

Kontrola i validacija čuvanja hranjivih podloga za ispitivanje sterilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda

Zrinski, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:169983>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Kristina Zrinski

**KONTROLA I VALIDACIJA
ČUVANJA HRANJIVIH PODLOGA
ZA ISPITIVANJE STERILNOSTI
GOTOVIH FARMACEUTSKIH
PROIZVODA**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Anite Slavice, Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, u Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju Odjela kontrole kvalitete, PLIVA Hrvatska d.o.o., pod voditeljstvom mr. sc. Tatjane Turčinov, dipl. ing. med. biokem.

Najljepše se zahvaljujem mr. sc. Tatjani Turčinov, dipl. ing. med. biokem., što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada te na njejoj stručnoj pomoći i savjetima.

Također, veliko hvala svim kolegama iz Mikrobiološkog i biološkog laboratorija na korisnim savjetima i pomoći u izvedbi eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Hvala što ste mi ovaj prijelaz iz studentskog u poslovni život učinili veselim i bezbolnim.

Veliku zahvalnost, dugujem i svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aniti Slavici, koja mi je bila od iznimne pomoći pri pisanju ovog rada svojim korisnim savjetima, prenesenom znanju, svojom susretljivošću i srdačnošću.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji, a posebice mami Mirni i tati Jadranku, koji su uvijek bili pola koraka iza mene, čuvajući me, i pola koraka ispred, pokazujući mi pravi put.

Na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju, neizmjereno hvala mojem Hrvoju, svim prijateljima koji su mi bili druga obitelj, dragim Gorilicama te svima koji su bili dio ovog nezaboravnog putovanja. Uz vas su suze nestajale, a prekrasne avanture nastajale!

Zahvaljujući svima vama, danas sam tu gdje jesam.

Naposljetku, hvala Bogu koji me je stvorio i učinio da ovaj život prolazim baš s vama!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

KONTROLA I VALIDACIJA ČUVANJA HRANJIVIH PODLOGA ZA ISPITIVANJE STERILNOSTI GOTOVIH FARMACEUTSKIH PROIZVODA

Kristina Zrinski, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212278

Sažetak: U ovome istraživanju načinjena je analiza po 10 LOT-ova dviju *ready-to-use* hranjivih podloga - *Fluid Thioglycolate Medium (FTM)* i *Tryptic Soy Broth (TSB)*. Ove dvije *ready-to-use* podloge podržavaju rast test mikroorganizama, koji su najčešći kontaminanti ciljanih farmaceutskih proizvoda i to prema zahtjevima farmakopeje SAD-a i EU, ali i zahtjevima proizvodnih postrojenja PLIVA Hrvatska d.o.o. Zadovoljeni su svi kriteriji prihvatljivosti ovih dviju hranjivih podloga, koji su definirani planom validacije prema internom protokolu. Rok valjanosti hranjivih podloga potvrđen je ovom validacijom te se ove dvije podloge mogu koristiti u cjelokupnom razdoblju unutar propisanog roka valjanosti uz propisne uvjete čuvanja podloga. Dvije ispitivane hranjive podloge prošle su analizu hranjivosti, odgovaraju traženim zahtjevima te se mogu koristiti unutar Mikrobiološkog i biološkog laboratorija ove tvrtke za daljnje ispitivanje sterilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda. Neželjene promjene ovih podloga, koje bi mogle utjecati na mogućnost identifikacije kontaminacije određenim vrstama mikroorganizama, nisu zamijećene ni u jednom od navedenih kritičnih parametara.

Ključne riječi: kontrola, validacija, hranjive mikrobiološke podloge, sterilnost, test mikroorganizmi

Rad sadrži: 77 stranica, 14 slika, 12 tablica, 51 literaturna navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Pomoć pri izradi: mr. sc. Tatjana Turčinov, dipl. ing. med. biokem., PLIVA HRVATSKA d.o.o.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu

1. prof. dr. sc. Jasna Novak (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anita Slavica (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjenski član)

Datum obrane: 19. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

CONTROL AND VALIDATION OF STORAGE OF NUTRIENT MEDIA FOR STERILITY
TESTING OF FINAL PHARMACEUTICAL PRODUCTS

Kristina Zrinski, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212278

Abstract: In this research analysis of 10 LOTs of two ready-to-use nutrient media - Fluid Thioglycolate Medium (FTM) and Tryptic Soy Broth (TSB) was accomplished. These two ready-to-use media support the growth of test microorganisms, which are the most common contaminants of targeted pharmaceutical products according to the requirements of the US Pharmacopoeia, the EU Pharmacopoeia, but also the requirements of PLIVA Hrvatska d.o.o. production facilities. All acceptance criteria of these two nutrient media, which were defined by the validation plan according to the internal protocol, were met. The shelf life of nutrient media is confirmed by this validation, and these two media can be used for the entire period within the prescribed validity period under the proper storage conditions. The two tested nutrient media have undergone nutrient analysis, meet the required requirements and can be used within the company's Microbiological and Biological Laboratory for further testing of the sterility of finished pharmaceutical products. Unwanted changes in these media, which could affect the possibility of identifying contamination by certain types of microorganisms, were not observed in any of the listed critical parameters.

Keywords: *control, validation, nutrient medium, sterility, test microorganisms*

Thesis contains: 77 pages, 14 figures, 12 tables, 51 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Anita Slavica, PhD, Full professor

Technical support and assistance: MS Med. Biochem. Tatjana Turčinov, PLIVA HRVATSKA d.o.o.

Reviewers:

1. Jasna Novak, PhD, Full professor (president)
2. Anita Slavica, PhD, Full professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Blaženka Kos, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: 19th July, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. HRANJIVE PODLOGE.....	2
2.1.1. Proizvodnja hranjivih podloga.....	3
2.1.2. Mjerenje pH	7
2.1.3. Ispitivanje hranjivosti naciepljivanjem hranjive mikrobiološke podloge.....	7
2.2. KONTROLA KVALITETE HRANJIVIH MIKROBIOLOŠKIH PODLOGA.....	8
2.2.1. Ispitivanje fizičkih svojstava	8
2.2.2. Ispitivanje mikrobioloških svojstava	9
2.3. TEST MIKROORGANIZMI	10
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	11
2.3.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11
2.3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	11
2.3.4. <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	12
2.3.5. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 i <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404.....	13
2.3.6. <i>Bacillus beringensis</i>	13
2.3.7. <i>Propionibacterium acnes</i>	14
2.4. MIKROBIOLOŠKA IDENTIFIKACIJA	14
2.5. VALIDACIJA	15
2.6. PROCJENA VREMENA TRAJANJA HRANJIVE PODLOGE	16
2.7. ISPITIVANJE STERILNOSTI	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Hranjive mikrobiološke podloge	18
3.1.2. Test mikroorganizmi.....	19
3.1.3. Pribor i oprema	23
3.1.4. Otopina korištena za pripremu suspenzija test mikroorganizama	24
3.1.5. Kemikalije korištene pri laboratorijskom radu	24
3.2. METODE	24
3.2.1. Opis načina rada u Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju	24
3.2.2. Priprema i određivanje primarnih parametara hranjivih podloga za održavanje rasta test mikroorganizama.....	26
3.2.3. Postupci pripreme primarnih, radnih i tjednih kultura test mikroorganizama	29

3.2.4. Kriteriji prihvatljivosti hranjivih podloga.....	34
3.2.4. Obrada podataka	35
3.2.5. Preduvjeti za provođenje validacije čuvanja hranjivih mikrobioloških podloga.....	35
3.2.6. Izbor hranjivih mikrobioloških podloga za provođenje validacije roka čuvanja <i>ready-to-use</i> hranjivih podloga	36
3.2.7. Kritični parametri validacije roka čuvanja hranjivih podloga	37
3.2.8. Broj ciklusa tijekom validacije postupka čuvanja	41
4. REZULTATI I RASPRAVA	42
4.1. Primarni parametri <i>ready-to-use</i> podloga FTM i TSB	43
4.1.1. Vizualni parametri <i>ready-to-use</i> podloga FTM i TSB.....	44
4.1.2. Mikrobiološki status (sterilnost) <i>ready-to-use</i> podloga FTM i TSB	45
4.1.3. pH vrijednosti otopina <i>ready-to-use</i> podloga FTM i TSB.....	46
4.1.4. Podržavanje rasta test mikroorganizama	47
4.3. Obrada podataka	68
5. ZAKLJUČCI.....	73
6. LITERATURA.....	74

1. UVOD

Kontrola kvalitete jedan je od najbitnijih koraka koji se provode u nekoj farmaceutskoj industriji. Unutar odjela Kontrole Kvalitete, svi proizvodi te intermedijeri proizvoda prolaze analize kojima se provjerava njihova ispravnost te funkcionalnost. Mikrobiološki laboratoriji se bave identifikacijom, karakterizacijom i kultiviranjem mikroorganizama, također provode se i razni testovi u svrhu kontrole proizvoda kao što su antibiotici, citostatici, razni lijekovi te sirovine koje se koriste u proizvodnji istih. Važno je napomenuti da rad u mikrobiološkim i biološkim laboratorijima zahtijeva stroge protokole i mjere sigurnosti kako bi se spriječilo širenje zaraza i očuvao integritet uzoraka i rezultata istraživanja. Tema ovog istraživanja je provjera kontrole kvalitete hranjivih podloga koje se koriste u mikrobiološkom laboratoriju za ispitivanje kvalitete proizvoda u farmaceutskoj industriji PLIVA HRVATSKA d.o.o. Hranjive podloge smjesa su hranjivih sastojaka u tekućem ili krutom stanju koje mikroorganizmima, u laboratorijskim uvjetima, omogućavaju rast, razmnožavanje i njihove biokemijske funkcije, odnosno čuvanje mikroorganizama. Prije upotrebe hranjivih podloga, tijekom mikrobioloških analiza, potrebno je provesti kontrolu kvalitete podloga ispitivanjem fizikalnih svojstava, vizualni pregled i mjerenje pH te ispitivanjem mikrobioloških svojstava, kontrola mikrobiološkoga statusa podloga (sterilnosti) i ispitivanje hranjivih, inhibitornih i indikativnih svojstava. Tijekom ispitivanja sterilnosti koriste se hranjive podloge *Fluid Thioglycollate Medium* (FTM) i *Tryptic Soy Broth* (TSB). Ovaj rad prikazuje ispitivanje kontrole kvalitete tih podloga, posebno hranjivosti, korištenjem test mikroorganizama *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 te na dva *in house* mikroorganizma, sporogeni *Bacillus beringensis* i anaerobni mikroorganizam *Propionibacterium acnes*. Cilj rada bio je, validacijom, potvrditi definirani rok valjanosti podloga. Hranjiva podloga ima definirane uvjete čuvanja te rok valjanosti koji predstavlja vrijeme unutar kojega zadržavaju nepromijenjena fizikalna i mikrobiološka svojstva. Hranjive podloge, nakon pripreme i sterilizacije, čuvaju se u hladnjaku pri 2 – 8 °C najduže mjesec dana, odnosno ako se radi o komercijalno pripremljenim hranjivim podlogama, čuvaju se pri propisanim uvjetima u roku valjanosti definiranom od proizvođača. Za procjenu vremena isteka roka trajanja, provodi se testiranje rasta mikroorganizama na kraju roka trajanja. Validacijom čuvanja hranjivih podloga potvrđuje se rok valjanosti podloga pri propisanim uvjetima čuvanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HRANJIVE PODLOGE

Hranjiva podloga od temeljne je važnosti te je osnova gotovo svih mikrobioloških analiza. Kako bi se osigurala visoka kvaliteta hranjivih podloga, potrebno je provoditi njihovu kontrolu te ih prikladno skladištiti (PLIVA HRVATSKA, 2023a). Hranjiva se podloga koristi za dobivanje čistih kultura, za rast i brojanje stanica mikroorganizama, za uzgoj i selekciju mikroorganizama. Hranjiva podloga sadrži nutrijente, promotore faktora rasta, izvore energije, puferske soli, minerale, metale i agar ukoliko su za analize potrebne krute hranjive podloge (Sandle, 2016). Dostupan je niz različitih hranjivih podloga, no najčešća podjela je temeljena na fizičkom stanju podloge: tekuće hranjive podloge, češće zvane *broth* (slika 1), čvrste i polučvrste hranjive podloge, uobičajeno zvane „agar“ (slika 2). Agar je polisaharid koji služi za skrućivanje hranjivih podloga (PLIVA HRVATSKA, 2022a). Navedene podloge mogu se još podijeliti prema namjeni: hranjive podloge za izolaciju i uzgoj mikroorganizama, selektivne podloge, diferencijalne podloge, podloge za posebne namjene, transportne, hranjive mikrobiološke podloge za čuvanje bakterijskih kultura. Farmaceutski mikrobiološki laboratoriji koriste niz različitih podloga ovisno o njihovoj primjeni (Sutton, 2005).



Slika 1. Tekuća hranjiva podloga *broth* (vlastita fotografija)



Slika 2. Mikrobiološka agar ploča s naciepljenom bakterijskom kulturom *S. aureus* (*vlastita fotografija*)

2.1.1. Proizvodnja hranjivih podloga

U mikrobiološkom laboratoriju za analizu koriste se podloge koje mogu biti pripravljene iz komponenti ili komercijalno pripravljene, *ready-to-use* podloge. Ukoliko se podloge pripremaju u laboratoriju, mogu se pripremati iz industrijski pripremljenih dehidriranih podloga različitih proizvođača kao što su BD, Difco, Biomerieux, Merck i dr. ili se važu pojedinačni sastojci. Ključne faze u procesu proizvodnje podloga su: početna priprema, rehidracija, sterilizacija, suplementiranje, punjenje, označavanje, sekundarna sterilizacija (Sutton, 2005). Sve ove faze pobliže će biti opisane u potpoglavljima koja slijede. Neprikladni uvjeti zagrijavanja ili sterilizacije za komercijalno ili interno pripremljene hranjive podloge mogu rezultirati promjenom boje, gubitkom bistrine, promijenjenom čvrstoćom agara, promjenom pH u odnosu na raspon deklariranog od proizvođača, kao i smanjenu hranjivost i/ili selektivnost podloga (PLIVA HRVATSKA, 2023a).

2.1.1.1. Početna priprema, vaganje i doziranje

Hranjive podloge smjesa su hranjivih sastojaka koji mikroorganizmima, u laboratorijskim uvjetima, omogućavaju rast, razmnožavanje i njihove biokemijske funkcije. Prije samog početka rada, definira se količina koja je potrebna te vrsta hranjive podloge koja se želi pripremiti. Odabir

hranjivih podloga i otopina koje se koriste u mikrobiološkom laboratoriju je proveden rukovodeći se preporukama važećih farmakopeja (Ph. Eur. i USP), odnosno potrebama analiza. Pri pripravi hranjivih podloga unutar mikrobiološkog laboratorija, ukoliko je potreban kompleksni medij, koristi se kupljeni *pre-mixed* prah. Dehidrirana podloga nije uvijek dostupna za sve vrste podloga koje se žele pripremiti. Radi toga, kupuju se i druge individualne komponente. Priprava hranjive podloge započinje odvagom propisane količine dehidrirane hranjive podloge ili pojedinih sastojaka (Sandle, 2019).

2.1.1.2. Rehidratacija

Odvagane komponente otope se u propisanoj količini pročišćene vode, po potrebi zagrije i ako je potrebno podesi se pH tako da nakon sterilizacije bude unutar deklarirane vrijednosti. Prah za podloge se rehidrira s određenim volumenom vode prema zahtjevu za podlogu koju se radi. Upute za pripremu su najčešće sadržane na vanjskoj strani ambalaže. Za agar, krajnja koncentracija je uobičajeno 1,5 % w/v. Ako se preporučuje zagrijavanje u svrhu olakšanog otapanja podloge, treba spriječiti mogućnost pregrijavanja podloge. Tamnija boja podloge obično je pokazatelj pregrijavanja. Ako se dodaju određene supstance u podlogu, potrebno je osigurati pravilno miješanje dodanih supstancija u svrhu njihove pravilne raspodjele. Za podlogu koja sadrži agar kao agens za skrućivanje, podloga se hidrira laganim zagrijavanjem i dodavanjem vode. Podloga bi se trebala razbistriti blizu temperature vrelišta (95 – 100 °C), a vrenje podloge nije dozvoljeno duže od minute. Pri proizvodnji tekućih hranjivih podloga, iste se rastoče u bočice (najčešće staklene) prije sterilizacije. Kada se proizvode krute podloge, najčešće se skuha podloga prvo sterilizira, ohladi te zatim rastoči u Petrijeve zdjelice (Sandle, 2019).

2.1.1.3. Sterilizacija

Hranjive podloge i otopine koje se koriste u mikrobiološkoj analizi moraju biti sterilne pa se nakon pripreme podvrgavaju postupku sterilizacije u autoklavu tj. steriliziraju se parom pod tlakom. U svrhu sterilizacije podloga treba koristiti kvalificirane postupke parne sterilizacije. Tekuće podloge i otopine je moguće sterilizirati i uz primjenu sterilne filtracije. Temperatura i vrijeme sterilizacije propisani su za svaku pojedinu podlogu uputom proizvođača podloge. Parametri sterilizacije, temperatura i vrijeme, ovisni su o kemijskom sastavu i termičkoj

osjetljivosti pojedinih sastojaka hranjive podloge. Neodgovarajući uvjeti sterilizacije hranjivih podloga mogu rezultirati promjenom boje, gubitkom bistrine, promijenjenom strukturom agara ili odstupanjem pH vrijednosti od očekivane kao i smanjenom aktivnošću za poticanje rasta i/ili selektivnošću (PLIVA HRVATSKA, 2022a). Dehidrirana podloga treba biti potpuno otopljena u vodi prije njenog rastakanja i sterilizacije. Većina prahova za podloge nije sterilna te se iz tog razloga mora provesti sterilizacija kako bi se eliminirali živi mikroorganizmi te kako ne bi došlo do kvarenja podloge. Takva kontaminirana podloga je mikrobiološki neispravna i neupotrebijiva za daljnju analizu i upotrebu (Sandle, 2019).

2.1.1.4. Dodatak suplemenata

Za neke hranjive podloge, neophodan je dodatak aditiva odnosno suplemenata. Većina takvih komponenti ne može se sterilizirati autoklaviranjem budući da se takve komponente najčešće raspadaju pod visokim temperaturama, uobičajeno neke aminokiseline i puferi. Sterilnost ovih komponenti postiže se membranskom filtracijom, pri čemu treba obratiti pozornost pri izboru materijala od kojeg je filter kako ne bi došlo do kontaminacije filtrata. Ove komponente se dodaju nakon sterilizacije, nakon što se podloga ohladi u vodenoj kupelji (Sandle, 2019).

2.1.1.5. Punjenje

Čvrsta hranjiva podloga, agar, prelijeva se u Petrijeve zdjelice dok je još u tekućem agregatnom stanju. Želiranje se obično javlja kod temperatura između 32 i 40 °C. Promjer Petrijevih zdjelica obično je između 95 i 100 mm. Punjenje Petrijevih zdjelica hranjivom podlogom obavlja se u čistim zonama s jednosmjernim strujanjem zraka kako bi se kontaminacije svele na minimum (Sandle, 2019).

2.1.1.6. Označavanje

Sve bočice s tekućom hranjivom podlogom *brothom* i prelivene Petrijeve zdjelice hranjivom podlogom moraju se označiti etiketom koja mora sadržavati ime hranjive podloge, serijski broj, datum isteka roka valjanost i uvjete čuvanja. Dodijeljeni broj svakoj podlozi zapisuje se u dnevnik rada.

2.1.1.7. Sekundarna sterilizacija

Za neke agar ploče, poput onih koje se koriste prostorijama klase A i B, potrebna je dodatna sterilizacija. Najčešća metoda je zračenje gama zraka. Učinak zračenja provjerava se naknadno ispitivanjem sterilnosti (Barry i Fay, 1972).

