

PHỤ LỤC 16

16.1 CÁC PHƯƠNG PHÁP TIỆT KHUẨN

Một sản phẩm được coi là vô khuẩn nếu nó hoàn toàn không chứa bất kỳ vi sinh vật sống nào. Phương pháp tiệt khuẩn là phương pháp làm cho một sản phẩm trở thành vô khuẩn. Do không thể đảm bảo độ vô khuẩn của sản phẩm bằng cách thử vô khuẩn, nên độ vô khuẩn của sản phẩm chỉ có thể đảm bảo bằng cách áp dụng một quy trình sản xuất đã được thẩm định thích hợp. Đối với mỗi quy trình tiệt khuẩn đã chọn phải tiến hành khảo sát để đảm bảo hiệu quả tiệt khuẩn và tính toàn vẹn của sản phẩm, bao gồm cả vật chứa và bao gói bên ngoài, trước khi áp dụng vào thực tế. Trong quá trình sản xuất phải tuân thủ đúng quy trình tiệt khuẩn đã thẩm định. Nếu có thay đổi lớn trong quy trình tiệt khuẩn, bao gồm cả sự thay đổi kích cỡ lô, phải tái thẩm định quy trình. Trong khi xây dựng quy trình sản xuất thuốc vô khuẩn phải tuân theo các nguyên tắc thực hành tốt sản xuất GMP, cụ thể là:

Sử dụng công nhân lành nghề đã trải qua quá trình huấn luyện thích hợp;

Thiết kế nhà xưởng phù hợp;

Thiết kế máy móc, thiết bị sản xuất sao cho dễ vệ sinh và tiệt khuẩn;

Áp dụng các biện pháp phòng ngừa thích hợp nhằm làm giảm số lượng vi sinh vật trong sản phẩm trước khi tiệt khuẩn;

Thẩm định quy trình sản xuất cho tất cả các công đoạn trong dây chuyền sản xuất có nguy cơ nhiễm khuẩn;

Thiết lập và thực thi chương trình giám sát chất lượng môi trường sản xuất và các quy trình kiểm tra trong quá trình sản xuất.

Các phương pháp mô tả dưới đây chủ yếu dùng để diệt hoặc loại bỏ vi khuẩn, nấm men và nấm mốc ra khỏi sản phẩm cần tiệt khuẩn. Đối với các sản phẩm sinh học có nguồn gốc từ người hay động vật, trong quá trình thẩm định phải chứng minh khả năng loại bỏ hay làm bất hoạt virus của quy trình tiệt khuẩn.

Nếu có thể, nên ưu tiên chọn phương pháp tiệt khuẩn thành phẩm. Nếu không thể tiệt khuẩn thành phẩm được, có thể loại vi khuẩn bằng phương pháp lọc qua màng lọc giữ lại vi khuẩn hay phương pháp sản xuất vô khuẩn. Trong mọi trường hợp, vật chứa và nút đậy phải có khả năng duy trì được tính vô khuẩn của sản phẩm cho đến khi hết hạn dùng.

Mức bảo đảm vô khuẩn

Sự khử khuẩn bằng tác nhân vật lý và hóa học tuân theo qui luật số mũ, do đó luôn luôn có khả năng còn vi sinh vật sống tồn tại trong sản phẩm sau khi tiệt khuẩn với một xác suất

thống kê nhất định. Mức bảo đảm vô khuẩn SAL (sterility assurance level) của một quy trình tiệt khuẩn đã cho là xác suất tồn tại một đơn vị đóng gói không vô khuẩn trong toàn bộ lô sản phẩm sau khi tiệt khuẩn bằng quy trình đó. Ví dụ:

$SAL = 10^{-6}$ có nghĩa là có khả năng có không nhiều hơn một vi sinh vật sống trong 1×10^6 đơn vị đóng gói của sản phẩm đã tiệt khuẩn. Đối với một quy trình tiệt khuẩn đã cho, SAL phụ thuộc số lượng vi sinh vật có trong sản phẩm trước khi tiệt khuẩn, sức đề kháng của nó với tác nhân tiệt khuẩn và môi trường trong đó vi sinh vật tồn tại trong quá trình xử lý. Khi có thể, sử dụng mức bảo đảm vô khuẩn SAL để đánh giá hiệu quả tiệt khuẩn của các phương pháp mô tả trong chuyên luận này. SAL của mỗi quy trình tiệt khuẩn được thiết lập trong khi thẩm định quy trình.

