- ♦ Sustavi:
  - Sinter (Jena, Pyrex) G5  $1,7 \mu\text{m}$ , staklo;
  - eks-slojnice  $0,8-1,4 \mu\text{m}$ , celuloza
  - svijeće (Berkefeld, Chamberland)  $3,6-4 \mu\text{m}$ , keramika, porculan
  - membranski (Millipore, Sartorius)  $0,3 \mu\text{m}$ , nitroceluloza, poliamidi, politetrafluoretilen;

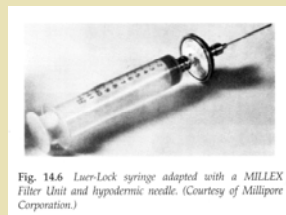
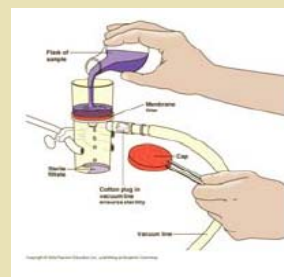


Fig. 14.6 Lucr-Lock syringe adapted with a MILLEX Filter Unit and hypodermic needle. (Courtesy of Millipore Corporation.)

## RADIOSTERILIZACIJA – STERILIZACIJA ZRAČENJEM

- ♦ Ionizacija  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  zrake
- ♦ UV lampa
- ♦ Termolabilni radiostabilni prašci
- ♦ Potreba visokospecijalizirane opreme
- ♦ Utjecaj radijacije na produkt i ambalažu

### ♦ Ozračivanje:

- $\alpha$ -zrake
  - $\beta$ -zrake (korpuskularne)
  - $\gamma$ -zrake (elektro-magnetske)
  - doza 25 kGy (Gray =  $\text{J kg}^{-1}$ ) = autoklaviranje
  - termolabilni radiostabilni prašci, masti, tekstil, plastici, droge
- ♦ UV-zrake (240-280 nm), energija: 100, odnosno 300-500  $\text{Jm}^{-2}$ , zrak, glatke površine

## STERILIZACIJA PLINOVIMA

- ♦ Kemijska sterilizacija najčešće etilenoksid
- ♦ Steriliziraju se termolabilni prašci, droge, plastici (spremnici, šprice, uređaji za hemodijalizu, membranski filtri) polimeri
- ♦ Nije prikladan za otopine
- ♦ Eksplozivnost, toksičnost, trajanje postupka
  - etilenoksid –  $\text{CO}_2$ ,

## ETILENOKSID

- ♦ prodornost, rasprostiranje, uklanjanje
- ♦ ljekovite supstancije? → alkiliranje
- ♦ Činitelji:
  - koncentracija plina (800-1200 mg/l)
  - temperatura (30-60°C)
  - tlak (do 700 kPa)
  - vlaga (35-50%)

## FORMALDEHID

- ♦ Učinkovitiji od etilenoksida ali slabije prodire i teže se uklanja
- ♦ 37%-tna otopina u vodi (formalin) + 10% metanola za sprečavanje polimerizacije (< 80°C paraformaldehid - bijela krutina)

## β-PROPIOLAKTON

- ♦ Aktivniji od formaldehida, ne polimerizira ali slabije prodire
- ♦ ne razrjeđuje se s vodom jer hidrolizira u nedjelatnu β-hidroksi-propilensku kiselinu

## PROPILENOKSID

- ♦ Tekućina koja isparava na 34°C,
- ♦ 2,1-21,5% plina u zraku zapaljivo (miješanje s CO<sub>2</sub>) → manje aktivan i teže prodire od etilenoksida
- ♦ s vodom daje propilenglikol → aerosoli

## Dezinficijensi

- ♦ Lister 1867
- ♦ Dezinfekcija – proces koji reducira (mnoge ili sve) patogene mikroorganizme na neživom objektu – izuzev bakterijskih spora
  - Koristi tekućine:
    - alkohol
    - spojevi klora (natrijev hipoklorid 5-6%)
    - glutaraldehid
    - hidrogen peroksid
    - otopine joda
    - peroctena kiselina
    - kvarterni amonijevi spojevi
    - fenol - izrazito toksičan (0,5 g), kaustičan (opekotine), otopine u vodi uz dodatak sapuna

