

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA BANKO

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA BANKO

**VREDNOTENJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI POGOJEV PRIPRAVE
ZDRAVIL ZA PARENTERALNO APLIKACIJO NA KLINIČNEM ODDELKU ZA
REVMATOLOGIJO INTERNE KLINIKE UNIVERZITETNEGA KLINIČNEGA
CENTRA LJUBLJANA**

**MICROBIOLOGICAL QUALITY EVALUATION OF CONDITIONS FOR
PARENTERAL MEDICATION PREPARATION AT THE DEPARTMENT OF
RHEUMATOLOGY OF THE UNIVERSITY MEDICAL CENTRE LJUBLJANA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za socialno farmacijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Igorja Locatellija, mag. farm. ter na Kliničnem oddelku za revmatologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod somentorstvom asist. dr. Andreje Čufar, mag.farm., spec. Mikrobiološke analize in druga merjenja so bila opravljena na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Igorju Locatelliju ter somentorici asist. dr. Andreji Čufar za pomoč in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge ter dosegljivost skozi celoten čas izdelave magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi farmacevtom iz lekarne v Bolnišnici dr. Petra Držaja, še posebej Tomislavu Laptošu za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela naloge. Za uvajanje in strokovne nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela se zahvaljujem tudi farmacevtom iz Centralne lekarne UKC Ljubljana, še posebej Simoni Mitrovič, Mateju Vehovcu, Tanji Torkar in Mateji Tršan. Zahvaljujem se tudi svoji družini in prijateljem za podporo in nasvete tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Igorja Locatellija, mag. farm. in somentorice asist. dr. Andreje Čufar, mag. farm., spec.

Eva Banko

Magistrska komisija

Predsednica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Mentor: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

Somentorica: asist. dr. Andreja Čufar, mag. farm., spec.

Član: doc. dr. Stane Pajk, mag. farm.

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	V
POVZETEK	VIII
ABSTRACT	IX
1. UVOD.....	1
1.1. Predstavitev Kliničnega oddelka za revmatologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana	1
1.2. Priprava zdravil za parenteralno aplikacijo	2
1.3. Čisti prostori	3
1.3.1. Klasifikacija čistih prostorov glede na GMP.....	5
1.3.2. Program nadzora okolja, v katerem poteka priprava zdravil v skladu s GMP	6
1.3.3. Komore z laminarnim pretokom zraka in biološko varne komore.....	7
1.4. Bolnišnične okužbe	9
1.4.1. Povzročitelji bolnišničnih okužb	10
1.4.2. Preprečevanje bolnišničnih okužb	12
1.4.2.1. Razkuževanje površin.....	13
1.4.2.2. Higiena rok in uporaba rokavic	13
2. NAČRT ZA DELO.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. Opis okolja, v katerem poteka priprava parenteralnih pripravkov	17
3.2. Priprava na delo	18
3.3. Mesta odvzemov vzorcev	19
3.4. Nadzor mikrobiološke kakovosti delovnih površin, površin vsebnikov in rokavic osebja z jemanjem mokrih brisov	23
3.5. Nadzor mikrobiološke kakovosti zraka	24
3.5.1. Sedimentacijska metoda	25
3.5.2. Volumetrična metoda	25
3.6. Statistična obdelava rezultatov	28
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti sterilnih rokavic.....	29

4.1.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih z rokavic osebe, ki pripravlja zdravila v biološko varni komori	29
4.1.2. Vrednotenje vpliva papirnate embalaže na mikrobiološko kakovost rokavic ...	31
4.1.3. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih z rokavic osebe, ki asistira pripravljavcu zdravil	33
4.2. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti delovnih površin.....	34
4.2.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih z različnih odsekov delovnih površin po delu	34
4.2.2. Primerjava rezultatov nadzora mikrobiološke kakovosti vzorcev, odvzetih s sredine BVK pred in po delu	35
4.3. Preučevanje povezave med mikrobiološko kakovostjo vzorcev, odvzetih z rokavic pripravljavca zdravil in delovnih površin.....	36
4.4. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih s površin vsebnikov	37
4.4.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti signatur, prebodnih gum vsebnikov ter prebodnih delov mini-spikov.....	37
4.4.2. Preučevanje medsebojnega vpliva kontaminacije rokavic osebe, ki rokuje z vsebniki in kontaminacije površin vsebnikov	39
4.4.3. Primerjava mikrobioloških kakovosti površin vsebnikov, s katerimi rokujejo na KO za revmatologijo in na KOAIT	40
4.5. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti zraka	41
4.5.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti zraka v biološko varni komori.....	41
4.5.2. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranem predprostoru, v katerem se nahaja biološko varna komora.....	42
4.5.3. Primerjava rezultatov nadzora mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranem prostoru, kjer stoji biološko varna komora in zraka v komori	43
4.5.4. Preučevanje vpliva tekstilne pregrade na kakovost zraka v različnih delih predprostora	44
4.5.5. Primerjava mikrobiološke kakovosti zraka v prostoru priprave zdravil na KO za revmatologijo in na KOAIT	45
4.5.6. Primerjava mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranih prostorih na KO za revmatologijo in na KOAIT	45
4.6. Pojavnost bakterij in gliv v vzorcih.....	47
4.6.1. Pojavnost bakterijskih vrst na brisih površin.....	47

4.6.2. Pojavnost bakterijskih vrst v vzorcih zraka	48
4.6.3. Pojavnost vrst gliv v vzorcih zraka.....	49
4.7. Ustreznost metode dezinfekcije.....	49
5. SKLEP	51
6. LITERATURA	54
7. PRILOGE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz gibanja zraka v biološko varni komori tipa II	8
Slika 2: Pravilno umivanje rok in kritična mesta na rokah.....	14
Slika 3: Pravilno nadenje sterilnih rokavic.....	15
Slika 4: Shematski prikaz postavitve opreme v prostoru, v katerem poteka priprava zdravil	17
Slika 5: Shematski prikaz izpostavitve agarja	25
Slika 6: Prikaz sestave vzorčevalnika SAS Super ISO 180	26
Slika 7: Mesta odvzemov brisov na vsebnikih in mini-spikih.....	38
Slika 8: Pojavnost posameznih bakterijskih vrst v pozitivnih vzorcih.....	47
Slika 9: Pojavnost bakterijskih rodov v vzorcih zraka	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Primerjava klasifikacije čistih prostorov med ISO >209< standardom, US Federal standardom 209 in British standardom 5295.....	3
Preglednica II: Razredi čistih prostorov glede na ISO 14644 - 1.....	3
Preglednica III: Klasifikacija čistih prostorov glede na GMP.....	5
Preglednica IV: Priporočena maksimalna koncentracija viabilnih mikroorganizmov v čistih prostorih glede na način/mesto odvzema vzorcev v skladu z GMP	5
Preglednica V: Mesta odvzemov vzorcev pri prvem vzorčenju.....	20
Preglednica VI: Standardna mesta odvzemov vzorcev (vzorčenja 2 – 13).....	21
Preglednica VII: Mesta odvzemov vzorcev pri zadnjem vzorčenju.....	22
Preglednica VIII: Sestava krvnega agarja	26
Preglednica IX: Sestava agarja SABORAUD	27
Preglednica X: Sestava in priprava agarja DG18	27
Preglednica XI: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti rokavic pripravljavca zdravil	30
Preglednica XII: Vpliv papirnate embalaže na mikrobiološko kontaminacijo rokavic.....	32
Preglednica XIII: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kontaminacije rokavic osebe, ki asistira pripravljavcu zdravil	33
Preglednica XIV: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti posazmeznih odsekov delovne površine znotraj biološko varne komore.....	34
Preglednica XV: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti sredine biološko varne komore pred in po delu.....	35
Preglednica XVI: Primerjava frekvenc kontaminiranih vzorcev, odvzetih z rokavic pripravljavca zdravil in delovnih površin v biološko varni komori	37
Preglednica XVII: Rezultati testiranja mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov in spikov	39
Preglednica XVIII: Primerjava rezultatov testiranja mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov in rokavic.....	39
Preglednica XIX: Primerjava mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov na KO za revmatologijo in KOAIT	40
Preglednica XX: Rezultati mikrobiološkega nadzora zraka predprostora, v katerem stoji biološko varna komora, s sedimentacijsko in volumetrično metodo.....	42

Preglednica XXI: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti zraka dela nekvalificiranega prostora, v katerem stoji biološko varna komora ter zraka v komori	43
Preglednica XXII: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti zraka celotnega nekvalificiranega prostora, v katerem stoji biološko varna komora ter zraka v komori	43
Preglednica XXIII: Primerjava rezultatov vrednotenja mikrobiološke kakovosti zraka v delih predprostora, ki se nahajata na različnih straneh tekstilne pregrade	44
Preglednica XXIV: Primerjava mikrobiološke kakovosti zraka v prostoru priprave zdravil na KO za revmatologijo in na KOAIT	45
Preglednica XXV: Primerjava mikrobiološkega nadzora zraka v nekvalificiranem prostoru na KO za revmatologijo in na KOAIT	46
Preglednica 1: Lastnosti izoliranih bakterijskih vrst rodu <i>Staphylococcus</i>	61
Preglednica 2: Lastnosti izoliranih bakterijskih vrst rodu <i>Bacillus</i>	62
Preglednica 3: Lastnosti izoliranih bakterijskih vrst rodu <i>Acinetobacter</i>	64

POVZETEK

Na Kliničnem oddelku za revmatologijo Interne klinike UKC Ljubljana se zdravijo bolniki z najtežjimi oblikami revmatoloških obolenj, ki prihajajo iz vse Slovenije. Ti bolniki večinoma prejemajo biološka zdravila, ki povzročijo supresijo imunskega sistema, nekateri pa tudi citostatike, ki jih pripravljajo na oddelku. Ti bolniki so bolj dovzetni za okužbe, zaradi česar je pravilna aseptična tehnika priprave parenteralnih pripravkov še toliko bolj nujna za preprečevanje nastanka bolnišničnih okužb. Priprava parenteralnih pripravkov poteka v biološko varni komori, ki stoji v nekvalificiranem prostoru na oddelku, pripravo pa izvaja farmacevtski tehnik iz lekarne pod nadzorom magistra farmacije.

Pri pripravi sterilnih izdelkov je ključna vpeljava programa nadzora okolja, katerega namen je preverjanje ustreznosti pogojev priprave zdravil. Namen naloge je z mikrobiološkega vidika ovrednotiti pogoje priprave zdravil na KO za revmatologijo in jih primerjati s pogoji priprave zdravil na oddelku brez biološko varne komore, kjer aseptična priprava poteka v bolniških sobah na oddelkih. Program nadzora okolja smo izvedli v skladu z navodili SOP UKCL za kontrolo snažnosti površin. Za nadzor mikrobiološke kakovosti delovnih površin, površin vsebnikov ter rokavic smo uporabili brise, nadzor mikrobiološke kakovosti zraka pa smo izvedli z dvema metodama, pasivno in aktivno.

Kljub aseptični pripravi zdravil v BV komori, dezinfekciji površin in ustrezni zaščitni opreми osebja, je na KO za revmatologijo relativno visok delež kontaminiranih rokavic oseb, ki prihajajo v stik s pripravo zdravil in delovnih površin. Ugotovili smo, da postavitve BV komore na oddelku pomembno vpliva na mikrobiološko kakovost zraka. Do statistično pomembnih razlik glede mikrobiološke kontaminacije zraka prihaja že pri primerjavi rezultatov vzorcev, odvzetih v nekvalificiranem, ločenem prostoru na oddelku, kjer poteka priprava zdravil na KO za revmatologijo in v bolniških sobah, kjer poteka priprava zdravil na KO za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok. Do statistično pomembnih razlik je prišlo tudi pri primerjavi mikrobiološke kontaminacije signatur vsebnikov na obeh oddelkih, medtem ko pri primerjavi mikrobiološke kontaminacije prebodnih gum statistično pomembnih razlik ni bilo.

KLJUČNE BESEDE: nadzor mikrobiološke kakovosti, parenteralni pripravki, čisti prostori, bolnišnične okužbe

ABSTRACT

The department of rheumatology (DR) of the University medical centre Ljubljana (UKCL) treats patients with the most serious rheumatological diseases. These patients usually receive biological medicines, which cause immunosuppression or cytotoxic medicines, which expose them to a greater risk of infections. This makes the importance of sterility of these parenteral preparations even more significant. The medicines are prepared in a biosafety cabinet (BSC) placed in an unclassified room on the ward by a pharmacy technician under a pharmacist's supervision.

The establishment of an environmental monitoring programme (EMP) is vital for ensuring a continuous quality control of conditions for parenteral medication preparation. The aim of this master thesis was to evaluate the microbiological quality of the conditions in which the parenteral preparations on the DR are prepared in and to compare them with conditions on another ward without a BSC on which the medicines are prepared in patient rooms by nurses. The EMP was conducted according to standard operating procedures of UKCL and was carried out by different methods. Swabs were used for the microbiological quality surveillance of surfaces in the BSC, medicine containers and gloves. An active and a passive air sampling method were used for the microbiological quality evaluation of air samples.

The results show a relatively high contamination level of gloves and work surfaces on the rheumatology ward despite of the appropriate protective personnel attire, presence of BSC and regular surface disinfection. The results show that the presence of a BSC improves the microbiological quality of air, although it is placed in an unclean environment. Furthermore, the difference of microbiological air quality is significant even when comparing the unclean environment, intended exclusively for the preparation of medicines on the DR, to an unclean patient room in which medicines are prepared on another ward. Significant differences were also apparent when comparing the contamination of labels from medicine containers in these two wards. No significant difference was found when comparing the microbiological contamination of rubber vial stoppers.

KEY WORDS: microbiological quality control, parenteral preparations, clean rooms, nosocomial infection

SEZNAM OKRAJŠAV

<i>A. johnsonii</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>A. lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BPD	Bolnišnica dr. Petra Držaja
BV	biološko varna
BVK	biološko varna komora
CFU	kolonijsko število (angl. <i>colony forming units</i>)
CM/ResAP(2011)1	Resolucija o zahtevah za zagotavljanje kakovosti in varnosti farmacevtskih izdelkov, pripravljenih v lekarnah za posebne potrebe pacientov, ki jo je sprejel Odbor ministrov Sveta Evrope leta 2011 v Strassbourgu
ECDC	Evropski center za nadzor in preprečevanje okužb (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
EN ISO	oznaka za evropski in mednarodni standard
FDA	Uprava Združenih držav Amerike za hrano in zdravila (angl. <i>Food and drug administration</i>)
FO	Farmacevtska oblika
GMP	dobra proizvodna praksa (angl. <i>good manufacturing practice</i>)
HEPA filter	filter za filtracijo zraka v čistih prostorih (angl. <i>High - efficiency particulate arrestance</i>)
IMI	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani
ISO	oznaka Mednarodne organizacije za standardizacijo (angl. <i>International Organisation for Standardization</i>)
IZ	interval zaupanja
KO	Klinični oddelek

KOAIT	Klinični oddelek za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok
LAF	komora z laminarnim pretokom zraka (angl. Laminar air flow chamber)
MRSA	Proti meticilinu odporni sevi bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> (angl. methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
PIC/S GPP	smernice dobrih proizvodnih praks za pripravo izdelkov v zdravstvenih ustanovah (angl. <i>Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme Guide for Good Practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments</i>)
RODAC	(angl. <i>Replicate Organism Detection and Counting</i>)
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
SOP	Standardni operacijski postopek
<i>sp.</i>	Vrsta (lat. species)
<i>spp.</i>	Vrste (lat. species)
SPSS	statistični program za družbene vede (angl. Statistical Package for the Social Sciences)
UKC	Univerzitetni klinični center
UKCL	Univerzitetni klinični center Ljubljana
ULPA filter	filter za filtracijo zraka v čistih prostorih (angl. Ultra low particulate air filter)
USA FS 209	Ameriški zvezni standard številka 209 (angl. <i>US Federal Standard 209</i>)

1. UVOD

1.1. PREDSTAVITEV KLINIČNEGA ODDELKA ZA REVMATOLOGIJO INTERNE KLINIKE UNIVERZITETNEGA KLINIČNEGA CENTRA LJUBLJANA

Univerzitetni klinični center Ljubljana je največja zdravstvena ustanova v Sloveniji, ki opravlja zdravstveno dejavnost na terciarni in sekundarni, pa tudi na primarni ravni. Obsega 15 klinik, poleg njih pa tudi številne oddelke in druge službe, ki se razprostirajo po večjem območju Ljubljane. Klinični oddelek za revmatologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana se nahaja v Bolnišnici dr. Petra Držaja v Šiški. Na tem oddelku se ukvarjajo z diagnostiko in zdravljenjem najtežjih oblik revmatoloških obolenj. Dejavnost poteka na bolnišničnem oddelku, v specialistični in nujni revmatološki ambulanti, ambulantni za terapijske obravnave, enoti fizioterapije in rehabilitacije ter v laboratoriju za imunologijo revmatizma (1).

Bolnišnica dr. Petra Držaja ima svojo lekarno, ki deluje kot bolnišnična in javna lekarna ter je specializirana za izdajo zdravil bolnikom z virusom HIV in hepatitisom C. Zraven opravljanja javne lekarniške službe magister farmacije in farmacevtski tehnik s posebnimi znanji iz lekarne BPD vsak dan pripravljata zdravila za parenteralno aplikacijo na KO za revmatologijo. Zdravila, ki se pripravljajo na tem oddelku, večinoma sodijo med imunosupresive, zaradi česar so bolniki, ki jih prejemajo, še posebej dovzetni za okužbe. Ta zdravila vsebujejo zdravilne učinkovine, ki sodijo v skupino bioloških zdravil, in sicer monoklonska protitelesa tocilizumab, rituksimab, infliksimab in belimumab. Poleg teh se na oddelku pripravlja tudi zdravilo, ki vsebuje zdravilno učinkovino ciklofosamid, ki sodi v skupino alkilirajočih citostatikov. Sterilnost parenteralnih pripravkov je za preprečevanje bolnišničnih okužb teh bolnikov ključnega pomena, zato so na oddelku postavili biološko varno komoro, v kateri se ta zdravila pripravljajo. Komora stoji v nekvalificiranem prostoru na kliničnem oddelku. V ta prostor med delom vstopa tudi drugo bolnišnično osebje, v njem pa poteka tudi tiskanje, telefoniranje, delo za računalnikom, shranjevanje zdravil in ostalih materialov ter druge aktivnosti. Tak način postavitve komore predstavlja kompromis med pripravo parenteralnih pripravkov s strani medicinskih sester v bolniških sobah na oddelkih UKCL ter centralizirano aseptično pripravo zdravil v Centralni lekarni UKCL. Prednost tega načina priprave je večja prilagodljivost potrebam bolnikov, ob

sočasnem zagotavljanju še sprejemljivih pogojev priprave zdravil za parenteralno aplikacijo.

1.2. PRIPRAVA ZDRAVIL ZA PARENTERALNO APLIKACIJO

Zdravila za parenteralno aplikacijo so sterilna zdravila, namenjena za aplikacijo z injekcijo, infuzijo ali implantacijo v človeško ali živalsko telo. Priprava zdravil za parenteralno aplikacijo mora potekati z uporabo materialov in metod, ki zagotavljajo sterilnost in preprečujejo vnos kontaminantov ali rast mikroorganizmov v končnem izdelku (2).

Sterilnost zdravil mora biti zagotovljena s primernim in validiranim postopkom proizvodnje, ohranjanje pa jo moramo skozi vse stopnje priprave zdravila, do končne aplikacije. Pri proizvodnji moramo zagotoviti ustrezno izobraženo osebje, ustrezen prostor in opremo za pripravo, zmanjšati mikrobno obremenitev, zagotoviti validacijo postopkov, program nadzora ter medprocesno kontrolo (2).

Za industrijsko proizvedena zdravila proizvajalec v kratkem povzetku značilnosti zdravila navede pogoje njegove priprave. Ta lahko zajema redčenje koncentratov, rekonstitucijo praškov, dodajanje topil ali nosilnih raztopin, ali pa samo navodila za prenos zdravila iz vsebnika v brizgo. Mikrobiološka stabilnost pripravka je odvisna od pogojev priprave. Za ohranjanje sterilnosti izdelka med pripravo je nujna uporaba aseptičnega postopka. Ta je v Farmacevtskem terminološkem slovarju definiran kot postopek, s katerim se ohranja sterilnost izdelka z uporabo predhodno steriliziranih vhodnih surovin, naprav, pripomočkov in ovojnine, v pogojih, ki preprečujejo kontaminacijo z mikroorganizmi (3).

V UKC Ljubljana poteka del priprave zdravil centralizirano, v bolnišnični lekarni, del pa decentralizirano, na oddelkih. V bolnišnični lekarni poteka priprava popolne parenteralne prehrane, večine pripravkov s citostatiki, pripravkov z radiofarmacevtiki in oftalmikov. Vsi ostali parenteralni pripravki se pripravljajo na oddelkih, večinoma s strani medicinskih sester v nekontroliranih pogojih brez posebne dodatne opreme. Izjema so nekateri oddelki, med njimi tudi KO za revmatologijo, na katerem zdravila pripravlja farmacevtski tehnik pod nadzorom magistra farmacije v ločenem prostoru na oddelku, ki je opremljen z biološko varno komoro.