2.1.2. Mjerenje pH

pH vrijednost hranjivih podloga definirana je deklaracijom proizvođača, a nakon sterilizacije treba biti u okviru $\pm 0,2$ jedinice u odnosu na deklariranu pH vrijednost, osim ako je širi raspon prihvaćen za to validiranom metodom. pH vrijednost hranjivih podloga provjerava se nakon sterilizacije pri temperaturi 23 – 25 °C, a ukoliko se radi o krutim hranjivim podlogama treba provjeriti pH vrijednost nakon njihovog skrućivanja (primjenom *surface flat* elektode i sl.) (PLIVA HRVATSKA, 2022a).

2.1.3. Ispitivanje hranjivosti naciepljivanjem hranjive mikrobiološke podloge

Ispitivanje hranjivosti se provodi naciepljivanjem s ne više od 100 CFU/mL (engl. *colony forming units*) odgovarajućeg test mikroorganizma te inkubacijom na temperaturi i kroz najkraće vrijeme koje je preporučeno u rutinskom testu. Postupak inokulacije hranjivih podloga provodi se sa tri decimalna razrjeđenja (slika 3) suspenzije po jednom test mikroorganizmu. Odabrana decimala razrjeđenja pipetiraju se na ispitivanu podlogu, poredbenu podlogu (ranije odobrenu istu hranjivu podlogu) i na inokulum. (PLIVA HRVATSKA, 2023b).



Slika 3. Primjer naciepljenoga mikroorganizma *Candida albicans* ATCC 10231 na čvrstu hranjivu podlogu trima različitim decimalnim razrjeđenjima: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (*vlastita fotografija*)

2.2. KONTROLA KVALITETE HRANJIVIH MIKROBIOLOŠKIH PODLOGA

Europska farmakopeja i farmakopeja SAD-a, Ph.Eur. i USP, opisuju upotrebu hranjivih podloga, u prvom redu za ispitivanje sterilnosti, ispitivanje mikrobiološke čistoće nesterilnih proizvoda te za ispitivanje mikrobiološke čistoće procesnih medija. Testovi kontrole kvalitete podloga se provode nakon što su izvršeni svi koraci u postupku pripreme hranjive podloge, uključujući i sterilizaciju. Ispitivanje se provodi prije primjene hranjivih podloga ili najkasnije tijekom njihove primjene uz uvjet da podloge imaju potvrđenu hranjivost prije kraja mikrobioloških analiza (Cundell, 2002).

Kontrola kvalitete hranjivih podloga može se podijeliti u dva dijela: ispitivanje fizičkih svojstava; vizualni pregled i mjerenje pH te ispitivanje mikrobioloških svojstava; kontrola mikrobiološkoga statusa podloga (sterilnosti) i ispitivanje hranjivih, inhibitornih i indikativnih svojstava.

2.2.1. Ispitivanje fizičkih svojstava

Primjer fizičkog ispitivanja uključuje vizualni pregled (izgled). Svakoj seriji *ready-to-use* ili pripremljenih hranjivih podloga u laboratoriju provjerava se integritet, izgled i boja prema sljedećem:

- oštećenja i nejednako punjenje spremnika,
- pukotine i udubljenja na agaru,
- sadržavanje mjehurića
- sadržavanje kristalnih struktura zbog mogućeg smrzavanja
- promjena boje ili prekomjerno tamnjenje
- mikrobiološka kontaminacija
- redoks indikatori (ako je primjenjivo)
- hemoliza
- čistoća ploča (npr. poklopac ne smije biti zalijepljen za zdjelicu).

Ispitivanje fizičkih svojstava uključuje i provjeru pH vrijednosti agar ploče ili *brotha*. Temperaturni raspon unutar kojeg se provode sva mjerenja pH vrijednosti je između 23 i 25 °C. pH metar je kalibriran za određeno područje primjene. Izmjerena vrijednost pH treba biti u

okviru $\pm 0,2$ jedinice u odnosu na deklarirani pH vrijednost, osim ako nije drugačije deklarirano od proizvođača. (PLIVA HRVATSKA, 2023b).

2.2.2. Ispitivanje mikrobioloških svojstava

Test sterilnosti odnosno kontrola mikrobiološkog statusa sterilnosti i ispitivanje hranjivih, inhibitornih i indikativnih svojstva najvažnija su ispitivanja kontrole kvalitete hranjivih podloga koja se provode u mikrobiološkom laboratoriju.

2.2.2.1. Kontrola sterilnosti

Hranjive podloge koje se koriste za provođenje mikrobioloških analiza moraju zadovoljiti zahtjev za mikrobiološki status (sterilnost) podloge. Cilj je otkriti eventualnu kontaminaciju nastalu tijekom procesa proizvodnje podloge i/ili njenog transporta. Vrijeme i temperatura inkubacije za test sterilnosti ovisi o kojoj je vrsti hranjive podloge riječ. Ukoliko kruta hranjiva podloga nakon inkubacije ne pokazuje nikakav rast kolonija, nema zamućenja kod tekuće hranjive podloge, podloga je sterilna. Ukoliko podloga nije sterilna, nije dozvoljeno koristiti ju za analizu te se rezultati takve analize ne prihvaćaju (PLIVA HRVATSKA, 2021).

2.2.2.2. Kontrola hranjivosti, inhibitornih i indikativnih svojstava

Ispitivanje hranjivosti provodi se na svakoj seriji hranjive mikrobiološke podloge, dok se ispitivanja inhibitornih i indikativnih svojstava provode kod selektivnih hranjivih podloga. Kod većine testova za ispitivanje hranjivosti nastoji se dokazati da medij podržava rast malog broja mikroorganizama točnije manje od 100 CFU/mL (Baird, 1989). Za verifikaciju inhibitornog svojstava selektivnih podloga ispitivanje se provodi naciepljivanjem podloge s više od 100 CFU/mL odgovarajućeg test mikroorganizma, a ispitivanje indikativnih svojstava podloge provodi se naciepljivanjem podloga s ne više od 100 CFU/mL odgovarajućeg test mikroorganizma, a nakon čega se provodi inkubacija pri temperaturi i kroz vrijeme inkubacije preporučeno za test u kojem se podloga rutinski koristi. Farmakopeja preporučuje korištenje određene vrste mikroorganizama, koje se mogu pronaći u nacionalnim zbirkama mikroorganizama, kao što je na primjer *American Type Culture Collection*, ATCC, a osim ATCC mikroorganizama potrebno je uključiti i najmanje jedan *in house* mikroorganizam.

Matične kulture iz kolekcija moraju se pažljivo čuvati unutar laboratorijske Zbirke mikroorganizama. To uključuje i održavanje dovoljno niske temperature u svrhu izbjegavanja fenotipskih varijacija te ograničavanje broja pasaža na manje od pet (Snell, 1995).

Ispitivanje hranjivosti se provodi naciepljivanjem s ne više od 100 CFU/mL odgovarajućeg test mikroorganizma te inkubacijom na propisanoj temperaturi i kroz najkraće vrijeme koje je preporučeno u rutinskom testu (PLIVA HRVATSKA, 2023b). Ukoliko se unutar propisanog vremena inkubacije tekuće hranjive podloge pojavi zamućenje, može se zaključiti da je ista tekuća hranjiva podloga hranjiva. Čvrsta hranjiva podloga zadovoljava test hranjivosti ukoliko na njenoj površini narastu kolonije koje su tipične izgledom i rastom za inokulirani mikroorganizam. Ukoliko se određuje ukupan broj mikroorganizama na čvrstoj hranjivoj podlozi, i kvantitativni kriterij rasta mora biti zadovoljen. U tom slučaju prihvatljiva serija bit će ona na kojoj je određen broj mikroorganizama u rasponu $\pm 50\%$ od poredbenoga inokuluma. Na obje vrste podloga, čvrstoj i tekućoj, rast mikroorganizama mora biti karakterističan za inokulirani mikroorganizam te mora biti usporediv s prethodno odobrenom serijom podloge (PLIVA HRVATSKA, 2023b).

2.3. TEST MIKROORGANIZMI

Test mikroorganizmi koji se koriste za kontrolu hranjivosti mikrobioloških hranjivih podloga moraju biti određeni sojevi i poznatoga podrijetla. To su sojevi stabilnih karakteristika, reprezentativni sojevi svoje vrste, pouzdani za optimalnu izvedu ispitivanja hranjivosti. Najčešće se uzimaju sojevi iz zbirke, kao što su američka ATCC (*American Type Culture Collection*), britanska NCTC (*National Collection of Type Cultures*), njemačka DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*). Test organizmi za svaki medij mogu uključivati različite vrste sojeva s tipičnim karakteristikama:

- slabo rastući pozitivni sojevi (tj. osjetljivije prirode),
- biokemijski nereaktivni sojevi (npr. oni koji pokazuju različite reakcije pri fermentaciji ili fluorescenciji) i
- potpuno inhibirani sojevi.

Važno je provesti ispitivanje relevantnih karakteristika matične kulture iz referentnih sojeva i zabilježiti ih u laboratoriju. U slučaju pojave atipičnih karakteristika, matična kultura se obnavlja. Korištenje nestandardiziranih kultura se ne preporuča ukoliko ne postoji povijest rukovanja ili dostupnih subkultura.

2.3.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Staphylococcus aureus je Gram-pozitivni (dokazano bojanjem po Gramu) patogen koji uzrokuje razne kliničke bolesti. Fakultativni je anaeroban mikroorganizam što znači da može preživjeti u okolišnim uvjetima s kisikom kao i bez kisika. Pripada rodu *Staphylococcus* te porodici *Staphylococcae*. Kuglasta je, nepokretna bakterija. Identifikacija *Staphylococcus aureus* tradicionalnim tehnikama jednostavna je, no spora. Uvođenjem molekularnih tehnika ovaj proces postaje sve brži. Kolonije *Staphylococcus aureus* izgledaju svjetlucavo, glatko i prozirno, često s zlatnim pigmentom. U tekućim podlogama ne stvara pigment nego kolonije imaju oblik pahuljica koje lebde u mediju (Bagnoli i sur., 2017).

2.3.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bakterije roda *Bacillus* su Gram-pozitivne, katalaza-pozitivne, štapićastog oblika te imaju sposobnost stvaranja spora (Kovács, 2019). Primjer za to je *Bacillus subtilis*, koji se široko koristi u laboratorijskim istraživanjima. Luči brojne enzime koji im omogućuju razgradnju raznih supstrata, što im pomaže preživjeti u promjenjivim okolišima (Earl i sur., 2008). *Bacillus subtilis* i slične vrste često se koriste za proizvodnju ljekovitih proteina i industrijskih enzima. Imaju izvrsnu sposobnost lučenja proteina, što ih čini vrijednim organizmima za heterolognu ekspresiju proteina. Također, *Bacillus subtilis* ima izvanredne fiziološke karakteristike i visoku prilagodljivost metabolizma, što olakšava jeftin uzgoj u podlozi. Brzo raste i fermentacijski ciklus obično traje 48 sati (Su i sur., 2020). Važno je napomenuti da *Bacillus subtilis* općenito ima status "*Generally regarded as safe*" (GRAS), što znači da se smatra sigurnim za uporabu u raznim poljima primjene (Zweers i sur., 2008).

2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Pseudomonas aeruginosa aerobna je, Gram-negativna bakterija (bojanjem po Gram-u boji se crveno), u obliku štapića, a pojavljuju se pojedinačno, u parovima, lancima ili su složeno jedan pokraj drugog. Nema sposobnost formiranja spora i ima jedan ili više polarnih bičeva za pokretljivost, dok neke vrste posjeduju i fimbrije. *Pseudomonas aeruginosa* dobro raste na temperaturi od 25 °C do 37 °C, što je unutar opsega tjelesne temperature ljudi. Njegova sposobnost rasta na 42 °C često se koristi kao karakteristika za razlikovanje *Pseudomonas*

aeruginosa od drugih vrsta *Pseudomonas*. Pripada rodu *Pseudomonas*. Vrste ovog roda posjeduju polisaharidnu kapsulu, enzime citokrom-oksidadazu i katalazu. Temeljom testa dokazivanja oksidaze mogu se razlikovati od eneterobakterija koje nemaju ovaj enzim. *Pseudomonas aeruginosa* je bakterija koja se može pronaći široko rasprostranjena u okolišu, tlu, vodi, biljkama, životinjama (Kalenić i sur., 2013). Ova vrsta ima visoku prilagodljivost i sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima. Osim što može uzrokovati bolesti u biljkama i životinjama, *P. aeruginosa* također je poznata kao značajan uzročnik infekcija kod ljudi. Većina sojeva *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi različite pigmente, uključujući piocijanin, pioverdin i piorubin. Ovi pigmenti daju karakteristične boje kolonijama *P. aeruginosa* na krutim hranjivim podlogama i mogu se koristiti kao dijagnostički pokazatelji za identifikaciju ove bakterije. Piocijanin je plavo-zeleni pigment, dok je pioverdin žuto-zelene i fluorescentne boje. Piorubin je crveno-smeđi pigment koji također može biti prisutan kod nekih sojeva *P. aeruginosa*, iako u manjoj mjeri u usporedbi s piocijaninom i pioverdinom (Wu i sur., 2015).

2.3.4. *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

Rod *Clostridium* su Gram-pozitivni, anaerobni, sporogeni pokretni štapići, žive u slobodnoj prirodi i u gastrointestinalnom sustavu čovjeka i životinja, imaju sposobnost stvaranja spora u nepovoljnim uvjetima. Položaj spora može biti centralni, subterminalni, terminalni, unutar štapića ili veće od štapića pri čemu ga deformiraju. Anaerobne bakterije ne rastu u prisustvu kisika tako da se za njihovu inkubaciju moraju osigurati anaerobni uvjeti. Raširene su u raznim staništima bez kisika kao što su tlo, voda, rijeka, jezera, dna oceana, otpadne vode. Identifikacija se provodi na temelju makroskopskoga i mikroskopskoga izgleda, pomoću raznih testova primjene različitih supstrata, čak i plinskom kromatografijom budući da su specifične hlapljive masne kiseline produkti mnogih klostridija (Kalenić i sur., 2013). *Clostridium sporogenes* je naziv za određene sojeve *C. botulinum* koji ne proizvode botulinum neurotoksine. *Clostridium sporogenes* može primijeniti kao vektor u genskoj terapiji raka zbog svoje prirode anaerobnog organizma koji ima sposobnost selektivnog rasta u tumorskom okruženju. Tumori često stvaraju anaerobne uvjete zbog nepravilne opskrbe kisikom, a *C. sporogenes* preferira takvo okruženje. *Clostridium sporogenes* klasificiran je na temelju svoje sposobnosti fermentacije aminokiselina kao apoteolitički član roda *Clostridium*, reda *Clostridiales*, porodice *Clostridiaceae*. U nepovoljnim uvjetima *C. sporogenes* proizvodi ovalne, subterminalne endospore (Li, 2014).

2.3.5. *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Kvasac *Candida albicans* i plijesan *Aspergillus brasiliensis* eukariotski su mikroorganizmi koji po svojoj klasifikaciji pripadaju u carstvo gljiva (fungi). Kvasac je jednostanični oblik gljive (blastokonidija) koji se razmnožava pupanjem, a plijesan je višestanični oblik (hife, micelij). Posjeduju primarni i sekundarni metabolizam kojim se izlučuju sekundarni metaboliti kao što su antibiotici i mikotoksini. Identifikacija kvasaca se temelji na morfološkim i fiziološkim osobinama, dok se identifikacija plijesni temelji na stvaranju konidija i morfologiji plodnih tijela (Kalenić i sur., 2013). Gljive ne sintetiziraju klorofil ili bilo koji fotosintetski pigment. Također, njihova stanična stijenka je sastavljena od hitina umjesto celuloze (iako postoje neke iznimke), a gljive imaju i sposobnost pohranjivanja glikogena. U okviru gljiva, postoje mnoge vrste koje su patogene i mogu uzrokovati ozbiljne bolesti kod ljudi. Stanicu kvasca se naziv blastokonidij. *Candida albicans* je posebno česta vrsta *Candida* koja može kolonizirati različite dijelove ljudskog tijela, što je jedan od glavnih razloga zašto je najčešća uzročnica infekcija ovog roda. Morfološke karakteristike ove vrste su: kremasta konzistencija, površina gljive može biti sjajna i reflektirajuća ili neprozirna, ovisno o vrsti, bijele do krem boje, može biti i boje slonovače do crvene boje. Boja može biti važan faktor pri identifikaciji vrste. Promjer gljive može varirati od 5 do 8 mm, ovisno o vrsti. Stanice gljive mogu biti jednostavne, zaobljene, ovalne ili izdužene. *Candida spp.* je mikroorganizam koji se najbolje razvija na toplim i vlažnim površinama, te može uzrokovati različite oblike kandidijaze. *Aspergillus brasiliensis* pripada rodu *Aspergillus*, klasi *Ascomycetes*, a opisana je unutar vrste *Aspergillus nigri*. Građena je od brojnih, sitnih, razgranatih hifa koje čine micelij. Micelij se sastoji od dva dijela; vegetativni dio koji apsorbira hranjive tvari iz vanjske okoline te služi prehranjivanju gljivičnog tijela i zračni micelij koji raste iznad supstrata te ima ulogu u razmnožavanju odnosno naziva se reproduktivni micelij (Kalenić i sur., 2013). Kolonije plijesni su na početku rasta slabo žute, a u kratkom vremenskom razdoblju postaju crne te stvaraju konidije.

2.3.6. *Bacillus beringensis*

Bacillus beringensis psihrotolerantni je soj te pripada rodu *Bacillus* te je izoliran iz Beringovog mora. Ovaj mikroorganizam okarakteriziran je pomoću polifaznog pristupa što znači da su svojstva ispitana na više razina. Stanice ovog mikroorganizma su Gram-pozitivne,

striktno aerobne, stvaraju spore, kreću se pomoću polarnog flageluma, štapićastoga su oblika, pojavljuju se pojedinačno ili u lancima. Optimalna temperatura rasta je na 30 – 33 °C, a optimalni pH 6,0 – 8,0. Kolonije su nakon inkubacije kružnoga oblika, neprozirne, bijele, konveksne s nepravilnim rubom (Yu i sur., 2010).

2.3.7. *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes je Gram-pozitivni bacil, anaeroban mikroorganizam koji ne sporulira. Stanice su polimorfnog oblika, a mnoge imaju dva zaobljena kraja. Kemoheterotrofi su te za im je za rast potreban složeni hranjivi medij. Replikacija odnosno umnažanje i rast je spor što može uzrokovati poteškoće pri uzgoju ovog mikroorganizma. Kolonije *Propionibacterium acnes* na površini krute hranjive podloge mogu pokazivati različite boje pigmentacije, uključujući bijelu, sivu, ružičastu, crvenu ili žutu (Zhou, 2015). Dio je normalne flore kože te se shodno tomu često može pronaći kao kontaminant u raznim kulturama mikroorganizama. Na ljudskoj koži uzročnik je akni (Arts, 2017).