Phương pháp và điều kiện tiệt khuẩn

Tiến hành tiệt khuẩn theo một trong các phương pháp giới thiệu dưới đây. Có thể cải tiến hoặc kết hợp các phương pháp đã giới thiệu, tuy nhiên phải tiến hành thẩm định phương pháp đã cải tiến để bảo đảm hiệu quả tiệt khuẩn của phương pháp cũng như để đảm bảo tính toàn vẹn của sản phẩm cần tiệt khuẩn, bao gồm cả bao bì sản phẩm. Đối với mọi phương pháp tiệt khuẩn, phải theo dõi các thông số vận hành quan trọng trong suốt quá trình tiệt khuẩn của mỗi lô sản phẩm nhằm đảm bảo các thông số đo được phù hợp với các thông số kỹ thuật đã thiết lập trước đó trong quá trình thẩm định phương pháp, kể cả trường hợp tiệt khuẩn trong điều kiện chuẩn.

Phương pháp tiệt khuẩn thành phẩm

Đối với phương pháp tiệt khuẩn thành phẩm, điểm quan trọng cần phải chú ý là sự phân bố không đồng đều của tác nhân tiệt khuẩn trong buồng tiệt khuẩn. Phải xác định được vị trí trong buồng tiệt khuẩn mà tác nhân tiệt khuẩn khó đến nhất (ví dụ vị trí có nhiệt độ thấp nhất trong nồi hấp) để bố trí sắp xếp sản phẩm có kiểu dáng và kích thước bao bì khác nhau.

Tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm

Phương pháp tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm được tiến hành trong một thiết bị chuyên dùng gọi là nồi hấp, tác nhân tiệt khuẩn là hơi nước bão hòa dưới áp suất cao. Đây là phương pháp ưu tiên chọn lựa, khi có thể, nhất là đối với các dung dịch nước. Điều kiện chuẩn của phương pháp tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm là đun nóng ở 121°C trong ít nhất 15 min đối với các thành phẩm là dung dịch nước. Có thể tiến hành tiệt khuẩn ở điều kiện nhiệt độ và thời gian khác với điều kiện chuẩn nếu chứng minh được hiệu quả của chế độ tiệt khuẩn đã chọn. Phải không chế số lượng vi sinh vật trong sản phẩm trước khi tiệt khuẩn bằng cách áp dụng quy trình sản xuất và các biện pháp phòng ngừa thích hợp để đạt được mức bảo đảm vô khuẩn SAL là 10^{-6} hay nhỏ hơn.

Trong quá trình tiệt khuẩn, phải theo dõi và ghi chép lại nhiệt độ và áp suất bên trong nồi hấp. Nhiệt độ thường

được theo dõi bằng các đầu dò nhiệt đặt ở phần nguội nhất của nồi hấp. Thông số vận hành của mỗi chu trình tiệt khuẩn được ghi lại dưới dạng biểu đồ nhiệt độ - thời gian, hay bằng một cách thích hợp khác.

Khi đánh giá hiệu quả của quá trình tiệt khuẩn bằng phương pháp sinh học, dùng chỉ thị sinh học thích hợp theo Phụ lục 16.2 Chỉ thị sinh học dùng cho tiệt khuẩn.

Tiệt khuẩn bằng nhiệt khô

Tiệt khuẩn bằng nhiệt khô được thực hiện trong tủ sấy có gắn thiết bị đối lưu không khí để đảm bảo sự phân phối nhiệt đồng đều trong toàn bộ khoang tiệt khuẩn. Điều kiện chuẩn của phương pháp tiệt khuẩn bằng nhiệt khô là sấy ở nhiệt độ tối thiểu 160 °C trong ít nhất 2 h. Có thể tiến hành tiệt khuẩn ở điều kiện nhiệt độ và thời gian khác với điều kiện chuẩn nếu chứng minh được hiệu quả của chế độ tiệt khuẩn đã chọn. Phải không chế số lượng vi sinh vật trong sản phẩm trước khi tiệt khuẩn bằng cách áp dụng quy trình sản xuất và các biện pháp phòng ngừa thích hợp để đạt được mức bảo đảm vô khuẩn SAL là 10^{-6} hay nhỏ hơn.

Trong quá trình tiệt khuẩn phải tiến hành theo dõi nhiệt độ bên trong tủ sấy. Nhiệt độ thường được đo bằng các đầu dò nhiệt đặt ở phần nguội nhất của tủ sấy. Phải ghi chép và lưu trữ thông số nhiệt độ của mỗi chu trình tiệt khuẩn.