1.3. ČISTI PROSTORI

Osnovni pogoj za preprečevanje kontaminacije farmacevtskih pripravkov je zagotavljanje t.i. čistih prostorov, v katerih potekajo vse faze priprave. Ločimo več klasifikacij čistih prostorov, najpogosteje pa se uporabljajo British standard 5295, ISO >209< in US Federal standard 209, ki pa ni več v veljavi (4). Ti standardi so med seboj primerljivi. Primerjavo med njimi prikazuje preglednica I.

Preglednica I: Primerjava klasifikacije čistih prostorov med ISO >209< standardom, US Federal standardom 209 in British standardom 5295 (4)

	ISO >209<	US Federal Standard 209	British Standard 5295
RAZRED	1	M 1,5	C
(glede na meritve	10	M 2,5	D
števíla delcev velikosti	100	M 3,5	E
$\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{ft}^3$ (US FS 209	1000	M 4,5	G
in BS 5295) oziroma $0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ (ISO >209<)	10000	M 5,5	J
	100000	M 6,5	K

Najpogosteje se uporablja definicija v skladu z ISO >209< standardom, ki je skupna oznaka za dva standarda za čiste prostore, ki ju je pripravil Tehnični odbor številka 209. Gre za standarda ISO 14644, ki pokriva področje čistih prostorov in ostalih nadzorovanih okolij ter ISO 14698, ki pokriva področje tehnologije čistih prostorov, in sicer nadzora biološke kontaminacije. Oba standarda sta sestavljena iz več delov.

ISO standardi klasificirajo prostore v več razredov glede na celokupno število delcev, ki se nahajajo v kubičnem metru zraka (preglednica II) (4).

Preglednica II: Razredi čistih prostorov glede na ISO 14644 - 1 (4)

RAZRED	MAKSIMALNA KONCENTRACIJA DELCEV POSAMEZNIH VELIKOSTI (število /m ³ zraka)					
	$\geq 0,1 \mu\text{m}$	$\geq 0,2 \mu\text{m}$	$\geq 0,3 \mu\text{m}$	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$
ISO 1	10	2				
ISO 2	100	24	10	4		
ISO 3	1000	237	102	35	8	
ISO 4	10000	2370	1020	352	83	
ISO 5	100000	23700	10200	3520	832	29
ISO 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
ISO 7				352000	83200	2930
ISO 8				3520000	832000	29300
ISO 9				35200000	8320000	293000

Slabost teh standardov je ta, da ne vsebujejo nobene smernice za določanje koncentracije viabilnih delcev, kot so mikroorganizmi. Ker ne obstaja nobena matematična formula, ki bi omogočila, da bi iz vzorca zraka znanega volumna z znanim številom delcev lahko izračunali število prisotnih mikroorganizmov, so nastale bolj specifične smernice, ki rešujejo ta problem. Te smernice so zbrane in integrirane v pravilih dobre proizvodne prakse (GMP) in so predstavljene v naslednjem poglavju (4).

Odbor ministrov Sveta Evrope je 19. 1. 2011 v Strasbourgu sprejel Resolucijo o zahtevah za zagotavljanje kakovosti in varnosti farmacevtskih izdelkov, pripravljenih v lekarnah za posebne potrebe pacientov - CM/ResAP(2011)1 (5). Namen resolucije je poenotiti standarde priprave zdravil v lekarnah med državami članicami Sveta Evrope in velja za 36 evropskih držav, med katerimi je tudi Slovenija.

V skladu z Resolucijo je potrebno pred pripravo farmacevtskih izdelkov vedno izvesti oceno tveganja, kar se nanaša tako na farmacevtske pripravke za humano uporabo, ki jih pripravljajo javne in bolnišnične lekarne za posebne potrebe pacientov, kot tudi na rekonstitucijo farmacevtskih pripravkov v zdravstvenih ustanovah. Ocena tveganja zajema več dejavnikov, in sicer vrsto pripravka (najvišjo stopnjo tveganja imajo parenteralne FO), letno količino pripravljenega zdravila (pri tem se stopnja tveganja določi v skladu z nacionalnimi predpisi oziroma smernicami), farmakološki efekt zdravilnih učinkovin (zelo močan/močan/šibak), terapevtsko okno, način priprave farmacevtskega izdelka (aseptično polnjenje ima najvišjo stopnjo tveganja) in distribucijo (eksterna/interna/različna razmerja interna:eksterna; najvišjo stopnjo tveganja imajo zdravila z izključno zunanjo distribucijo). Vsi ti faktorji tveganja se nato zmnožijo, pri čemer dobimo številčni rezultat; če je le – ta višji od 100, gre za pripravek z visokim tveganjem, če pa je manjši ali enak 100, pa gre za pripravek z nizko stopnjo tveganja (5).

Resolucija priporoča, da se za pripravke z visokim tveganjem uporabljajo standardi zagotavljanja kakovosti v skladu z GMP, za pripravke z nizko stopnjo tveganja pa zadošča zagotavljanje kakovosti v skladu s PIC/S GPP (Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme Guide for Good Practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments) (5).

Pri našem delu smo imeli opravka z zdravili z visoko stopnjo tveganja, zato za njihovo zagotavljanje kakovosti veljajo zahteve GMP. Pogoji, ki jih navaja GMP, veljajo tako za industrijsko proizvodnjo zdravil, kot tudi za njihovo rekonstitucijo v skladu z navodili proizvajalca.

1.3.1. Klasifikacija čistih prostorov glede na GMP

Za klasifikacijo čistih prostorov GMP uporablja klasifikacijo v skladu z ISO standardom EN ISO 14644-1, pri čemer se največje dovoljeno število delcev določene velikosti razlikuje glede na to, ali je preiskovan prostor v stanju mirovanja ali delovanja (6).

Stanje mirovanja je definirano kot stanje, v katerem je v prostoru prisotna vsa oprema, ki tudi deluje, vendar ni prisotnega nobenega osebja. Stanje v delovanju pa je definirano kot stanje, pri katerem je v prostoru prisotna delujoča oprema, ki deluje na definiran način ter točno določeno število oseb (6). Klasifikacijo čistih prostorov v skladu z GMP prikazuje preglednica III.

Preglednica III: Klasifikacija čistih prostorov glede na GMP (5)

RAZRED	MAKSIMALNO DOVOLJENO ŠTEVILO DELCEV ENAKE ALI VEČJE VELIKOSTI, KOT JE DOLOČENO, NA m ³ zraka			
	V MIROVANJU		V DELOVANJU	
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Ni določeno	Ni določeno

GMP narekuje redno testiranje prostorov, v katerih poteka aseptična priprava in definira tudi dovoljeno število viabilnih mikroorganizmov v stanju delovanja, ki jih izmerimo v enotah CFU (Colony Forming Units). Uporabljene metode, kot sta npr. odvzem brisov in uporaba kontaktnih plošč, ne smejo vplivati na zaščito območja (6). Maksimalno koncentracijo viabilnih mikroorganizmov v čistih prostorih prikazuje preglednica IV.

Preglednica IV: Priporočena maksimalna koncentracija viabilnih mikroorganizmov v čistih prostorih glede na način/mesto odvzema vzorcev v skladu z GMP (6)

RAZRED	MAKSIMALNO ŠTEVILO VIABILNIH MIKROORGANIZMOV			
	VZOREC ZRAKA (CFU/m ³)	PETRIJEVKA premera 90 mm (CFU/4 h)	KONTAKTNA PLOŠČA premera 55mm (CFU/ploščo)	ODTIS ROKAVICE - pet prstov (CFU/rokavico)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

1.3.2. Program nadzora okolja, v katerem poteka priprava zdravil v skladu z GMP

Program nadzora okolja je program, s pomočjo katerega dokazujemo, da okolje, v katerem poteka priprava zdravil v skladu z GMP, ustreza zahtevam GMP. Ta program je ključen pri pripravi sterilnih izdelkov, saj moramo pri njihovi pripravi vzpostaviti in skozi ves čas priprave vzdrževati pogoje, ki preprečujejo njihovo mikrobiološko kontaminacijo. Namen programa nadzora okolja, v katerem poteka priprava zdravil v skladu z GMP, je dokumentirati stanje kontrole samega prostora, v katerem priprava poteka in ne določanje kvalitete (sterilnosti) končnega produkta (7).

Pomembno je, da so v rutinski program nadzora okolja vključena vsa mesta, ki predstavljajo največje tveganje za vnos mikroorganizmov, saj lahko s tem testiranjem nadzorujemo, če so bili aseptični pogoji vzdrževani skozi ves čas dela. Vzorce površine in zraka moramo jemati na mestih, kjer poteka pomemben del aktivnosti in na mestih, kjer pride do izpostavitve produkta med samo pripravo. Površine, ki med delom prihajajo v stik s sterilnimi materiali, morajo ostati sterilne skozi ves čas dela. Smernice za aseptično delo, ki jih je izdala FDA, priporočajo, da se v standardnih operacijskih postopkih (SOP) opišejo vsa mesta odvzemov vzorcev za nadzor okolja, pri čemer mora biti opis tako podroben, da omogoča ponovljivo vzorčenje. SOP-ji morajo vsebovati tudi podatke o pogostosti vzorčenja, času vzorčenja (pred/po delu), trajanju vzorčenja, velikosti vzorca (volumen zraka ali površina območja, kjer smo odvzeli vzorec), specifični opremi, ki smo jo uporabili za vzorčenje, dovoljenih mejah oziroma mejah, pri katerih moramo ukrepati ali postanejo celo alarmantne ter primernem odzivu na deviacije (7).

FDA priporoča tudi pripravo t.i. mikrobiološkega kataloga za prostore, v katerih poteka priprava zdravil za parenteralno aplikacijo. V tem katalogu so opisane vse vrste mikroorganizmov, ki so jih v tem okolju odkrili tekom izvajanja programa nadzora okolja. Smernice narekujejo redno testiranje okolja in osebja v neposredni bližini priprave zdravil in na kritičnih točkah, pri čemer naj se izolirani mikroorganizmi identificirajo do vrste ali, kadar je to bolj primerno, do rodu. S takim načinom dela lahko namreč ugotovimo, ali je prišlo do migracije mikroorganizmov iz manj kontroliranih okolij, kot je na primer ISO 8 razred, v bolj čiste prostore (7).

1.3.3. Komore z laminarnim pretokom zraka in biološko varne komore

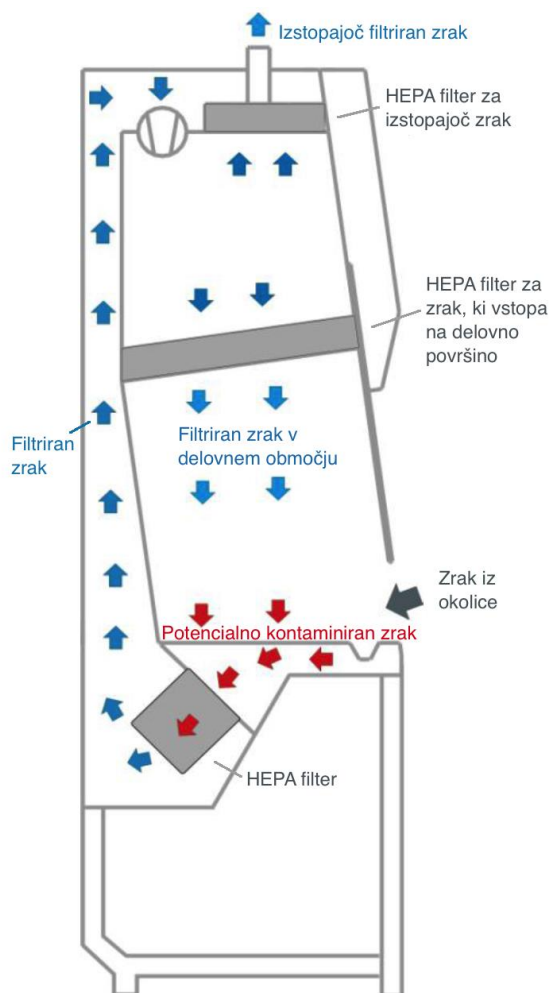
Komore z laminarnim pretokom zraka (LAF komore) so čisti prostori, ki jih glede na GMP klasifikacijo uvrščamo v razred A, kadar zadoščajo vsem potrebnim pogojem, med katerimi je ključen ta, da se komora nahaja v prostoru razreda B. Te komore zagotavljajo primerno okolje za aseptične postopke dela z vzdrževanjem laminarnega toka zraka pri hitrostih med 0,36 in 0,54 m/s (6).

Osnovni princip delovanja vsake LAF komore temelji na stalnem odstranjevanju delcev (tako viabilnih, kot neviabilnih) s pomočjo prepihanja zraka. Ta se v komori giba laminarno, kar pomeni, da se plasti zraka gibljejo vzporedno. Kadar se aseptična priprava zdravil izvaja v več prostorih različnih razredov, mora med posameznimi prostori obstajati tlačna razlika med 10 in 15 Pa, pri čemer je v LAF komorah običajno prisoten pozitiven nadtlak, ki preprečuje vstop manj kvalitetnega zraka iz prostora, v katerem se komora nahaja. Zrak se v LAF komorah filtrira skozi HEPA (ali ULPA) filtre. HEPA filtri iz zraka odstranijo delce velikosti 0,3 μm z več kot 99,97% učinkovitostjo, ULPA filtri pa z več kot 99,99996% učinkovitostjo. Največkrat se za aseptično delo uporabljajo HEPA filtri, ki zagotavljajo hitrost zraka 0,45 m/s. Za podaljšanje življenjske dobe HEPA filtra se velikokrat uporabljajo tudi predfiltri, na katerih se ujamejo večji delci. Na učinkovitost LAF komore imata neposreden vpliv hitrost pretoka zraka in učinkovitost HEPA filtra. (8)

Poznamo dve vrsti LAF komor, in sicer horizontalne ter vertikalne LAF komore. Pri horizontalni LAF komori zrak vstopa skozi predfilter na zgornji površini komore, se filtrira skozi HEPA filter za zadnjo steno LAF komore in nato zapušča komoro proti osebi, ki pripravlja zdravila. Zaradi tega horizontalna LAF komora ni primerna za pripravo zdravju ali okolju škodljivih snovi, omogoča pa zaščito pripravka pred kontaminacijo. Vertikalna LAF komora se od horizontalne razlikuje po smeri pihanja zraka, ki pri tej piha v navpični smeri, od zgoraj navzdol (8).

Poseben primer LAF komor so biološko varne komore, ki nudijo poleg zaščite produkta tudi zaščito pripravljavca in okolja. Namenjene so pripravi zdravju ali okolju škodljivih snovi. V teh komorah se ustvarja podtlak, ki preprečuje izstop zraka iz komore v okolje. Zrak tudi v BVK vstopa skozi predfilter, se filtrira skozi HEPA filter, piha na delovno površino in nato izstopa skozi poseben filtrirni sistem iz delovnega območja. Poznamo tri tipe BVK, ki se razlikujejo glede na vrsto zaščite, ki jo nudijo. BVK razreda 1. ščiti

pripravljalca zdravil in okolje, ne ščiti pa samega produkta pred kontaminacijo. BVK razreda III. se imenujejo tudi izolatorji in so popolnoma zaprti sistemi, v katerih se delovne operacije izvajajo s pomočjo vgrajenih rokavic ali robota in nudijo največjo zaščito za delavca, hkrati pa ščitijo tudi produkt in okolje. Najpogosteje se uporabljajo biološko varne komore razreda II, ki nudijo zaščito za okolje, delavca in izdelek. Ta razred BVK se deli še naprej na posamezne tipe in podtipe. Za vse je značilno, da zrak v komoro vstopa na sprednji strani in tako tvori zračno zaveso, ki preprečuje izhod kontaminiranega zraka v okolje. Ventilator nato potiska delovni in zunanji zrak skozi HEPA filtre; del tega zraka se nato skozi HEPA filter potiska v okolico, del pa se filtrira nazaj v komoro, v katero vstopa v vertikalni smeri glede na delovno površino (8). Gibanje zraka v biološko varni komori razreda II prikazuje slika 1.



Slika 1: Shematski prikaz gibanja zraka v biološko varni komori tipa II

(preurejeno po viru: http://iskra-pio.si/images/documents/safety_cabinets/MC%20..-3.pdf)

1.4. BOLNIŠNIČNE OKUŽBE

Bolnišnična okužba je vsaka klinična mikrobna bolezen, ki jo je dobil bolnik med zdravljenjem in bivanjem v bolnišnici in ni bil že v inkubaciji za isto bolezen. Z enakim imenom poimenujemo tudi bolezen, ki jo je bolnik dobil v bolnišnici, čeprav se je pojavila po odpustu domov ter okužbo, ki jo dobi zdravstveno osebje pri delu v bolnišnici (9). Bolnišnične oziroma nozokomialne okužbe se lahko pojavijo v roku 48 ur po sprejetju v bolnišnico, v roku treh dni po odpustu iz bolnišnice ali v roku 30 dni po operaciji (10). Evropski center za preprečevanje in nadzor okužb ocenjuje, da za bolnišničnimi okužbami v Evropski uniji vsako leto zboli približno 4,1 milijona ljudi, med katerimi je približno 37 tisoč okužb neposredni vzrok smrti (11). V svetovnem merilu v povprečju za bolnišničnimi okužbami zboli od 5% do 9% vseh bolnikov, ta delež pa je še višji na intenzivnih enotah (12). Najpogostejše so okužbe urinarnega trakta, sledijo infekcije respiratornega trakta, okužbe po posegih ter okužbe krvnega obtoka. ECDC ocenjuje, da bi približno 20-30% okužb lahko preprečili z intenzivnim programom higiene in nadzora (11).

Za vse okužbe oziroma infekcije je značilno, da lahko potekajo asimptomatično ali z bolezensko sliko (13). Da lahko govorimo o bolnišnični okužbi, je nujna prisotnost kliničnih znakov; če teh ni, na bolnikovi koži ali sluznicah pa vseeno dokažemo prisotnost mikroorganizmov (ki so se namnožili zaradi uničenja naravnih antagonistov), govorimo o kolonizaciji z mikroorganizmi. Slednja je lahko povod za razvoj bolnišnične okužbe (9).

Okužba je definirana kot vdor bolezenskih povzročiteljev v človeški organizem in njihovo razmnoževanje v njem. Na nastanek okužbe vplivajo gostiteljeva sprejemljivost, imunost in dovzetnost ter povzročiteljevi patogenost in virulenca (13).

Za okužbe so zlasti dovzetni kronični bolniki (še posebej tisti z rakavimi obolenji, krvnimi boleznimi, sladkorno boleznijo, imunskimi pomanjkljivostmi, malformacijami), nedonošenčki in stari ljudje, pri katerih je imunski sistem funkcionalno manj aktiven. Pri teh rizičnih skupinah je vstop mikroorganizmov v drugače sterilna področja, kot so kri, likvor, osrčnik, podkožje, plevralna in peritonealna votlina, ipd., nevaren za razvoj okužbe. Povzročitelji so večinoma oportunistični mikroorganizmi, ki v svojem fiziološkem okolju ne izzovejo nobenih škodljivih reakcij, pri vstopu v nefiziološko okolje pa lahko povzročijo vnetja (lokalizirana ali splošna) ter sepsa. Dejavniki tveganja za razvoj bolnišnične okužbe so dolžina hospitalizacije, teža bolezni in imunsko stanje bolnika ter vrsta in število invazivnih postopkov, katerim je bil bolnik podvržen. Najpogostejši vir

bolnišničnih okužb so neumite in nerazkužene roke ter rokavice, ki jih zdravstveno osebje ne menjuje pri vsakem posegu. Pogost vir so tudi nesterilni instrumenti in naprave, okužene raztopine, razkužila, zdravila ter voda (9).

Posledice bolnišničnih okužb so povečana smrtnost, podaljšan čas bivanja v bolnišnici ter višji stroški zdravljenja (12).

1.4.1. Povzročitelji bolnišničnih okužb

Bolnišnične okužbe lahko povzročajo tako bakterije, kot tudi virusi in glive. Med bakterijami je najpogostejši povzročitelj bolnišničnih okužb *Escherichia coli*, sledijo ji stafilokoki, enterokoki in pseudomonade. Virus, ki najpogosteje povzročajo bolnišnične okužbe so rotavirusi, sledijo respiratorni sincicijski virus in enterovirusi. Med glivnimi okužbami so najpogostejše kandidoze in aspergiloze (12). V nadaljevanju so opisane nekatere lastnosti najpomembnejših bakterij in gliv, ki povzročajo bolnišnične okužbe.

Bakterijski povzročitelji:

Rod Escherichia

Bakterije rodu *Escherichia* sodijo med enterobakterije, ki so del normalne črevesne flore, virulentni sevi pa povzročajo okužbe v prebavilih in zunajčrevesne okužbe. *Escherichia coli* povzroča večino akutnih in velik delež kroničnih okužb sečil. Pri hospitaliziranih bolnikih pogosto povzroča sepso, katere vir so večinoma sečila. Poleg naštetih okužb povzroča tudi infekcije kirurških ran, pljučnico, vnetje slepiča, trebušne mrene in okužbe rodil (12).