### Antiseptici

- ♦ reduciraju patogene bakterije sa živog materijala
- ♦ kvarterni amonijski spojevi - aseptička obrada kirurških instrumenata, gumenih predmeta, rublja, kože, rana

### ASEPTIČKI POSTUPAK

- ♦ Izvor kontaminacije
  - Zrak
  - Disanje
  - Koža
  - Kosa
  - Odjeća
  - Radna površina

### ASEPTIČKI RAD

- ♦ Pripravci termolabilnih, kemijski i radijacijski razgradivih supstancija
- ♦ hermetički zatvoreni ormarići (vrata, otvori za ruke, UV-svjetiljka)

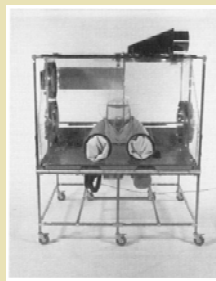
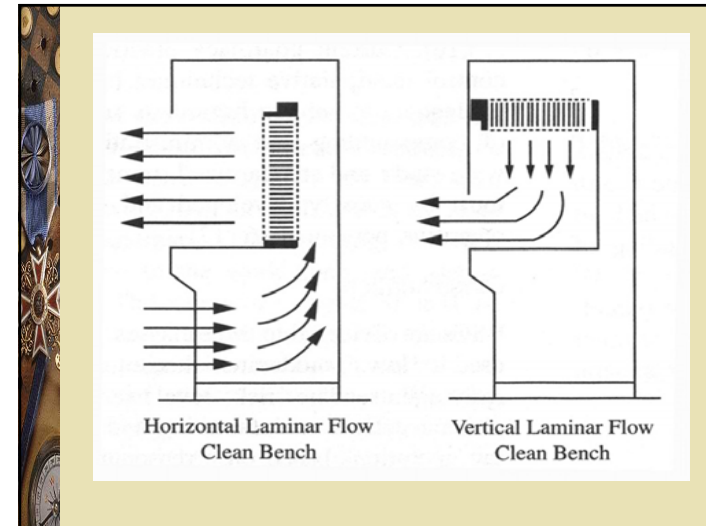
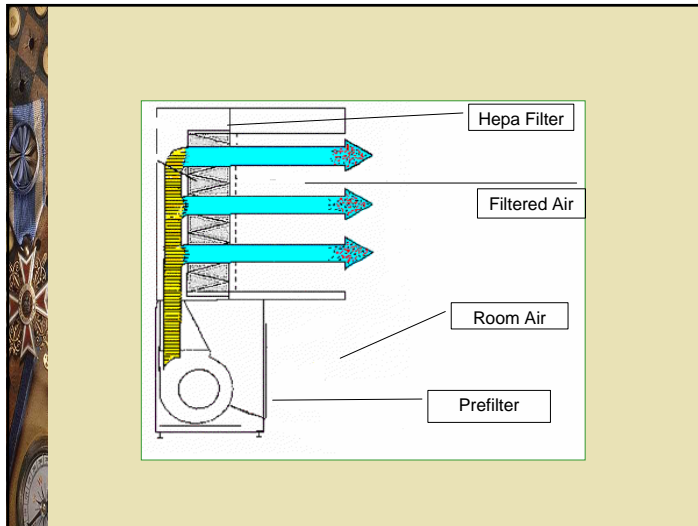


Figure 41-10. One configuration of an isolator (biosafety cabinet).