2.4. MIKROBIOLOŠKA IDENTIFIKACIJA

Postoje različite tehnike identifikacije koje se koriste, od tradicionalnih diferencijalnih bojenja stanične stijenke, kao što je bojanje po Gramu, do suvremenih molekularnih bioloških metoda (Sandle, 2004). Glavni cilj mikrobne identifikacije je razlikovanje jednog mikrobnog izolata od drugog te klasifikacija izolata na razini porodice, roda, vrste ili posebnog soja. Komercijalno dostupni mikrobni identifikacijski sustavi mogu se podijeliti na fenotipske i genotipske metode (Sandle, 2014). Ponekad se spominje i treća kategorija proteomskih metoda, dok se u nekim tekstovima proteini smatraju oblikom fenotipa zbog njihove ovisnosti o vanjskoj okolini. Također, spominje se i četvrta kategorija kemotaksonomskih metoda koje se temelje na kemijskim sastojcima stanica, kao što su antigeni, sastav stanične stijenke, sadržaj masnih kiselina ili proteini cijele stanice. Fenotipske metode temelje se na opažanjima karakteristika mikrobnih fenotipa kao što su morfologija, fiziologija, biokemija i metaboličke aktivnosti. Uključuju tradicionalne tehnike poput diferencijalnih bojenja, kultivacije na selektivnim medijima, testiranja enzima i druge fenotipske testove. Biokemijski testni sustavi primjer su fenotipskih metoda identificiranja mikroorganizama te su vrlo često korišteni u identifikaciji bakterija. Ovi testovi temelje se na istraživanju enzimskih aktivnosti stanica i omogućuju analizu

sposobnosti bakterija da koriste različite izvore ugljika za energiju potrebnu za njihov život. Poluautomatizirani fenotipski identifikacijski sustavi, kao što su VITEK i OmniLog, popularni su u laboratorijima (Sandle, 2013). Postoji i alternativa fenotipskim metodama; analiza staničnih masnih kiselina pomoću plinske kromatografije (GC-FAME) (Fung, 2002). Fenotipske metode koje su odnedavno razvijene uključuju masenu spektrometriju i protočnu citometriju. Masena spektrometrija identificira mikroorganizme na temelju proteinskih „otisaka prstiju“. Radi se o specifičnim obrascima ekspresije proteina koji se koriste kao biomarkeri za identifikaciju. Primjer uređaja pomoću kojeg se može provesti identifikacija je MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*). Izolirana kolonija ili stanični ekstrakt nanose se na ciljnu ploču koja se zatim analizira laserskom ionizacijom. Rezultat analize su proteinski spektri koji se uspoređuju s bazom podataka poznatih spektara kako bi se identificirao mikroorganizam (Sandle, 2015). Protočna citometrija je tehnika koja koristi serološke metode za analizu stanica suspendiranih u tekućem mediju pomoću svjetla, električne vodljivosti ili fluorescencije (Attfield, 1999).

2.5. VALIDACIJA

Proces laboratorijskih ispitivanja koja mogu potvrditi da izvedbene karakteristike neke metode zadovoljavaju zahtjeve za namjeravanu primjenu može se definirati kao validacija (Riley i Rosanske, 1996). Validacija je važan korak u osiguravanju prikladnosti i pouzdanosti nove metode ili tehnike za namjeravanu svrhu. Validacija mikrobiološke metode također pridonosi osiguranju kvalitete laboratorijskih rezultata i važan je korak u regulaciji farmaceutskih procesa. Može uključivati procjenu samog postupka metode kao i prikladnost uzorka koji se analizira ili testira u odnosu na tu metodu. S napretkom tehnologije i regulatornih zahtjeva mikrobiološke metode „okreću“ se sve više kvantitativnim metodama te se „udaljavaju“ od kvalitativnih. Bez obzira koriste li se tradicionalne ili naprednije metode, zajedničko za validaciju mikrobiološke metode je: određivanju ima li uzorak koji se ispituje antimikrobna svojstva i mogu li uvjeti inkubacije i rasta oporaviti mikroorganizme koji mogu biti prisutni do prihvatljive razine (Sandle, 2015). Usporedno s razvojem metode, a prije validacije moraju se postaviti i kriteriji prihvatljivosti. Kriteriji prihvatljivosti uključuju mikroorganizme koji se moraju uključiti u proces validacije, hranjivu podlogu, temperatura inkubacije/okoline, vrijeme inkubacije, atmosferu u kojoj se inkubiraju mikroorganizmi, specifičnost, robusnost, linearnost, opseg metode, točnost, ponovljivost. Također postoje i alternativne i brze mikrobiološke metode koje

mogu učinkovitije provesti mikrobiološku kontrolu i poboljšano osiguranje kvalitete farmaceutskog proizvoda (Gordon, 2011).

2.6. PROCJENA VREMENA TRAJANJA HRANJIVE PODLOGE

Hranjiva podloga ima definirane uvjete čuvanja kao i datum isteka roka valjanosti (Martin, 1971). Komercijalna pakiranja dehidriranih hranjivih podloga nakon otvaranja trebaju imati oznaku datuma kada su otvorena i smiju se koristiti do isteka roka valjanosti uz uvjet da nije došlo do promijene u strukturi podloge. Ispitivanje roka valjanosti potvrda je roka trajanja hranjive podloge. Rok trajanja ovisi o uvjetima skladištenja, kemijskoj stabilnosti podloge, kvaliteti polaznih materijala i formulacije, procesu proizvodnje podloge, procesu sterilizacije, kvaliteti i vrsti spremnika u kojem je podloga pohranjena. Hranjive podloge nakon pripreme i sterilizacije čuvaju se u hladnjaku pri 2 – 8 °C najduže mjesec dana, odnosno ako se radi o komercijalno pripremljenim hranjivim podlogama, čuvaju se pri propisanim uvjetima u definiranom roku valjanosti kako je proizvođač naveo na pakiranju. Industrijski pripravljene (*ready-to-use*) podloge u zatvorenim spremnicima mogu se koristiti za analize do datuma otisnutog na pakiranju, uz uvjet da su čuvane prema preporuci proizvođača. Za procjenu vremena isteka roka trajanja, provodi se testiranje rasta mikroorganizama na kraju roka trajanja. Dobiveni rezultati trebali bi zadovoljiti iste kriterije kao pri izvornome testiranju (PLIVA HRVATSKA, 2022a).

2.7. ISPITIVANJE STERILNOSTI

Pojam sterilnosti prvenstveno se odnosi na svojstvo koje ukazuje na odsutnost mikroorganizama. Ispitivanje sterilnosti predstavlja analitičku metodu kojom se ispituje odnosno potvrđuje sterilnost uzorka. Primjenjuje se za ispitivanje sterilnosti supstancija, poluproizvoda, pakiranih materijala, gotovih proizvoda te ostalih uzoraka koji moraju biti sterilni prema propisanoj specifikaciji. Svaki postupak ispitivanja sterilnosti mora biti aseptičan odnosno negativnom kontrolom dokazan da je isti proveden u aseptičnim uvjetima rada što uključuje sterilnost upotrijebljenoga pribora, otopina i podloga. Kontrola podloga i provjera hranjivosti podloga za ispitivanje sterilnosti provodi se na svakoj seriji pripravljene i sterilizirane podloge te na svakoj zaprimljenoj isporuci podloga istoga LOT-a.

Tryptic Soy Broth (TSB) odnosno medij za digestiju kazeina soje hranjiva je podloga koja se koristi za izolaciju i uzgoj mikroorganizama. Koristi se za provjeru sterilnosti, ali je i generalni tekući medij koji se koristi pri ispitivanju hranjivih svojstava medija. Može se također koristiti i za simulacijska ispitivanja (Booth, 2006) .

Fluid Thioglycollate Medium (FTM) koristi se za uzgoj anaerobnih i aerobnih bakterija. Primarno se koristi za ispitivanje sterilnosti te kao takav sadrži resazurin, oksidacijsko-redukcijski indikator (Sandle, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Hranjive mikrobiološke podloge

Za validaciju i kontrolu čuvanja hranjivih podloga i to za ispitivanje sterilnosti određenih gotovih farmaceutskih proizvoda koristile su se sljedeće hranjive podloge:

- *ready-to-use* hranjiva mikrobiološka podloga TSB
- *ready-to-use* hranjiva mikrobiološka podloga FTM
- *Tryptic Soy Agar* (TSA)
- *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
- *Tryptic Soy Broth* (TSB)
- *Reinforced Medium for Clostridium* (RMC)
- *Trypcase Soy agar + 5 % ovčja krv* (TSS)

3.1.1.1. Sastav mikrobiološke hranjive podloge TSB

- Pepton iz kazeina 17,0 g/L;
- Pepton iz sojinog brašna 3,0 g/L;
- D (+) glukoza 2,5 g/L;
- Natrijev klorid 5,0 g/L;
- Di-kalijev hidrogenfosfat 2,5g/L

3.1.1.2. Sastav mikrobiološke hranjive podloge FTM

- Pepton iz kazeina 15,0 g/L;
- Kvaščev ekstrakt 5,0 g/L ;
- D (+) glukoza 5,5 g/L;
- L-cistein 0,5 g/L;
- Natrijev klorid 2,5 g/L;
- Natrijev tioglikolat 0,5 g/L;
- Natrijev resazurin 0,001 g/L;
- Agar-agar 0,75 g/L.

3.1.1.3. Sastav mikrobiološke hranjive podloge RMC

- Mesni ekstrakt 10,0 g/L;
- Pepton 5,0 g/L;
- Kvašćev ekstrakt 3,0 g/L;
- D (+) glukoza 5,0 g/L;
- Škrob 1,0 g/L;
- Natrijev klorid 5,0 g/L;
- Natrijev acetat 3,0 g/L;
- L-cistein klorid 0,5 g/L;
- Agar-agar 0,5 g/L.

3.1.1.4. Sastav mikrobiološke hranjive podloge SDA

- pepton 10,0 g/L;
- D (+) glukoza 20,0 g/L;
- agar-agar 170 g/L.

3.1.1.5. Sastav mikrobiološke hranjive podloge TSA

- pepton iz kazeina 15,0 g/L
- pepton iz sojinog brašna 5,0 g/L
- natrijev klorid 5,0 g/L
- agar-agar 15,0 g/L

3.1.1.6. Sastav mikrobiološke hranjive podloge TSS

- pepton iz kazeina 15,0 g/L
- pepton iz sojinog brašna 5,0 g/L
- natrijev klorid 5,0 g/L
- agar-agar 15,0 g/L
- ovčja krv 5 %

3.1.2. Test mikroorganizmi

Pri ispitivanju pogodnost za rast tj. hranjivost *ready-to-use* podloga koriste se suspenzije test mikroorganizama koje se pripremaju u Laboratoriju. Korišteni test mikroorganizmi prema zahtjevu SOP001608 (PLIVA HRVATSKA, 2023b) su: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Clostridium sporogenes*

ATCC 11437, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, „in-house“ soj *Bacillus beringensis* (podaci o soju su interni), „in-house“ soj *Propionibacterium acnes* (podaci o soju su interni).

Taksonomska klasifikacija mikroorganizama je kako slijedi:

Test mikroorganizam *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Carstvo: Bacteria

Koljeno: Firmicutes

Razred: Bacilli

Red: Bacillales

Porodica: Staphylococcaceae

Rod: *Staphylococcus*

Vrsta: *Staphylococcus aureus* (De La Fuente i sur., 1985)

Test mikroorganizam *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Carstvo: Bacteria

Koljeno: Bacillota

Razred: Bacili

Red: Bacillales

Porodica: Bacillaceae

Rod: *Bacillus*

Vrsta: *Bacillus subtilis* (Kovacs, 2019)

Test mikroorganizam *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Carstvo: Bacteria

Koljeno: Pseudomonadota

Razred: Gammaproteobacteria

Red: Pseudomonadales

Porodica: Pseudomonadaceae

Rod: *Pseudomonas*

Vrsta: *Pseudomonas aeruginosa* (Rudra i sur., 2022)

Test mikroorganizam *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

Carstvo: Bacteria

Koljeno: Bacillota
Razred: Clostridia
Red: Eubacteriales
Porodica: Clostridiaceae
Rod: *Clostridium*
Vrsta: *Clostridium sporogenes* (Prevot, 1938)

Test mikroorganizam *Candida albicans* ATCC 10231

Carstvo: Gljive
Koljeno: Ascomycota
Razred: Saccharomycetes
Red: Saccharomycetales
Porodica: Saccharomycetaceae
Rod: *Candida*
Vrsta: *Candida albicans* (Berkhout, 1923)

Test mikroorganizam *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Kraljevstvo: Gljive
Koljeno: Ascomycota
Razred: Eurotiomycetes
Red: Eurotiales
Porodica: Trichocomaceae
Rod: *Aspergillus*
Vrsta: *Aspergillus brasiliensis* (Samson i sur., 2004)

Test mikroorganizam *Bacillus beringensis*

Carstvo: Bacteria
Koljeno: Firmicutes
Razred: Bacili
Red: Bacillales
Porodica: Bacillaceae
Rod: *Bacillus*
Vrsta: *Bacillus beringensis* (Larkin i Stokes, 1967)

Test mikroorganizam *Propionibacterium acnes*

Carstvo: Bacteria

Koljeno: Actinomycetota

Razred: Actinomycetia

Red: Propionibacteriales

Porodica: Propionibacteriaceae

Rod: *Cutibacterium*

Vrsta: *Propionibacterium acnes* (Dekio i sur., 2015)

3.1.3. Pribor i oprema

U tablici 1 su prikazani svi korišteni laboratorijski uređaji i drugi laboratorijski materijali.

Tablica 1. Popis korištenih laboratorijskih uređaja i drugih materijala

Uređaj	Model	Proizvodač
pH-metar	S47 Seven Multi	Mettler Toledo
pH-metar	MP225	Mettler Toledo
Parni sterilizator	Ge-669 ERC 2	Getinge
Hladnjak	Kirsch Labo 720	Kirsch Medical
Mikroskop	Tip BX 50	Olympus
Hladna komora za čuvanje materijala pri 2-8° C	Thermasgard HFTM	S+S Regeltechnik GmbH
Čista zona s jednosmjernim strujanjem zraka klase čistoće zraka A	KTB-VS III	Klima oprema
Zamrzivač	MDF-U53V	Sanyo Electric Co.
Automatska pipeta	Reference 2	Eppendorf
Uzorkovač zraka	MAS-100 NT	Merck
Vodena kupelj	Memmert WB/OB 7	Memmert
Inkubator	MIR-554	Sanyo Electric Co.
Inkubator	MIR-553	Sanyo Electric Co.
Termostat	MIR-154	Panasonic
Vortex	GENIUS 3	IKA
Multipipeta	MULTIPETTE-M4	Eppendorf
Kivete	14 ml PP Tube sterile	Greiner bio-one
Mikrobiološke ušice, sterilne	LOOPS 1 UL SOFT	Copan Group
Sterilni nastavci	Ep Dualfilter T.I.P.S.	Eppendorf
Sterilni nastavci	Combitips advanced	Eppendorf
Pinceta	SS 105MM	LLG
Gumene rukavice	TouchNTuff	Ansell
Indikator anaerobnih uvjeta	Microbiology Anaerotest	Merck Milipore
Anaerobna vrećica	GENbag anaer	bioMérieux
Sterilne epruvete	/	<i>In house</i>
Petrijeve ploče	90mm sterile	bioMérieux

3.1.4. Otopina korištena za pripremu suspenzija test mikroorganizama

- Natrij klorid pepton otopina (pH 7,0)

3.1.5. Kemikalije korištene pri laboratorijskom radu

- Sterilna otopina etanola Premiere Klericide 70/30 (dezinfekcija)
- Tehnička puferska otopina pH 7,00; 4,01; i 9,21 (METTLER TOLEDO) (umjeravanje pH-metra)

3.2. METODE

3.2.1. Opis načina rada u Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju

Izvođenje ovog istraživanja, u organizacijskoj jedinici Mikrobiološki i biološki laboratorij, provedeno je u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP). GMP je dio sustava osiguranja kakvoće, kojom se postiže da se lijekovi dosljedno i trajno proizvode i provjeravaju prema odgovarajućim standardima kakvoće u skladu s njihovom namjenom (NN, 76/13). GMP uključuje: edukaciju djelatnika, prakticanje odgovarajućih higijenskih standarda, održavanje čistoće i urednosti objekata, opreme i radnog prostora, zatim validaciju procesa, praćenje procesa te zapisivanje i bilježenje svih pobrojanih radnji, postupaka, procesa i rezultata elektronički i na papiru. Prije početka rada, svaki analitičar mora proći edukaciju i trening baš za analizu kojom će se uglavnom baviti. Trening je praktični dio u laboratoriju, a uključuje sve tehnike i metode kojima analitičar mora u cijelosti ovladati te koje će koristiti u svrhu obavljanja određene analize.

U svakome laboratoriju, posebice u organizacijskoj jedinici Mikrobiološki i biološki laboratorij, vrijede propisana pravila za čišćenje i dezinfekciju pribora, drugih materijala u uporabi, instrumenata, radnih površina i prostora, koje se provode sukladno preciznim uputstvima. Ova pravila imaju za cilj osigurati odgovarajuću visoku čistoću prostora, laboratorijskih instrumenta i opreme, ali i zaštititi sve vrste uzoraka kao i djelatnike. Sva važeća pravila i uputstva u skladu su s preporukama dobre laboratorijske prakse (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP). Cjelokupno istraživanje opisano u ovom radu provedeno je u skladu sa spomenutim pravilima i uputstvima.

Pod pojmom „čišćenje“ podrazumijevaju se postupci fizičkog uklanjanja mehaničkih, kemijskih i mikrobioloških onečišćenja. Pod pojmom „dezinfekcija“ podrazumijevaju se

postupci koji se provode s ciljem uništavanja, usporavanja rasta i razmnožavanja ili uklanjanja nepoželjnih mikroorganizama. Sredstvo, najčešće kemijsko, koje se koristi za dezinfekciju, naziva se dezinficijens. Svaki korišteni dezinficijens potvrđen je kroz studiju efikasnosti dezinficijensa. Sredstva koja se koriste za uklanjanje nečistoća s laboratorijskog namještaja, instrumenata, opreme i ruku djelatnika su različita i mogu biti: tekući detergentski, tekući sapuni, sredstva za uklanjanje vodenog kamenca, neabrazivna sredstva za čišćenje i poliranje, abrazivna sredstva za odmašćivanje i čišćenje jako zaprljanih površina (npr. 70 % v/v otopina etanola). Od sredstava za dezinfekciju koriste se dezinficijensi s klorheksidinom, kvarternim amonijevim spojevima, klorom te alkoholi. Pribor koji se smije koristiti za čišćenje i dezinfekciju su krpe, spužve, kistovi, četke, metle, plastične posude, T-štap, papirnati ručnici, staničevina i drugo (PLIVA HRVATSKA, 2022b).

Priprema 70 % v/v otopine etanola. Volumen od 730 mL 96 % etanola razrijedi se s deioniziranom vodom do 1000 mL. Ovako priređena otopina se primjenjuje nanošenjem tankim mlazom po staničevini te se prebrišu površine i ostave da se osuše na zraku.

Pripreme otopine detergenata. Otopine detergenata priređuju se u konačnom volumenu od 1000 mL i to kao 0,5 % i 2 % otopine.

Dezinficijens. Sterilni dezinficijens komercijalnog imena „Klericide 70/30“ koristi se za prebrisavanje površina laboratorijskog namještaja, opreme i instrumenata. Nanosi se tankim mlazom (nikako raspršivanjem) po staničevini, kojom se prebrišu površine. Komercijalno pripremljen dezinficijens za higijensku dezinfekciju ruku „Plivasept blue“ nanosi se na dlanove suhih ruku i utrljava u kožu sve dok se koža potpuno ne osuši (najmanje 30 s) (PLIVA HRVATSKA, 2022b).

Osobna zaštitna obuća i odjeća. Osobna zaštitna obuća i odjeća je obavezna tijekom rada u Laboratoriju. U ovu grupu pripadaju: laboratorijska kuta, radna obuća, gumene rukavice, navlake za obuću, kapa te zaštitne naočale. Svaki analitičar dužan je držati se navedenih mjera zaštite i pravila održavanja uvjeta na radu.