Khi đánh giá hiệu quả của quá trình tiệt khuẩn bằng phương pháp sinh học, dùng chỉ thị sinh học thích hợp theo Phụ lục 16.2 Chỉ thị sinh học dùng cho tiệt khuẩn.

Tiệt khuẩn và khử chất gây sốt các dụng cụ thủy tinh thường tiến hành ở nhiệt độ cao hơn 220 °C. Trong trường hợp này, có thể thay chỉ thị sinh học bằng nội độc tố vi khuẩn bền nhiệt. Để kiểm tra quá trình tiệt khuẩn, cấy một hay nhiều vật liệu cần tiệt khuẩn với ít nhất 1000 đơn vị nội độc tố vi khuẩn. Lượng nội độc tố còn lại sau khi sấy tiệt khuẩn phải không được nhiều hơn 1/1000 so với lượng nội độc tố ban đầu (xem Phụ lục 13.2 Phép thử nội độc tố vi khuẩn).

Tiệt khuẩn bằng bức xạ ion hóa

Phương pháp này được tiến hành bằng cách cho sản phẩm trong bao bì cuối tiếp xúc với bức xạ ion hóa. Hai nguồn bức xạ ion hóa thường dùng là: tia γ phát ra từ nguồn phóng xạ thích hợp (ví dụ đồng vị phóng xạ Cobalt 60), và chùm electron năng lượng cao được gia tốc bởi máy gia tốc electron.

Đối với phương pháp tiệt khuẩn bằng bức xạ ion hóa, liều hấp thụ chuẩn là 25 kGy. Có thể tiến hành tiệt khuẩn với liều hấp thụ khác với liều hấp thụ chuẩn nếu chứng minh được hiệu quả của chế độ tiệt khuẩn đã chọn. Phải không chế số lượng vi sinh vật trong sản phẩm trước khi tiệt khuẩn bằng cách áp dụng quy trình sản xuất và các biện pháp phòng ngừa thích hợp để đạt được mức bảo đảm vô khuẩn SAL là 10^{-6} hay nhỏ hơn.

Trong quá trình tiệt khuẩn phải định kỳ đo bức xạ hấp thụ bởi sản phẩm cần tiệt khuẩn bằng thiết bị đo liều thích hợp. Thiết bị đo liều phải được hiệu chỉnh với nguồn bức xạ chuẩn ít nhất mỗi năm một lần.

Khi đánh giá hiệu quả của quá trình tiệt khuẩn bằng phương pháp sinh học, dùng chỉ thị sinh học thích hợp theo Phụ lục 16.2 Chỉ thị sinh học dùng cho tiệt khuẩn.

Tiệt khuẩn bằng chất khí

Chất khí thường dùng trong phương pháp này là ethylen oxyd. Đây là loại khí dễ cháy, có khả năng gây đột biến và có thể để lại vết chất độc trong vật liệu đem tiệt khuẩn, do đó chỉ nên chọn phương pháp này khi không thể chọn phương pháp nào khác. Phải có biện pháp thích hợp để bảo đảm sự thẩm thấu của khí và hơi ẩm vào bên trong vật liệu cần tiệt khuẩn cũng như làm giảm lượng ethylen oxyd hoặc sản phẩm phân hủy của nó trong sản phẩm đã tiệt khuẩn xuống dưới mức có thể gây nguy hiểm khi sử dụng sản phẩm.

Khi có thể, nên theo dõi và ghi chép nồng độ khí, độ ẩm tương đối, nhiệt độ và thời gian tiệt khuẩn của mỗi lô tiệt khuẩn.

Đánh giá hiệu quả của mỗi lô tiệt khuẩn bằng chỉ thị sinh học thích hợp (xem Phụ lục 16.2 Chỉ thị sinh học dùng cho tiệt khuẩn).

Tiệt khuẩn bằng phương pháp lọc

Phương pháp lọc thường được dùng để tiệt khuẩn các dung dịch kém bền nhiệt, không thể tiệt khuẩn trong bao bì cuối. Nguyên tắc của phương pháp là dẫn dung dịch cần tiệt khuẩn qua vật liệu lọc có khả năng giữ vi khuẩn. Vật liệu lọc thường dùng là các màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,22 μm hay nhỏ hơn, có khả năng giữ lại 100 % vi khuẩn *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091, CIP 103020) trong điều kiện thí nghiệm thích hợp. Kiểm tra khả năng giữ khuẩn của màng lọc bằng cách lọc qua màng lọc một hỗn dịch vi khuẩn *Pseudomonas diminuta* trong môi trường nuôi cấy tryptone soya broth, hay môi trường dinh dưỡng tương đương, có nồng độ thích hợp sao cho mỗi cm^2 bề mặt màng lọc có ít nhất 10^7 CFU và tốc độ lọc lớn hơn 30 Psi. Ủ dịch lọc ở 32 °C trong điều kiện hiếu khí, phải không được có vi khuẩn phát triển.