Rod Staphylococcus

Najpomembnejša patogena vrsta tega rodu je *Staphylococcus aureus*, ki povzroča gnojne okužbe kože, kirurških ran, opeklin, vnetje očesne veznice in srednjega ušesa. Pri gnojnih vnetjih se lahko bakterija razširi v kri, kar vodi do resnih zapletov. Ob vdihavanju in redkeje zaradi hematogenega širjenja lahko ta bakterija povzroči tudi pljučnico. Vir bakterije so bolniki in zdravi klicenosci, pri katerih se bakterija največkrat nahaja v nosu. V bolnišničnem okolju so zelo pomembni tudi sevi MRSA, ki so zaradi mutacije genov, ki

nosijo zapis za penicilin vežoče beljakovine, odporni proti betalaktamskim antibiotikom (12).

Ostale pomembne vrste stafilokokov so koagulazno negativni stafilokoki, ki so v zdravem gostitelju predstavniki normalne bakterijske flore, pri bolnikih z oslABLJENO imunsko odpornostjo pa povzročajo hude, lahko tudi smrtno nevarne okužbe. Kolonizirajo kirurške rane in opekline ter imajo visoko afiniteto do kirurških vsadkov (12). Slednja je značilna zlasti za vrsto *Staphylococcus epidermidis*, katere sevi pogosto izkazujejo odpornost na določene antibiotike in na površini vsadkov tvorijo biofilme, kar močno otežuje zdravljenje okužb s to vrsto bakterij. Odpornost sevov *S. epidermidis* na meticilin in ostale antibiotike vedno bolj narašča, saj se tem sevom ne posveča toliko pozornosti kot sevom MRSA. Čeprav so sevi, izolirani iz okolja, večinoma občutljivi na vse antibiotike, je skoraj 80% sevov *S. epidermidis* izoliranih z vsadkov, povezanih z nastankom okužbe, odpornih na meticilin ali na več antibiotikov (14).

Rod *Enterococcus*

Enterokoki so dolgo časa veljali za medicinsko nepomembne bakterije, kar se je v zadnjih letih močno spremenilo, saj so postali eni izmed najpogostejših povzročiteljev bolnišničnih okužb. Po svetu močno narašča tudi pogostost sevov, odpornih na več antibiotikov. Zelo nevarne so okužbe z enterokoki, odpornimi na vankomicin, ki povzročijo smrt v kar 75% primerov. So drugi najpogostejši povzročitelji okužb kirurških ran in sečil. V bolnišničnem okolju sta najpomembnejši vrsti *Enterococcus faecalis*, ki je najpogostejši povzročitelj okužb ter *Enterococcus faecium*, ki predstavlja največje tveganje za razvoj odpornosti na antibiotike (15).

Rod *pseudomonas*

V rod *Pseudomonas* sodi več kot 200 vrst. Najpomembnejši predstavnik je *Pseudomonas aeruginosa*, ki ima številne virulentne dejavnike, kot so polarni pilusi, encimi, toksini, v določenih okoliščinah pa še polisaharidno kapsulo. V bolnišničnem okolju ga lahko odkrijemo v pitni vodi, kopelih, bazenih, vlažilcih ali tekočinah za dializo, razkužilih, tekočinah za izpiranje, kapljicah za oči, na surovem sadju, zelenjavi ... Je drugi najpogostejši povzročitelj okužb opeklin in ran, takoj za stafilokoki. Je zelo prilagodljiv, odporen proti številnim razkužilom in antibiotikom. Povzroča tudi pljučnico in sepso (12).

Glivni povzročitelji:

Rod Candida

Glive rodu *Candida* so najpogostejši povzročitelji glivičnih okužb. Najpomembnejši predstavnik tega rodu je *Candida albicans*. Zaradi preventivne uporabe antimikotikov pri za glivične okužbe najbolj ogroženih ljudeh pa narašča tudi incidenca okužb z drugimi vrstami. Poleg povrhnje kandidoze in kronične mukokutane kandidoze lahko pri poškodbi kože ali sluznic, okužbi žilnih katetrov ali kirurških posegih pride tudi do vdora kandidate v krvni obtok – kandidemije. Klinični potek je odvisen od velikosti inokuluma, virulence mikroorganizma, najbolj pa od gostiteljevega imunskega odziva. Sistemska kandidoza je lahko lokalizirana na organ ali organski sistem, za vse sistemske kandidoze pa je značilno, da ogrožajo bolnikovo življenje (12).

Rod Aspergillus

Najpogostejši povzročitelji okužb tega rodu so vrste *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* in *A. terreus*. Tudi pri aspergilozah je klinični potek močno odvisen od imunskega stanja bolnika. Pri imunsko oslabilih osebah lahko povzročijo invazivno pljučno aspergilozo, ki se lahko hematogeno razširi tudi na druge organe in tkiva ter je vzrok za visoko umrljivost (12).

1.4.2. Preprečevanje bolnišničnih okužb

Pomemben del preprečevanja razvoja bolnišničnih okužb sta čiščenje in razkuževanje delovnih površin in rok, uporaba rokavic, pa tudi ostali postopki zagotavljanja ustrezne stopnje čistote okolja, kot je na primer filtriranje zraka. Pomembno je, da za vse naštetu obstajajo natančna pisna navodila ter da vse postopke izvaja usposobljeno osebje, ki svoje znanje tudi redno obnavlja (9).

Med najpomembnejše ukrepe za preprečevanje bolnišničnih okužb sodijo tudi racionalna uporaba antibiotikov, izolacija inficiranih in koloniziranih bolnikov, ciljane mikrobiološke preiskave, evidenca bolnišničnih okužb, redna identifikacija povzročiteljev okužb in analiza njihove občutljivosti na antibiotike, cepljenje in reden nadzor osebja ter ustrezna zasedenost delovnih mest (13).

1.4.2.1. Razkuževanje površin

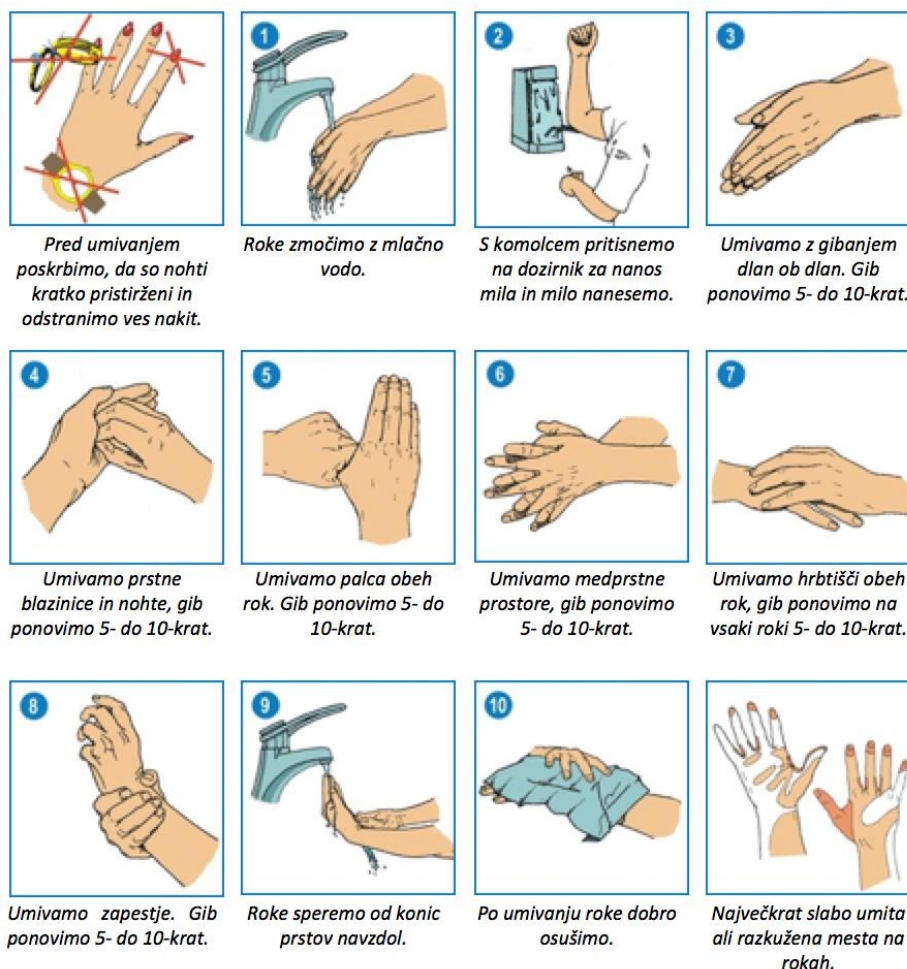
Razkuževanje je postopek, s katerim, če ga ustrezno izvajamo, uničimo 99% mikroorganizmov. Z večino poznanih metod razkuževanja uničimo predvsem vegetativne oblike mikroorganizmov, bakterijske spore pa uničimo redkeje, saj je za to potreben daljši čas delovanja, ki pri vsakdanjem delu ni vedno zagotovljen (9).

Praviloma površine najprej očistimo, nato pa razkužimo. Za razkuževanje delovnih površin največkrat uporabljamo kemična razkužila. Na njihovo učinkovitost lahko vpliva več dejavnikov: vrsta razkuževanega materiala, število in vrsta mikroorganizmov, temperatura in čas delovanja, prisotnost različnih organskih in anorganskih snovi, koncentracija in vrsta razkužila ... Kemična razkužila delimo v učinkovita (npr. klorheksidinijev glukonat, alkoholi) in zelo učinkovita (npr. jodni pripravki, klorove spojine, perocetna kislina) (13).

Med alkoholnimi razkužili se pogosto uporabljajo raztopine etanola in raztopina izopropanola v vodi. Slednja prodira v lipidne ovojnice mikroorganizmov, denaturira celične proteine in zavira delovanje encimov. Raztopine alkoholov uničujejo vegetativne oblike bakterij, gliv in mikobakterij, delujejo na večino virusov (npr. virus HIV je občutljiv že na koncentracije etanola nižje od 40%; izopropanol pa je zoper viruse manj učinkovit in na enterične viruse v 70% koncentraciji sploh ne deluje), ne delujejo pa sporicidno, zaradi česar se lahko v njih spore celo zadržujejo. Absolutni alkohol ni primeren za razkuževanje, saj je za mikrobiciden učinek nujen dodatek vode (9).

1.4.2.2. Higiena rok in uporaba rokavic

Ključni dejavnik bolnišnične higiene in preprečevanja bolnišničnih okužb je ustrezna higiena rok. Na koži rok se nahaja stalna mikrobna flora, ki se na njej razmnožuje in jo v večini sestavljajo po Gramu pozitivne bakterije, občasno pa tudi bakterije rodu *Acinetobacter*. Zraven te se na koži rok nahaja tudi prehodna mikrobna flora, katero predstavljajo oportunistični ali patogeni mikroorganizmi iz okolja, ki se na koži ne razmnožujejo in se na njej zadržijo le krajši čas. Z umivanjem rok lahko odstranimo umazanijo in del prehodne flore, stalne flore pa ne (13). Umivanje rok poteka po ustaljenem postopku, ki ga prikazuje slika 2.



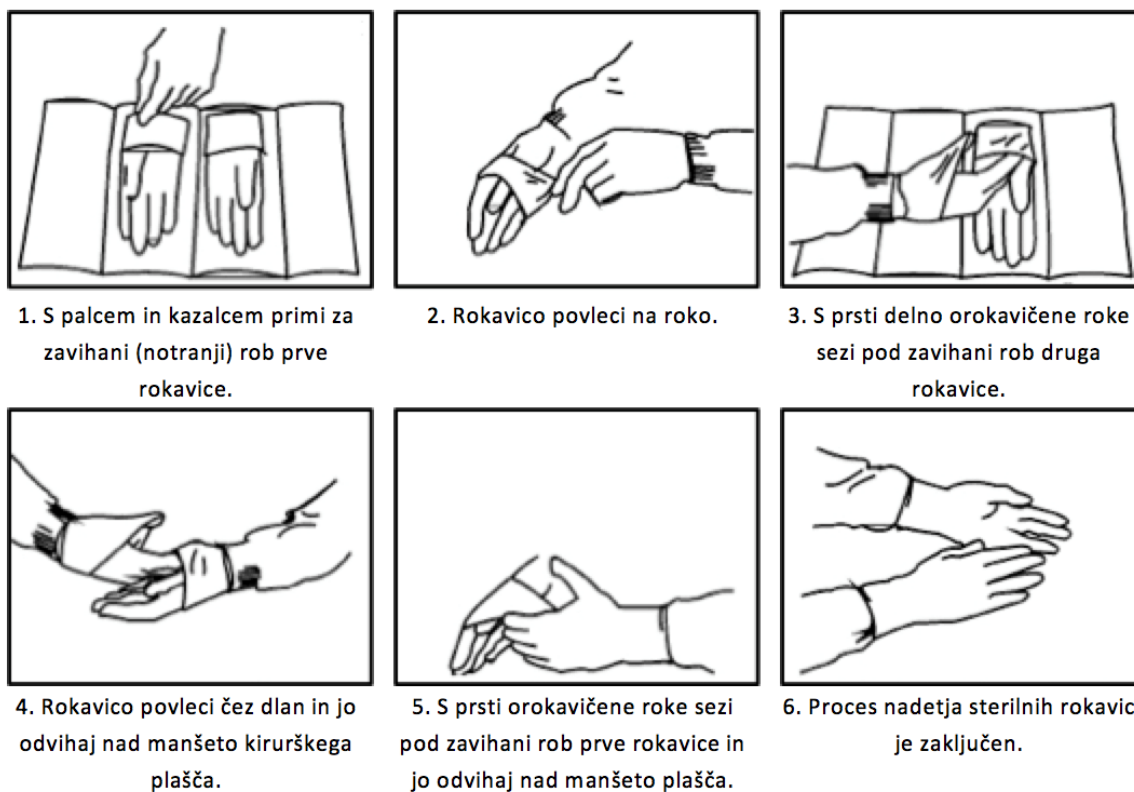
Slika 2: Pravilno umivanje rok in kritična mesta na rokah (preurejeno po viru

<http://design-ivan-mori.weebly.com/umivanje-rok.html>)

Pred aseptičnimi postopki, delom s kužnimi bolniki, z izločki in krvjo, pred in po uporabi rokavic ter pred in po oskrbi rane je nujno tudi razkuževanje rok. V ta namen se uporabljajo alkoholi, klorheksidin ali jodofori. Razkuževanje z alkoholi ne povzroča alergij, v primerjavi z umivanjem kožo manj poškoduje, močneje zniža število bakterij in deluje hitreje. Roke razkužujemo tako, da najprej alkoholno razkužilo nanesemo na dlan, nato ga vtiramo v konice prstov, sledita palca obeh rok in medprstni prostori, razkuževanje pa zaključimo na hrbtišču obeh rok. Vsak gib ponovimo vsaj trikrat, postopek pa naj traja približno eno minuto. Pred delom pustimo, da se razkužilo posuši (13).

V skladu z GMP (6) je pri pripravi zdravil v čistih prostorih razredov A in B nujna tudi uporaba steriliziranih gumijastih ali plastičnih rokavic brez smukca. Rokavice se morajo med delom redno dezinficirati, da vzdržujemo njihovo sterilnost (7).

Pred nadenjenjem sterilnih rokavic je nujno umivanje rok z neškodljivim, higiensko neoporečnim milom, nakar roke osušimo in jih razkužimo. Za ohranjanje sterilnosti rokavic je nujno, da na suhe roke nadenemo sterilne rokavice na ustrezen, aseptičen način, ki ga prikazuje slika 3.



Slika 3: Pravilno nadenje sterilnih rokavic

(preurejeno po viru: http://www.radiation-therapy-review.com/Infection_Control.html)

Rezultati raziskave prepustnosti medicinskih rokavic iz lateksa kažejo, da je njihova prepustnost zelo odvisna od proizvajalca (9). V povprečju je bila fizikalna prepustnost lateksnih medicinskih rokavic (preizkušena s polnjenjem rokavic z vodo, obarvano z metilenskim modrilom ali fuksinom v različnih časovnih intervalih) 5%. Še višja je bila njihova prepustnost za bakterije (9%), prepustnost rokavic za viruse pa je bila kar 87,5% (9). Prepustnost v prvih petih minutah je povezana s fizikalnimi okvarami rokavic pri proizvodnji, prepustnost po daljšem času pa je odvisna od kakovosti materiala, iz katerega so rokavice izdelane. Prenos mikroorganizmov je hitrejši v mokrem okolju, zato je potrebno vlažne rokavice (od zunaj ali od znotraj) hitro zamenjati (9).

2. NAČRT ZA DELO

Z eksperimentalnim delom želimo ovrednotiti vpliv biološko varne komore, postavljene v nekvalificiran prostor na KO za revmatologijo, na mikrobiološko kakovost površin, materialov, rokavic in zraka.

Vzorčenje bomo izvajali ob ponedeljkih in sredah na Kliničnem oddelku za revmatologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, na katerem poteka priprava zdravil za parenteralno aplikacijo v BVK, ki je postavljena v nekvalificiran prostor na oddelku. Na prvem vzorčenju si bomo ogledali potek dela in ocenili najprimernejša mesta za odvzem vzorcev, hkrati pa sestre seznanili s praktičnim vidikom aseptičnega dela, katerega poznavanje je pomembno za pravilen odvzem brisov. Spoznali in preizkusili bomo tudi pravilno tehniko vzorčenja, shranjevanja vzorcev in njihovega transporta do Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer bodo izvedli testiranje vzorcev na prisotnost bakterij in v določenih primerih tudi gliv.

Vzorci bomo jemali vsakič na istih mestih, ki jih bomo določili po prvem (orientacijskem) testiranju. Vsakič bomo s pomočjo uporabe mokrih brisov odvzeli 10 vzorcev z različnih površin in izpostavili 4 agarje, s katerimi bomo ocenili še mikrobiološko kakovost zraka v prostoru. Izvedli bomo tudi dodatno testiranje, s katerim bomo ovrednotili vpliv (vsaj delno) papirnate embalaže na mikrobiološko kontaminacijo rokavic pripravljavca zdravil. V posebnih testiranjih bomo izvedli tudi volumetrično metodo nadzora mikrobiološke kontaminacije zraka s presesavanjem.

Rezultate bomo statistično obdelali s pomočjo uporabe programa SPSS in interpretirali, razmislili bomo o možnih napakah, ki lahko med delom vodijo do mikrobiološke kontaminacije vzorcev ter predlagali ustrezne ukrepe za izboljšanje mikrobiološke kakovosti preiskovanih vzorcev. Ovrednotili bomo tudi ustreznost prostora priprave zdravil ter razkuževalnih tehnik in jih primerjali s primeri dobrih praks v literaturi in centralni lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Komentirali bomo tudi ustreznost tehnike odvzema brisov.

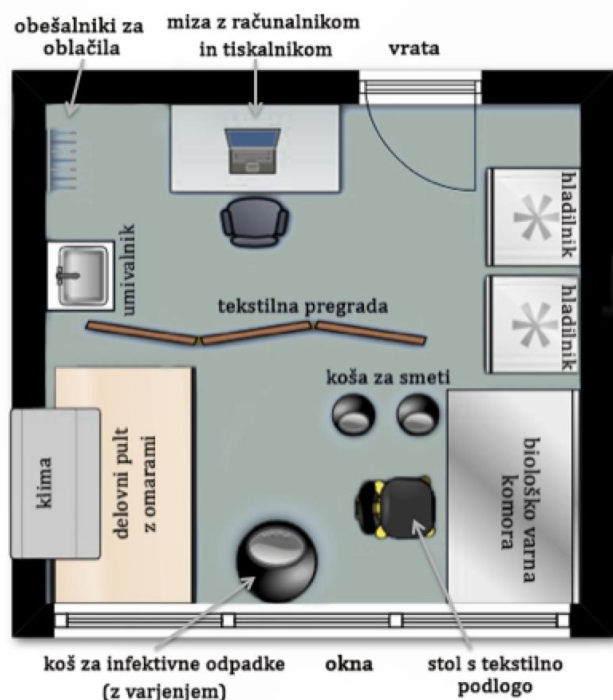
Dobljene rezultate bomo primerjali z rezultati primerljivih vzorčenj na Oddelku za intenzivno terapijo Kliničnega oddelka za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok UKC Ljubljana, na katerem poteka priprava zdravil za parenteralno aplikacijo v nekvalificiranih prostorih (bolniških sobah), ki nimajo BV komore.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. OPIS OKOLJA, V KATEREM POTEKA PRIPRAVA PARENTERALNIH PRIPRAVKOV

Eksperimentalni del magistrske naloge smo izvajali v Bolnišnici dr. Petra Držaja, na Kliničnem oddelku za revmatologijo. Rekonstitucija in redčenje zdravil potekata v biološko varni komori, ki se nahaja v ločenem prostoru tega oddelka, ki pa ni namenjen samo pripravi zdravil, ampak vanj med delom velikokrat vstopajo tudi medicinske sestre in drugo osebje, ki ni vključeno v proces priprave zdravil. Takšen način postavitve komore je redek, zato nas je zanimalo, v kolikšni meri njena uporaba vpliva na izboljšanje mikrobiološke kakovosti priprave izdelkov v primerjavi z oddelkom, ki te komore nima.