Plan čišćenja Laboratorija. Plan čišćenja Laboratorija provodi se ovisno o stupnju kritičnosti određenih površina te je sukladno tomu propisana i učestalost čišćenja i dezinfekcije ovih površina. Na dnevnoj bazi provodi se čišćenje i dezinfekcija laboratorijskog namještaja i opreme, točnije prije početka, tijekom i po završetku rada (npr. laminar). Jednom tjedno provodi se čišćenje manje kritičnog laboratorijskog namještaja, opreme i instrumenata (npr. površine oko računala) te se jednom mjesečno čisti i dezinficira nekritični laboratorijski namještaj, oprema i instrumenti. Pod pojmom kritične površine podrazumijevaju se sve one površine koje mogu doći

u izravan doticaj s uzorkom te tako dovesti do mikrobiološke ili mehaničke kontaminacije tijekom provođenja analize. Prilikom provođenja analize hranjivosti određene podloge, kritične površine koje su bile u izravnom doticaju s uzorkom su: čiste zone s jednosmjernim strujanjem zraka (unutarnje površine), pH-metri, uzorkovač zraka, kolica za uzorke, radni stol, automatske pipete. Manje kritične površine tj. površine koje nisu u izravnom kontaktu s uzorcima, ali su dio analize, su: inkubatori (unutarnje i vanjske površine), hladnjaci i zamrzivači. Nekritične površine koje su dio analize, ali ne mogu izravno utjecati na rezultat analize su: hladna komora (police, podovi, zidovi i stropovi), ormari s hranjivim podlogama, ormari s dokumentacijom, ormari s laboratorijskim suđem, ladice, police, računala, printeri, kako je to detaljno opisano u SOP003674 (PLIVA HRVATSKA, 2022b).

3.2.2. Priprema i određivanje primarnih parametara hranjivih podloga za održavanje rasta test mikroorganizama

U primarne parametre hranjivih podloga za održavanje rasta test mikroorganizama ubrajaju se: vizualna karakterizacija, određivanje pH vrijednosti, provjera mikrobiološkog statusa podloge i provjera hranjivosti podloge.

Na početku ove analize ponajprije se uzorkuje zrak unutar laminara, odnosno čiste zone s jednosmjernim strujanjem, i to primjenom uzorkovača zraka. Uzorkovanje zraka unutar laminara obavezno je načiniti prije svake analize, koja se odvija unutar laminara. Rezultat mikrobiološke analize uzorkovanog zraka (analiza se provodi u *Environmental Monitoring* tj. drugom odjeljku Mikrobiološkog i biološkog laboratorija, PLIVA Hrvatska d.o.o., rezultati analize uzorkovanog zraka nisu dio ovog rada) izuzetno je važan i mora zadovoljiti kriterije stupnja čistoće zraka unutar laminara (interni dokument, PLIVA HRVATSKA). Ukoliko rezultat analize zraka pokaže prisutnost kontaminanata iznad dozvoljene vrijednosti, ni rezultat same analize, koja se provodi u laminaru, nije valjan odnosno povećana je mogućnost kontaminacija uzoraka zrakom koji struji u laminaru. Spremnici hranjivih *ready-to-use* podloga TSB i FTM dopremaju se u kartonskim kutijama i u svakoj od kutija nalazi se po šest bočica od 100 mL korisnog volumena.

Vizualna karakterizacija. Ponajprije se detaljno određuju vizualne karakteristike hranjive podloge u spremniku: izgled i boja podloge, uključujući promjene poput pojave kristala ili aglomeracija u podlozi te promjene boje i strukture podloge, zatim eventualna oštećenja na spremnicima - bočicama (npr. napuknuće stakla bočice) kako bi se usporedile s propisanim

izgledom i bojom definiranom od strane proizvođača za ovu podlogu (poglavlje 4.1.). Podloge se pregledavaju netom prije ispitivanja njihove hranjivosti. Svaku bočicu, koja se koristi u analizi, detaljno se pregleda te, ukoliko je sve u redu, bočica se uzima u obzir za daljnju analizu. Kod provjere *ready-to-use* hranjivih mikrobioloških podloga, izgled i boja se provjeravaju u dva navrata - prvi put odmah nakon dolaska podloge u laboratorij, a drugi put na kraju njezinoga roka valjanosti odnosno provodi se validacija podloga (poglavlje 4.2.).

Određivanje pH vrijednosti. Kontrola pH vrijednosti provodi se određivanjem ove vrijednosti pomoću pH-metra (Mettler, Toledo). Za određivanje pH vrijednost hranjivih podloga, pH metar se kalibrira za područje primjene prema postupku opisanom u SOP005208 „Određivanje pH vrijednosti“ (PLIVA HRVATSKA, 2022c). Određivanja se provode u temperaturnom rasponu od 23 do 25 °C. pH metar je potrebno umjeriti jednom dnevno i to prije mjerenja pH vrijednosti *ready-to-use* hranjivih podloga. Umjeravanje se provodi Mettler Toledo puferskim otopinama s pH vrijednostima 4.01, 7.00 i 9.21. Iz jedne od bočica koje se koriste u analizi, u malu laboratorijsku čašu, unutar laminara, pipetira se nekoliko mililitara (proizvoljno) svake podloge koja se analizira, ali volumen treba biti dovoljan da se pH elektroda može uroniti u čašu s odpipetiranim volumenom podloge. Određeni pH upisuje se u *addendum* (slike 5 i 6). Kao i vizualne karakteristike hranjivih podloga, pH vrijednosti *ready-to-use* hranjivih podloga se provjeravaju u dva navrata - prvi put nakon dolaska podloga u laboratorij, a drugi put na kraju roka valjanosti, prilikom njihove validacije. Dobivena pH vrijednost se uspoređuje s certificiranom pH vrijednosti za određeni tip podloge, kako je naveo proizvođač.

Kontrola mikrobiološkog statusa (sterilnosti). Kontrola mikrobiološkog statusa hranjivih podloga provodi se prema uvjetima inkubacije prikazanim u tablici 3. Za kontrolu sterilnosti *ready-to-use* hranjivih podloga uzimaju se po dvije bočice hranjive podloge korisnog volumena 100 mL i to iz svakog LOT-a koji se analizira. Ove se neotvorene bočice odnose u inkubator na inkubaciju kroz period (tablica 3, slike 5 i 6). Ovdje se pod pojmom inkubacija podrazumijeva održavanje kontroliranih uvjeta radi postizanja optimalnog rasta mikroorganizama (PLIVA HRVATSKA, 2023b). Nakon inkubacije, promatra se pojava zamućenja tekuće hranjive podloge odnosno porast kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi te se zabilježi rezultat pregleda u *addendum*. Produljeno vrijeme inkubacije za provjeru mikrobiološkog statusa je dopušteno. Ovo ispitivanje provodi se dva puta kod *ready-to-use* mikrobioloških podloga, i to prvi put nakon dolaska podloga u laboratorij, a drugi put na kraju roka valjanosti prilikom provedbe validacije, kao i kod provjere vizualnih karakteristika i određivanja pH vrijednosti hranjivih podloga.

Hranjivosti tj. pogodnosti za rast test mikroorganizama. Za ispitivanje hranjivosti tj. pogodnosti za rast test mikroorganizama ovih dviju *ready-to-use* mikrobioloških podloga, koriste se farmakopejski propisani test mikroorganizmi koji se pobrojani u tablici 2. Cilj je utvrditi podržava li određena podloga rast određene skupine test mikroorganizama. Za ispitivanje hranjivosti podloga koriste se tjedne radne kulture test mikroorganizama iz kojih se pripravlja svježe suspenzije test mikroorganizma u određenom puferu. Svježa suspenzija test mikroorganizma se priprema razrjeđivanjem, kako bi se dobila razrjeđenja koja u primijenjenom volumenu (0,1 mL) sadrže manje od 100 CFU/mL. Za provedbu analize hranjivih svojstava *ready-to-use* hranjive podloge, koje su od proizvođača stigle u bočicama s korisnim volumenom od 100 mL, iz bočica se pipetira po 9,0 mL podloge u sterilne epruvete. Budući da se test mikroorganizam nacijeppljuje u podlogu trima različitim razrjeđenjima, za svaki mikroorganizam koriste se po tri sterilne epruvete. Također, u analizu je potrebno uključiti i poredbenu podlogu (P). Pod pojmom poredbena podloga podrazumijeva se već prije ispitana, odobrena, ista vrsta hranjive podloge kao i ona koja se ispituje, samo poredbena podloga je izuzeta iz sasvim drugog LOT-a. Odabrana decimalna razrjeđenja suspenzije test mikroorganizama (50 μ L), pipetiraju se automatskom pipetom na: ispitivanu ili testnu podlogu (T), poredbenu podlogu (P) i, kod bakterija kao test mikroorganizama na čvrstu TSA podlogu, a u slučaju kvasaca i plijesni kao test mikroorganizama, na čvrstu SDA podlogu. Postupak inokuliranja poredbene podloge (P) identičan je kao i za ispitivanu ili testnu podlogu (T). Nakon inokulacije svih pobrojanih podloga, slijedi inkubacija kroz određeni vremenski period i pri propisanoj temperaturi (tablica 2). Nakon inkubacije, broje se kolonije test mikroorganizama koje su porasle na TSA i SDA te se upisuju u *addendum*. Broj poraslih kolonija određenih test mikroorganizama, koje su porasle na TSA i SDA, kvantitativna je informacija koja je u korelaciji s ispitivanom podlogom (T). Nakon proteka vremenskog perioda inkubacije test mikroorganizama, epruvete s rezultirajućim suspenzijama pregledavaju se vizualno. Zamućenje podloge, koja je prije inkubacije bila bistra, najčešći je pokazatelj pozitivnog rasta mikroorganizma. Često se mogu uočiti i kolonije u obliku kratkih, oštih zareza, sitnih ili krupnijih okruglih kolonija koje lebde u suspenziji u epruveti. Kod provjere hranjivosti *ready-to-use* mikrobioloških podloga, ukupno se provode dva testa - prvi put nakon dolaska podloga u laboratorij, a drugi put na kraju njezinog roka valjanosti.

Hranjive podloge koje se koriste u mikrobiološkim analizama kontroliraju se prije upotrebe ili iznimno, u dogovoru s rukovodstvom Laboratorija, istovremeno s njihovom primjenom. Odgovarajuća kvaliteta podloge mora biti potvrđena prije izdavanja rezultata analize u kojoj je korištena ista podloga. *Ready-to-use* hranjiva podloga pri dolasku se zaprima zajedno s

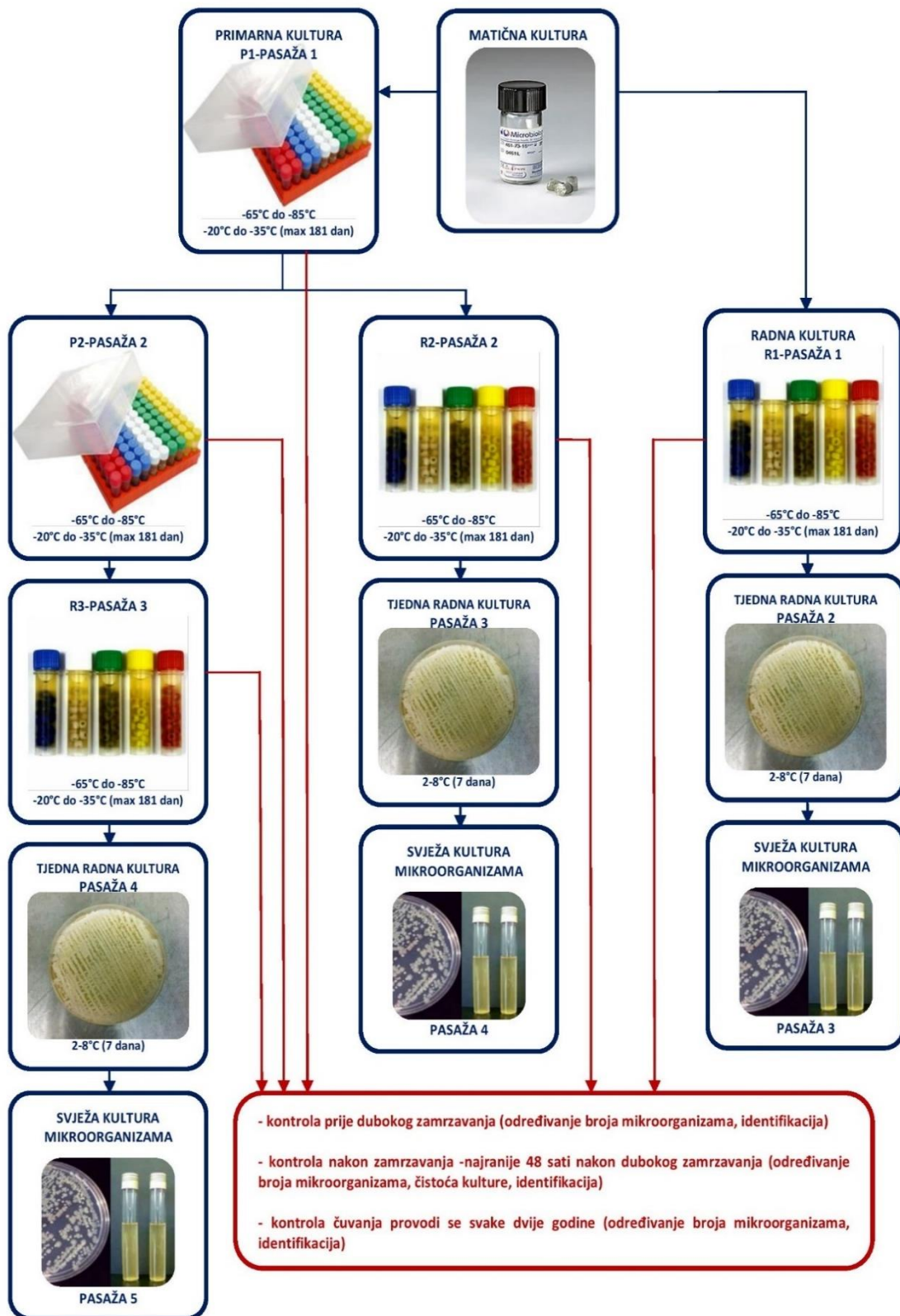
certifikatom proizvođača, koji se čuva uz rezultate ispitivane hranjive podloge (prilozi 1 i 2). Hranjiva podloga koja nije zadovoljila ove zahtjeve za kvalitetu ne smije se koristiti u mikrobiološkim analizama.

3.2.3. Postupci pripreme primarnih, radnih i tjednih kultura test mikroorganizama

Prvi korak u analizi hranjivih podloga je priprava tjednih radnih kultura svih test mikroorganizama (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus beringensis*), koji su potrebni za analizu. Ovdje zadnja dva soja test mikroorganizama su tzv. *in house* mikroorganizmi i nemaju cjelovitu oznaku u svome nazivu poradi zaštite ovih podataka izvan tvrtke PLIVA Hrvatska d.o.o.

Tjedne radne kulture test mikroorganizama dobivaju se precjepljivanjem biomase iz tzv. radne kulture, a koriste se za pripremu svježih kultura za potrebu mikrobiološkog ispitivanja. Pod pojmom radna kultura test mikroorganizma podrazumijeva se biomasa porasla nakon nacjepljivanja iz tzv. matične ili primarne kulture, a koristi se za pripremu tjednih radnih kultura. Oživljavanje kulture određenog mikroorganizma iz liofilizata iz zbirke mikroorganizama i njezino održavanje zamrzavanjem (tzv. *seed-lot* postupak, slika 4) omogućuju dugotrajno čuvanje čiste kulture određenog soja mikroorganizma stabilnog genotipa i fenotipa te osiguravaju njihovu sljedivost. Primarna kultura mikroorganizama dobiva se s jednim ili dva uzastopna precjepljivanja, počev od matične kulture. Tjedna radna kultura koristi se za pripremu svježih kultura test mikroorganizama za potrebe mikrobioloških ispitivanja. Za potrebe pripreme tjednih radnih kultura mikroorganizama, koje se koriste za mikrobiološka ispitivanja ili za potrebe pripreme novih primarnih i radnih kultura za banku mikroorganizama, krio-bočice se u transportnoj krio-kutiji prenose iz zamrzivača s temperaturom - 65 °C do - 85 °C odnosno banke mikroorganizama, u zamrzivač s temperaturom od - 20 °C do - 35 °C, gdje se čuvaju dok se iz krio-bočice ne potroše sve keramičke kuglice s mikroorganizmima. Naime, keramičke kuglice su nosači preko kojih je pipetiranjem nanosena suspenzija određenog soja mikroorganizma i čuva se pri relativno niskoj temperaturi. Krio-bočice se drže u transportnoj krio-kutiji za vrijeme pripreme tjednih radnih kultura mikroorganizama u čistoj zoni s jednosmjernim strujanjem zraka (laminar). Krio-kutija izrađena je od stiropora s vanjske strane te metalnog dijela s unutarnje strane s numeriranim mjestima za krio-bočice, koje se mogu postaviti u ovu krio-kutiju. Dakle,

glavna uloga krio-kutije je održavanje prikladne definirane niske temperature krio-bočica izvan zamrzivača. Mikroorganizmi radne kulture nalaze se u krio-bočicama, na nosačima koji su zapravo porozne keramičke kuglice uronjene u krio-protektivnu tekućinu. Pincetom se uzme iz krio-bočice jedan pelet ili keramička kuglica s određenim mikroorganizmom te se laganim pokretima stanice na kuglici (peletu) razvuku po površini odgovarajuće hranjive podloge - TSA ukoliko se radi o bakterijama, ili SDA ukoliko se priprema kultura kvasca ili plijesni. Ukoliko se priređuje tjedna kultura *in-house* test mikroorganizma, uzima se hranjiva podloga TSS, budući da je to krvni agar, koji pospješuje rast mikroorganizma koji inače slabije raste na drugim hranjivim podlogama. Krio-bočica s preostalim kuglicama se, što je moguće prije, vraća u transportnu krio-kutiju i zatim u zamrzivač s temperaturom od - 20 °C do - 35 °C u kojem se čuvaju u krio-kutiji ili transportnoj krio-kutiji dok se ne potroše sve keramičke kuglice ili do isteka roka valjanosti. Nacijepljene tjedne kulture se zatim inkubiraju pri temperaturi 30 – 35 °C za bakterije, te 20 – 25 °C za kvasce i plijesni. Nakon njihove inkubacije, na površini čvrstih podloga vidljive su kolonije mikroorganizama te se tako dobivene tjedne kulture mogu koristiti maksimalno kroz tjedan dana. Ukoliko su za rast bakterija potrebni anaerobni uvjeti, koriste se vrećice za inkubaciju, a njihova nepropusnost se provjerava upotrebom indikatora za utvrđivanje anaerobnih uvjeta (npr. Anaerotest[®]), a inkubacija se provodi tijekom 24 – 48 sati. Nakon inkubacije nacijepljeni test mikroorganizama, makroskopski se provjerava čistoća tjednih radnih kultura mikroorganizama, gdje su na površini čvrstih podloga vidljive kolonije mikroorganizama te se tako pripravljene tjedne kulture čuvaju u hladnjaku pri temperaturi 2 – 8 °C maksimalno tijekom sedam dana. Ovako pripravljene tjedne radne kulture se koriste za pripravu svježih kultura test mikroorganizama za potrebe mikrobioloških ispitivanja. Tijekom izrade banke mikroorganizama koristi se tzv. *seed-lot* postupak (slika 4.) kako bi broj precjepljivanja bio što manji, budući da se u mikrobiološkim ispitivanjima koriste kulture mikroorganizama s najviše pet precjepljivanja, počevši od matičnih kultura.