Quy trình sản xuất và môi trường sản xuất các sản phẩm tiệt khuẩn bằng phương pháp lọc phải được thiết kế thích hợp để giảm thiểu tối đa sự nhiễm khuẩn. Phải thường xuyên kiểm tra chất lượng môi trường sản xuất bằng một chương trình giám sát chất lượng môi trường đã được thẩm định. Các máy móc, thiết bị, vật chứa và nắp đậy phải được tiệt khuẩn trước khi sử dụng bằng phương pháp thích hợp. Vị trí lọc tiệt khuẩn nên bố trí càng gần nơi đóng ống càng tốt và thời điểm tiệt khuẩn nên bố trí càng gần thời điểm đóng ống càng tốt. Tất cả các thao tác sau khi lọc tiệt khuẩn phải thực hiện trong điều kiện vô khuẩn.

Cần có biện pháp thích hợp để tránh sự hấp thụ hoạt chất trên màng lọc, cũng như để tránh sự thôi tạp chất từ màng lọc vào dịch lọc.

Trước khi lọc phải kiểm tra để đảm bảo màng lọc không bị rách trong quá trình lắp ráp và tiệt khuẩn hệ thống lọc, sau khi lọc xong cũng phải kiểm tra tính toàn vẹn của màng lọc bằng phương pháp thích hợp, ví dụ phương pháp đo

áp suất điểm sủi bọt (bubble-point test) hay phương pháp đo chênh áp suất trước và sau khi qua màng lọc (pressure hold test).

Vì hiệu quả của quá trình lọc tiệt khuẩn phụ thuộc vào số lượng vi sinh vật trong sản phẩm trước khi lọc nên nếu không thể làm giảm số lượng vi sinh vật bằng phương pháp khác, nên lọc trước dung dịch cần tiệt khuẩn qua tiền lọc có khả năng giữ vi khuẩn.

Sản xuất vô khuẩn

Trong quá trình sản xuất vô khuẩn, sản phẩm chờ đóng gói, vật chứa rỗng và nắp đậy được tiệt khuẩn riêng rẽ sau đó kết hợp với nhau trong điều kiện vô khuẩn để thu được sản phẩm cuối. Bởi vì sản phẩm đã đóng gói không được tiệt khuẩn bổ sung bằng bất kỳ phương pháp nào khác nên quá trình sản xuất phải tiến hành trong điều kiện môi trường có chất lượng rất cao. Trước khi phối hợp, mỗi thành phần của sản phẩm cuối phải được tiệt khuẩn riêng bằng phương pháp thích hợp, ví dụ bằng nhiệt khô với vật chứa bằng thủy tinh, bằng nhiệt ẩm với nắp đậy bằng nhựa và bằng phương pháp lọc đối với các dung dịch. Để duy trì tính vô khuẩn của mỗi thành phần trong quá trình sản xuất phải chú ý đến các yếu tố sau:

Môi trường sản xuất;

Con người;

Các bề mặt tiếp xúc trực tiếp với sản phẩm hở;

Quy trình tiệt khuẩn các vật liệu bao gói và quy trình vận chuyển chúng vào khu vực đóng gói;

Thời gian lưu trữ tối đa của sản phẩm chờ đóng gói trước khi đóng vào bao bì cuối.

Để đảm bảo tính vô khuẩn của thành phẩm, cả quy trình tiệt khuẩn và quy trình đóng gói đều phải được thẩm định bằng phương pháp thích hợp trước khi áp dụng trong thực tế. Thẩm định quy trình đóng gói phải bao gồm thử nghiệm dùng môi trường dinh dưỡng nuôi cấy vi sinh vật thay cho sản phẩm thật (media fill test). Phải lấy mẫu để kiểm tra độ vô khuẩn tất cả các lô của bất kỳ sản phẩm nào được tiệt khuẩn bằng phương pháp lọc và/hoặc sản xuất vô khuẩn trước khi xuất xưởng (Xem Phụ lục 13.7 Thử vô khuẩn để biết thêm chi tiết).