V prostoru, kjer smo izvajali vzorčenje, se poleg BVK nahajata še dva hladilnika z biološkimi zdravili, ki se na tem oddelku uporabljajo, miza z računalnikom, tiskalnikom in stolom s tekstilno oblogo, umivalnik (se ne uporablja), delovni pult in omara. Delovni pult, nad katerim je omara s pripomočki, potrebnimi za delo v LAF komori ter sama LAF komora sta med delom od vhodnih vrat, hladilnikov, umivalnika in mize z računalnikom ločena s tekstilno pregradno steno.



Slika 4: Shematski prikaz postavitve opreme v prostoru, v katerem poteka priprava zdravil

Na steni ob desni strani komore se nahajajo okna, ki morajo biti ves čas obratovanja komore zaprta. Velikokrat pa so okna odprta pred pripravo zdravil, saj prostor v odsotnosti pripravljavcev zdravil uporablja tudi drugo bolnišnično osebje. Na steni, nasprotni od oken, se nahajajo vrata, skozi katera tudi med pripravo zdravil pogosto vstopajo medicinske sestre in drugo osebje. Nasproti BV komore se nahaja klima, s pomočjo katere se uravnava temperatura prostora na sobno temperaturo.

Biološko varna komora, v kateri se na kliničnem oddelku za revmatologijo v Bolnišnici dr. Petra Držaja pripravljajo zdravila, ni vklopljena ves čas, ampak se vklopi nekaj ur pred začetkom dela in se ugasne po končanem delu.

3.2. PRIPRAVA NA DELO

V prostoru, kjer je potekala priprava zdravil in vzorčenje, smo bili vedno prisotni magister farmacije, farmacevtski tehnik ter jaz, občasno pa še kakšna medicinska sestra, ki je vedno ostala na drugi strani zaščitne pregrade. Pred začetkom dela smo si najprej v skladu s pisnimi navodili umili in razkužili roke, si naredili zaščitno pokrivalo in masko. Nato smo oblekli zaščitni plašč in naredili sterilne rokavice iz lateksa tako, da so segale preko manšetnega roba kirurškega plašča. Tehnik, ki je pripravljaval zdravila, si je nad zaščitno haljo in rokavice iz lateksa nadel še narokavnike ter še druge, sterilne nitrilne rokavice.

Uporabljena zaščitna oblačila:

- **Sterilne rokavice iz kavčuka iz naravnega lateksa**, SHIELDskin XTREME™, SHIELD Scientific B.V., Sterile latex 300 DI
- **Sterilne nitrilne rokavice**, DERMAGRIP, Nitrile Extended Cuff Sterile Examination Gloves, WRP, za enkratno uporabo
- **Polmaska s filtrom za delce**, Dräger, X-plore 1730+ V FFP3, za uporabo v maksimalnem trajanju ene delovne izmene
- **Narokavniki**, Chemoprotect® Protective Arm Sleeves, sterilni narokavniki za zaščito pri rokovanju s citotoksičnimi zdravili, za enkratno uporabo
- **Kirurški plašč**, Barrier® Surgical Gown Primary, sterilni kirurški plašč za enkratno uporabo
- **Kirurško pokrivalo**, Kimberly – Clark, nesterilno, za enkratno uporabo

Pred pričetkom dela farmacevtski tehnik prebriše delovno površino v BVK in na sredino položi sterilno delovno podlogo. Med tem magister farmacije, ki se nahaja v predprostoru BV komore, prebriše vse vsebnike in embalaže brizg, igel, mini-spikov ter ostalih pripomočkov, potrebnih za pripravo zdravil ter jih položi na alkoholni robec v sprednjem levem delu BV komore. Med delom si oba, tako magister farmacije, kot tudi farmacevtski tehnik, rokavice občasno prebrišeta z alkoholnim robcem.

Uporabljeni materiali in prostor za delo:

- **citostatično varna komora**, Iskra pio d.o.o., tip C-[MaxPro]3-130. Ta komora nudi zaščito tako operaterju in okolici, kot tudi zagotavlja čisto okolje za zaščito produkta. Gre za komoro, pri kateri zrak vstopa iz okolja skozi rešeto v sprednjem delu BV komore, pri čemer se deloma premeša z recirkuliranim zrakom, ki se že nahaja pod segmentiranim delom pulta BV komore. Mešanica zraka se nato filtrira v predfiltru in HEPA filtrih, pri čemer potuje za zadnjo steno komore navzgor in v delovni prostor vstopa iz stropa navzdol.
- **alkoholni robci**, Klerwipe 70/30[®], sterilni alkoholni robci impregnirani s 70% v/v izopropanolom, z majhnim odpuščanjem delcev
- **sterilna delovna podloga za delo s citostatiki**, Berner International GMBH, tip BI-8001

3.3. MESTA ODVZEMOV VZORCEV

Smernice Evropske unije o proizvodnji sterilnih farmacevtskih izdelkov narekujejo pogost nadzor prostorov, v katerih se izvaja aseptična priprava, z metodami, kot so izpostavitve agarjev, metoda presesavanja in vzorčenje površin (z uporabo brisov ali kontaktnih plošč) (7).

Vzorčenje smo izvajali šestnajstkrat, pri čemer smo štirinajstkrat vzeli brise in izpostavili agarje, dvakrat pa smo izvedli mikrobiološki nadzor kakovosti zraka z metodo presesavanja. Večino vzorcev smo jemali na standardnih mestih, ki jih prikazuje preglednica VI, pri prvem in zadnjem vzorčenju pa smo določena mesta odvzemov nekoliko spremenili (preglednici V in VII).

Pred samim začetkom eksperimentalnega dela smo preučili postopke dela in na tej osnovi identificirali kritična mesta, na katerih bi med delom lahko prišlo do kontaminacije pripravkov. Nato smo pripravili načrt dela in odvzeli vzorce na mestih, ki jih prikazuje preglednica V.

Preglednica V: Mesta odvzemov vzorcev pri prvem vzorčenju

Zaporedna številka vzorca	Vrsta vzorca	Opis vzorca
1	BRIS	DELOVNA POVRŠINA V BVK, SREDINA, PRED DELOM
2	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI ASISTIRA, PO DELU
3	BRIS	PREBODNI DEL SPIKA, PO DELU
4	BRIS	VSEBNIK 1, SIGNATURA, PO DELU
5	BRIS	VSEBNIK 1, PREBODNO MESTO, PO DELU
6	BRIS	VSEBNIK 2, SIGNATURA, PO DELU
7	BRIS	VSEBNIK 2, PREBODNO MESTO, PO DELU
8	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO DELU
9	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO DELU
10	BRIS	NOTRANJI ROB BVK, DESNO ZADAJ, PO DELU
11	BRIS	DELOVNA POVRŠINA BVK, SREDINA, PO DELU
12	BRIS	NOTRANJI ROB BVK, DESNO SPREDAJ, PO DELU
13	AGAR	BVK, LEVO
14	AGAR	BVK, DESNO
15	AGAR	DELOVNI PULT (NA ISTI STRANI PREGRADE, KOT BVK)

Ko smo dobili rezultate prvega vzorčenja, smo še dodatno razmislili o drugih mestih kontaminacije in dodali še tri mesta vzorčenja. Vsa vzorčenja, razen zadnjega, smo nato izvajali na mestih, ki jih prikazuje preglednica VI. Vzorčenja smo izvajali ob ponedeljkih in ob sredah ob vnaprej določenih in pripravljavcem zdravil znanih terminih.

Preglednica VI: Standardna mesta odvzemov vzorcev (vzorčenja 2 – 13)

Zaporedna številka vzorca	Vrsta vzorca	Opis vzorca
1	BRIS	DELOVNA POVRŠINA BVK, SREDINA, PRED DELOM
2	BRIS	DELOVNA POVRŠINA BVK, DESNO SREDI, PRED DELOM
3	BRIS	PREBODNI DEL SPIKA, PO DELU
4	BRIS	VSEBNIK 1, SIGNATURA, PO DELU
5	BRIS	VSEBNIK 1, PREBODNO MESTO, PO DELU
6	BRIS	VSEBIK 2, SIGNATURA, PO DELU
7	BRIS	VSEBNIK 2, PREBODNO MESTO, PO DELU
8	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO DELU
9	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO DELU
10	BRIS	NOTRANJI ROB BVK, DESNO ZADAJ, PO DELU
11	BRIS	DELOVNA POVRŠINA V BVK, SREDINA, PO DELU
12	BRIS	NOTRANJI ROB BVK, DESNO SPREDAJ, PO DELU
13	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI ASISTIRA, PO DELU
14	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI ASISTIRA, PO DELU
15	BRIS	BVK, REŠETO, PO DELU
16	AGAR	LEVA STRAN BVK
17	AGAR	DESNA STRAN BVK
18	AGAR	DELOVNI PULT (NA ISTI STRANI PREGRADE, KOT BVK)
19	AGAR	VRH HLADILNIKA (NA DRUGI STRANI PREGRADE, BVK)

Po zaključenih trinajstih vzorčenjih smo pregledali dobljene rezultate in dodali še eno vzorčenje, pri katerem smo brise jemali izključno z rokavic osebe, ki dela v LAF komori in opazovali vpliv prebrisovanja rok po odpiranju embalaž brizg, ki imajo eno stranico

papirnato, na rezultate mikrobiološkega nadzora. Mesta odvzemov vzorcev pri tem vzorčenju prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII: Mesta odvzemov vzorcev pri zadnjem vzorčenju

Zaporedna številka vzorca	Vrsta vzorca	Opis vzorca
1	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 1. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
2	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 1. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
3	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 1. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
4	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 1. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
5	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 2. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
6	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 2. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
7	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 2. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
8	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 2. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
9	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 3. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
10	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 3. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
11	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 3. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
12	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 3. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
13	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 4. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
14	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 4. BRIZGE (PRED RAZKUŽEVANJEM)
15	BRIS	LEVA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 4. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
16	BRIS	DESNA ROKAVICA OSEBE, KI DELA V BVK, PO ODPRTJU 4. BRIZGE (PO RAZKUŽEVANJU)
17	AGAR	LEVA STRAN BVK
18	AGAR	DESNA STRAN BVK
19	AGAR	DELOVNI PULT (NA ISTI STRANI PREGRADE, KOT BVK)
20	AGAR	VRH HLADILNIKA (NA DRUGI STRANI PREGRADE, KOT BVK)

3.4. NADZOR MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI DELOVNIH POVRŠIN, POVRŠIN VSEBNIKOV IN ROKAVIC OSEBJA Z JEMANJEM MOKRIH BRISOV

Za nadzor mikrobiološke kakovosti vseh površin smo uporabljali sterilne brise v tekočini, ki je vsebovala 5 ml fiziološke raztopine z dodanim deaktivatorjem razkužila. Pripravili so jih na IMI, kjer smo jih na dan vzorčenja tudi prevzeli in jih po vzorčenju oddali na mikrobiološko analizo.

Vzorčenje z jemanjem brisov se praviloma uporablja na površinah, ki niso ploščate in so težje dostopne (16). Omenja se tudi v GMP, čeprav so v preglednicah tega dokumenta omenjeni kvantitativni rezultati pri nadzoru mikrobiološke kakovosti z metodo kontaktnih plošč. Učinkovitost vzorčenja z jemanjem brisov je nizka, saj z brisom zajamemo samo okrog 10% vseh mikroorganizmov, ki se nahajajo na preiskovani površini. Metoda zaradi tega ni dovolj natančna za kvantitativno določanje prisotnih mikroorganizmov, vseeno pa nam nudi koristne informacije o obsegu njihove prisotnosti (17).

Brise smo jemali pred delom in po delu, pri čemer smo večino vzorcev odvzeli po delu. Zaradi narave samega dela, med katerim smo velikokrat čakali na potrditev terapije s strani zdravnikov, smo zaradi večje učinkovitosti brise »po delu« odvzeli po zaključenem segmentu dela, ko je delo potekalo že vsaj eno uro in ne po zaključku vsega dela tistega dne. Ker je šlo za delo v aseptičnih pogojih, je bila ključnega pomena sama tehnika odvzema, ki je morala zagotavljati, da med samim vzorčenjem ni prišlo do kontaminacije. Pred vsakim odvzemom brisov smo si sterilne rokavice prebrisali z alkoholnim robcem, zraven rokavic pa smo nosili tudi kirurško pokrivalo, plašč in polmasko s filtrom za delce. Brise smo v skladu z internimi navodili IMI za odvzem brisov (18) odvzeli tako, da smo epruveto s palčko odprli šele v BV komori in odvečno tekočino iztisnili z lahkim pritiskom ob notranjo steno epruvete. Nato smo med neprestanim vrtenjem palčke odvzeli bris s površine, velike približno 20 cm² tako, da smo v navpično smer s cikcak gibanjem naredili vsaj 3 linije, v vodoravno smer pa vsaj dve liniji. Tako smo jemali brise z delovnih površin in večjih površin vsebnikov (npr. signature). Površino prebodnega dela mini-spika in prebodne gume na vsebnikih smo vzorčili tako, da smo s palčko med neprestanim vrtenjem prebrisali celotno površino prebodnega dela mini-spika oziroma prebodnega mesta. Jemali smo tudi brise rokavic, pri čemer smo se posebej osredotočili na odvzem brisa s področja palca, kazalca in sredinca (ter med njimi), prebrisali pa smo tudi površino dlani s cikcak

gibanjem v navpični smeri vsaj 3x in v vodoravni smeri vsaj 2x. Ves čas odvzema brisov smo palčko vrteli. Vsak vzorec smo označili z zaporedno številko in si zabeležili tudi čas odvzema brisov. Po zaključenem delu smo brise v hladilni torbi prenesli na IMI, kjer so brise testirali na prisotnost bakterij. Pri tem smo pazili, da so bili brisi vedno postavljeni v navpični položaj, s čemer smo preprečili razlitje tekočine iz epruvet brisov.

3.5. NADZOR MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI ZRAKA

ISO standardi omenjajo dve vrsti metod za nadzor mikrobiološke kakovosti zraka – pasivne in aktivne metode. Mikroorganizmi se v zraku običajno ne nahajajo kot samostojne celice, ampak so pritrjeni na neviabilne delce, ki so običajno večji od velikosti 10 μm (4).

Pri aktivni metodi vzorčenja vzorčevalnik zraka zajame znan volumen zraka in ga presesa na gojišče (trdno ali tekoče) ali nitrocelulozno membrano. Pri tem dobimo tako kvantitativen rezultat (merjen v CFU/ m^3 zraka), kot tudi kvalitativen rezultat o vrstah prisotnih mikroorganizmov (19).

Poznamo različne tipe presesalnikov za aktivno vzorčenje zraka, pri njihovem izboru pa moramo upoštevati številne faktorje, kot so vrsta in velikost določevanih viabilnih delcev, občutljivost delcev na proces vzorčenja, pričakovana koncentracija delcev, vrsta gojišča, sposobnost presesalca za zaznavo visokih in nizkih nivojev biokontaminacije, pogoji v preiskovanem prostoru, motnja zračnega toka, ki jo presesalec povzroči in različne druge lastnosti presesalca. Bistvena lastnost vsakega presesalca za zrak je ta, da njegov izpust ne kontaminira okolja, v katerem vzorčimo in da ne dopušča ponovnega presesavanja zraka iz izpusta. Pomembni lastnosti sta tudi fizična in biološka učinkovitost presesalca. Fizična učinkovitost pomeni sposobnost vzorčevalca, da zajame delce različnih velikosti, biološka učinkovitost pa pomeni njegovo sposobnost zajetja delcev, na katerih se nahajajo mikrobi. Material in zgradba vzorčevalnika morata omogočati enostavno dezinfekcijo in sterilizacijo (20).

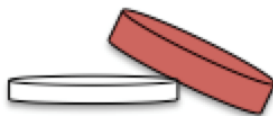
Pasivna metoda vzorčenja oziroma sedimentacijska metoda je metoda, pri kateri izkoriščamo silo gravitacije, zaradi katere se delci (med katerimi so tudi viabilni delci) usedajo na petrijevko s sterilnim gojiščem. Petrijevke pri tej metodi izpostavimo za vnaprej določen čas, ki je lahko dolg od 30 minut pa vse dokler še lahko zagotovimo integriteto medija, kar praviloma pomeni do 4 ure (16). Tudi ta metoda je ustrezna in ima dolgo

zgodovino uporabe, vendar bi jo lahko zamenjali z volumetrično metodo, ki je v čistih prostorih, kjer se nahaja majhno število mikroorganizmov, bolj učinkovita (21).

Vse tipe agarjev, ki smo jih uporabili, so pripravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer smo jih na dan vzorčenja prevzeli in jih po končanem vzorčenju oddali na mikrobiološko analizo.

3.5.1. Sedimentacijska metoda

Sedimentacijsko metodo smo izvedli v skladu z internimi navodili IMI (18). Petrijevko s krvnim agarjem smo odprli na mestu vzorčenja in jo postavili tako, da smo spodnji del petrijevke z agarjem naslonili na njen pokrov pod kotom 45 stopinj, kar prikazuje slika 5.



Slika 5: Shematski prikaz izpostavitve agarja

Pri prvih štirih vzorčenjih smo agarje pustili izpostavljene 1 uro, nato pa smo ta čas podaljšali na 2 uri. Pri prvem vzorčenju smo uporabili samo tri agarje, ki smo jih izpostavili na levi in desni strani BV komore ter na delovnem pultu, ki se (glede na tekstilno pregrado) nahaja na isti strani predprostora kot BV komora, pri vseh ostalih vzorčenjih pa smo dodali še eno mesto vzorčenja, in sicer smo dodatni agar izpostavili na vrhu hladilnika, ki se nahaja na drugi strani predprostora kot BVK. Mesta izpostavitve agarjev prikazujejo preglednice V., VI. in VII. Agarje smo po končanem vzorčenju ovili s parafilmom in jih v hladilni torbi prenesli na IMI, kjer so izvedli testiranje vzorcev na prisotnost mikroorganizmov.

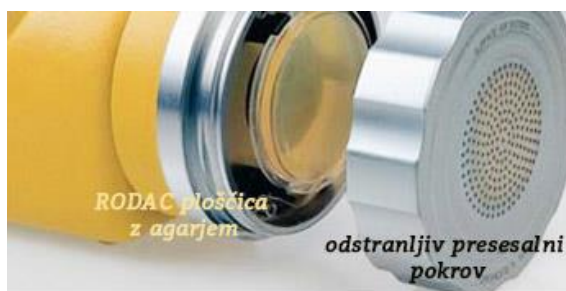
3.5.2. Volumetrična metoda

Nadzor mikrobiološke kakovosti zraka smo izvedli tudi s pomočjo aktivne (volumetrične) metode. Pri tej metodi smo z uporabo posebej za to namenjenega vzorčevalnika presesali 1 m³ zraka na RODAC ploščice s tremi različnimi vrstami agarjev – krvni agar, SABORAUD agar in agar DG18.

Delo je potekalo v skladu z navodili za uporabo aktivnega vzorčevalnika (22). Z vzorčevalnika smo najprej odvili presesalni pokrov in pod njega namestili RODAC ploščico z agarjem. Pokrov smo namestili nazaj, nato smo aparat vklopili in presesali 1 m³ zraka v predprostoru. Zatem smo ponovno odvili pokrov, zaprli in odstranili ploščico z agarjem ter jo ovili s parafilmom. Postopek smo nato ponovili še z drugima dvema vrstama agarjev. Po končanem delu smo agarje v hladilni torbi prenesli na mikrobiološki inštitut, kjer so izvedli testiranje dobljenih vzorcev na bakterije in glive.

Uporabljeni materiali:

- **Presesalec za zrak tip SAS Super ISO 180** – presesalec za volumetrični nadzor mikrobiološke kakovosti zraka, ki v minuti prečrpa 180 litrov zraka (22). Presesalec deluje tako, da pri konstantni hitrosti in predhodno nastavljenem času skozi majhne luknjice na pokrovu presesa zrak iz prostora neposredno na površino agarja. Pri tem se ustvari laminarni tok zraka. Po končanem vzorčenju agar odstranimo in inkubiramo. Sestavo presesalca za zrak prikazuje slika 6.



Slika 6: Prikaz sestave vzorčevalnika SAS Super ISO 180

(preurejeno po viru: <http://sapvalidation.com/equipment/pbi-air-sampler/accessories/>)

- **Krvni agar** – neselektivno gojišče, na katerem uspevajo bakterije in glive; agar pred uporabo avtoklavirajo (15 minut pri 121°C). Shranjujemo ga v hladilniku pri 2 – 8 °C, uporaben pa je 2 do 4 tedne. Njegovo sestavo prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Sestava krvnega agarja (podatki z IMI)

SESTAVA	KOLIČINA
Osnova za krvni agar, BBL 211037	40 g
Destilirana voda	1000 ml
Defibrinirana ovčja kri	50 ml

- **Agar SABORAUD** – selektivno gojišče, na katerem uspevajo nekatere vrste gliv (zlasti dermatofiti) (23). Agar pred uporabo avtoklavirajo 15 minut pri temperaturi 121°C. Shranjujemo ga v hladilniku pri 2 – 8°C, uporaben pa je 2 do 4 tedne. Sestavo agarja prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Sestava agarja SABORAUD (podatki z IMI)

SESTAVA	ZATEHTA
Neopepton, BD 211681	10 g
Dekstroza, BD 215530	40 g
Agar-agar, Merck, 1.01614.1000	19 g
Mlečna kislina, Kemika 1316601	2 – 3 kapljice
Destilirana voda	1000 ml

- **Agar DG 18 (Dichloran glycerol agar)** – selektivno gojišče, na katerem uspevajo nekatere vrste gliv. Agar pred uporabo avtoklavirajo 15 minut pri temperaturi 121°C. Shranjujemo ga v hladilniku pri 2 – 8°C, uporaben pa je 1 teden. Njegovo sestavo prikazuje preglednica X.