Slika 4. *Seed-lot* postupak, koji se primjenjuje u Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju, PLIVA Hrvatska d.o.o. (PLIVA HRVATSKA, 2018)

3.2.3.1. Priprava aerobnih bakterijskih kultura test mikroorganizama

Uzgoj aerobnih test mikroorganizama započinje precjepivanjem biomase s TSA čvrste podloge prethodno pripremljenih tjednih radnih kultura (jednim kratkim potezom mikrobiološke eze dio porasle biomase kulture mikroorganizma duljine oko 5mm) u TSB i inkubira pri 30 – 35 °C kroz vremensko razdoblje 18-24 sata. Nakon inkubacije prirede se razrjeđenja porasle suspenzije (automatskom pipetom se 1,0 mL suspenzije pipetira u epruvetu s 9 mL puferirane otopine natrij klorid peptona pH 7,0) najčešće do sedmog razrjeđenja, ovisno o mikroorganizmu tako da posljednje priređeno razrjeđenje imaju manje od 100 CFU/mL, kako je propisano prema zahtjevu farmakopeje. Pripremljene suspenzije koriste se unutar 2 ili 24 h, ukoliko se čuvaju na 2 – 8 °C. Pri analizi se koriste tri različita priređena decimalna razrjeđenja i to za *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ; dok za *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus beringensis* razrjeđenja 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

3.2.3.2. Priprava kulture anaerobne bakterijske vrste test mikroorganizma *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 i *Propionibacterium acnes*

Tjedna kultura test mikroorganizma *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 i *Propionibacterium acnes* (in house soj) priprema se na sličan način kao i kultura aerobnih mikroorganizama. Razlika je što se kulture ovih mikroorganizama uzgajaju u RMC podlozi (za razliku od TSB podloge koja se koristi za uzgoj aerobnih kultura) pri anaerobnim uvjetima uzgoja i to pri temperaturi 30 – 35 °C tijekom 24 – 48 h. Nakon inkubacije rade se decimalna razrjeđenja istim postupkom kao i za pripravu aerobnih bakterijskih kultura. Pri analizi se koriste tri različita decimalna razrjeđenja i to: za *Clostridium sporogenes* 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , a za *Propionibacterium acnes* 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

3.2.3.3. Priprava kulture test mikroorganizma vrste *Candida albicans* ATCC 10231

Tjedna kultura test mikroorganizma *Candida albicans* ATCC 10231 pripravi se uzgojem na SDA inkubacijom pri 20 – 25 °C kroz vremenski period od 2 – 3 dana. Nakon inkubacije priređuju se decimalna razrjeđenja kao i u postupku pripreme aerobnih bakterijskih kultura.

3.2.3.4. Priprava kulture test mikroorganizma vrste *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Tjedna kultura test mikroorganizma *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 pripravi se uzgojem na SDA inkubacijom pri 20 – 25 °C kroz vremenski period od 5 – 7 dana točnije dok

stanice ovog soja ne formiraju spore. Nakon inkubacije, prirede se decimalna razrjeđenja, kako je opisano u poglavlju 3.2.

3.2.4. Kriteriji prihvatljivosti hranjivih podloga

Rezultati analize hranjive podloge su prihvatljivi ukoliko je test hranjivosti pozitivan. Pozitivan test znači da je na ispitivanim *ready-to-use* hranjivim podlogama uočen karakterističan rast naciepljenoga test mikroorganizma. Ukoliko se radi o zahtjevu za provjeru inhibitornih svojstava, očekivani rezultat bi bila „čista“ podloga, bez rasta karakterističnog test mikroorganizma. U tablici 3 navedene su ispitivane *ready-to-use* podloge, test mikroorganizmi koji se naciepljuju na ove podloge te očekivani rezultat ispitivanja.

Tablica 2. Uvjeti ispitivanja i očekivani rezultati ispitivanja hranjivih svojstava (podržavanje rasta test mikroorganizma) određenih hranjivih podloga

Mikrobiološka podloga	Test mikroorganizam	Uvjeti inkubacije	Očekivani rezultat (rast)
<i>Fluid Thioglycollate Medium (FTM)</i>	H* - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	30 – 35 °C, ≤ 72 h	Pozitivan
	H – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	30 – 35 °C, ≤ 72 h	Pozitivan
	H – <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11347	30 – 35 °C, ≤ 72 h	Pozitivan
	H – <i>Propionibacterium acnes</i>	30 – 35 °C, ≤ 72 h	Pozitivan
<i>Tryptic Soy Broth (TSB)</i>	H - <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20 – 25 °C, ≤ 72 h	Pozitivan
	H - <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20 – 25 °C, ≤ 5 dana	Pozitivan
	H - <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	20 – 25 °C, ≤ 5 dana	Pozitivan
	H - <i>Bacillus beringensis</i>	20 – 25 °C, ≤ 72 h	Pozitivan

H* - označava hranjivost; svojstvo podloge koje se provjerava

U tablici 3 navedeni su kriteriji prihvatljivosti, koji moraju biti ispunjeni kako bi analiza *ready-to-use* hranjivih podloga bila valjana.

Tablica 3. Kriterij prihvatljivosti za kritične parametre hranjivih podloga

Vrsta podloge	Kriterij prihvatljivosti			
	Izgled i boja	pH - vrijednost	Hranjivost	Sterilnost/uvjeti inkubacije
<i>Tryptic Soy Broth (TSB)</i>	Bistra, svijetlo žućkasta tekuća podloga	$7,3 \pm 0,2$	odgovara zahtjevu iz tablice 2	Odgovara / 20 – 25 °C tijekom 14 dana
<i>Fluid Thioglycollate Medium (FTM)</i>	Slabo žućkasta, bistra podloga, 10 % gornjeg dijela podloga može biti crvenkasta. Nakon mućkanja otopina postaje crvenkasta u cijelom volumenu.	$7,1 \pm 0,2$	odgovara zahtjevu iz tablice 2	Odgovara /20 – 25 °C tijekom 14 dana

3.2.4. Obrada podataka

Deskriptivna statistika dobivenih rezultata analize napravljena je pomoću programa Microsoft Excel, a uključivala je računanje minimuma, maksimuma, koeficijenta varijabilnosti i srednje vrijednosti (aritmetičke sredine). Ovaj je program korišten i za provođenje dvofaktorijalne analize varijance za dvije hranjive podloge - FTM i TSB, i to uz LOT i test mikroorganizme kao faktore.

3.2.5. Preduvjeti za provođenje validacije čuvanja hranjivih mikrobioloških podloga

Prije no što se pristupi validaciji, nekoliko preduvjeta mora biti zadovoljeno kako bi validacija bila valjana:

- Odabrati reprezentativne uzorke hranjivih podloga za ispitivanje
- Za svaku podlogu osigurati odgovarajući broj spremnika, koji su potrebi za provođenje svakog od navedenih testova za sve točke ispitivanja
- Za svaku točku ispitivanja planirati pravovremeno provođenje ispitivanja
- Provjera kvalitete hranjivih podloga treba se provesti u najkraćem roku koji će zadovoljiti definirane vremenske točke ispitivanja

- Svaku podlogu označiti internim brojem podloge
- Osigurati da svaka „*ready-to-use*“ podloga ima certifikat o analizi dobiven od proizvođača
- Podloge izvaditi iz hladnjaka i temperirati na sobnu temperaturu najmanje 1 h prije provođenja ispitivanja na rast mikroorganizama i određivanja pH vrijednosti podloge (PLIVA HRVATSKA, 2023b; PLIVA HRVATSKA, 2022d).

Validacija je potrebno provesti prema protokolu: *Validation Protocol for Media Culture Storage* (kritični parametri prikazani u tablici 4) te uputama za rad prema propisanoj proceduri u dokumentu „Kontrola hranjivih podloga“ (PLIVA HRVATSKA, 2023b).

Kriteriji navedeni u tablici 3 korišteni su u ovome istraživanju za procjenu rezultata validacije.

3.2.6. Izbor hranjivih mikrobioloških podloga za provođenje validacije roka čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga

Odabir reprezentativnih podloga za provođenje validacije roka čuvanja proveden je na temelju procjene kritičnosti svih podloga, bilo da se radi o *in house* pripremljenim podlogama ili komercijalno pripremljenim *ready-to-use* podlogama. Za kontrolu i validaciju čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga za ispitivanje sterilnosti koriste se komercijalno pripremljene, sterilizirane dvije hranjive podloge - *ready-to-use* hranjive podloge FTM i TSB dobavljene od proizvođača Merck, kako je to preporučeno prema farmakopeji Ph.Eur.2.6.1 (Anonymous 1). Ove hranjive podloge odlikuju se visokom prozirnošću i mogu se relativno jednostavno filtrirati. Ukoliko se dobave praškaste hranjive podloge, njihov granulirani oblik osigurava manju raspodjelu praškaste faze u Laboratoriju, brzo se otapa te se ne lijepi za stijenke posuda (MERCK Microbiology Manual). Nakon dobave i prije analize ove se podloge čuvaju u neventilirajućim spremnicima, prema uputi proizvođača. Obje se podloge mogu koristiti za analizu unutar definiranog roka valjanosti uz uvjet da se skladište pri kontroliranim uvjetima (PLIVA HRVATSKA, 2021). Za kontrolu hranjivosti *ready-to-use* podloge TSB prema propisanom zahtjevu (interni dokument, PLIVA HRVATSKA) korišten je *in house* mikroorganizam *Bacillus beringensis*, koji može formirati spore, a izoliran je tijekom analize određenih *in house* otopina prije njihove sterilizacije filtracijom. Za kontrolu hranjivosti *ready-to-use* FTM korišten je *in house* anaerobni mikroorganizam *Propionibacterium acnes* prema internom zahtjevu (interni dokument, PLIVA HRVATSKA).

3.2.7. Kritični parametri validacije roka čuvanja hranjivih podloga

Prije odabira hranjivih podloga za potrebe validacije roka čuvanja hranjivih podloga, provedena je procjena kritičnosti svih podloga, bilo da se radi o *in house* pripremljenim podlogama ili komercijalnim dobavljenim *ready-to-use* podlogama. Kritični parametri koji su uzeti u razmatranje tijekom odabira podloga, kao što su uvjeti i trajanje čuvanja, učestalost korištenja, temperatura čuvanja i vrsta spremnika hranjive podloge, analizirani su za svaku podlogu posebno (tablica 4). Općenito, poznata je osjetljivost hranjivih podloga na uvjete njihova čuvanja. Tijekom analize kontrole i validacije čuvanja hranjivih podloga nekoliko je kritičnih parametara, koji se analiziraju, kako slijedi:

- Vizualni pregled (izgled) hranjivih mikrobioloških podloga
- pH vrijednosti hranjivih mikrobioloških podloga
- Kontrola mikrobiološkog statusa (sterilnosti) hranjivih mikrobioloških podloga
- Hranjiva, inhibitorna i indikativna svojstva hranjivih mikrobioloških podloga (ukoliko hranjiva podloga sadrži tvari odgovorne za inhibitorna i indikativna svojstva).

Kontrola sterilnosti podloga i ispitivanje njihovih hranjivih, inhibitornih i indikativnih svojstava provodi se uz korištenje aseptičnih tehnika rada. Aseptičan rad postupak je koji se provodi pri uvjetima koji sprječavaju kontaminaciju uzoraka mikroorganizama, a uz korištenje sterilne opreme, pribora i tehnika rada (PLIVA HRVATSKA, 2023b).

Tablica 4. Hranjive podloge FTM i TSB s kriterijima kritičnosti (PLIVA HRVATSKA, 2022d)

Naziv podloge	Odabir stupnja kritičnosti				Prikladno za validaciju čuvanja (podloge s > 3 kritična kriterija)
	Vrsta analize	Vrijeme čuvanja	Opseg utjecaja na rezultate analize	Porijeklo podloge / temp. uvjeti čuvanja / vrsta spremnika	
TSB - gubitak hranjivih svojstava podloge tijekom definiranog period čuvanja podloge	<u>kritičan</u> Podloga se koristi pri ispitivanju sterilnosti – izrazito kritična hranjivost podloge	<u>kritičan</u> Podloga ima dugi rok valjanosti te postoji mogućnost gubitka hranjivih svojstava	<u>kritičan</u> Podloga se koristi svakodnevno pri ispitivanju sterilnosti – moguć veliki utjecaj	<u>kritičan</u> Komercijalno pripremljen / sobna temperatura / 100 mL bočica	<i>Podloga će biti uključena u validaciju roka čuvanja kao potencijalno kritična</i>

Tablica 4. Hranjive podloge FTM i TSB s kriterijima kritičnosti (PLIVA HRVATSKA, 2022d) - nastavak

Naziv podloge	Odabir stupnja kritičnosti				
	Vrsta analize	Vrijeme čuvanja	Opseg utjecaja na rezultate analize	Porijeklo podloge / temp. uvjeti čuvanja / vrsta spremnika	Prikladno za validaciju čuvanja (podloge s > 3 kritična kriterija)
FTM - gubitak hranjivih svojstava podloge tijekom definiranog period čuvanja podloge	<u>kritičan</u> Podloga se koristi pri ispitivanju sterilnosti – izrazito kritična hranjivost podloge	<u>kritičan</u> Podloga ima dugi rok valjanosti te postoji mogućnost gubitka hranjivih svojstava	<u>kritičan</u> Podloga se koristi svakodnevno pri ispitivanju sterilnosti – moguć veliki utjecaj	<u>kritičan</u> Komercijalno pripremljen / sobna temperatura / 100 mL bočica	<i>Podloga će biti uključena u validaciju roka čuvanja kao potencijalno kritična</i>

Pri procjeni mogućeg utjecaja na rezultat analize kao najkritičniji parametar koji se povjerava je analiza ispitivanja sterilnosti te analiza hranjivosti za test mikroorganizma. Vezano uz trajanje čuvanja hranjivih podloga, procijenjeno je da duži rok valjanosti (duže od mjesec dana) ima potencijalno veći rizik po gubitak kvalitete hranjive podloge, pa je dulji rok valjanosti hranjive podloge kritičniji. Kod procjene širine utjecaja na rezultate analize hranjivih podloga, potencijalno postoji veći utjecaj svih navedenih parametara kod hranjivih podloga koje se češće koriste pri analizama, jer je ukupan utjecaj na rezultate analize potencijalno veći te se takve podloge smatraju kritičnije. Čuvanje podloga pri sobnoj temperaturi smatra se više kritično od čuvanja podloga pri nižim temperaturama i to zbog mogućnosti isušivanja podloga.

3.2.8. Broj ciklusa tijekom validacije postupka čuvanja

Validacija čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga provedena je na jednom LOT-u odabranih podloga i to u dvije točke ispitivanja:

- prva točka ispitivanja – neposredno nakon dolaska hranjive podloge u Laboratorij
- druga točka ispitivanja – po isteku roka valjanosti (unutar 15 dana od isteka valjanosti hranjive podloge).

Analiziran je izgled, pH, vrijednosti, mikrobiološki status te hranjiva svojstva hranjivih podloga.

Prva točka ispitivanja predstavlja ulaznu kontrolu hranjivosti (redovna analiza hranjivosti). Uz hranjivu podlogu koju se ispituje, na analizu se uzima i istovrsna referentna hranjiva podloga, (poredbena podloga, P), koja je prethodno ispitana i potvrđena na hranjiva / indikativna / inhibitorna svojstva. Validaciju roka čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga za ispitivanje sterilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda provodi se u Laboratoriju na isti način kao i sama kontrola *ready-to-use* hranjivih podloga, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome istraživanju, koje je provedeno u Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju Odjela kontrole kvalitete, PLIVA Hrvatska d.o.o., mikrobiološki je analizirano po 10 LOT-ova dviju *ready-to-use* hranjivih podloga - *Fluid Thioglycolate Medium* (FTM) i *Tryptic Soy Broth* (TSB). Ove dvije *ready-to-use* podloge pogodne su i podržavaju rast test mikroorganizama (tablica 2), koji su najčešći kontaminanti ciljanih farmaceutskih proizvoda. Prije nego se ove *ready-to-use* hranjive podloge uporabe za rast definiranoga broja i opsega test mikroorganizama, kako je to propisano u zahtjevima Ph. Eur 2.6.12. (Anonymous 2) i Ph. Eur. 2.6.13. (Anonymous 3) tj. za provjeru sterilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda, potrebno je ispitati njihovu sterilnost, ali i druge parametre od ključne važnosti za rast čistih kultura ovih test mikroorganizama, kako slijedi. Tako je potrebno utvrditi: (1) vizualne karakteristike dostavljene *ready-to-use* podloge (intaktnost spremnika tj. bočice u kojoj je podloga dostavljena, npr. pojava pukotina na staklenoj ambalaži i moguće curenje sadržaja spremnika; zatim karakterističan izgled same podloge u spremniku tj. bistrina, boja i homogenost otopine ili gela; pojava pjene; eventualni rast kontaminanata i drugo) (tablica 5), kao i (2) mikrobiološki status (sterilnost) *ready-to-use* podloga (tablica 6); (3) pH vrijednost ovih otopina (tablica 7), kao i (4) pogodnost za rast tj. hranjivost *ready-to-use* podloge pogodne za rast test mikroorganizama (tablice 8 i 9). Ispitivanje hranjivosti ovih podloga provedeno je prema standardnom operativnom postupku (engl. *Standard Operational Procedure*; SOP) SOP001608 (PLIVA HRVATSKA, 2023b). Sve su to primarni parametri ispravnosti *ready-to-use* podloge, koji se ispituju u mikrobiološkom laboratoriju farmaceutske tvrtke i, ukoliko *ready-to-use* podloga zadovolji ovo ispitivanje, tada se može koristiti za provjeru sterilnosti određenih gotovih farmaceutskih proizvoda.

Dodatno, po jedan od ovih 10 LOT-ova obiju hranjivih podloga, FTM i TSB, korišten je za provođenje validacije čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga pri sobnoj temperaturi i to u cilju potvrde roka valjanosti ovih hranjivih mikrobioloških podloga kroz period od mjesec dana u skladu sa zahtjevima Europske farmakopeje - Ph. Eur 2.6.12. i Ph. Eur. 2.6.13., kao i farmakopeje Sjedinjenih Američkih Država - USP<61> (Anonymous 4) i USP<62> (Anonymous 5). Validacija roka čuvanja hranjivih podloga sastavni je dio dobre mikrobiološke prakse laboratorija (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP; USP <1117>; Anonymous 6) te se je provela u svrhu potvrde valjanosti podloga pri uvjetima čuvanja unutar Laboratorija. Općenito, u ovome Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju hranjive podloge čuvaju se u

prikladno označenim i odvojenim spremnicima pri sobnoj temperaturi, odnosno kako je proizvođač podloga naznačio za svaku podlogu u uporabi. Ove dvije hranjive podloge, FTM i TSB, sukladno zahtjevima Europske farmakopeje (Ph. Eur. 2.6.12. i Ph. Eur. 2.6.13.) odabrane su za validacijski protokol za čuvanje hranjivih podloga za ispitivanje sterilnosti određenih farmaceutskih proizvoda u ovoj tvrtki. Kritični parametri uzeti u obzir za validaciju ovih dviju *ready-to-use* hranjivih podloga bili su: uvjeti (sobna temperatura) i trajanje čuvanja (sukladno deklaraciji proizvođača, do jedne ili dvije godine) FTM i TSB, učestalost korištenja FTM i TSB za ispitivanje sterilnosti gotovih farmaceutskih proizvoda (uglsvnom svaki dan, a najmanje jednom tjedno), te vrsta čepa na staklenom spremniku *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB korisnog volumena od 100 mL - metalni čep (za gel hranjive podloge, koje se zagrijavanjem otapaju i raspodjeljuju u Petrijve zdjelice za daljnju uporabu) ili gumeni čep s plastičnim omotom (koji je pogodan za dodavanje suspenzije test mikroorganizama u otopinu hranjive podloge injektiranjem). Rezultate ovdje opisane analize potrebno je zabilježiti u za to predviđeni *addendum* ili tzv. dodatni dokument (slike 5 i 6), kako to nalaže SOP001608 (PLIVA HRVATSKA, 2023b).

U okviru ovoga istraživanja načinjena je i dvofaktorijalna statistička analiza dobivenih eksperimentalnih podataka za svih 10 LOT-ova dviju *ready-to-use* podloga - FTM i TSB. Načinjena je analiza varijance kao i statistička analiza broja kolonija poraslih na TSA (za bakterije) i SDA (za kvasce i plijesni) nakon inkubacije po četiri testna mikroorganizma za svaku *ready-to-use* podlogu.

4.1. Primarni parametri *ready-to-use* podloga FTM i TSB

Ovdje ispod su dani podaci za svaki ključni parametar u analizi *ready-to-use* hranjivih mikrobioloških podloga FTM i TSB: vizualni parametri (tablica 5), sterilnost (tablica 6); pH vrijednost (tablica 7), kao i hranjiva svojstva tj. podržavanje rasta test mikroorganizama (tablice 8 i 9).