16.2 CHỈ THỊ SINH HỌC DÙNG CHO TIỆT KHUẨN

Chỉ thị sinh học dùng cho tiệt khuẩn là những chế phẩm sinh học đã tiêu chuẩn hóa, được sản xuất từ các vi sinh vật chọn lọc, dùng để đánh giá hiệu quả của các quy trình tiệt khuẩn. Chỉ thị sinh học thường được sản xuất bằng cách cấy một lượng bào tử vi sinh vật chỉ thị lên vật mang tro, ví dụ bằng giấy lọc, bản mỏng thủy tinh hay ống plastic, sau đó đóng gói vật mang đã cấy khuẩn vào bao bì thích hợp nhằm bảo vệ sản phẩm tránh bị biến chất và tạp nhiễm. Vật liệu dùng làm bao gói phải bền, không bị phân hủy trong quá trình tiệt khuẩn, nhưng phải cho tác nhân tiệt khuẩn

thấm vào bên trong để tiếp xúc với vi khuẩn. Hỗn dịch bào tử vi khuẩn đóng trong ống thủy tinh kín cũng có thể được dùng làm chỉ thị sinh học.

Đối với các chế phẩm lỏng, có thể cấy trực tiếp bào tử vi khuẩn chỉ thị vào một số đơn vị đóng gói đại diện của sản phẩm cần tiệt khuẩn hay vào chất lỏng có thành phần gần giống sản phẩm, nếu không thể cấy trực tiếp vào sản phẩm thật. Trong trường hợp này, phải có biện pháp kiểm tra thích hợp để đảm bảo bản thân chế phẩm hay sản phẩm giả đều không có khả năng ức chế vi khuẩn chỉ thị.

Các thông tin bắt buộc phải cung cấp kèm theo mỗi chỉ thị sinh học bao gồm: tên loài vi khuẩn dùng làm vi sinh vật đối chiếu, số định danh loài của bảo tàng giống gốc, số lượng bào tử sống trên mỗi vật mang, hạn dùng và trị số D. Trị số D là tham số tiệt khuẩn (khoảng thời gian hoặc liều hấp thụ) cần để làm giảm lượng bào tử sống xuống còn 10 % so với lượng ban đầu. Chỉ thị sinh học có thể gồm hai hay nhiều loài vi khuẩn trên một vật mang, nhưng không được lẫn tạp khuẩn. Ngoài ra, trên nhãn chỉ thị sinh học phải cung cấp thông tin về môi trường nuôi cấy và điều kiện ủ.

Để kiểm tra một quy trình tiệt khuẩn, đặt chỉ thị sinh học tại vị trí được giả định, hoặc đã được xác định trước bằng phương pháp vật lý thích hợp khi có thể, là nơi mà tác nhân tiệt khuẩn khó luân chuyển đến nhất trong buồng tiệt khuẩn. Sau khi cho tiếp xúc với tác nhân tiệt khuẩn, chuyển vật mang vào trong môi trường dinh dưỡng thích hợp trong điều kiện vô khuẩn và đem ủ. Đối với chỉ thị sinh học đóng trong ống thủy tinh kín có chứa sẵn môi trường dinh dưỡng thì đem ủ ngay.

Các vi khuẩn chỉ thị được chọn lựa theo nguyên tắc:

a) Sức đề kháng của vi khuẩn chỉ thị đối với phương pháp tiệt khuẩn đã cho phải lớn hơn sức đề kháng của tất cả các vi khuẩn gây bệnh và các vi khuẩn có khả năng nhiễm vào sản phẩm cần tiệt khuẩn;

b) Không gây bệnh;

c) Dễ nuôi cấy.

Sau khi ủ, nếu quan sát thấy vi khuẩn chỉ thị phát triển, chứng tỏ quy trình tiệt khuẩn đã sử dụng không đạt yêu cầu.

Tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm

Chỉ thị sinh học được dùng để thẩm định quy trình tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm là bào tử của vi khuẩn *Bacillus stearothermophilus* (ví dụ: ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157, hay CIP 52.81). Số lượng bào tử sống trên mỗi vật mang phải từ 5×10^5 trở lên. Trị số D ở $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (ký hiệu D_{121}) phải lớn hơn 1,5 min. Phải kiểm tra để bảo đảm ở chế độ tiệt khuẩn ở $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 6 min chỉ thị sinh học vẫn còn vi khuẩn sống, nhưng bị diệt hoàn toàn ở chế độ tiệt khuẩn $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 min.

Tiệt khuẩn bằng nhiệt khô

Chỉ thị sinh học được dùng để thẩm định quy trình tiệt khuẩn bằng nhiệt khô là bào tử của vi khuẩn *Bacillus*