Preglednica X: Sestava in priprava agarja DG18 (podatki z IMI)

SESTAVA	ZATEHTA
Pepton, BD 211 677	5 g
Glukoza, BD 215530	10 g
Kalijev dihidrogen fosfat - KH_2PO_4 , Merck, 1.04873.0250	1 g
Magnezijev sulfat heptahidrat – $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, Merck, 4.115158	0,5 g
Glicerol, Merck, 1.04092.1000	220 g
Agar-agar, Merck, 1.01614.1000	15 g
Destilirana voda	1000 ml
Kloramfenikol, 100 mg/ml	1 ml
2,6-dikloro-4-nitroanilin (dichloran), 0,2%	1 ml

3.6. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Za statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo uporabljali računalniški program SPSS, pri čemer smo iskali statistično pomembne razlike med dvema kategoričnima spremenljivkama. Za obdelavo podatkov smo rezultate najprej strnili v 2x2 kontingenčne tabele. V večini primerov smo med seboj primerjali dve neodvisni spremenljivki, zato smo za statistično obdelavo uporabili Pearsonov Chi-kvadrat test z Yatesovo korekturo. To korekturo uporabimo pri 2x2 kontingenčnih tabelah, saj z njo odpravimo preveliko oceno, ki nam jo poda sam Pearsonov Chi-kvadrat test. Ta statistični test temelji na primerjavi opazovanih frekvenc s pričakovanimi in je primerna za večje vzorce. V primerih, ko so bili vzorci majhni in so bile pričakovane frekvence manjše od pet, smo za statistično obdelavo uporabili Fisherjev natančni test (24). V določenih primerih smo med seboj primerjali tudi dve odvisni spremenljivki v dveh različnih časovnih obdobjih. Takrat smo za obdelavo uporabili McNemarjev test. V vseh primerih smo z dvostransko stopnjo tveganja 5% izračunali vrednost p . Kadar je ta vrednost manjša od 0,05 pomeni, da med spremenljivkama obstajajo statistično pomembne razlike, kadar pa je večja od 0,05 pa pomeni, da statistično pomembnih razlik med spremenljivkama ni.

Delež pozitivnih vzorcev smo podali tudi v obliki 95% intervala zaupanja (95% IZ).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. VREDNOTENJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI STERILNIH ROKAVIC

4.1.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih z rokavic osebe, ki pripravlja zdravila v biološko varni komori

Tekom eksperimentalnega dela smo vzorčili rokavice pripravljavca zdravil, ki celoten proces priprave izvaja v BV komori. Skupno smo odvzeli 26 brisov rokavic, od tega 13 levih in 13 desnih rokavic po zaključenem delu oziroma segmentu dela. S tem smo poskrbeli, da je bila v tem času izpeljana že večina aktivnosti, ki bi potencialno lahko povzročile mikrobiološko kontaminacijo. Vzorčenja pred pričetkom dela nismo izvajali, saj smo pri delu uporabljali sterilne rokavice, katerih sterilnost zagotavlja proizvajalec. Zaradi tega smo predpostavili, da so bile vse rokavice pred začetkom dela sterilne. Med svojim delom si pripravljavec zdravil občasno (vsaj enkrat na vsake pol ure) prebriše roke z alkoholnim robcem. Vzorčili smo neodvisno od tega, ali si je pred odvzemom vzorca tehnik prebrisal roke ali ne, saj nas je zanimalo dejansko stanje med samo pripravo zdravil, kot ta poteka, neodvisno od tega, če je v prostoru prisotna oseba, ki nadzoruje možno kontaminacijo ali ne. Pri vzorčenju smo uporabljali brise, ki vsebujejo deaktivator razkužila, s čemer smo zagotovili, da prisotnost razkužila, s katerim si je pripravljavec zdravil prebrisal rokavice, na brisu ni uničila morebitnih bakterij, ki smo jih z brisom zajeli. Rezultate prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti rokavic pripravljavca zdravil

ROKAVICA OSEBE, KI PRIPRAVLJA ZDRAVILA	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	PRISOTNE BAKTERIJE (glede na izvor)	ŠTEVILO VZORCEV, V KATERIH SO BAKTERIJE PRISOTNE	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV (glede na število pozitivnih)
LEVA	13	2	15,4%	Bakterije normalne flore	0	0%
				Bakterije iz okolja	2	100%
DESNA	13	2	15,4%	Bakterije normalne flore	2	100%
				Bakterije iz okolja	0	0%
OBE	26	4	15,4%	Bakterije normalne flore	2	50%
				Bakterije iz okolja	2	50%

Delež pozitivnih rezultatov vzorčenja rokavic pripravljavca zdravil znaša 15,4% (95% IZ: 1,5% - 29,3%). Iz zgornje preglednice je razvidno, da sta odstotka pozitivnih vzorcev odvzetih z leve in desne rokavice enaka. Ker sta v obeh primerih enaki tudi absolutni števili odvzetih in pozitivnih vzorcev, nadaljnja statistična obdelava ni bila potrebna. Iz rezultatov sklepamo, da lahko zaradi načina priprave zdravil pri samem postopku pride do kontaminacije sterilnih rokavic, ki jih nosi pripravljavec. Obe rokavici sta bili pozitivni v 15,4%, oziroma v dveh primerih od trinajstih.

V pozitivnih vzorcih, odvzetih z leve rokavice, smo odkrili izključno bakterijske vrste, ki izvirajo iz okolja (*Brevundimonas diminuta*, *Rhizobium (agrobacterium) radiobacter*), v pozitivnih vzorcih, odvzetih z desne rokavice, pa izključno bakterijske vrste normalne flore kože (*Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis* in *Staphylococcus capitis*). Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da je možen vir kontaminacije tako okolje, kot tudi pripravljavec zdravil oziroma osebe, ki so v prostoru prisotne zraven pripravljavca.

Izmed okoljskih dejavnikov so pomembne površine vsebnikov in materialov, s katerimi pripravljavec rokuje. Farmacevtski tehnik (pripravljavec) na tem oddelku rokuje z biološkimi zdravili, ki so praviloma shranjena v majhnih steklenih vialah, katerih površino

skoraj v celoti prekriva signatura. Priprava teh zdravil je zahtevnejša in praviloma zahteva tudi vrtenje vial okrog lastne osi z namenom povečanja hitrosti raztapljanja zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi. Pri tem se pripravljavec dalj časa dotika signature, ki predstavlja pogost vir mikrobiološke kontaminacije, saj jo je težko dezinficirati. Eden izmed razlogov za to je njihovo odstopanje ob stiku z vlago in razkritje adhezivnega dela, ki ni izpostavljen prebrisovanju z razkužilnimi robci, problematični pa so tudi robovi nalepljenih signatur, ki predstavljajo mesto, na katerem se pogosto zadržujejo mikroorganizmi in jih je težko dezinficirati (4).

Pri opazovanju dela farmacevtskega tehnika, ki pripravlja zdravila, smo opazili, da z levo roko občasno sega iz BV komore, saj sta zunaj nje postavljena koša za odpadke, v katere sproti meče odpadne embalaže brizg, igel, mini-spikov in ostale nenevarne odpadne materiale. To počne vedno z levo roko, saj sta tudi koša postavljena na levi strani, kar bi lahko pomenilo vir kontaminacije leve rokavice z okoljskimi bakterijskimi vrstami.

Iz preglednice je razvidno, da del izoliranih bakterij izvira tudi z normalne flore. Možen razlog je neposredna kontaminacija rokavic z bakterijami normalne flore kože pripravljavca zaradi nepravilne tehnike ali nepazljivega nadenja rokavic, možna pa je tudi posredna (sekundarna) kontaminacija s kontaminiranih površin, s katerimi so bile pripravljavčeve rokavice v stiku.

Mikrobiološko kakovost bi lahko izboljšali z uporabo kombinacije več razkuževalnih tehnik, pri čemer bi ohranili prebrisovanje z alkoholnimi robci, dodali pa bi še škropljenje z dezinficiensom (17). Seganje farmacevtskega tehnika iz BV komore bi moralo vedno biti zelo počasno in redko, saj je v nasprotnem primeru možna tvorba vrtincev, ki lahko v najslabšem primeru omogočijo vstop zraka iz predprostora v BV komoro. Iz istega razloga je pomembno tudi počasno in kontrolirano premikanje pripravljavca zdravil skozi ves čas priprave (4). Prebrisovanje rokavic z alkoholnimi robci bi lahko potekalo še pogosteje in vsakič po seganju izven čistega prostora.

4.1.2. Vrednotenje vpliva papirnate embalaže na mikrobiološko kakovost rokavic

Ena izmed kritičnih točk razkuževanja je tudi zunanost embalaže, v kateri so shranjeni sterilni pripomočki za delo in je vsaj delno papirnata. Takšne so na primer embalaže, v katerih so sterilne brizge, igle in mini-spiki. V raziskavi (M. G. Cockcroft, D. Hepworth, J.

C. Rhodes in drugi, 17) so z nadzorom mikrobiološke kakovosti teh embalaž v več aseptičnih enotah bolnišničnih lekarn ugotovili, da je bilo pozitivnih 5 izmed 9 testiranih embalaž brizg in 1 izmed 3 testiranih embalaž igel (17). Iz tega razloga smo tekom eksperimentalnega dela opazovali tudi vpliv prebrisovanja rok z alkoholnimi robci na mikrobiološko kakovost brisov rokavic pripravljavca zdravil, po rokovanju z embalažo z brizgo, ki ima eno stranico papirnato. Odvzeli smo po 4 brise leve in 4 brise desne roke neposredno po odprtju te embalaže ter vzorčenje ponovili še po prebrisovanju rokavic z alkoholnimi robci. Rezultate testiranja prikazuje preglednica XII.

Preglednica XII: Vpliv papirnat embalaže na mikrobiološko kontaminacijo rokavic

ROKAVICE PRIPRAVLJAVCA ZDRAVIL (po rokovanju s papirnato embalažo)	PRED PREBRISOVANJEM Z ALKOHOLNIMI ROBCI KLERWIPE			PO PREBRISOVANJU Z ALKOHOLNIMI ROBCI KLERWIPE		
	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV
LEVA	4	1	25%	4	0	0%
DESNA	4	0	0%	4	1	25%
SKUPAJ	8	1	12,5%	8	1	12,5%

Iz rezultatov lahko razberemo, da je kontaminacija rokavic po rokovanju z delno papirnato embalažo prisotna v 12,5% primerov, ne glede na prebrisovanje z alkoholnimi robci, a iz tega ne moremo sklepati, da prebrisovanje ne zmanjša kontaminacije, saj je bil preiskovan vzorec zelo majhen. Kljub majhnosti vzorca pa lahko iz rezultatov razberemo, da je bil v enem primeru pred prebrisovanjem z razkužilnimi robci pozitiven vzorec, odvzet z leve rokavice, v enem primeru po prebrisovanju pa vzorec, odvzet z desne rokavice. Do tega bi lahko prišlo zato, ker je pripravljavec zdravil pri razkuževanju obeh rok uporabil isti robec. Pri tem obstaja možnost rekontaminacije, torej prenosa bakterij z leve roke na desno, saj smo takšne rezultate dobili pri brisih, ki smo jih odvzeli neposredno drugega za drugim, torej enega takoj po odprtju embalaže, naslednjega pa po prebrisovanju rok. Na obeh brisih je bila prisotna bakterijska vrsta *Staphylococcus epidermidis* v količini 50 CFU/dm². Zaradi možnosti prenosa mikroorganizmov, ki se mehansko ujamejo v razkužilni robec, na drugo trdno površino (rekontaminacija) je priporočljivo, da se za vsak poteg robca med samo dezinfekcijo uporabi drug del robca in da se potegi med seboj delno prekrivajo (4).

Drug možen razlog za tak rezultat pa je tudi ta, da v pri vzorčenju nismo prebrisali istih mest, saj je površina, ki jo s posameznim brisom zajamemo, relativno majhna glede na površino rokavice in zato ni nujno, da med vzorčenjem vedno zajamemo ista mesta (17).

4.1.3. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih z rokavic osebe, ki asistira pripravljavcu zdravil

Tekom eksperimentalnega dela smo brise jemali tudi z rokavic magistra farmacije, ki nadzoruje pripravo zdravil in asistira farmacevtskemu tehniku, ki zdravila pripravlja. Odvzeli smo skupno 25 brisov, od tega 12 brisov leve in 13 desne rokavice. Rezultate prikazuje preglednica XIII.

Preglednica XIII: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kontaminacije rokavic osebe, ki asistira pripravljavcu zdravil

ROKAVICA OSEBE, KI ASISTIRA	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	PRISOTNE BAKTERIJE (glede na izvor)
LEVA	12	1	8,3%	Bakterije normalne flore
DESNA	13	1	7,7%	
SKUPAJ	25	2	8,0%	

Delež pozitivnih rezultatov mikrobiološkega testiranja vzorcev, odvzetih z obeh rokavic osebe, ki asistira pripravljavcu zdravil, znaša 8,0% (95% IZ: 0% - 18,6%).

Čeprav magister farmacije vse aktivnosti izvaja v nekontroliranem okolju, bakterijskih vrst, ki izvirajo iz okolja nismo odkrili. V obeh pozitivnih vzorcih se je pojavila bakterijska vrsta normalne flore kože, *Staphylococcus epidermidis*. Med delom si magister redno prebrisa rokavice z robci, impregniranimi z alkoholom, ki pa proti bakterijam rodu *Staphylococcus* niso vedno učinkoviti (17). Mikrobiološko kakovost bi tako lahko izboljšali z uporabo kombinacije razkuževalnih tehnik, na primer kombinacijo prebrisoavanja in škropljenja z dezinficiensom ali kombinacija teh dveh tehnik v obratnem časovnem zaporedju (17). Takšna metoda bi ohranila učinkovitost proti bakterijskim vrstam, ki izvirajo iz okolja in povečala učinkovitost proti bakterijam normalne flore.

4.2. VREDNOTENJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI DELOVNIH POVRŠIN

4.2.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti brisov, odvzetih z različnih odsekov delovnih površin po delu

Preučevali smo mikrobiološko kakovost delovnih površin. Brise delovnih površin smo jemali v BVK po delu. Mesta odvzemov brisov, rezultate in izvor prisotnih bakterij prikazuje preglednica XIV.

Preglednica XIV: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti odsekov delovne površine znotraj biološko varne komore

ODSEK DELOVNE POVRŠINE, NA KATEREM SMO VZORČILI	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	PRISOTNE BAKTERIJE (glede na izvor)	ŠTEVILO VZORCEV, V KATERIH SO BAKTERIJE PRISOTNE	ODSTOTEK VZORCEV, V KATERIH SO BAKTERIJE PRISOTNE
SREDINA BVK	13	2	15,4%	Bakterije normalne flore	1	7,7%
				Bakterije iz okolja	1	7,7%
NOTRANJI ROB BVK, DESNO ZADAJ	13	1	7,7%	Bakterije normalne flore	1	7,7%
				Bakterije iz okolja	1	7,7%
NOTRANJI ROB BVK, DESNO SPREDAJ	13	1	7,7%	Bakterije normalne flore	1	7,7%
				Bakterije iz okolja	0	0%
REŠETO, SREDINA SPREDAJ	12	1	8,3%	Bakterije normalne flore	0	0%
				Bakterije iz okolja	1	8,3%

Bakterije normalne flore, ki smo jih odkrili v vzorcih, odvzetih z površin po delu so bodisi del normalne flore kože (*S. Epidermidis*), zgornjih dihal (*Neisseria perflava*, *Neisseria*

flavescens) ali ustne votline (*Streptococcus mitis*). Iz preglednice je razvidno, da so bakterije normalne flore in bakterije iz okolja prisotne v približno enakem odstotku vzorcev. Iz rezultatov vzorčenj lahko sklepamo, da se določen del bakterij normalne flore lahko prenese s pripravljavca zdravil na delovno površino kljub uporabi vse potrebne zaščitne opreme, možen pa je tudi vstop bakterij iz nekontroliranega okolja v BV komoro.

4.2.2. Primerjava rezultatov nadzora mikrobiološke kakovosti vzorcev, odvzetih s sredine BVK pred in po delu

Večina priprave zdravil poteka na sterilni podlogi, položeni na sredino BV komore. Ker je sredina BV komore prostor, kjer se zdravilo nahaja največ časa in kjer poteka tudi prebadanje prebodne gume vial, ki lahko potencialno omogoči vnos mikroorganizmov v sam pripravek, smo vzorce jemali tudi na tem področju. Vzorčili smo pod sterilno podlogo pred pričetkom dela in po delu. Rezultate mikrobioloških testiranj smo vpisali v preglednico XV.

Preglednica XV: Rezultati vrednotenja mikrobiološke sredine biološko varne komore pred in po delu

	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV PO DELU	ŠTEVILO NEGATIVNIH VZORCEV PO DELU
ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV PRED DELOM	0	1
ŠTEVILO NEGATIVNIH VZORCEV PRED DELOM	2	10

Rezultate smo statistično obdelali z uporabo programa SPSS (McNemarjev test, $p = 1,000$). Ugotovili smo, da med frekvencama kontaminiranih vzorcev, odvzetih s sredine LAF komore pred začetkom in po zaključku dela, ni statistično značilnih razlik.

Kljub temu lahko iz tabele razberemo, da je v 15,4% primerov oziroma v dveh primerih izmed skupno trinajstih, med delom prišlo do kontaminacije delovne površine. Da do te kontaminacije ne bi prišlo, je zelo pomembno, da so vsi predmeti, ki jih postavimo v BVK, sterilni in da so sterilne tudi rokavice pripravljavca zdravil, saj na tak način preprečimo sekundarno kontaminacijo površine.

V enem primeru je bil kontaminiran tudi vzorec, odvzet s površine pred pričetkom dela. Temu bi se lahko izognili tako, da bi celotno površino BV komore pred pričetkom dela

natančno prebrisali v skladu z navodili SOP za čiščenje brezprašnih komor. Delovne površine v skladu s SOP-jem prebrisujemo od leve proti desni in od zgoraj navzdol. Čistimo jih vsak dan, in sicer med samim procesom dela in po vsakem končanem delu oziroma pred vsako izdelavo novega pripravka. Po zaključenem delu bi morali dvigniti delovne plošče v komori in jih prebrisati z obeh strani s sterilnimi zloženci, namočenimi v redestilirani vodi in nato še s sterilnimi zloženci, ki smo jih namočili v 70% sterilni alkohol. Na enak način bi morali prebrisati še notranje stranske stene in dno brezprašne komore. Delovne površine bi nato prebrisali še s sterilnimi etanolnimi brezprašnimi krpicami. Zraven dnevnega čiščenja je potrebno enkrat tedensko komoro očistiti tudi s sterilnim biocidom, enkrat mesečno pa bi morali generalno očistiti celoten prostor, vključno s komoro. Ta SOP velja za čiščenje aseptičnih prostorov, v katerih je postavljena brezprašna komora Iskra Pio, saj lahko le s pravilnim čiščenjem in vzdrževanjem komore zagotovimo njeno pravilno delovanje (25).

Čeprav prostor, v katerem stoji BV komora na oddelku, ne sodi med čiste prostore, bi z istim načinom čiščenja lahko zmanjšali možnost kontaminacije. Za zmanjšanje možnosti vstopa delcev in mikroorganizmov iz nekvalificiranega predprostora v komoro je pomembno tudi, da je ta neprestano prižgana oziroma da se, v kolikor je ugasnjena, vklopi vsaj 30 minut pred začetkom dela (da se vzpostavi laminarni pretok) in se pred pričetkom dela temeljito očisti (26).

4.3. PREUČEVANJE POVEZAVE MED MIKROBIOLOŠKO KAKOVOSTJO VZORCEV, ODVZETIH Z ROKAVIC PRIPRAVLJAVCA ZDRAVIL IN DELOVNIH POVRŠIN

Preučevali smo povezavo med mikrobiološko kontaminacijo rokavic osebe, ki dela v BVK in delovnih površin v BVK. V enem izmed petih pozitivnih vzorcev površin je prišlo do pojava, ko se je na vzorcu, odvzetem na določenem odseku površine, pojavila ista vrsta bakterije normalne flore, kot na vzorcu, ki je bil tekom istega vzorčenja odvzet z rokavic osebe, ki dela v BV komori (*S. epidermidis*). V enem primeru se je na obeh mestih vzorčenja pojavila ista bakterijska vrsta, ki izvira iz okolja (*Rhizobium (agrobacterium) radiobacter*). V enem primeru so bili kontaminirani vzorci, odvzeti z obeh površin, vendar so bile bakterijske vrste, ki so se pojavile v posameznih vzorcih, različne. V istem primeru so se na sredini BV komore pojavile bakterije rodu *Lactococcus spp.*, ki so zelo pogoste v

okolju in niso del normalne flore. V dveh vzorčenjih so bili kontaminirani bodisi samo posamezni del površine BV komore, bodisi rokavice pripravljavca zdravil. Dobljene rezultate prikazuje preglednica XVI.