4.1.1. Vizualni parametri *ready-to-use* podloga FTM i TSB

U tablici 5. prikazani su ukupni rezultati za analizirani parametar vizualni pregled.

Tablica 5. Ukupni rezultati za izgled *ready-to-use* mikrobioloških hranjivih podloga FTM i TSB

LOT	FTM	LOT	TSB
1	odgovara	1	odgovara
2	odgovara	2	odgovara
3	odgovara	3	odgovara
4	odgovara	4	odgovara
5	odgovara	5	odgovara
6	odgovara	6	odgovara
7	odgovara	7	odgovara
8	odgovara	8	odgovara
9	odgovara	9	odgovara
10	odgovara	10	odgovara

Vizualnim pregledom *ready-to-use* podloga FTM i TSB utvrđeno je da je izgled njihovih spremnika i samih podloga (otopina) odgovarao izgledu propisanom od strane proizvođača. Promjene, kao što su kristalizacija, aglomeracija i druge promjene u strukturi i boji podloge nisu uočene. Bočice s podlogom čuvane su prema propisanim uvjetima te na njima nije uočeno nikakvo oštećenje ili napuknuće, a sama podloga nije promijenila boju.

4.1.2. Mikrobiološki status (sterilnost) *ready-to-use* podloga FTM i TSB

U tablici 6. prikazani su ukupni rezultati za analizirani parametar mikrobiološki status.

Tablica 6. Ukupni rezultati mikrobiološkog statusa tj. sterilnosti *ready-to-use* hranjivih mikrobioloških podloga FTM i TSB

FTM		TSB	
LOT	Mikrobiološki status	LOT	Mikrobiološki status
1	odgovara	1	odgovara
2	odgovara	2	odgovara
3	odgovara	3	odgovara
4	odgovara	4	odgovara
5	odgovara	5	odgovara
6	odgovara	6	odgovara
7	odgovara	7	odgovara
8	odgovara	8	odgovara
9	odgovara	9	odgovara
10	odgovara	10	odgovara

U nijednom inkubiranom uzorku hranjivih FTM i TSB podloga nije primijećeno njihovo zamućenje ili rast mikroorganizama, a zamućenje nije zapaženo tijekom propisanog vremena inkubacije pri odgovarajućim uvjetima. To ukazuje da su sve testirane podloge ispunile zahtjev za sterilnost.

4.1.3. pH vrijednosti otopina *ready-to-use* podloga FTM i TSB

U tablici 7. prikazani su ukupni rezultati za analizirani parametar pH vrijednost.

Tablica 7. Ukupni rezultati za određivanje pH vrijednosti *ready-to-use* hranjivih mikrobioloških podloga FTM i TSB određenih pri navedenim vrijednostima temperature u Laboratoriju

FTM			TSB		
LOT	pH vrijednost	Temperatura (°C)	LOT	pH vrijednost	Temperatura (°C)
1	7,05	24,6	1	7,11	24,1
2	7,04	24,3	2	7,09	24,9
3	7,03	24,2	3	7,3	24,5
4	7,01	24,8	4	7,14	24,5
5	7,05	23,2	5	7,14	24
6	6,98	23,1	6	7,32	24,6
7	7,09	25	7	7,2	23,9
8	7,06	24,4	8	7,25	24,9
9	7,07	24,1	9	7,15	23,7
10	7,01	23,8	10	7,11	24,2

Određena pH vrijednost podloga (tablica 7) pokazuje da su sve vrijednosti unutar zadanog intervala (FTM, pH $7,1 \pm 0,2$; TSB, pH $7,3 \pm 0,2$) i ova se vrijednost nije promijenila tijekom propisanog vremena čuvanja, pa stoga obje podloge odgovaraju zahtjevima.

Sukladno rezultatima prikazanim u tablicama 5 – 7, može se zaključiti da su ispitivane *ready-to-use* podloge FTM i TSB prikladne za ispitivanje hranjivosti tj. da su pogodne za rast test mikroorganizama. Unatoč tomu što svi ovdje prikazani rezultati odgovaraju zahtjevima ispitivanja, kako je to i uobičajeno u farmaceutskoj industriji, provjeru navedenih parametara (izgled, mikrobiološki status i pH vrijednost,) potrebno je provoditi prilikom svake nove analize hranjivih podloga, koja se provodi svaki tjedan, jer standardi ove industrije zahtijevaju strogu mikrobiološku kontrolu svih pobrojanih parametara, sukladno dobroj proizvođačkoj praksi. Navedeni zahtjevi primjenjuju se obavezno za svaku podlogu, koja mora proći mikrobiološko ispitivanje u Laboratoriju.

4.1.4. Podržavanje rasta test mikroorganizama

U tablici 8. prikazani su ukupni rezultati za analizirani parametar hranjivosti odnosno podržavanje rasta mikroorganizama.

Tablica 8. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava (H) tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge FTM (test podloga, T)

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	24	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	18	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁵	11	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁵	17	Odgovara	Odgovara
2	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	34	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	13	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁶	15	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁵	17	Odgovara	Odgovara
3	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	31	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	26	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁶	21	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁵	17	Odgovara	Odgovara

Tablica 8. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava (H) tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge FTM (test podloga, T) - *nastavak*

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
4	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	32	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	34	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁶	18	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁵	17	Odgovara	Odgovara
5	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	35	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	13	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁵	10	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁵	23	Odgovara	Odgovara
6	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	40	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	25	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁵	13	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁵	15	Odgovara	Odgovara

Tablica 8. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava (H) tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge FTM (test podloga, T) - nastavak

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
7	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	31	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	29	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁵	12	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁶	19	Odgovara	Odgovara
8	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	27	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	20	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁶	16	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁶	15	Odgovara	Odgovara
9	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	50	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	28	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁶	16	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁶	30	Odgovara	Odgovara

Tablica 8. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava (H) tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge FTM (test podloga, T) - nastavak

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
10	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁻⁶	33	Odgovara	Odgovara
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁻⁶	37	Odgovara	Odgovara
	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁻⁶	26	Odgovara	Odgovara
	<i>P. acnes</i>	H	10 ⁻⁶	18	Odgovara	Odgovara

Tablica 9. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge TSB (test podloga, T)

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA i SDA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
1	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	26	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁴	12	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	12	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁴	25	Odgovara	Odgovara
2	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	12	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁵	16	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	23	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	14	Odgovara	Odgovara
3	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	13	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁵	19	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	28	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	18	Odgovara	Odgovara

Tablica 9. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge TSB (test podloga, T) - nastavak

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA i SDA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
4	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	13	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁵	19	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	28	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	18	Odgovara	Odgovara
5	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	16	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁴	19	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	29	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	15	Odgovara	Odgovara
6	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	26	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁶	15	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	32	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁴	42	Odgovara	Odgovara

Tablica 9. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge TSB (test podloga, T) - nastavak

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA i SDA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
7	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	20	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁵	14	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	30	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	14	Odgovara	Odgovara
8	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	12	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁴	26	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	22	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁴	18	Odgovara	Odgovara
9	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	39	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁵	29	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	18	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	15	Odgovara	Odgovara

Tablica 9. Ukupni rezultati ispitivanja hranjivih svojstava tj. podržavanja rasta određenih test mikroorganizama *ready-to-use* hranjive podloge TSB (test podloga, T) - nastavak

LOT	Test mikroorganizam	Vrsta testa	Razrjeđenje pripremljene suspenzije	Broj poraslih kolonija na TSA i SDA (CFU/mL)	Rezultat (T)	Poredbena podloga (P)
10	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	H	10 ⁻⁵	16	Odgovara	Odgovara
	<i>B. beringensis</i>	H	10 ⁻⁶	12	Odgovara	Odgovara
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	14	Odgovara	Odgovara
	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	10	Odgovara	Odgovara

Obje testirane hranjive podloge podržavaju rast inokuliranih test mikroorganizama (tablice 8 i 9) u manjem broju od 100 CFU/mL u definiranom vremenskom periodu (PLIVA HRVATSKA, 2023b). Vidljiv je rast svih inokuliranih test mikroorganizama unutar propisanoga vremena te je time potvrđena hranjivost ovih testiranih podloga. Ispitivanje inhibitornih i indikativnih svojstava ovih dviju podloga nije bilo zahtijevano, pa stoga niti provedeno.

Sukladno zahtjevima SOP001608 rezultati objedinjeni u tablicama 5 i 9 obavezno se upisuju u *addendum* (dodatni dokument), kako je to prikazano na slikama 5 i 6.

Kontrola tekućih i selektivnih hranjivih podloga

Hranjiva podloga		FTM ✓					
Interni broj/lot	Rok valjanosti: 08. 2023 ✓	Proizvođač: HEZCK ✓					
Analizira se prema: SOP001608. 2; REP0094201 ✓							
IZGLED	<input checked="" type="checkbox"/> odgovara <input type="checkbox"/> ne odgovara	Analizirao/datum: Hvaljević 03.01.2023. ✓					
pH metar/ Vrijedi do	FA1097011, 16.12.23. ✓	pH = 7,04 = 7,0(24,3°C) ✓					
Analizirao/datum:	Zindli, 10.01.23. ✓	Channel R GLP: Off Date: 10-01-23 Time: 14:46 Sample ID: Result: 7.04pH ✓ Zindli Temperature: 24.3°C ✓ 10.01.23. ATC/MTC: ATC User: B-027 ✓ Ede 18.01.2023					
ISPITIVANJE HRANJIVOSTI							
Otopina za razjedinjavanje / Lot / Vrijedi do	POP 4 3. ✓	Temperature					
Pipeta / Vrijedi do	J12800H, 16.05.23. ✓	30-35°C ✓					
Nastavci za pipete / Vrijedi do	L200777G; 01.2027. ✓						
LF kabinet / Vrijedi do	LF3; 24.02.23. ✓						
bakterije	Volumen suspenzije mikroorganizma	Inkubator Vrijedi do					
kvasci, plijesni	50 µl ✓	107H, 16.12.23. ✓					
Analizirao	Zindli	Datum/Vrijeme	10.01.23.; 15:45 ✓				
Lot poredbene podloge: ✓							
Test mikroorganizmi (bakterije)	Vrsta testa	Razjedinjenje	Inokulum (cfu) Lot	Očitao Datum/ Vrijeme	Odgovara (+) Ne odgovara (-)		Očitao Datum/ Vrijeme
					P**	T**	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	H	10 ⁶	34	Zindli, 10.01.23., 09:30 ✓	+	+	Zindli, 10.01.23., 11:01:23 ✓
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	H	10 ⁶	13	11.01.23., 09:30 ✓	+	+	Zindli, 11.01.23., 09:30 ✓
<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	H	10 ⁶	15		+	+	Zindli, 11.01.23., 09:30 ✓
<i>Propionibacterium acnes</i> ...	H	10 ⁵	17		+	+	Zindli, 12.01.23., 10:00 ✓
Negativna kontrola Lot: ✓				Zindli, 12.01.23., 10:00 ✓	<input checked="" type="checkbox"/> odgovara <input type="checkbox"/> ne odgovara		

Slika 5a. Rezultati analize jednog LOT-a ready-to-use hranjive podloge FTM zabilježeni u addendum za kontrolu hranjivih i selektivnih hranjivih podloga (stranica 1 u addendumu)

Kontrola tekućih i selektivnih hranjivih podloga

Test mikroorganizmi (kvasci i plijesni)	Vrsta testa*	Razrjeđenje	Inokulum (cfu) Lot: /	Očitao Datum/ Vrijeme	Odgovara (+) Ne odgovara (-)		Očitao Datum/ Vrijeme
					P**	T**	
/	/	/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/	/	/
/	/	/	/	/	/	/	/
Negativna kontrola Lot: /	Očitao Datum/ Vrijeme		/	odgovara		ne odgovara	
MIKROBIOLOŠKI STATUS (STERILNOST)							
Inkubator Vrijedi do	20T4, 15.01.2023 ✓ * Zmli, 17.01.23.		Temperatura	30 - 35°C ✓			
Analizirao	M. V. G. O.		Datum/Vrijeme	03.01.2023 ^{13:30} ✓			
odgovara ✓ ne odgovara							
Očitao	Zmli		Datum/Vrijeme	17.01.2023.; 14:30 ✓			
Napomena: * vrijedi do: 25.07.2023. veza na lab. bilježnicu ... Zmli, 17.01.23. ✓							

* H-ispitivanje hranjivosti; I-ispitivanje inhibitornih svojstava; D-ispitivanje indikativnih svojstava
** P-rezultati poredbene podloge; T-rezultati ispitivane podloge

KVALITETA HRANJIVE PODLOGE

odgovara ✓	ne odgovara
Pregledao, datum: Š. 18.01.2023	

Related document: SOP001608

Page 2 of 2

Requested by:
Requested for:Requested on:
Reason for printing:

Controlled copy No

Slika 5b. Rezultati analize jednog LOT-a ready-to-use hranjive podloge FTM zabilježeni u addendum za kontrolu hranjivih i selektivnih hranjivih podloga (stranica 2 u addendumu)

Kontrola tekućih i selektivnih hranjivih podloga

Hranjiva podloga		TSB - sterilizirano ✓					
Interni broj/lot:		Rok valjanosti: 10.2023 ✓		Proizvođač: MERCK ✓			
Analizira se prema: SOP001608 / REP009420 ✓							
IZGLED		odgovara ✓ ne odgovara		Analizirao/datum: Zrindli, 03.01.23 ✓			
pH metar/ Vrijedi do		FA1097011, 16.12.23 ✓		pH = 7,09 = 7,1 (24,9°C) ✓			
Analizirao/datum:		Zrindli, 10.01.23 ✓		Channel R			
ISPITIVANJE HRANJIVOSTI							
Otopina za razjeđivanje / Lot / Vrijedi do		POP ✓		GLP: Off			
Pipeta / Vrijedi do		J12P001, 16.05.23 ✓		Date: 18-01-23			
Nastavci za pipete / Vrijedi do		L200777G, 01.2027 ✓		Time: 14:47			
LF kabinet / Vrijedi do		LF3, 24.02.23 ✓		Sample ID: ✓			
bakterije		Inkubator		Result: 7.09pH / Zrindli			
Volumen suspenzije mikroorganizama		Vrijedi do		Temperature: 24,9°C / 10.01.23.			
50 µl		24TH, 06.04.23 ✓		ATC/MTC: ATC ✓			
kvasci, plijesni		24TH, 06.04.23 ✓		User: B-027 ✓			
Analizirao		Datum/Vrijeme		AD00502316, CC30 ✓			
Zrindli		10.01.23, 15:45 ✓		20-25°C ✓			
Lot poredbene podloge: ✓				20-25°C ✓			
Test mikroorganizmi (bakterije)	Vrsta testa	Razjeđenje	Inokulum (cfu)	Očitao Datum/ Vrijeme	Odgovara (+) Ne odgovara (-)		Očitao Datum/ Vrijeme
					P**	T**	
B. subtilis ATCC 6633	H	10 ⁵	12	Zrindli, 11.01.23, 09:30 ✓	+	+	Zrindli, 13.01.23, 08:45 ✓
Bacillus cereus	H	10 ⁵	16		+	+	Zrindli, 13.01.23, 08:45 ✓
/	/	/	/		-	-	/
/	/	/	/		-	-	/
/	/	/	/		-	-	/
/	/	/	/		-	-	/
/	/	/	/		-	-	/
Negativna kontrola				Zrindli, 13.01.23, 08:45 ✓	odgovara ✓	ne odgovara	
Lot: ✓							

Related document: SOP001608

Page 1 of 2

Requested by:
Requested for:Requested on:
Reason for printing:

Controlled copy No:

Slika 6a. Rezultati analize jednog LOT-a ready-to-use hranjive podloge TSB zabilježeni u addendum za kontrolu hranjivih i selektivnih hranjivih podloga (stranica 1 u addendumu)

Kontrola tekućih i selektivnih hranjivih podloga

Test mikroorganizmi (kvasci i plijesni)	Vrsta testa*	Razrjeđenje	Inokulum (cfu) Lot: ✓	Očitao Datum/ Vrijeme	Odgovara (+) Ne odgovara (-)		Očitao Datum/ Vrijeme
					P**	T**	
C. albicans ATCC 10231	H	10 ⁻⁶	23	Zrnkli, 13.01.23, 08:45 ✓	+	+	Zrnkli, 13.01.23, 08:45 ✓
A. brasiliensis ATCC 16404	H	10 ⁻⁵	14	Zrnkli, 13.01.23, 08:45 ✓	+	+	Zrnkli, 13.01.23, 08:45 ✓
/	/	/	/	/	/	/	/
Negativna kontrola Lot: ✓	Očitao Datum/ Vrijeme		Zrnkli, 13.01.23. 08:45 ✓	odgovara ✓		ne odgovara	
MIKROBIOLOŠKI STATUS (STERILNOST)							
Inkubator Vrijedi do	21 TH, 15.01.23 + Zrnkli, 17.01.23.		Temperatura	20 - 25 °C ✓			
Analizirao	Hvaljević		Datum/Vrijeme	03.01.2023 13:30 ✓			
odgovara ✓ ne odgovara							
Očitao	Zrnkli		Datum/Vrijeme	17.01.2023. 14:30 ✓			

Napomena: Inokulum za brže inkubiranje ne na 30-35°C, inkubator 10 TH, vrijedi do 16.12.2023. ✓
 * Vrijedi do 25.07.23. Veza na lab. bilježnicu --- ✓
 Zrnkli, 17.01.23. ✓

* H-ispitivanje hranjivosti; I-ispitivanje inhibitornih svojstava; D-ispitivanje indikativnih svojstava
 ** P-rezultati poredbene podloge; T-rezultati ispitivane podloge

KVALITETA HRANJIVE PODLOGE

odgovara ✓	ne odgovara
Pregledao, datum: Čle, 18.01.2023	

Slika 6b. Rezultati analize jednog LOT-a ready-to-use hranjive podloge TSB zabilježeni u addendum za kontrolu hranjivih i selektivnih hranjivih podloga (stranica 2 u addendumu)

Dakle, osim naziva podloge, proizvođača i roka valjanosti svake podloge, u *addendumu* se bilježi (stranica 1): (a) prikladnost izgleda podloge; (b) tip tj. interni broj pH-metra, datum određivanja pH vrijednosti podloge i sama pH vrijednost podloge kao i temperatura pri kojoj je ova vrijednost određena; (c) vrsta puferske otopine za pripravu suspenzije svih test mikroorganizama (tako je npr. POP oznaka za otopinu NaCl peptona, pH 7,0); (d) vrsta pipete i sterilnih nastavaka za pipetu, koji su korišteni pri razrjeđivanju suspenzije test mikroorganizama; (e) broj laminara unutar Mikrobiološkog i biološkog laboratorija, koji se koristio za osiguravanje aseptičnih uvjeta rada; (f) vrsta test mikroorganizma (tablica 2) i volumen načinjene suspenzije, koja se naciepljuje u FTM ili TSB podlogu; (g) interni broj inkubatora, temperatura inkubacije pri kojoj se inkubira naciepljena podloga kao i datum i vrijeme početka inkubacije; (h) vrsta naciepljenih test mikroorganizama, vrsta analize (npr. H označava ispitivanje hranjivih svojstava podloge) i razrjeđenje naciepljene suspenzije; zatim (i) broj poraslih kolonija na *ready-to-use* hranjivoj podlozi *Tryptic Soy Agar* (TSA) i *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), koje se naciepljuju paralelno sa FTM i/ili TSB podlogama uz korištenje istog protokola u istovjetnim uvjetima pripreme i inkubacije; (j) rast test mikroorganizama na poredbenoj podlozi (P, prethodno ispitana odnosno odobrena hranjiva podloga iste vrste kao i ispitivana podloga) i testnoj podlozi (T, podloga kojoj se ispituje npr. hranjiva vrijednost); (k) rezultati inkubacije istovrsne podloge u istovjetnim uvjetima, ali bez naciepljivanja test mikroorganizama tj. negativna kontrola. Nadalje, u *addendum* se bilježe i parametri sterilnosti tj. porast kontaminanata kada test mikroorganizmi nisu naciepljeni na odgovarajuću podlogu (stranica 2 u *addendumu*). Ukoliko nakon inkubacije nenaciepljenih podloga nema porasta kontaminanata, ova podloga se označava s „odgovara“ i može se koristiti za analizu sterilnost gotovih farmaceutskih proizvoda u Mikrobiološkom i biološkom laboratoriju. U napomene je potrebno dodati sve izmjene oko bilo kojeg dijela opreme ili instrumenata (npr. ispravnost inkubatora do određenog datuma) kao i broj laboratorijske bilježnice u kojoj se bilježe sve promjene vezane uz opremu ili određeni instrument. Uz svaki zabilježeni parametar potrebno je unijeti datum (i vrijeme) kao i potpis analitičara, koji je proveo analizu. Dodatno i obavezno, ovlašteni zaposlenik laboratorija provjerava svaki parametar zabilježen u *addendum* i označava ispravnost svih zabilježenih parametara, dodaje datum kada je provjeru proveo i provjerene parametre ovjerava svojim potpisom.