### ASEPTIČKI RAD

- ♦ Laminar flow uređaji (sterilna radna zona → filtrirani zrak: predfilter + High Efficiency Particulate Air = HEPA)
- ♦ filtri: HEPA (High Efficiency Particulate Air) - 99,9% čestica > 0,5  $\mu\text{m}$ ;
- ♦ Filter reducira broj čestica > 5  $\mu\text{m}$  na 3500 (1000  $\times$ ), a broj mikroorganizama na 3-5 (10  $\times$ )



## ISPITIVANJE STERILNOSTI

- ◆ U sterilnom prostoru (laminar flow)
- ◆ Metode
  - Membranska filtracija
  - Direktna inokulacija u kulturu
- ◆ Membranska filtracija
  - Pripadljiva za vodene, alkoholne i uljne pripravke koji se mogu filtrirati (promjer pora 0,45  $\mu\text{m}$ )
  - Postupak:
    - Sterilizacija sustava za filtraciju i membranskog filtra
    - Filtracija otopina u aseptičkim uvjetima
    - Nanošenje membranskog filtra na kulturu (aseptički uvjeti)

- ◆ Direktna inokulacija u kulturu
  - Odgovarajuća količina pripravka nanosi se na kulturu
  - Volumen pripravka < 10% volumena medija
  - Vodene otopine, ulja, masti, kreme



## KONTROLA STERILIZACIJE

↔ provjera čimbenika inaktivacije:

- ♦ metode:
  - fizičke
  - kemijske
  - biološke

## FIZIČKA MJERENJA

- ♦ Provjera temperature (baždarenje termometra, termočlanci krom/aluminij)
- ♦ provjera tlaka, stupnja zasićenosti pare
- ♦ izračunavanje najveće veličine pora

## KEMIJSKA MJERENJA

- ♦ indikatori (promjena boje reakcijske smjese)
  - Tip 1 (crna mrlja) > 126°C i vlaga
  - Tip 2 (žuta mrlja) > 130°C, vlaga i vakuum
  - Tip 3 (zelena mrlja) 160°C
  - Tip 4 (plava mrlja) 180°C

## KEMIJSKA MJERENJA

- ♦ Kristali s određenim talištem (trake s 2,4-dinitrofenil-hidrazonom)
- ♦ Magnezij-klorid, kloridna kiselina, brom-fenol plavilo → etilenklor-hidrin (žuto u crveno)
- ♦ Kemijski dozimetri: promjena optičke gustoće (kvant.), promjena boje supstancije (kval.)

## BIOLOŠKA MJERENJA

- ♦ **Indikatori (mikroorganizmi otporni na sredstvo sterilizacije, genetski stabilni, nepatogeni. Npr.**
  - *B. coagulans* (autoklaviranje)
  - *B. subtilis* (suhi vrući zrak)
  - *B. pumilis* (ozračivanje)
  - *B. subtilis* (etilenoksid)
  - Naneseno > 10<sup>5</sup> spora na trake alufolije
- ♦ **staklo, nerđajući čelik, pijesak**

## TESTOVI STERILNOSTI

- ♦ **Mikroorganizmi – USP XXII preporuča biološke indikatore**
  - tekući pripravci - dodati direktno na pripravak
  - kruti pripravci ili ambalaža – dodati kulturu na traci ili filter papiru
- ♦ **Markeri mikroorganizama koji su rezistentni na pojedinu metodu sterilizacije**

<b>Metoda sterilizacije</b>	<b>Marker</b>
-----------------------------	---------------

Zasićena vodena para	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Suhi vrući zrak	<i>Bacillus subtilis</i>
Etilenoksid	<i>Bacillus subtilis</i>
Zračenje	<i>Bacillus pumilus</i>

## TEST PIROGENE AKTIVNOSTI

- ♦ **Pirogeni – organske supstancije, lipopolisaharidi staničnih membrana bakterija**
  - endotoksini (endogeni, egzogeni)
  - egzogeni endotoksini – kompleks pirogenog lipopolisaharida
    - Lipidni dio lipopolisaharida odgovoran za pirogenu reakciju,
    - Polisaharidni dio lipopolisaharida povećava topljivost
- ♦ **Izvor pirogene kontaminacije**
  - Otapalo
  - Lijek
  - Uređaji
  - Čuvanje prije sterilizacije