Preglednica XVI: Primerjava frekvenc kontaminiranih vzorcev, odvzetih z rokavic pripravljavca zdravil in delovnih površin v biološko varni komori

	ROKAVICE PRIPRAVLJAVCA ZDRAVIL	DELOVNE POVRŠINE V BVK
KONTAMINACIJA	4	5
NI KONTAMINACIJE	22	46

Ugotavljali smo, ali med vzorci, ki so odvzeti s površin in tistimi, ki so odvzeti z rokavic, obstajajo statistično pomembne razlike. S statističnim programom SPSS (Fisherjev natančni test, $p = 0,477$) smo ugotovili, da razlike v frekvenci kontaminiranih vzorcev niso statistično značilne.

4.4. VREDNOTENJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI BRISOV, ODVZETIH S POVRŠIN VSEBNIKOV

4.4.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti signatur, prebodnih gum vsebnikov ter prebodnih delov mini-spikov

Vsi materiali za uporabo v aseptični pripravi zdravil morajo biti dezinficirani in v čisti prostor prinešeni skozi sistem zrakotesnih loput (17). Na oddelku te možnosti ni, zato se materiali dezinficirajo v nečistem prostoru, iz katerega se neposredno po dezinfekciji prenesejo v BV komoro, kar pomeni večjo možnost kontaminacije v primerjavi s proizvodnjo v aseptičnih enotah bolnišnic ali v industriji.

Vsebniki in materiali za uporabo v aseptični pripravi zdravil se praviloma shranjujejo v relativno čistih pogojih. Vseeno pa lahko med njihovim shranjevanjem pride do kontaminacije. Pomemben potencialen vir kontaminacije so vialne s »flip off« pokrovčki, ki ne zagotavljajo sterilnosti prebodne gume, ki se nahaja pod njimi. Njihov vnos brez predhodnega snetja pokrovčka in dezinfekcije površine prebodne gume, ki se nahaja pod njim, pomeni možen vir kontaminacije (17). Te vialne se uporabljajo na oddelku, vendar se

temu načinu kontaminacije izognejo tako, da pred vnosom vial v BV komoro magister farmacije sname pokrovček in z alkoholnim robcem natančno prebriše prebodno gumo, ki se pri tem odkrije. Šele nato vialo postavi v komoro. Tehniko bi lahko še izboljšali tako, da bi pred vnosom vial v komoro uvedli kombinacijsko tehniko razkuževanja ter uvedli dodatno prebrisovanje z alkoholnim robcem tik pred prebodom gume z iglo ali mini-spikom, pri čemer bi počakali le toliko, da alkohol izhlapi (17).

Veliko možnost vnosa mikroorganizmov v BV komoro predstavljajo tudi signature, ki prekrivajo večji del vial. Pri prebrisovanju z alkoholnimi robci lahko pride do njihovega odstopanja, pri čemer se lahko razkrije del, ki ni bil prebrisan, težko razkužljivo mesto pa predstavljajo tudi njihovi robovi, na katerih se pogosto zadržujejo mikroorganizmi (4).

Vzorci smo jemali s površin vial z zdravili, ki so prekrite s signaturami, prebodne gume in konice mini-spikov po končanem delu. Ob vsakem vzorčenju smo odvzeli brisa signatur dveh različnih vial, brisa prebodnih gum dveh vial in en bris mini-spika. Po vzorčenju smo prebrisane materiale zavrgli. Mesta vzorčenj prikazuje slika 7.



Slika 7: Mesta odvzemov brisov na vsebnikih in mini-spikih

(preurejeno po virih <http://www.amazon.com/Braun-Mini-Spike-Dispensing-Rubber-Stoppered-Vials/dp/B002203AFI> in <http://www.rasayanika.com/product/primary-antibodies/abcam/anti-adamts6-antibody/>)

Od skupno 65 odvzetih vzorcev s površin vsebnikov in mini-spikov sta bila 2 pozitivna, kar znaša 3,1% (95% IZ: 0% - 7,3%). Dobljene rezultate prikazuje preglednica XVII.

Preglednica XVII: Rezultati testiranja mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov in spikov

DEL VIALE OZIROMA SPIKA, NA KATEREM SMO JEMALI BRISE	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	PRISOTNE BAKTERIJE (glede na izvor)	ŠTEVILO VZORCEV, V KATEREM JE PRISOTNA POSAMEZNA BAKTERIJA	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV, V KATEREM JE PRISOTNA POSAMEZNA BAKTERIJA
SIGNATURA	26	1	3,85%	Bakterije iz okolja	1	100%
PREBODNA GUMA	26	0	0,00%	/	/	/
KONICA MINI-SPIKA	13	1	7,7%	Bakterije normalne flore	1	100%

Čeprav je odstotek pozitivnih vzorcev relativno nizek, je problematičen pozitiven rezultat s prebodnega dela mini-spika, ki sega v samo vialo z zdravilom in zato predstavlja veliko tveganje za kontaminacijo pripravka. V tem vzorcu smo odkrili bakterijsko vrsto normalne flore (*S. epidermidis*), zato obstaja možnost, da je prišlo do njenega prenosa z rokavic pripravljalca zdravil na mini-spika. Pomembno je, da se konica mini-spika pred prebodom zapornika vial ne dotakne nobene površine, saj bi lahko pri tem prišlo do njene kontaminacije. Pozitiven je tudi vzorec, odvzet s signature, ki predstavlja težko razkužljivo površino. Na njem smo odkrili bakterijsko vrsto, ki izvira iz okolja (*B. cereus*) .

4.4.2. Preučevanje medsebojnega vpliva kontaminacije rokavic osebe, ki rokuje z vsebniki in kontaminacije površin vsebnikov

Primerjali smo obstoj povezave med kontaminacijo površin vsebnikov in rokavic oseb, ki z vsebniki tekom priprave zdravil rokujejo. Rezultate testiranj prikazuje preglednica XVIII.

Preglednica XVIII: Primerjava rezultatov testiranja mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov in rokavic

	ROKAVICE	VSEBNIKI
FREKVENCA POZITIVNIH VZORCEV	6	2
FREKVENCA NEGATIVNIH VZORCEV	45	63

Rezultate smo statistično obdelali s programom SPSS (Fisherjev natančni test, $p = 0,136$). Razlike v frekvenci prisotne kontaminacije niso statistično značilne. Vseeno pa je lahko prišlo do prenosa bakterij normalne flore (*S. epidermidis*) z rokavic pripravljavca zdravil na mini-spike, zato je pri rokovanju s sterilnimi materiali potrebno skrbno paziti, da ne pride do dotikanja površin, ki segajo v pripravek.

4.4.3. Primerjava mikrobioloških kakovosti površin vsebnikov, s katerimi rokujejo na KO za revmatologijo in na KOAIT

Dobljene rezultate mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov smo primerjali z mikrobiološko kakovostjo enakih površin vsebnikov (signatura, prebodna guma) in mini-spikov na Oddelku za intenzivno terapijo Kliničnega oddelka za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok, kjer priprava zdravil poteka v nekontroliranem okolju bolniških sob. Rezultate vrednotenja mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov na obeh oddelkih prikazuje preglednica XIX.

Preglednica XIX: Primerjava mikrobiološke kakovosti površin vsebnikov na KO za revmatologijo Interne klinike UKC Ljubljana in KOAIT

	KO za revmatologijo Interne klinike UKC Ljubljana			Oddelek za intenzivno terapijo KO za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok (48)		
	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV
SIGNATURA	26	1	3,8%	23	12	52,2%
PREBODNA GUMA	26	0	0%	18	2	11,1%

Iz zgornje preglednice lahko razberemo, da je delež pozitivnih vzorcev, odvzetih s signatur bistveno višji na Oddelku za intenzivno terapijo, kot na KO za revmatologijo. S statistično obdelavo rezultatov (SPSS, Pearsonov Chi-kvadrat test, $p = 0,00009$) smo ugotovili, da obstajajo statistično signifikantne razlike med mikrobiološko kontaminacijo signatur na obeh oddelkih. S tem napovednim modelom smo izračunali razmerje obetov 27,3, kar pomeni, da obstajajo približno 27-krat večji obeti za kontaminacijo signatur na Oddelku za intenzivno terapijo, kot na KO za revmatologijo. Do takšne razlike prihaja zaradi razlike v načinu priprave zdravil. Na KO za revmatologijo vse vsebnike pred pričetkom dela

magister farmacije temeljito prebriše, nadaljnjo kontaminacijo pa v veliki meri preprečuje kontrolirano okolje biološko varne komore, na Oddelku za intenzivno terapijo pa medicinska sestra, ki pripravlja zdravila, prebriše samo prebodno gumo, med delom ne nosi rokavic (ampak si roke samo razkuži), sam vsebnik pa se ves čas nahaja v nekontroliranem prostoru na pultu bolniške sobe (27).

Tudi delež mikrobiološko kontaminiranih vzorcev, odvzetih s prebodnih gum vsebnikov, je višji na Oddelku za intenzivno terapijo (preglednica XIX), vendar pri tem ni tako velike razlike, kot pri vrednotenju mikrobiološke kakovosti signatur, saj prebodno gumo tudi na tem oddelku prebrišejo z alkoholnim robcem. Po statistični obdelavi smo ugotovili, da med mikrobiološko kontaminacijo prebodnih gum vsebnikov na obeh oddelkih ni statistično pomembnih razlik (SPSS, Fisherjev natančni test, $p = 0,162$).

Mikrobiološka kakovost vsebnikov je boljša na KO za revmatologijo, kjer priprava zdravil poteka v BV komori v primerjavi z Oddelkom za intenzivno terapijo, ki te komore nima.

4.5. VREDNOTENJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI ZRAKA

4.5.1. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti zraka v biološko varni komori

Zrak v BVK smo testirali s pomočjo sedimentacijske metode (izpostavitve agarjev). Agarja smo izpostavili na desni in na levi strani komore. Na nobenem izmed osemindvajsetih izpostavljenih agarjev ni prišlo do rasti bakterij, kar pomeni, da je bila kvaliteta zraka neoporečna. Smo pa nekatere bakterijske vrste odkrili na delovnih površinah v komori (preglednica XIV), zaradi česar ne moremo izključiti možnosti vstopa bakterijskih vrst iz nekvalificiranega prostora v BVK, saj obstaja možnost, da so se bakterijske vrste iz zraka že posedle na površine in jih v zraku komore več ni bilo.

4.5.2. Vrednotenje mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranem predprostoru, v katerem se nahaja biološko varna komora

Zrak v predprostoru, v katerem se nahaja BV komora, smo testirali z dvema različnima metodama. Štirinajstkrat smo izvedli pasivno vzorčenje s sedimentacijsko metodo, pri kateri smo skupno izpostavili 28 agarjev, dvakrat pa smo izvedli še volumetrično (aktivno) metodo vzorčenja s presesavanjem. Rezultate prikazuje preglednica XX.

Preglednica XX: Rezultati mikrobiološkega nadzora zraka predprostora, v katerem stoji biološko varna komora, s sedimentacijsko in volumetrično metodo

	BAKTERIJE			GLIVE		
	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV
Sedimentacijska metoda	27	16	59,3%	27	2	7,4%
Volumetrična metoda	2	2	100%	2	2	100%

Iz preglednice XXIII lahko razberemo, da je mikrobiološka kakovost zraka v predprostoru slaba. Vanj med delom vstopajo medicinske sestre in drugo bolnišnično osebje, v njem poteka tiskanje dokumentov in delo za računalnikom, medicinske sestre v času, ko ne poteka priprava zdravil na oddelku ta prostor uporabljajo tudi v druge namene in ga prezračujejo z odpiranjem oken. V tem prostoru poteka tudi preoblačenje v sterilna oblačila, shranjevanje potrebnih materialov, tu se nahajata tudi hladilnika in klima, ki piha proti BV komori. Mikrobiološko kakovost zraka bi lahko izboljšali že z namensko uporabo prostora na oddelku samo za pripravo zdravil in omejevanjem vstopa izključno na osebje, ki zdravila pripravlja. BV komoro bi odmaknili od vrat in oken. Iz prostora bi umaknili vse nenujne stvari in tako omogočili njegovo lažje čiščenje, zagotovili pa bi tudi ločen prostor za preoblačenje v sterilna oblačila. Še boljše bi bilo celostno načrtovanje čistih prostorov, pri katerem bi tako osebje, kot tudi materiali v čisti prostor vstopali skozi sistem zračnih loput in bi se čistost okolja postopoma stopnjevala do najvišjega razreda, razreda A.

4.5.3. Primerjava rezultatov nadzora mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranem prostoru, kjer stoji biološko varna komora in zraka v komori

Zanimalo nas je, kakšna je razlika med mikrobiološko kakovostjo zraka v nekvalificiranem predprostoru, v katerem stoji BV komora in zrakom v sami komori.

Pasivna vzorčenja zraka s sedimentacijsko metodo smo izvajali štirinajstkrat. Ker je predprostor, v katerem stoji BVK od preostalega dela prostora ločen s premično tekstilno pregrado, smo se pri prvi primerjavi osredotočili samo na primerjavo mikrobiološke kakovosti zraka v delu predprostora, ki se nahaja na isti strani pregrade kot BVK ter zrakom v sami komori. Rezultate smo združili v 2x2 kontingenčno tabelo (preglednica XXI).

Preglednica XXI: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti zraka dela nekvalificiranega prostora, v katerem stoji biološko varna komora ter zraka v komori

	ZRAK DELA PREDPROSTORA NA ISTI STRANI PREGRADE, KOT JE BVK	ZRAK V BVK KOMORI
FREKVENCA POZITIVNIH VZORCEV	6	0
FREKVENCA NEGATIVNIH VZORCEV	8	14

Rezultate smo statistično obdelali s statističnim programom SPSS (Fisherjev natančni test, $p = 0,016$). Ugotovili smo, da med mikrobiološko kakovostjo zraka v predprostoru in v BV komori obstajajo statistično značilne razlike.

Primerjali smo tudi kakovost zraka v celotnem predprostoru s kakovostjo zraka v BV komori. Dobljene rezultate mikrobioloških testiranj prikazuje preglednica XXII.

Preglednica XXII: Rezultati vrednotenja mikrobiološke kakovosti zraka celotnega nekvalificiranega prostora, v katerem stoji biološko varna komora ter zraka v komori

	ZRAK V PREDPROSTORU	ZRAK V BV KOMORI
FREKVENCA POZITIVNIH VZORCEV	16	0
FREKVENCA NEGATIVNIH VZORCEV	11	28

S statistično obdelavo podatkov v programu SPSS (CHI kvadrat test, $p = 0,000006$) smo ugotovili, da so razlike med kakovostjo zraka v BV komori in kakovostjo zraka v predprostoru statistično značilne. Ker je mikrobiološka kakovost zraka v predprostoru zelo slaba (59,3% kontaminiranih vzorcev) obstaja veliko tveganje za vdor mikroorganizmov iz okoliškega prostora v komoro. To tveganje je še posebej veliko pri pogostem seganju iz BV komore in hitrem premikanju pripravljavca zdravil, saj lahko pri tem pride do tvorbe vrtincev, ki lahko segajo tudi izven BV komore in tako omogočijo vstop (potencialno kontaminiranega) zraka v LAF komoro (4).

Na mikrobiološko kakovost zraka v nekvalificiranem prostoru vpliva tudi režim odpiranja oken in vrat v prostoru. Okna so med obratovanjem BV komore sicer vedno zaprta, so pa velikokrat odprta, kadar pripravljavcev zdravil ni na oddelku. Med delom v prostor pogosto vstopajo medicinske sestre in drugo osebje, ki s tem omogoča vstop zraka iz preostalega dela bolnišnice v nekvalificiran prostor, hkrati pa tudi samo vnaša kontaminante, saj ne nosijo primerne zaščitne opreme. Za izboljšanje mikrobiološke kakovosti zraka bi zato lahko tudi omejili dostop do prostora priprave zdravil.

4.5.4. Preučevanje vpliva tekstilne pregrade na kakovost zraka v različnih delih predprostora

V nadaljevanju nas je zanimalo, v kolikšni meri prisotnost tekstilne pregrade v nekvalificiranem predprostoru izboljšuje mikrobiološko kakovost zraka v delu predprostora, ki je na isti strani pregrade kot BV komora. V nekvalificiranem prostoru, v katerem se nahaja BVK smo izpostavili dva agarja. Enega smo izpostavili v delu prostora, ki se nahaja na drugi strani tekstilne pregrade kot BVK, drugega pa smo izpostavili v delu prostora, ki se nahaja na isti strani pregrade kot komora. Dobljene rezultate mikrobioloških testiranj smo strnili v 2x2 kontingenčno tabelo (preglednica XXIII).

Preglednica XXIII: Primerjava rezultatov vrednotenja mikrobiološke kakovosti zraka v delih predprostora, ki se nahajata na različnih straneh tekstilne pregrade

	ZRAK V DELU PREDPROSTORA, KI JE NA DRUGI STRANI TEKSTILNE PREGRADE KOT BVK	ZRAK V DELU PREDPROSTORA, KI JE NA ISTI STRANI TEKSTILNE PREGRADE KOT BVK
FREKVENCA POZITIVNIH VZORCEV	9	5
FREKVENCA NEGATIVNIH VZORCEV	3	8

S statistično obdelavo dobljenih rezultatov s programom SPSS (CHI kvadrat test, $p = 0,159$) smo ugotavljali, ali med številoma kontaminiranih vzorcev na obeh straneh pregrade prihaja do statistično pomembnih razlik. Med kontaminacijo agarjev, izpostavljenih na različnih straneh tekstilne pregrade, ni statistično značilnih razlik. Pregrada torej ne vpliva na kakovost zraka v delih predprostora, na katera ju deli.

4.5.5. Primerjava mikrobiološke kakovosti zraka v prostoru priprave zdravil na KO za revmatologijo in na KOAIT

Priprava zdravil na KO za revmatologijo poteka v BV komori, medtem ko priprava zdravil na Oddelku za intenzivno terapijo poteka v bolniških sobah. Primerjali smo mikrobiološko kakovost zraka v obeh prostorih, kar prikazuje preglednica XXIV.

Preglednica XXIV: Primerjava mikrobiološke kakovosti zraka v prostoru priprave zdravil na KO za revmatologijo in na KOAIT

	KO za revmatologijo Interne klinike UKC Ljubljana			Oddelk za intenzivno terapijo KO za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok (48)		
	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV
AGARJI	28	0	0%	36	34	94,4%

Že iz preglednice je razvidno, da je odstotek kontaminiranih vzorcev zraka bistveno višji pri vzorcih, odvzetih v bolniških sobah Oddelka za intenzivno terapijo. S statistično obdelavo rezultatov (SPSS, Pearsonov Chi-kvadrat test, $p = 3,9 \cdot 10^{-13}$) smo potrdili, da med kontaminacijo vzorcev zraka odvzetih v BV komori na KO za revmatologijo in v bolniških sobah Oddelka za intenzivno terapijo, obstajajo statistično pomembne razlike.

4.5.6. Primerjava mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranih prostorih na KO za revmatologijo in na KOAIT

Primerjali smo rezultate mikrobiološkega nadzora zraka v nekvalificiranih prostorih preiskovanega oddelka (KO za revmatologijo) in Oddelka za intenzivno terapijo, ki smo ga

izvedli s sedimentacijsko (pasivno) metodo. Zanimalo nas je, ali sta mikrobiološki kakovosti zraka v nekvalificiranem predprostoru, v katerem se nahaja BV komora na KO za revmatologijo in zraka v prostoru, kjer poteka priprava zdravil na Oddelku za intenzivno terapijo, primerljivi. Rezultate mikrobiološkega nadzora prikazuje preglednica XXV.