Rezultati analize za preostalih devet LOT-ova *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB zabilježeni u *addendum* za kontrolu hranjivih (npr. FTM i TSB) i selektivnih hranjivih podloga (nije dio ovoga rada) nisu prikazani u ovome radu.

4.2. Validacija čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB pri sobnoj temperaturi u cilju potvrde njihova roka valjanosti

Kod validacije čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB, potrebno je načiniti dva ispitivanja. Prva točka ispitivanja (prvotna analiza) provodi se kada hranjiva podloga po prvi put dolazi u Laboratorij i namjerava se koristiti u daljnjem radu ovoga Laboratorija. To je ulazna kontrola hranjivosti (ili redovna analiza hranjivosti) takve hranjive podloge (tablica 10). Druga točka ispitivanja provodi se pred kraj roka valjanosti svih hranjivih podloga (tablica 11). Obje točke ispitivanja trebaju obuhvatiti samo po jedan LOT svake hranjive podloge.

Rezultati validacije uvijek se navode i dodatno evaluiraju unutar završnog izvještaja (interni dokument, PLIVA HRVATSKA). Validacija hranjivih podloga FTM i TSB čine parcijalni izvještaj te su dio svih provedenih validacija unutar Mikrobiološkog i biološkog laboratorija.

Tablica 10. Prva točka ispitivanja za analizu validacije čuvanja *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB pri sobnoj temperaturi u cilju potvrde njihova roka valjanosti za određeni LOT (interna informacija, PLIVA HRVATSKA)

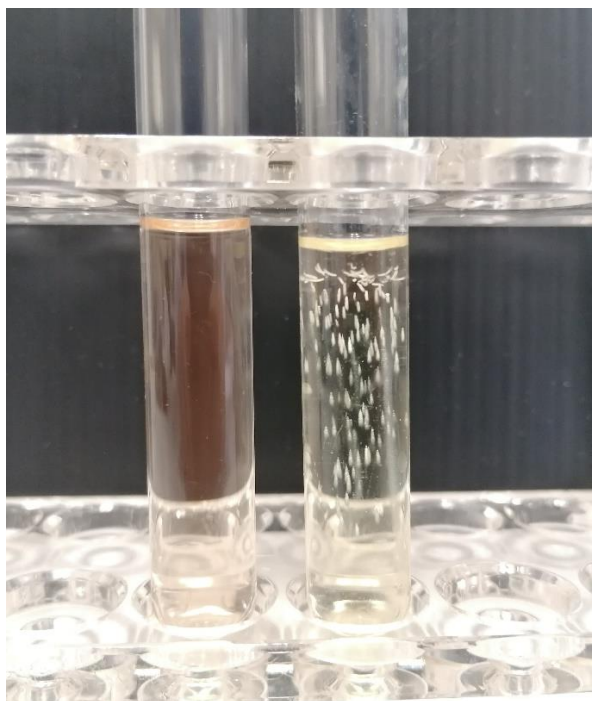
Hranjiva podloga	Izgled podloge	pH vrijednost	Ispitivanje hranjivih svojstava			Sterilnost
			Test mikroorganizmi	Vrsta testa	Rezultat	
FTM	Odgovara	7,1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Propionibacterium acnes</i>	H	Odgovara	
TSB	Odgovara	7,3	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Bacillus beringensis</i>	H	Odgovara	Odgovara

Tablica 11. Druga točka ispitivanja za analizu validacije kraja roka valjanosti *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB za LOT 6

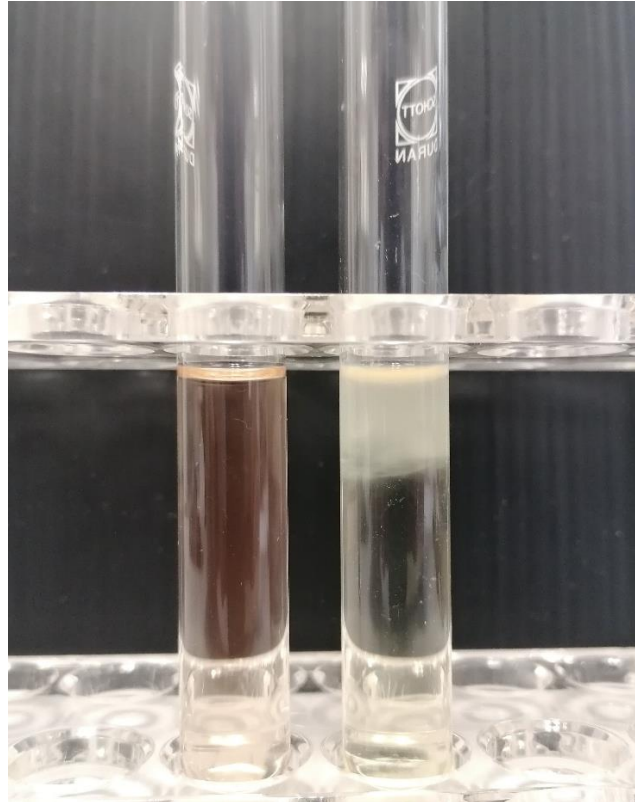
Hranjiva podloga	Izgled podloge	pH vrijednost	Ispitivanje hranjivih svojstava			Sterilnost
			Test mikroorganizmi	Vrsta testa	Rezultat	
FTM	Odgovara	6,98	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	H		
			<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	H		
			<i>Propionibacterium acnes</i>	H		
TSB	Odgovara	7,32	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	H	Odgovara	Odgovara
			<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	H		
			<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	H		
			<i>Bacillus beringensis</i>	H		

Rezultati prve (tablica 10) i druge točke (tablica 11) ispitivanja za analizu validacije kraja roka valjanosti *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB za određene LOT-ove ukazuju da je validacija provedena u skladu s validacijskim protokolom (PLIVA HRVATSKA, 2022d) te su zadovoljeni svi kriteriji prihvatljivosti obiju podloga prema navedenom protokolu.

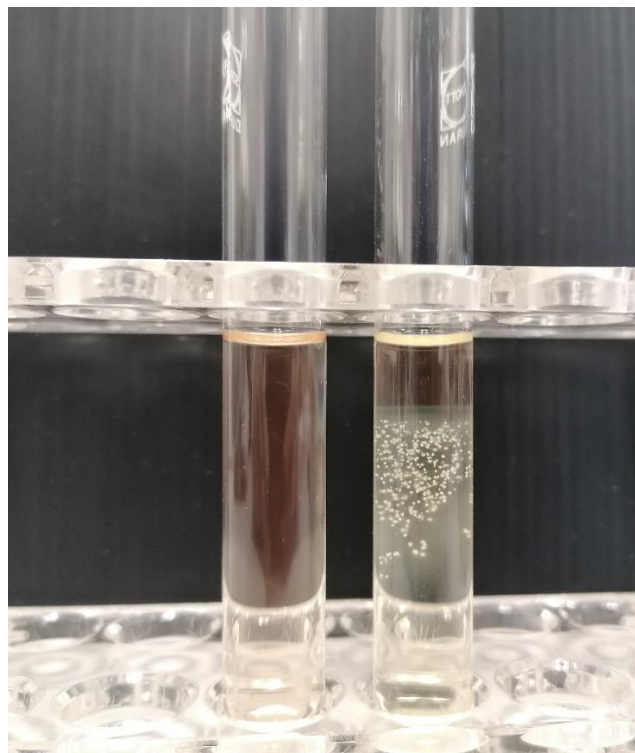
Slike kojima bi se prikazale vizualne karakteristike *ready-to-use* podloga FTM i TSB, kao i slike za koje potvrđuju podržavanje rasta test mikroorganizama (tablice 5 i tablice 8 – 9) nisu dane u ovome radu. Ovdje ispod su poredane slike (slike 7 – 14) koje vizualiziraju ispitivanja za analizu validacije kraja roka valjanosti *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB za LOT 6 nakon propisanog vremena inkubacije s naciepljenim testnim mikroorganizmima (tablica 2). Slike su načinjene po postupku detaljno opisanom u poglavlju 3.2.2.



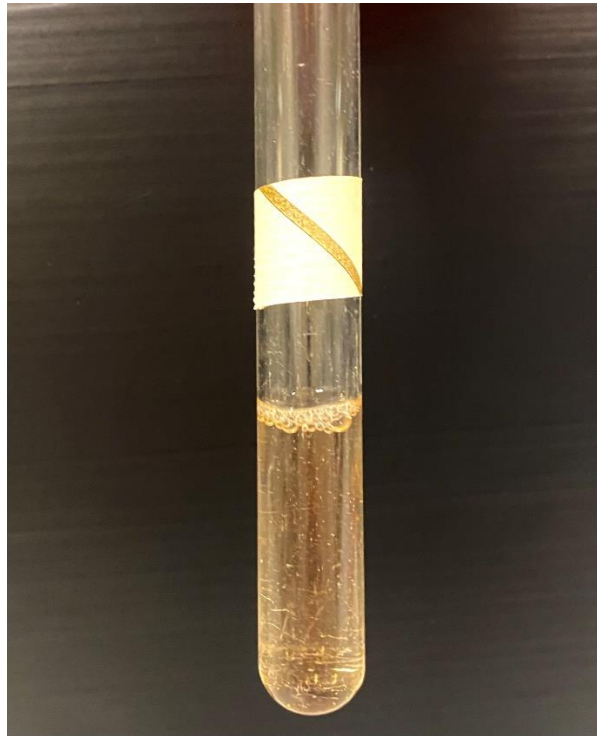
Slika 7. *Ready-to-use* podloga FTM prije (lijevo) i nakon (desno) naciepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *S. aureus* ATCC 6538 (vlastita fotografija)



Slika 8. *Ready-to-use* podloga FTM prije (lijevo) i nakon (desno) naciepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *P. aeruginosa* ATCC 9027 (*vlastita fotografija*)



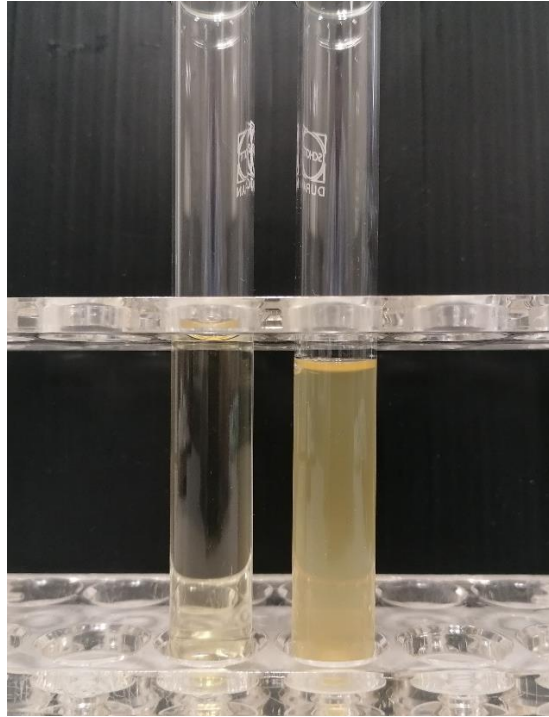
Slika 9. *Ready-to-use* podloga FTM prije (lijevo) i nakon (desno) naciepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *C. sporogenes* ATCC 11437 (*vlastita fotografija*)



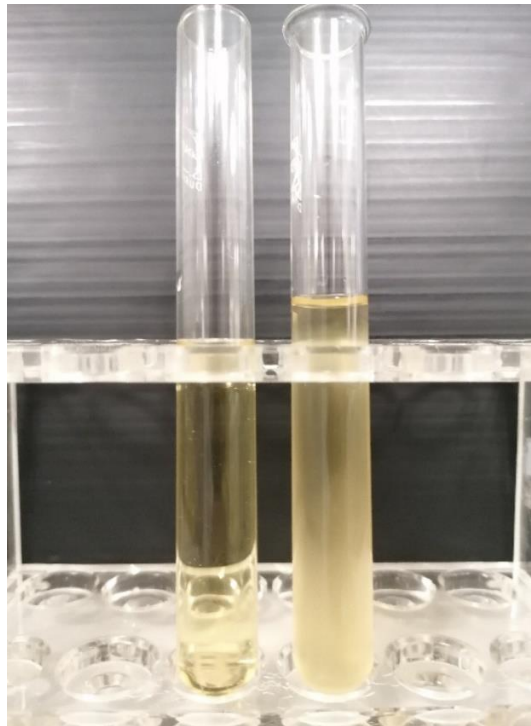
Slika 10. *Ready-to-use* podloga FTM nakon naciepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *P. acnes* (vlastita fotografija)



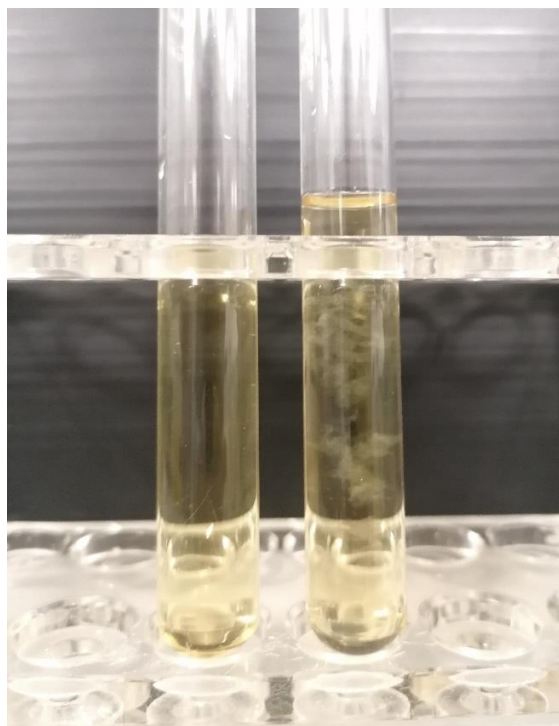
Slika 11. *Ready-to-use* podloga TSB prije (lijevo) i nakon (desno) naciepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *B. subtilis* ATCC 6633 (vlastita fotografija)



Slika 12. *Ready-to-use* podloga TSB prije (lijevo) i nakon (desno) nacjepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *B. beringensis* (vlastita fotografija)



Slika 13. *Ready-to-use* podloga TSB prije (lijevo) i nakon (desno) nacjepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *C. albicans* ATCC 10231 (vlastita fotografija)



Slika 14. *Ready-to-use* podloga TSB prije (lijevo) i nakon (desno) naciepljivanja i inkubacije s test mikroorganizmom *A. brasiliensis* ATCC 16404 (*vlastita fotografija*)

4.3. Obrada podataka

U ovome poglavlju statistički su obrađeni dobiveni eksperimentalni podaci za svih 10 LOT-ova dviju *ready-to-use* podloga - FTM i TSB. Načinjena je analiza varijance kao i statistička analiza broja kolonija poraslih na TSA (za odabrane test bakterijske sojeve) ili SDA (za odabrane sojeve kvasaca i plijesni) nakon inkubacije po četiri testna mikroorganizma za svaku *ready-to-use* podlogu. Statistička obrada podataka načinjena je upravo kako je to opisano u poglavlju 3.2. Ukratko, načinjena je dvofaktorijalna analiza varijance za obje *ready-to-use* hranjive podloge kod koje je prvi faktor bio LOT, a drugi faktor testni mikroorganizam. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 11 i 12.

Tablica 10. Dvofaktorijska analiza varijance za *ready-to-use* hranjive podloge FTM i TSB

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F	<i>p</i> -vrijednost	F tablični
FTM						
LOT	641.6	9	71.29	2.31	0.0444695	2.25
Mikroorganizam	1855.7	3	618.57	20.08	0.0000005	2.96
Pogreške	831.8	27	30.81			
Ukupno	3329.1	39				
TSB						
LOT	679.2	9	75.47	1.39	0.242	2.25
Mikroorganizam	182.7	3	60.89	1.12	0.358	2.96
Pogreške	1467.1	27	54.34			
Ukupno	2329.0	39				

SS, zbroj kvadrata odstupanja (engl. *Sum of Squares*); df, broj stupnjeva slobode (engl. *degrees of freedom*); MS, aritmetička sredina kvadrata (engl. *Mean Squares*); F, empirijski omjer.

Analiza varijance pokazala je signifikantan učinak obaju faktora - LOT-a i testnog mikroorganizma za *ready-to-use* hranjivu podlogu FTM, dok za *ready-to-use* hranjivu podlogu TSB nije bilo signifikantnog učinka niti jednog od ova dva faktora.

Tablica 11. Broj kolonija (CFU/mL) poraslih na hranjivoj podlozi FTM za 10 LOT-ova i četiri testna mikroorganizma

LOT	Mikroorganizam				Min	Maks	CV (%)	Prosjek
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>P. acnes</i>				
1	24	18	11	17	11	24	34	15.9
2	34	13	15	17	13	34	60	16.2
3	31	26	21	17	17	31	28	21.9
4	32	34	18	17	17	34	38	23.6
5	35	13	10	23	10	35	68	16.6
6	40	25	13	15	13	40	65	19.1
7	31	29	12	19	12	31	43	20.7
8	27	20	16	15	15	27	31	17.6
9	50	28	16	30	16	50	54	26.3
10	33	37	26	18	18	37	30	27.4
Min	24	13	10	15				**
Maks	50	37	26	30				
CV (%)	21	34	31	24				
Prosjek	33.7	24.3	15.8	18.8	*			

* F test signifikantan uz $p < 0,05$; ** F test signifikantan uz $p < 0,05$; CV-koeficijent varijabilnosti

Broj kolonija za četiri testna mikroorganizma poraslih na TSA nakon inkubacije varirao je kroz 10 LOT-ova od 24 do 50 CFU/mL za test mikroorganizam *S. aureus*, 13 – 37 CFU/mL za test mikroorganizam *P. aeruginosa*, 10 – 26 CFU/mL za test mikroorganizam *C. sporogenes* odnosno 15 – 30 CFU/mL za test mikroorganizam *P. acnes*. Koeficijent varijabilnosti za iste mikroorganizme bili su, redom, 21 %, 34 %, 31 % i 24 %. Prosječan broj kolonija signifikantno se razlikovao između četiri vrste test mikroorganizama. U prosjeku je najviše kolonija formirano na TSA nakon inkubacije test mikroorganizma *S. aureus* ATCC 6538 (33,7 CFU/mL), a najmanji broj kolonija formirano je na TSA nakon inkubacije test mikroorganizma *C. sporogenes* ATCC 11437 (15,8 CFU/mL).

Prosječne vrijednosti broja kolonija za sve LOT-ove međusobno su se signifikantno razlikovale i kretale su se u rasponu od 15,9 CFU/mL (LOT 1) do 27,4 CFU/mL (LOT 10). U

značajnom širom rasponu varirao je broj kolonija kod LOT-ova 2, 5, 6 i 9 s pripadajućim koeficijentima varijabilnosti od, redom, 60 %, 68 %, 65 % i 54 %.