♦ **Test na kunićima**

- Praćenje temperature 1, 2 i 3 sata, tri kunića, 10 ml/kg pripravka, promjena ne > 0,6 °C prema kontroli (suma 3 rezultata ne > 1,4 °C)
- Ako je suma > od 1,4 °C, ispitati još 5 kunića
- Ako kod svih 8 kunića nije temperatura promijenjena za > 3,7 °C, test je negativan

**Test na pirogene – kunići (1942. g. USP XII), Ph. Eur**



**Test na bakterijske endotoksine – Ph. Eur**

**LAL TEST**

- ♦ **Lymulus Aemobocyte Lysate**
- ♦ **Ekstrakt krvnih stanica Lymulus Polyphenus – sadrži enzim i protein koji koaguliraju s malim količinama lipopolisaharida**

**Limulus polyphemus**



- ♦ **Detektirati i kvantificirati endotoksine gram negativnih bakterija (LAL test)**
  - Enzimatska koagulacija = gel, reakcija monocita (enzimi) sa endotoksinima
  - Potrebna standardizacija reagensa (aktivnost varira)
- ♦ **LAL test prihvatljiviji od ispitivanja pirogena**
  - Jeftiniji, brži, točniji
  - Odvija se u laboratoriju
  - Specifičan za endotoksine gram negativnih bakterija

- ♦ **Prihvatljiv za:**
  - **Radiofarmaka i citotoksične supstancije**
  - **Pripravke sa značajnom farmakološkom i toksikološkom aktivnosti (npr. inzulin)**
  - **Krvne produkte**
  - **Voda za injekcije (točniji i brži)**

### LAL TEST

- ♦ **Ekvivalentni volumeni reagensa i test otopine (0,1 ml) miješaju se u apirogenoj epruveti**
- ♦ **Inkubacija 37°C 1 sat**
- ♦ **Očitavanje rezultata**
  - **Različite metode određivanja krajnje točke (različite točnosti i preciznosti)**
    - Geliranje lizata u prisustvu endotoksina
    - Zamućenje lizata, turbidimetrijsko određivanje – fotometrija
    - Kromogeno, razvoj boje – fotometrija
    - Odsustvo bakterijskih endotoksina ukazuje na odsustvo pirogenih supstancija

### PRIPRAVCI KOJI SE STERILIZIRAJU

- ♦ **Injekcije, infuzijski pripravci – parenteralni pripravci**
- ♦ **Otopine različitih namjena, npr. otopine za peritonealnu dijalizu, hemodijalizu, otopine za inhalacije, za urološka ispiranja**
- ♦ **Oftalmički pripravci**
- ♦ **Implantati**
- ♦ **Zavoji**
- ♦ **Instrumenti (kirurški)**
- ♦ **Ambalaža za sterilne pripravke**

MIKROBIOLOŠKI ZAHTJEVI FARMACEUTSKIH OBLIKA (Ph.Eur.)		
Oblik	Kvantitativni zahtjev	Odsustvo
Topički i nesterilni inhalacijski	< 10 <sup>2</sup> aerobnih bakterija i gljivica/g ili ml < 10 <sup>1</sup> enterobakterija i gramnegativnih/g ili ml	Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus
Oralni i rektalni	< 10 <sup>3</sup> aerobnih bakterija/g ili ml < 10 <sup>2</sup> gljivica/g ili ml	Escherichia coli
Oralni sa komponentama prirodnog porijekla	< 10 <sup>4</sup> aerobnih bakterija i gljivica/g ili ml < 10 <sup>2</sup> enterobakterija i gramnegativnih/g ili ml	Salmonella Escherichia coli Staphylococcus aureus
Biljni koji se prerađuju kuhanjem	< 10 <sup>7</sup> aerobnih bakterija i gljivica/g ili ml < 10 <sup>2</sup> Escherichia coli/g ili ml	
Biljni	< 10 <sup>5</sup> aerobnih bakterija i gljivica/g ili ml < 10 <sup>3</sup> enterobakterija i gramnegativnih/g ili ml	Escherichia coli Salmonella