Preglednica XXV: Primerjava mikrobiološkega nadzora zraka v nekvalificiranem prostoru na KO za revmatologijo in na KOAIT

	KO za revmatologijo Interne klinike UKC Ljubljana			Oddelk za intenzivno terapijo KO za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok (48)		
	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV	ŠTEVILO ODVZETIH VZORCEV	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	ODSTOTEK POZITIVNIH VZORCEV
AGARJI	27	16	59,3%	36	34	94,4%

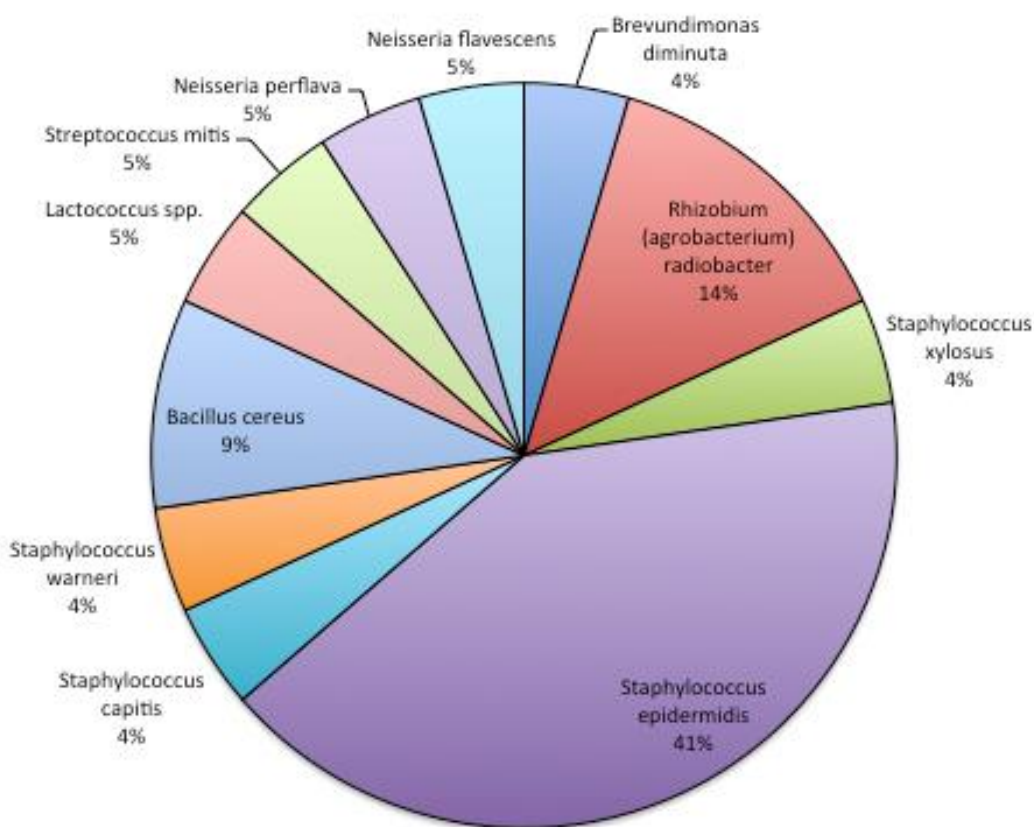
Iz preglednice je razvidno, da je delež kontaminiranih vzorcev, odvzetih s sedimentacijsko metodo visok na obeh oddelkih, vendar je bistveno višji na Oddelku za intenzivno terapijo. To smo potrdili tudi s statistično obdelavo rezultatov (SPSS, Pearsonov Chi-kvadrat test, $p = 0,002$), s katero smo ugotovili, da med mikrobiološko kakovostjo zraka na KO za revmatologijo in Oddelku za intenzivno terapijo obstajajo statistično pomembne razlike. Z napovednim testom smo ugotovili, da je razmerje obetov 11,7, kar pomeni, da je na Oddelku za intenzivno terapijo 11,7 krat večji obet za kontaminacijo zraka, kot na KO za revmatologijo.

Na Oddelku za intenzivno terapijo poteka priprava zdravil v bolniških sobah, zaradi česar je razumljivo, da je v njih veliko večja vsebnost kontaminantov. Tudi mikrobiološka kakovost zraka na KO za revmatologijo ni dobra, saj prostor, v katerem se nahaja BV komora ni čist.

4.6. POJAVNOST BAKTERIJ IN GLIV V VZORCIH

4.6.1. Pojavnost bakterijskih vrst na brisih površin

Tekom vseh vzorčenj smo odvzeli skupno 208 brisov. V pozitivnih vzorcih so se pojavile tako bakterije normalne flore kot tudi bakterije, ki izvirajo iz okolja. Nekatere lastnosti izoliranih bakterij prikazuje priloga 1. Izmed vseh odvzetih brisov je bilo pozitivnih 17, torej 8,2% brisov. Pojavnost izoliranih bakterij v pozitivnih brisih prikazuje slika 8.

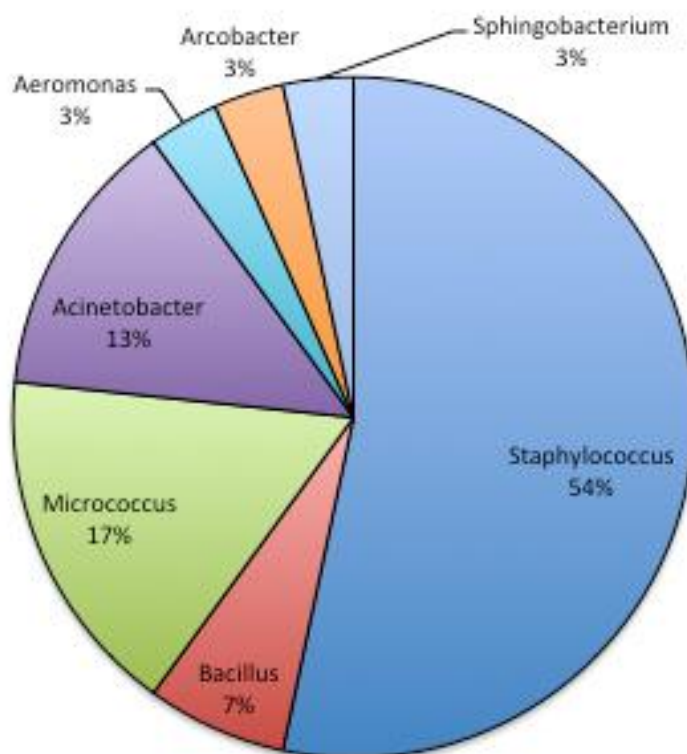


Slika 8: Pojavnost posameznih bakterijskih vrst v pozitivnih vzorcih

Iz slike 8 je razvidno, da je najbolj pogosta bakterija, ki smo jo izolirali v pozitivnih vzorcih, bakterija normalne flore *Staphylococcus epidermidis*, ki je bila prisotna v kar 41% pozitivnih vzorcev. Sledita bakterijski vrsti iz okolja, *Rhizobium (agrobacterium) radiobacter*, ki smo jo izolirali v 14% pozitivnih vzorcev in *Bacillus cereus*, ki smo jo izolirali v 9% pozitivnih vzorcev.

4.6.2. Pojavnost bakterijskih vrst v vzorcih zraka

S pasivno in aktivno metodo nadzora mikrobiološke kakovosti zraka smo odvzeli skupno 57 vzorcev, izmed katerih jih je bilo 18 (31,6%) pozitivnih. Lastnosti bakterijskih vrst izoliranih z vzorcev zraka prikazuje priloga 1. Iz vzorcev zraka smo izolirali kar 15 bakterijskih vrst, zato smo zaradi boljše preglednosti na sliki 9 prikazali pojavnost posameznih bakterijskih rodov.



Slika 9: Pojavnost bakterijskih rodov v vzorcih zraka

Tudi v vzorcih zraka so najpogostejše bakterije rodu *Staphylococcus*, ki so prisotne v več kot polovici vzorcev. Izmed vrst tega rodu je v vzorcih najpogostejši *S. hominis* (7% vseh pozitivnih vzorcev), *S. epidermidis* in *S. haemolyticus* pa sta na drugem mestu in sta prisotna vsak v 5,3% pozitivnih vzorcev. V 17% pozitivnih vzorcev je bila prisotna vrsta *Micrococcus luteus*, ki je zaradi tega najpogostejša izolirana bakterijska vrsta, čeprav je rod *Micrococcus* prisoten v manj pozitivnih vzorcih, kot rod *Staphylococcus*. Velik delež pozitivnih vzorcev predstavljajo tudi bakterije rodu *Acinetobacter*, in sicer smo izolirali

vrsti vrsti *A. johnsonii* in *A. lwoffii*. Obe vrsti so na IMI testirali tudi na občutljivost na antibiotike imipenem, gentamicin (ob odmerjanju 1x dnevno v velikem odmerku), amikacin (ob odmerjanju 1x dnevno v velikem odmerku), ciprofloksacin, levofloksacin in trimetoprim v kombinaciji s sulfametoksazolom. Vsi izolirani sevi so bili občutljivi na vse našete antibiotike.

4.6.3. Pojavnost vrst gliv v vzorcih zraka

V dveh vzorcih, ki smo jih odvzeli s sedimentacijsko metodo, smo odkrili tudi glive, ki za svojo rast normalno potrebujejo boljše pogoje kot bakterije in se na krvnem agarju redko razvijejo. To pomeni, da jih je bilo v zraku verjetno tako veliko, da so na gojišče padle v zadostni količini, da smo jih lahko zaznali in so se tam začele tudi razmnoževati. Na ta način smo v dveh vzorcih odkrili glive rodu *Alternaria sp.*, v enem pa *Penicillium sp.* Glive smo odkrili tudi z metodo presesavanja, pri čemer pa smo izvedli dodatno testiranje s pomočjo agarjev SABORAUD in DG18. Pri teh testiranjih smo odkrili glive rodov *Penicillium sp.* in *Cladosporium sp.* ter vrsti *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus niger*. Najpogostejše so bile izolirane glive rodu *Penicillium* (75% pozitivnih vzorcev), vse ostale rodove (*Aspergillus*, *Alternaria* in *Cladosporium*) pa smo odkrili v 50% pozitivnih vzorcev.

4.7. USTREZNOST METODE DEZINFEKCIJE

Na KO za revmatologijo se kot metoda dezinfekcije uporablja prebrisovanje s sterilnimi alkoholnimi robci. S tem odstranjujemo mikroorganizme na dva načina; del mikroorganizmov odstranimo mehansko, pri čemer se ti ujamejo v vlakna robca in tam ostanejo, v kolikor jih ne prenesemo na drugo površino, preostale mikroorganizme pa odstranimo kemično z dezinficiensom (17). Na oddelku se uporabljajo alkoholni robci, impregnirani s 70% izopropanolom. Ti dosežejo baktericidni učinek po 5 minutah kontaktnega časa, fungicidni učinek pa po 15 minutah (28).

V raziskavi, ki je preiskovala vpliv različnih metod dezinfekcije na prisotnost posameznih mikroorganizmov, so odkrili, da je samo prebrisovanje z alkoholnimi robci proti rodu *Staphylococcus* nekoliko manj učinkovito kot škropljenje z dezinficiensom, ampak odstrani več spor, saj se te lahko ujamejo med vlakna robca. Pri tem je zelo pomembna

pravilna tehnika, saj lahko v nasprotnem primeru pride do rekontaminacije razkuževanih površin ali do kontaminacije drugih površin, ki pridejo v stik z robcem. Bolj učinkovit način bi pomenila vpeljava razkuževanja z dvojnim prebrisovanjem, ki bi eliminiralo vse bakterije rodu *Staphylococcus*, a vseeno ne bi v celoti eliminiralo bakterij rodu *Bacillus*. Učinkovitost metode dezinfekcije bi lahko še dodatno izboljšali z uporabo kombinacije razkuževalnih tehnik, na primer kombinacijo prebrisovanja in škropljenja z dezinficiensom ali kombinacijo teh dveh tehnik v obratnem časovnem vrstnem redu. S tako tehniko bi odstranili vse bakterije rodu *Staphylococcus*, večino rodu *Bacillus* ter del plesni, ki jih rutinsko odkrivamo na površinah. Da bi dosegli mejo manj kot 1 CFU mikroorganizmov na 55 milimetrski kontaktni plošči, ki jo priporoča GMP, bi bilo potrebno vse materiale in površine dezinficirati vsaj dvakrat, pri čemer bi morala vsaj ena faza dezinfekcije vključevati kombinacijsko tehniko (17).

5. SKLEP

Centralizirana priprava zdravil v lekarni ni vedno mogoča, zato rekonstitucija in redčenje pogosto potekata na kliničnih oddelkih v nekontroliranih pogojih. Nekateri oddelki UKCL, kot na primer KO za revmatologijo, so s ciljem izboljšanja pogojev priprave zdravil za parenteralno aplikacijo na svoj oddelek postavili BV komoro. Njena uporaba lahko pri pripravljavcu zdravil vzpodbudi nek lažen občutek varnosti in predvidevanje, da tveganja za kontaminacijo pripravkov v tem primeru ni, oziroma je to tveganje minimalno. To ni nujno res, saj je za učinkovitost pri preprečevanju kontaminacije nujno pravilno delo, skrbno vzdrževanje čistote in redna kvalifikacija same komore. Izrednega pomena je redno in sistematično izobraževanje osebja o pravilnem aseptičnem delu.

Na podlagi rezultatov nadzora mikrobiološke kakovosti pogojev priprave zdravil za parenteralno aplikacijo smo ugotovili, da:

- je kljub dvojnemu rokavičenju pripravljavca zdravil in uporabi sterilnih rokavic odstotek kontaminiranih vzorcev, odvzetih s površin rokavic, relativno visok (15,4%). Leva in desna rokavica sta bili kontaminirani v istem odstotku primerov, pri čemer smo odkrili tako bakterije normalne flore, kot tudi bakterije iz okolja. Predlagamo pogostejšo dezinfekcijo rokavic z uporabo alkoholnih robcev ali uporabo kombinacijske tehnike razkuževanja (brisanje rokavic z uporabo alkoholnih robcev in razprševanje z dezinficiensom).
- pri uporabi iste površine alkoholnega robca za brisanje več površin obstaja možnost rekontaminacije. Nujno je, da za vsak poteg robca uporabimo drug del robca in da se potegi med seboj delno prekrivajo.
- so na delovni površini v BVK prisotne bakterije normalne flore in bakterije, ki izhajajo iz okolja v primerljivem odstotku vzorcev. Iz tega lahko sklepamo, da je možen vir kontaminacije površin tako pripravljavec zdravil, kot tudi nekvalificirano okolje, v katerem se nahaja BVK.
- med kontaminacijo sredine delovne površine BVK pred in po delu ni statistično pomembnih razlik.
- je bil v enem primeru kontaminiran vzorec, odvzet s sredine BVK pred delom. To lahko preprečimo z rednim čiščenjem v skladu s pisnimi navodili. Zraven dnevnega

čiščenja z alkoholnimi robci je potrebno enkrat tedensko komoro očistiti tudi s sterilnim biocidom, enkrat mesečno pa bi morali generalno očistiti celoten prostor, vključno s komoro.

- je bil v enem primeru pozitiven vzorec, odvzet s konice mini-spika. Ta rezultat je zelo kritičen, saj sam mini-spike sega neposredno v vialo z zdravilom. Za preprečitev kontaminacije konice je nujno, da se pripravljavec zdravil ne dotika konice mini-spika in da se slednja ne dotika delovnih površin, saj lahko pri tem pride do njene kontaminacije.
- so na KO za revmatologijo, kjer poteka priprava zdravil v BV komori, obeti za mikrobiološko kontaminacijo signatur vsebnikov 27,3-krat nižji kot na Oddelku za intenzivno terapijo, ki nima BVK.
- med kontaminacijama prebodnih gum vsebnikov na oddelku z BVK in oddelku brez BVK ni statistično pomembnih razlik. Iz tega lahko sklepamo, da prostor ni edini dejavnik, ki vpliva na mikrobiološko kakovost, ampak je zelo pomemben dejavnik tudi način dela. Na obeh oddelkih prebodno gumo prebrišejo z alkoholnim robcem, zaradi česar so rezultati primerljivi.
- je mikrobiološka kakovost zraka v BVK neoporečna kljub njeni postavitvi v nekvalificiran prostor. To pa ne pomeni, da kontaminacija iz okolja ni možna, saj je mogoče, da so se mikroorganizmi že posedli na površine v komori. Za zagotavljanje najboljših pogojev za aseptično delo bi bilo potrebno celostno načrtovanje čistih prostorov s sistemi zračnih loput (tako za osebje, kot tudi za materiale) ter postopnim stopnjevanjem čistosti okolja do najvišjega razreda A.
- so se bakterije razvile v 59,3% odstotkov agarjev, izpostavljenih v nekvalificiranem predprostoru BVK. V 7,4% so se na krvnih agarjih razvile tudi glive, ki za svojo rast in razmnoževanje običajno potrebujejo boljše pogoje. Boljše rezultate nadzora mikrobiološke kakovosti zraka v nekvalificiranem prostoru bi lahko dosegli z namensko rabo prostora izključno za pripravo zdravil. V ta prostor bi lahko vstopalo samo osebje, vključeno v proces priprave zdravil, v njem pa bi se nahajala samo oprema in materiali, ključni za ta proces.
- so se na vseh vzorcih, odvzetih z aktivno metodo vzorčenja zraka razvile tako bakterije, kot tudi glive.
- med mikrobiološko kakovostjo zraka v nekvalificiranem preprostoru, v katerem se nahaja BVK in BVK obstajajo statistično pomembne razlike

- prisotnost tekstilne pregrade, ki deli predprostor biološko varne komore na dva dela, ne vpliva na mikrobiološko kakovost zraka na obeh straneh pregrade (med njima ni statistično pomembnih razlik).
- obstajajo statistično pomembne razlike med mikrobiološkima kontaminacijama zraka v nekvalificiranih prostorih na KO za revmatologijo in Oddelku za intenzivno terapijo. Na Oddelku za intenzivno terapijo so 11,7-krat višji obeti za kontaminacijo zraka kot na KO za revmatologijo. Te razlike bi lahko zmanjšali tako, da na Oddelku za intenzivno terapijo priprava zdravil ne bi več potekala v bolniških sobah, temveč v posebej za to namenjenem prostoru.
- obstajajo statistično pomembne razlike med mikrobiološko kontaminacijo v prostorih, kjer poteka priprava zdravil na KO za revmatologijo (BVK) in na Oddelku za intenzivno terapijo (bolniške sobe).

Mikrobiološko kakovost vsebnikov in ostalih površin bi lahko izboljšali z vpeljavo dvojne tehnike razkuževanja; najprej bi površine prebrisali z alkoholnimi robci, s čemer bi mikroorganizme odstranili deloma mehansko, deloma pa kemično, nato pa bi površine še popršili z raztopino dezinficiensa (ali obratno). Za doseganje meje števila mikroorganizmov, ki jo priporoča GMP, bi morali vsako površino razkužiti vsaj dvakrat, pri čemer bi morala biti vsaj ena izmed uporabljenih tehnik kombinacijska.

Za zagotavljanje in preverjanje ustreznosti pogojev dela v čistih prostorih mora obstajati rutinski program nadzora okolja, ki obsega vse kritične točke za možno kontaminacijo produkta. Mesta vzorčenja se morajo v SOP-jih opisati dovolj natančno, da je možno njihovo ponovljivo vzorčenje.

Način priprave zdravil in prostor, v katerem priprava poteka, bistveno vplivata na mikrobiološko kakovost pogojev priprave zdravil površin vsebnikov. Za preprečevanje bolnišničnih okužb je nujno, da za vse postopke, ki so temu namenjeni, obstajajo natančna pisna navodila ter da jih izvaja ustrezno usposobljeno osebje.

6. LITERATURA

1. Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinike, oddelki in druge službe, http://www.kclj.si/index.php?dir=/pacienti_in_obiskovalci/klinike_in_oddelki (Dostopano: maj 2015)
2. European Pharmacopoeia 5.0: 614, 445-447. <http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/> (Dostopano: maj 2015)
3. Farmacevtski terminološki slovar, 2013, <http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmacevtski#v> (Dostopano: april 2015).
4. Ramstorp M, Introduction to Contamination Control and Cleanroom Technology, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, str. 61 – 73
5. Resolution CM/ResAP(2011)1 on quality and safety assurance requirements for medicinal products prepared in pharmacies for the special needs of patients, 2011, [https://wcd.coe.int/ViewDoc.jsp?Ref=CM/ResAP\(2011\)1&Language=lanEnglish&Ver=original&BackColorInternet=DBDCF2&BackColorIntranet=FDC864&BackColorLogged=FDC864](https://wcd.coe.int/ViewDoc.jsp?Ref=CM/ResAP(2011)1&Language=lanEnglish&Ver=original&BackColorInternet=DBDCF2&BackColorIntranet=FDC864&BackColorLogged=FDC864) (Dostopano: april 2015).
6. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (EU GMP). Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version), 2008, http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf (Dostopano: april 2015).
7. Sutton S, The Environmental Monitoring Program in a GMP Environment, http://www.microbiologynetwork.com/content/file/JGXP_2010_v14n3_The-Environmental-Monitoring-Program-in-a-GMP-Environment.pdf, (Dostopano: april 2015)
8. M. Lubej, prof. dr. Stane Srčič, mag. farm., Komore z laminarnim pretokom zraka in izolatorji, Ljubljana, 2012 (Interno gradivo)
9. Dragaš AZ, Škerl M: Higiena in obvladovanje okužb, Založba ZRC, ZRC SAZU, Ljubljana, 2004: 23-25, 73-80.

10. Inweregbu K, Jayshree D, Pittard A, Nosocomial infections, <http://ceaccp.oxfordjournals.org/content/5/1/14.full>, (Dostopano: februar 2015)
11. European Centre for Disease Prevention and Control, Healthcare-associated Infections, http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections/Pages/index.aspx, (Dostopano: junij 2015)
12. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Medicinski razgledi, 2002: 61, 65-66, 139-145, 147-153, 179-184, 201-203, 225-232, 247-250, 255-259, 405-408.
13. Gubina M, Dolinšek M: Bolnišnična higiena, Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1998: 47 – 49, 106 – 113, 256 – 259
14. Batzilla C, Kozitskaya S: Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. International Journal of Antimicrobial Agents 28S, 2006, <http://www.ijaaonline.com/retrieve/pii/S0924857906001774>, (Dostopano: junij 2015)
15. Fisher K, Phillips C: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Society for general microbiology, 2009, <http://mic.sgmjournals.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.026385-0#tab2>, (Dostopano: junij 2015)
16. Tierney P. et al.: Environmental Monitoring - Maintaining a Clean Room, <http://www.pharmpro.com/articles/2010/05/environmental-monitoring-maintaining-clean-room>, (Dostopano: maj 2015)
17. Cockcroft MG et al.: Validation of liquid disinfection techniques for transfer of components into hospital pharmacy clean rooms. Hospital Pharmacist 2001; 8: 226-232
18. Seme K: Kontrola snaznosti površin z brisi in odtisi (Navodila za odvzem vzorcev). Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana. (Interno gradivo)

19. Napoli C et al.: Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444341/>; (Dostopano: maj 2015)
20. Kelly J: Microbiological Air Samplers and ISO 14698-1/2, <http://www.cemag.us/articles/2005/05/microbiological-air-samplers-and-iso-14698-1-2>, (Dostopano: maj 2015)
21. Andon BM: Active air vs. passive air (settle plate) monitoring in routine environmental monitoring programs, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17260900>, (Dostopano: maj 2015)
22. Instructions manual, "SAS Super100/180", "Duo SAS Super 360", "SAS Isolator" - Code n. 18198/19121, 24584, 43216/43217 , http://www.masterflex.com/assets/Manual_pdfs/33687-02.pdf (Dostopano: april 2015)
23. Hare J: Saboraud agar for Fungal Growth Protocols, <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3156-sabouraud-agar-for-fungal-growth-protocols>, (Dostopano: maj 2015)
24. Field A: Discovering statistics using SPSS (and sex and drugs and rock 'n' roll), 3. izdaja, SAGE, London, 2009: 688-699.
25. SOP-UKC-LG-02-21-02, Brezprašna komora Iskra Pio (interno gradivo)
26. Warner T et al.: Survey of Sterile Admixture Practices in Canadian Hospital Pharmacies: Part 1. Methods and Results, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2826929/>, (Dostopano: april 2015)
27. Debelak K, Vrednotenje mikrobiološke kakovosti okolja za pripravo farmacevtskih izdelkov za parenteralno uporabo na Oddelku za intenzivno terapijo Kliničnega oddelka za anesteziologijo in intenzivno terapijo operativnih strok v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, magistrsko delo, Ljubljana, 2015
28. Specifikacija robcev Klerwipe, http://www.cleanroom.com.au/3035540_Klerwipe_70_30_Sterile_70_IPA_Low_Particulat_e_Pouch_Wipe.html, (Dostopano: maj 2015)

29. Betty D, Mehvish S, Gousia N, F. Alsaba: Significance of *Staphylococcus Haemolyticus* in Hospital Acquired Infections, <http://www.jpmsonline.com/jpms-vol4-issue3-pages119-125-ra.html>, (Dostopano: februar 2015)
30. Otto M, *Staphylococcus epidermidis* – the »accidental« pathogen, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807625/>, (Dostopano: februar 2015)
31. Szewczyk EM et al.: Potential Role of *Staphylococcus cohnii* in a Hospital Environment, <http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&ved=0CEQQFjAE&url=http%3A%2F%2Fwww.microbecolhealthdis.net%2Findex.php%2Fmehd%2Farticle%2Fdownload%2F7978%2F9318&ei=MtTYVJzqMYe7Uaa8g8AG&usg=AFQjCNE0IeJgtrVxo4TU1kzM4b0EY1Al6g&sig2=yU90SlqCwuVpVkfbKiKbtw&bvm=bv.85464276,d.d24>, (Dostopano: februar 2015)
32. Probs AJ et al.: *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* SI rbsp. nov., <http://ijs.sgmjournals.org/content/48/3/651.long>, (Dostopano: februar 2015)
33. Misawa Y: First reported case of *Staphylococcus condimenti* infection associated with catheter-related bacteraemia, [http://www.newmicrobesnewinfections.com/article/S2052-2975\(14\)00003-1/fulltext](http://www.newmicrobesnewinfections.com/article/S2052-2975(14)00003-1/fulltext), (Dostopano: februar 2015)
34. Kloos WE, Schleifer KH: Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin, <http://ijs.sgmjournals.org/content/25/1/62.full.pdf+html>, (Dostopano: februar 2015)
35. Van Der Zwet WC et al.: Nosocomial Spread of a *Staphylococcus capitis* Strain with Heteroresistance to Vancomycin in a Neonatal Intensive Care Unit, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120592/>, (Dostopano: februar 2015)
36. Dordet – Frisoni E et al.: Genomic Diversity in *Staphylococcus xylosus*, <http://aem.asm.org/content/73/22/7199.full>, (Dostopano: februar 2015)
37. Chavez F et al.: Nosocomial Spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* Strain Causing Sepsis in a Neonatal Intensive Care Unit, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1234135/>, (Dostopano: februar 2015)

38. Incani RN et al.: *Staphylococcus warneri* meningitis in a patient with *strongyloides stercoralis* hyperinfection and lymphoma. First report of a case, <http://www.revistas.usp.br/rimtsp/article/viewFile/31327/33212>, (Dostopano: februar 2015)
39. ABIS Encyclopedia, *Bacillus simplex*, <http://www.tgw1916.net/Bacillus/simplex.html>, (Dostopano: februar 2015)
40. ABIS Encyclopedia, *Bacillus weihenstephanensis*, <http://www.tgw1916.net/Bacillus/weihenstephanensis.html>, (Dostopano: februar 2015)
41. Burker Database, *Bacillus simplex*, <http://spectra.folkhalsomyndigheten.se/spectra/database/bruker.action;jsessionid=CFAF64ACCD93B3BD2E0C5475EBEE0716?selection=B>, (Dostopano: februar 2015)
42. Noonan L et al.: *Bacillus cereus* and other non-anthraxis *Bacillus* species, <http://www.uptodate.com/contents/bacillus-cereus-and-other-non-anthraxis-bacillus-species>, (Dostopano: februar 2015)
43. Teuber M, Geis A: The Genus *Lactococcus*, http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30744-3_7, (Dostopano: februar 2015)
44. Facklam R, Elliott JA: Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci , <http://cmr.asm.org/content/8/4/479.full.pdf>, (Dostopano: februar 2015)
45. MSDS online, free safety data index, *Micrococcus* spp., <http://www.msdsonline.com/resources/msds-resources/free-safety-data-sheet-index/micrococcus-spp.aspx>, (Dostopano: februar 2015)
46. Kocur M et al.: Taxonomic Status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and Designation of the Neotype Strain, <http://ijs.sgmjournals.org/content/22/4/218.full.pdf>, (Dostopano: februar 2015)
47. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, *Aeromonas hydrophila*, FDA,

<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070523.htm>, (Dostopano: februar 2015)

48. Public health agency of Canada, *Aeromonas hydrophila*, Pathogen safety data sheet, <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/aeromonas-hydrophila-eng.php>, (Dostopano: februar 2015)

49. Regalado NG, *Acinetobacter lwoffii*: Bacteremia associated with acute gastroenteritis, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1477893909000933>, (Dostopano: februar 2015)

50. Kup SC, Chen TL: *Acinetobacter* species, <http://www.antimicrobe.org/b71.asp>, (Dostopano: februar 2015)

51. Donachie SP et al.: *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*, <http://ijs.sgmjournals.org/content/55/3/1271.long>, (Dostopano: februar 2015)

52. Collado L, Figueras MJ: Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*, <http://cmr.asm.org/lens/cmr/24/1/174>, (Dostopano: februar 2015)

53. Shobha K et al., *Brevundimonas diminuta* causing urinary tract infection, https://www.webmedcentral.com/article_view/4411, (Dostopano: februar 2015)

54. Han XY et al., *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones, <http://jac.oxfordjournals.org/content/55/6/853.full.pdf>, (Dostopano: februar 2015)

55. ABIS Encyclopedia, *Brevundimonas (Pseudomonas) Diminuta*, <http://www.tgw1916.net/Pseudomonas/diminuta.html>, (Dostopano: februar 2015)

56. Namdari H et al: *Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter* Identified as a Cause of Chronic Endophthalmitis Subsequent to Cataract Extraction, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179851/>, (Dostopano: februar 2015)

57. The University of Adelaide, Mycology Online, *Alternaria* sp., [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(dematiaceous\)/Alternaria/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(dematiaceous)/Alternaria/), (Dostopano: februar 2015)
58. Centers for disease control and prevention, *Cladosporium*, <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/other/cladosporium.html>, (Dostopano: februar 2015)
59. Institute national de sante public Quebec, *Penicillium* spp., <http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/penicillium-spp>, (Dostopano: februar 2015)
60. The University of Adelaide, Mycology Online, *Aspergillus fumigatus*, [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/fumigatus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/fumigatus.html), (Dostopano: februar 2015)
61. Biotechnology program under the toxic substances control act, *Aspergillus niger* final risk assessment, http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra006.htm, (Dostopano: februar 2015)
62. The University of Adelaide, Mycology Online, *Aspergillus niger*, [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/niger.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/niger.html), (Dostopano: februar 2015)

7. PRILOGE

Priloga 1: Nekatere značilnosti izoliranih bakterijskih vrst

Rod Staphylococcus

Stafilokoki sodijo med po gramu pozitivne bakterije. Vsem vrstam tega rodu je skupna sferična oblika, pozitivna reakcija pri barvanju po gramu in odsotnost endospor.

Stafilokoki (z izjemo *S. Aureus*) ne izdelujejo encima koagulaze in so del normalne bakterijske flore kože in nekaterih sluznic. Gre za fakultativno anaerobne oportunistične bakterije, kar pomeni, da v normalnih pogojih ne povzročajo okužb, pri novorojenčkih, dojenčkih, starejših ljudeh in bolnikih z zmanjšano imunsko odpornostjo pa jih vseeno lahko povzročajo. Okužbe so še posebej pogoste pri bolnikih v različnih vsadki (npr. žilni, urinski kateter) ali pa pri tistih, ki so bili izpostavljeni invazivnim posegom. Najbolj tipične stafilokokne okužbe so endokarditis, stafilokokni kožni sindrom z luščenjem, pljučnica, stafilokokna zastrupitev s hrano, sindrom toksičnega šoka, okužbe kože (npr. impetigo, karbunkel, furunkel), vnetje očne veznice, empiem ter septični artritis. Lahko se pojavljajo posamično ali pandemično. V bolnišnicah se najpogosteje prenašajo z rokami osebja, lahko pa se prenašajo tudi posredno s kontaminiranimi predmeti (12). Lastnosti rodu *Staphylococcus* prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Lastnosti izoliranih bakterijskih vrst rodu *Staphylococcus*

BAKTERIJSKA VRSTA	NORMALNO NAHAJALIŠČE	POSEBNOST
<i>S. haemolyticus</i> (29)	Normalna flora kože in sluznic.	Je druga najpogostejša vrsta stafilokokov, ki povzroča bolnišnične okužbe in hkrati kaže največjo rezistenco proti antibiotikom.
<i>S. epidermidis</i> (30)	Normalna flora kože in sluznic ljudi in ostalih sesalcev.	Ima zelo veliko afiniteto do žilnih katetrov in ostalih vsadkov. Na njih tvori biofilme, ki imajo intrinzično odpornost proti antibiotikom in zavirajo gostiteljeve obrambne mehanizme.
<i>S. cohnii ssp. Cohnii</i> (31)	Normalna flora kože.	Zaradi svoje pogostosti v bolnišničnem okolju in sposobnosti interspecifičnega prenosa determinant rezistence proti antibiotikom (ki ga izkazujejo vsi najpogostejši stafilokoki) ima pomembno vlogo pri razvoju multirezistence <i>S. aureusa</i> .
<i>S. condimenti</i>	Novejša bakterijska vrsta, prvič izolirana iz mešanice za sojino omako (32).	Ta vrsta ima nizek patogeni potencial, vendar so se že pojavila tudi poročila o bolnišničnih okužbah, povzročenih s to bakterijsko vrsto (33).

<i>S. capitis</i>	Normalna flora kože, pri čemer je največje nahajališče lasišče (34).	Pojavljajo se bakterijski sevi, rezistentni na vankomicin, ki lahko v bolnišnicah postanejo celo enedemični (35).
<i>S. xylosus</i> (36)	Normalna flora kože, najpogostejša pri živalih, manj pri ljudeh.	V redkih primerih povzroča oportunistične okužbe. Uporablja se pri fermentaciji mleka in mesnih izdelkov.
<i>S. hominis</i>	Normalna flora kože (34).	Pomemben nozokomialen patogen na intenzivnih enotah za novorojenčke (37).
<i>S. warneri</i>	Normalna flora kože (34).	Vzrok meningitisa pri pacientu s superinfekcijo s <i>Strongyloides stercoralis</i> , povezano z jemanjem zdravila z učinkovino rituksimab (38).

Rod Neisseria

Gre za po Gramu negativne koke, ki se večinoma nahajajo v parih, lahko pa tudi v manjših skupkih. Te bakterije so aerobne, negibljive in nesporogene. Določene vrste tega rodu so patogene (*N. Meningitidis* in *N. Gonorrhoeae*), ostale vrste pa so del normalne bakterijske flore zgornjih dihal, spolovil in sečil in bolezni povzročajo le izjemoma (12).

Rod Bacillus

Bakterije rodu *Bacillus* sodijo med aerobne, po Gramu pozitivne, večinoma sporogene mikroorganizme. Medicinsko pomembne vrste so *B. Subtilis*, *B. Cereus*, *B. Mycoides*, *B. Stearothermophilus* ter *B. Anthracis*.(12). Njihove lastnosti prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Lastnosti izoliranih bakterijskih vrst rodu Bacillus

LASTNOST	BAKTERIJSKA VRSTA		
	<i>B. Cereus</i> (12)	<i>B. Simplex</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>
NORMALNO NAHAJALIŠČE	Zemlja, mleko, stročnice in druga živila.	Izoliran iz zemlje (39).	Izoliran iz pasteriziranega mleka (39).
SPOROGENOST	Da.	Da (41).	Da (41).
TOLERANCA NA KISIK	Fakultativni anaerob.	Fakultativni anaerob (41).	Fakultativni anaerob (39).
POSEBNOSTI	Pogost povzročitelj gastroenteritisa z drisko in bljuvanjem ob zaužitju toplotno neobdelanih okuženih živil. Znane so tudi bolnišnične okužbe (sepsa, meningitis, okužbe dihal in ran, endoftalmitis).	Njegova patogenost ni znana. Variabilna obarvanost po Gramu (39).	Sodi v skupino <i>B. Cereus</i> , kamor zraven te vrste sodi še pet drugih vrst: <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pseudomycoides</i> , <i>B. thuringiensis</i> in <i>B. anthracis</i> . Po svojih lastnostih so si zelo podobne, zato je njihova diferenciacija zelo zahtevna (41).

Rod Streptococcus

Streptokoki so po gramu pozitivne bakterije okrogle oblike, ki se urejajo v verige, ne tvorijo spor in so negibljive. Glede na tip hemolize, ki jo povzročajo na krvnem agarju, ločimo več skupin streptokokov: betahemolitične (popolnoma razgradijo eritrocite v krvnem agarju), alfa-hemolitične (eritrocite razgradijo nepopolno, na agarju okrog bakterijske kolonije nastane značilen zelen pas) in gama – oziroma nehemolitične, ki eritrocitov sploh ne hemolizirajo.

Pri ljudeh najpogosteje povzročajo nastajanje zobne gnilobe oziroma kariesa, če pa zaidejo v kri, lahko povzročijo tudi sepso, zaradi svoje sposobnosti prilepljanja na endokardij pa tudi subakutni endokarditis (12).

Rod Lactococcus

Bakterijske vrste rodu *Lactococcus* najdemo predvsem v različnih mlečnih izdelkih ter v črevesju goveda in koz (42). Bakterije tega rodu so zelo pogoste v okolju in so do pred kratkim veljale za človeku nenevarne, v zadnjem času pa se pojavlja vedno več poročil o boleznih, povzročenih z laktokoki (subakutni bakterijski endokarditis, septikemija, pljučnica, cistitis ...). So fakultativno anaerobne po Gramu pozitivne bakterije. Vrste tega rodu je zelo težko diferencirati, zaradi česar se velikokrat identificirajo samo do rodu (43).

Rod Micrococcus

Na koži ljudi in živali, v vodi, na rastlinah in v zraku najdemo bakterijsko vrsto *Micrococcus luteus* (44). Gre za nesporogeno, aerobno, po Gramu pozitivno bakterijo (45). Je oportunistični mikroorganizem, ki lahko pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom povzroča okužbe, kot so pljučnica, meningitis, septični artritis in intrakranialni abscesi (44).

Rod Aeromonas

Široko razširjena vrsta tega rodu je *Aeromonas hydrophila*. Življenjski prostor te bakterije je voda – najdemo jo tako v pitni, kot tudi v rahlo slani vodi, zaradi česar jo lahko pogosto najdemo v ribah, pa tudi v mesu (46). Je po Gramu negativen nesporogen fakultativni anaerob. Pri zdravih posameznikih lahko povzroči gastroenteritis ali okužbo ran, pri

imunsko oslabeledih pa tudi septikemijo, meningitis, pljučnico, osteomielitis, peritonitis in nekatere druge okužbe (47).

Rod Acinetobacter

Lastnosti dveh bakterijskih vrst tega rodu - *A. lwoffii* in *A. johnsonii* prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3: Lastnosti izoliranih bakterijskih vrst rodu *Acinetobacter*

LASTNOST	BAKTERIJSKA VRSTA	
	<i>A. lwoffii</i> (48)	<i>A. johnsonii</i> (49)
NORMALNO NAHAJALIŠČE	Normalna flora orofarinksa in kože, najdemo jih tudi v zemlji in vodi.	Komenzal kože, grla in izločkov ljudi, najdemo jih tudi v zemlji in vodi.
SPOROGENOST	Ne.	Ne.
TOLERANCA NA KISIK	Aerobna bakterija.	Aerobna bakterija.
DELITEV GLEDE NA BARVANJE PO GRAMU	Po Gramu negativen bacil.	Po Gramu negativen bacil.
POSEBNOSTI	Oportunistična bakterija, ki lahko pri imunsko oslabeledih povzroča nozokomialne infekcije, kot so septikemija, pljučnica, meningitis, infekcije urinarnega trakta ...	Oportunistična bakterija, ki je znan potencialen povzročitelj nozokomialnih okužb pri imunsko oslabeledih, še posebej pri uvedbi katetrov.

Rod Arcobacter

Bakterijska vrsta *A. Halophilus* je po Gramu negativen mikroorganizem, ki je fakultativen anaerob. Je obligatoren halofil, ki so ga prvič izolirali iz zelo slane lagune na Havajih (50). Bakterije rodu *Arcobacter* postajajo vedno pomembnejše, saj se večja pogostost z njimi povzročenih okužb (endokarditis, peritonitis, gastrointestinalne motnje ...) (51).

Rod Brevundimonas

Bakterijska vrsta *B. diminuta* je redek oportunistični patogen in je odporen proti kinolonom. Povzroča lahko infekcije urinarnega trakta (52), zraven teh pa tudi bakteriemijske, okužbe plevralnega prostora in druge okužbe (53). Gre za aeroben, po Gramu negativen bacil, ki živi v vodi (54).

Rod Rhizobium (Agrobacterium)

Bakterijska vrsta *R. Radiobacter* je rastlinski patogen in jo najdemo v zemlji. Pri ljudeh ima majhen klinični pomen, saj le redko povzroča okužbe - predvsem oportunistične okužbe pri imunsko oslabilih pacientih. Znani so primeri endokarditisa, bakteriemije, peritonitisa, infekcij urinarnega trakta in endoftalmitisa (slednji se je pojavil pri pacientu po operaciji katarakte). Je po Gramu negativen aeroben bacil (55).

Priloga 2: Nekatere lastnosti izoliranih vrst gliv

Alternaria sp.

Rod *alternaria* vsebuje 44 vrst, ki večinoma parazitirajo rastline, nekatere pa najdemo tudi v zemlji. Povzročajo lahko mikotični keratitis, feohifomikozo, okužbe kože, paranazalni sinusitis, osteomielitis in peritonitis (56).

Cladosporium sp.

Glive rodu *Cladosporium* so med najpogostejšimi vrstami gliv. Najdemo jih na rastlinah, v zraku in na vlažnih površinah. Bolezni povzročajo redko, znani pa so primeri okužb kože, oči, sinusov in meningitisi. Povezane so tudi z nastankom alergij in z astmo (57).

Penicillium sp.

Poznamo več kot 200 vrst tega rodu, ki jih pogosto najdemo v zemlji, kompostu, na lesu, sušenih živilih, začimbah, svežem sadju in zelenjavi. Najdemo jih tudi na prahu in na vlažnih gradbenih materialih. Zraven alergijskih reakcij in draženja dihalnih poti lahko povzročajo tudi oportunistične okužbe dihalnega trakta, mikotični keratitis, otomikozo in endokarditis.(58).

Aspergillus sp.

A. fumigatus je zelo razširjena vrsta, ki jo najdemo praktično povsod, najpogosteje pa v zemlji in na razkrajajočih organskih snoveh. Je pomemben človeški patogen in najpogostejši povzročitelj vseh oblik invazivnih in neinvazivnih aspergiloz (59).

A. niger je pogosta vrsta gliv, ki jo pogosto najdemo na odpadlem listju, kompostu in ostali razkrajajoči vegetaciji (60). Je tretja najpogostejša vrsta, ki povzroča invazivno aspergilozo, pogost vzrok nastanka aspergiloma in najpogostejši vzrok otomikoz (61).