Tablica 12. Broj kolonija (CFU/mL) poraslih na hranjivoj podlozi TSB za 10 ulaznih LOT-ova i četiri testna mikroorganizma

Ulazni lot	Mikroorganizam				Min	Maks	CV (%)	Prosjek
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. beringsis</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404				
1	26	12	12	25	12	26	42	18.8
2	12	16	23	14	12	23	29	16.3
3	13	19	28	18	13	28	32	19.5
4	13	19	28	18	13	28	32	19.5
5	16	19	29	15	15	29	32	19.8
6	26	15	32	42	15	42	39	28.8
7	20	14	30	14	14	30	39	19.5
8	12	26	22	18	12	26	31	19.5
9	39	29	18	15	15	39	43	25.3
10	16	12	14	10	10	16	20	13.0
Min	12	12	12	10				ns*
Maks	39	29	32	42				
CV (%)	45	31	30	48				
Prosjek	19.3	18.1	23.6	18.9	ns*			

*ns F test nije signifikantan

Kod podloge TSB, nije bilo signifikantnih razlika u broju kolonija poraslih na TSA (za kulture bakterija) ili SDA (za kulturu kvasaca i plijesni) nakon inkubacije četiriju sojeva test mikroorganizama niti između 10 analiziranih LOT-ova. U prosjeku je najviše kolonija formirano na SDA nakon inkubacije test mikroorganizma *C. albicans* ATCC 10231 (23,6 CFU/mL), a najmanji broj kolonija formirano je na TSA nakon inkubacije test mikroorganizma *B. beringsis* (18,1 CFU/mL).

Između svih 10 LOT-ova opažena je manja varijabilnost broja kolonija poraslih na TSA nakon inkubacije, kod podloge FTM uz koeficijent varijabilnosti od 20 % do 43 %. S druge

strane, varijabilnost broja kolonija poraslih na TSA i SDA nakon inkubacije između 10 LOT-ova TSB podloge bila je veća u odnosu na FTM podlogu s rasponom koeficijenta varijabilnosti od 30 – 48 %.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u okviru ovoga diplomskoga rada, može se zaključiti, kako slijedi:

1. Vizualnim pregledom utvrđeno je da je izgled spremnika i po 10 LOT-ova dviju *ready-to-use* hranjivih podloga - *Fluid Thioglycolate Medium* (FTM) i *Tryptic Soy Broth* (TSB) odgovarao izgledu propisanom od strane proizvođača. Promjene, kao što su kristalizacija, aglomeracija i druge modifikacije u strukturi i boji podloga nisu uočene. Bočice s podlogama čuvane su prema propisanim uvjetima te na njima nije uočeno nikakvo oštećenje ili napuknuće, a same podloge nisu promijenile boju.
2. U svim inkubiranim uzorcima *ready-to-use* hranjivih FTM i TSB podloga nije primijećeno zamućenje ili rast mikroorganizama kontaminanata tijekom propisanog vremena inkubacije za provjeru sterilnosti. Ovi rezultati potvrđuju da su svi LOT-ovi ovih dviju podloga ispunili zahtjev za sterilnost tj. imali ispravan mikrobiološki status.
3. pH vrijednost svih LOT-ova bile su unutar zadanih intervala (FTM, pH $7,1 \pm 0,2$; TSB, pH $7,3 \pm 0,2$) i ova se vrijednost nije promijenila tijekom propisanog vremena čuvanja, pa stoga u cjelosti obje podloge odgovaraju zahtjevima (PLIVA HRVATSKA, 2023b).
4. Svi LOT-ovi dviju *ready-to-use* podloga podržavali su rast inokuliranih test mikroorganizama (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus beringensis*) i to u manjem broju od 100 CFU/mL u definiranom vremenskom periodu (PLIVA HRVATSKA, 2023b) i time je potvrđena hranjivost ovih testiranih podloga.
5. Rezultati prve i druge točke ispitivanja za analizu validacije kraja roka valjanosti *ready-to-use* hranjivih podloga FTM i TSB za određene LOT-ove ukazuju da je validacija provedena u skladu s validacijskim protokolom (interni dokument, PLIVA Hrvatska d.o.o.) te su zadovoljeni svi kriteriji prihvatljivosti prema navedenom protokolu.
6. Na temelju dvofaktorijalne statističke analize, LOT i test mikroorganizam signifikantno utječu na podržavanje rasta test mikroorganizama na podlozi FTM, dok nema signifikantnog utjecaja na ovaj parametar kod TSB podloge.

6. LITERATURA

Anonymous 1,

Biological tests, <http://www.uspbpep.com/ep60/2.6.%201.%20sterility%2020601e.pdf>.

Pristupljeno 19. lipnja 2023.

Anonymous 2,

Microbiological examination of non-sterile products,

[http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20\(total%20viable%20aerobic%20count\).pdf](http://uspbpep.com/ep50/2.6.12.%20Microbiological%20examination%20of%20non-sterile%20products%20(total%20viable%20aerobic%20count).pdf).

Pristupljeno 21. lipnja 2023.

Anonymous 3, Microbiological examination of non-sterile products (test for specified microorganisms), https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP5/EP5.0_01__148.pdf. Pristupljeno 21. lipnja 2023.

Anonymous 4, Microbiological examination of nonsterile products: Microbial enumeration tests, https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-method/q05b_pf_ira_34_6_2008.pdf. Pristupljeno 21. lipnja 2023.

Anonymous 5, Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms, https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-method/q05a_pf_ira_34_6_2008.pdf. Pristupljeno 21. lipnja 2023.

Anonymous 6, Microbiological best laboratory practices,

https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/USP42-NF37/USP42-NF37_172.pdf. Pristupljeno 21. lipnja 2023.

Arts CJJ, Geurts J (2017) Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs). U: Reubsat L, Ekkelenkamp MB (ured.) Pathogen-directed antibiotic Therapy, University Medical Center Utrecht, Utrecht, str. 231-255.

Attfield P, Gunasekera T, Boyd A, Deere D, Veal D (1999) Application of flow cytometry to microbiology of food and beverage industries. *Australas Biotechnol* **9**, 159-166.

Bagnoli F, Rappuoli R, Grandi G (2017) *Staphylococcus aureus*, Springer International Publishing, New York. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72063-0>

Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW (1986) Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology, Elsevier Science, London

Barry AL, Fay GD (1972) A review of some common sources of error in the preparation of agar media. *Am J Med Technol* **38**, 241-245.

Berkhout CM (1923) De schimmelgeslachten Monilia, Oidium, Oospora en Torula, Rijksuniversiteit Utrecht, Utrecht.

Booth C (2006) The role of media fills in process control. *Pharm Techn Eu* **18**, 16-17.

Cundell AM (2002) Review of media selection and incubation conditions for the compendial sterility and microbial limits tests. *Pharm Forum* **28**, 2034-2041.

Dekio I, Culak R, Misra R, Gaulton T, Fang M, Sakamoto M, i sur. (2015) Dissecting the taxonomic heterogeneity within *Propionibacterium acnes*; proposal of *Propionibacterium eue*. *J Syst Evol Microbiol* **65**, 4776-4787.

De La Fuente R, Suarez G, Schleifer KH (1985) *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. *nov.*, the causal agent of abscess disease of sheep. *Int J Syst Bacteriol* **35**, 99-102.

Earl AM, Losick R, Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiol* **16**, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>

Fung DY (2002) Rapid methods and automation in microbiology. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **1**, 3-2.

Gordon O, Gray JC, Anders HJ, Staerk A, Schlaefli O (2011) Overview of Rapid Microbiological Methods Evaluated, Validated and Implemented for Microbiological Quality Control, *Pharm Rev*, **16**, 9-13

Kalenić S, Abram M, Batinić D, Beader N, Bedenić B, Bošnjak Z i sur. (2013) Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb.

Kovács AT (2019) *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **27**, 724-725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>

Larkin JM, Stokes JL (1967) Taxonomy of psychrophilic strains of *Bacillus*. *J Bacteriol* **94**, 889–895. <https://10.1128/jb.94.4.889-895.1967>

Li H (2014) (R)-Indolelactyl-CoA dehydratase, the key enzyme of tryptophan reduction to indolepropionate in *Clostridium sporogenes*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.

Martin RJ (1971) Storage of microbiological culture media. *Lab practice* **20**, 653-656.

Merck Microbiology Manual (2005) , 12. izd., Merck KGaA, Darmstadt.

Narodne novine (2013) Zakon o medicinskim proizvodima. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1521.html. Pristupljeno 27.06.2023.

PLIVA HRVATSKA (2018) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Instructions for Preparation, Storage and Handling of cryopreserved Microorganisms Cultures (SOP003528).

PLIVA HRVATSKA (2021) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Ispitivanje sterilnosti (SOP000053).

PLIVA HRVATSKA (2022a) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Priprava i sterilizacija hranjivih podloga i otopina (SOP003890).

PLIVA HRVATSKA (2022b) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Čišćenje i dezinfekcija u Mikrobiološkim i biološkim laboratorijima (SOP003674).

PLIVA HRVATSKA (2022c) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Određivanje pH vrijednosti (SOP005208).

PLIVA HRVATSKA (2022d) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Validation protocol for Media Culture Storage (VEP022962).

PLIVA HRVATSKA (2023a) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Osnove rada u Mikrobiološkim i biološkim laboratorijima (SOP005060).

PLIVA HRVATSKA (2023b) Kvaliteta – Kontrola kvalitete. Opća dokumentacija – Kontrola hranjivih podloga (SOP001608).

Prevot AR (1938) Etudes de systematique bacterienne: Critique de la conception actuelle du genre Clostridium. *Ann Ins. Pasteur* **61**, 72-91.

Riley CM, Rosanske TW (1996) Development and Validation of Analytical Methods, Pergamon, New York.

Rudra B, Duncan L, Shah AJ, Shah HN, Gupta RS (2022) Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraeruginosa* sp. nov. *Int. J Syst Evol Microbiol* **72**, 11.

Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud in Mycol* **50**, 45-61.

Sandle T (2004) Gram's Stain: History and Explanation of the Fundamental Technique of Determinative Bacteriology. *IST Sci and Techn J* **54**, 3-4.

Sandle T (2013) Automated microbial identifications: a comparison of USP and EP approaches. *Am Pharm Rev* **16**, 56-61.

Sandle T (2014) Biochemical and Modern Identification Techniques: Food-Poisoning Microorganisms. U: Batt CA, Tortorello ML (ured.) Encyclopedia of Food Microbiology, 2.izd., Elsevier Ltd., Cambridge, str. 238-243.

Sandle T (2015) Microbiological Identification with MALDI-TOF MS. *J of Valid Techn* **21**, 1-10.

Sandle T (2016) Pharmaceutical Microbiology Essential for Quality Assurance and Quality Control, Woodhead Publishing, Sawston.

Sandle T (2019) Industrial Pharmaceutical Microbiology - Standards & Controls, 5.izd., EC Pharma Ltd, Passfield.

Snell JJS (1995) Preservation of control strain. U: Snell JJS, Brown DFB, Roberts C (ured.) Quality assurance: principles and practice in the microbiology laboratory, Public Health Laboratory Service, London, str. 69-76.

Sutton S (2007) Microbial Recovery Studies – 50 % or 70 %?, *Pharma Microbiol Forum Newslet* **3**, 3-9.

Su Y, Liu C, Fang H, Zhang D (2020) *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine, *Microb Cell Fact* **19**, 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>

USP (2016) <71> Sterility Tests. USP - United States Pharmacopoeia, https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-method/q11_pf_ira_34_6_2008.pdf . Pristupljeno 19. lipnja 2023.

Zhou X, Li Y (2015) Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease, Elsevier Science, Amsterdam. <https://10.1016/b978-0-12-802234-4.00004-5>

Zweers JC, Barák I, Becher D, Driessen AJ, Hecker M, Kontinen VP i sur. (2008) Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microb Cell Fact* **7**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-10>

Yu Y, Li HR, Zeng YX, Chen B (2010) *Bacillus beringensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from the Bering Sea. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 551–557. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9523-4>

Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S (2015) Molecular Medical Microbiology, 2. izd., Academic Press, Cambridge/Massachusetts. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>



www.sigmaaldrich.com

Certificate of Quality
Steritest™ Media for Sterility Test
Clear Fluid Thioglycollate Medium

Catalogue Number : STBMCTM12
Lot Number : F3BB86116
Expiry date : FEB-2024
Storage Conditions : 2 – 25°C (35 to 77°F)
Protected from light

We certify that the product described herein meets the following criteria.

Product Description

Clear Fluid Thioglycollate Medium is intended for the detection of anaerobic bacteria however, it also enables aerobic bacterial detection. This medium is used for sterility testing by membrane filtration or direct inoculation. Performance of this medium complies with the requirements described in the European Pharmacopeia (EP), United States Pharmacopeia (USP) and Japanese Pharmacopeia (JP) for Fluid Thioglycollate Medium.

One box of product contains 12 bottles of 100ml of Medium, each bottle has a screw cap with a septum.

Composition per liter of purified water

Casein peptone	15.0 g
L-Cystine	0.5 g
Monohydrated/Anhydrous dextrose	5.5 g/5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium chloride	2.5 g
Sodium thioglycollate or Thioglycolic acid	0.5 g 0.3 ml
Resazurin	0.001 g
Synthetic Agar	0.75 g

Formula can be adjusted and/or supplemented and sources of components are selected to meet the performance criteria required.

Precautions

- Do not inhale or ingest while handling the product.
- Decontaminate grey stoppers thoroughly prior to perforation in particular when performing sterility testing by membrane filtration.
- For direct inoculation or transfer of the liquid, before unscrewing the top in a controlled environment, decontaminate thoroughly the different components.
- When conducting the test for sterility, control that not more than the upper half of the medium has undergone a colour change indicative of oxygen uptake at the end of the 14 days incubation period (no pink layer should be visible at the bottom of the canister).

Good Manufacturing Practices

This product was manufactured at Millipore S.A.S., Molsheim, France which adheres to Good Manufacturing Practices guidelines. Special emphasis has been placed on cleanliness and environmental control conditions.

ISO® 9001/14001

The product has been manufactured in a Millipore SAS facility whose quality management system is approved by an accredited registering body to the appropriate ISO® 9001 Quality System Standard and ISO® 14001 Environmental Management Standard. Manufacturing processes are audited on a regular basis.

Pharmacopoeia references

European Pharmacopeia, 2.6.1 Sterility.
United States Pharmacopeia, <71> Sterility tests
Japanese Pharmacopeia, 4.06 Sterility test.



Lot Analysis

This manufacturing lot was sampled, tested and released according to the following specifications:

Physical Tests

- **100 % visual control**

This product was designed and manufactured to meet the following specifications:

Criteria	Specifications	Results
Appearance of the media	Light yellow and viscous liquid with a pink ring in suspension ≤ 1 cm	Conform
pH	7.1 +/- 0.2	Conform
In process volume control	100 to 106 ml	Conform

Biological Tests

- **Sterility**

Representative samples were incubated at 20-25°C and 30-35°C for 14 days.

- **Fertility/ Growth Promotion**

Fertility tests were conducted by direct inoculation. All samples provided good growth associated to a clearly visible turbidity of the medium.

This product was designed and manufactured to meet the following specifications:

Criteria	Specifications	Results
Sterility Assurance Level	No contamination after 14 days at 20-25°C and 30-35°C	Conform
Growth promotion: <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC® 19404	Inoculum ≤ 100 CFU Clear visible growth within 3 days at 30-35°C	Conform
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538	Inoculum ≤ 100 CFU Clear visible growth within 3 days at 30-35°C	Conform
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Inoculum ≤ 100 CFU Clear visible growth within 3 days at 30-35°C	Conform

Batch Record

The lot of bottles has a complete documentation which includes product description, test methods, test specifications and results.

According to the above results, the product complies with Millipore SAS's acceptance criteria and is released.

This document has been produced electronically and is valid without a signature
Head of Biomonitoring Quality, Molsheim France



Prilog 2. Certifikat hranjive podloge TSB proizvođača Merck



www.sigmaldrich.com

Certificate of Quality
Steritest™ Media for Sterility Test
Soybean Casein Digest Medium
(Trypcase Soy Broth or Tryptic Soy Broth)

Catalogue Number : STBMTSB12
Lot Number : F3CB97349
Expiry date : MAR-2024
Storage Conditions : 2 – 25°C (35 to 77°F)
Protected from light

We certify that the product described herein meets the following criteria.

Product Description

Soybean-Casein Digest Medium is intended for the detection of aerobic bacteria and fungi. This medium is used for sterility testing by membrane filtration or by direct inoculation. Performance and preparation of this medium comply with the European Pharmacopeia (EP), United States Pharmacopeia (USP) and Japanese Pharmacopeia (JP) for Soybean-Casein Digest Medium.

Soybean-Casein Digest Medium is also used as pre-enrichment broth for non-sterile products as described in the European Pharmacopoeia (EP), the United States Pharmacopoeia (USP) and the Japanese Pharmacopeia (JP).

One box of product contains 12 bottles of 100ml of Medium, each bottle has a screw cap with a septum.

Composition per liter of purified water

Casein peptone	17.0 g
Soy peptone	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Dibasic potassium phosphate	2.5 g
Monohydrated/Anhydrous dextrose	2.5 g/2.3 g

Formula can be adjusted and/or supplemented and sources of components are selected to meet the performance criteria required.

Precautions

- Do not inhale or ingest while handling the product.
- Decontaminate grey stoppers thoroughly prior to perforation in particular when performing sterility testing by membrane filtration.
- For direct inoculation or transfer of the liquid, before unscrewing the top in a controlled environment, decontaminate thoroughly the different components.

Good Manufacturing Practices

This product was manufactured at Millipore S.A.S., Molsheim, France which adheres to Good Manufacturing Practices guidelines. Special emphasis has been placed on cleanliness and environmental control conditions.

ISO® 9001/14001

The product has been manufactured in a Millipore SAS facility whose quality management system is approved by an accredited registering body to the appropriate ISO® 9001 Quality System Standard and ISO® 14001 Environmental Management Standard. Manufacturing processes are audited on a regular basis.

Pharmacopoeia references

European Pharmacopeia, 2.6.1 Sterility, 2.6.12 & 2.6.13. Microbial examination of non-sterile products.

United States Pharmacopeia, <71> Sterility tests, <61> & <62> microbial examination of non-sterile products.

Japanese Pharmacopeia, 4.06 Sterility test.

The Life Science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S and Canada.



Lot analysis

This manufacturing lot was sampled, tested and released according to the following specifications:

Physical Tests

- **100 % visual control**

This product was designed and manufactured to meet the following specifications:

Criteria	Specifications	Results
Appearance of the media	Light yellow clear liquid	Conform
pH	7.3 +/- 0.2	Conform
In process volume control	100 to 106 ml	Conform

Biological Tests

- **Sterility**

Representative samples were incubated at 20-25°C and 30-35°C for 14 days.

- **Fertility / Growth Promotion**

Fertility tests were conducted by direct inoculation. All samples provided good growth associated to a clearly visible turbidity of the medium.

This product was designed and manufactured to meet the following specifications:

Criteria	Specifications	Results
Sterility Assurance Level	No contamination after 14 days at 20-25°C and 30-35°C	Conform
Growth promotion:		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	Inoculum ≤ 100CFU Clear visible growth within 3 days at 20-25°C and 30-35°C	Conform
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	Inoculum ≤ 100CFU Clear visible growth within 5 days at 20-25°C	Conform
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i> ATCC® 16404	Inoculum ≤ 100CFU Clear visible growth within 5 days at 20-25°C	Conform
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538	Inoculum ≤ 100CFU Clear visible growth within 3 days at 30-35°C	Conform
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Inoculum ≤ 100CFU Clear visible growth within 3 days at 30-35°C	Conform

Batch Record

The lot of bottles has a complete documentation which includes product description, test methods, test specifications and results

According to the above results, the product complies with Millipore SAS's acceptance criteria and is released.

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Head of Biomonitoring Quality, Molsheim France



IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, KRISTINA ZRINSKI, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis

