

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*

subtilis (ví dụ: var. *niger* ATCC 9372, NCIMB 8058, CIP 77.18). Số lượng bào tử sống trên mỗi vật mang không được ít hơn 1×10^5 và trị số D ở 160 °C phải từ 1 min đến 3 min. Trong trường hợp tiệt khuẩn ở nhiệt độ cao hơn 220 °C, ví dụ tiệt khuẩn và khử chất gây sốt các dụng cụ thủy tinh, có thể dùng nội độc tố vi khuẩn bền nhiệt thay cho bào tử vi khuẩn (xem Phụ lục 16.1 Các phương pháp tiệt khuẩn để biết thêm chi tiết).

Tiệt khuẩn bằng bức xạ ion hóa

Chỉ thị sinh học có thể được sử dụng để kiểm tra mỗi lô tiệt khuẩn trong điều kiện sản xuất bình thường như một biện pháp bổ sung để thẩm định phương pháp tiệt khuẩn bằng bức xạ ion hóa. Thường dùng bào tử của vi khuẩn *Bacillus pumilus* (ví dụ: ATCC 27.142, NCTC 10327, NCIMB 10692, CIP 77.25). Số lượng bào tử sống trên mỗi vật mang không được ít hơn 1×10^7 . Trị số D không được nhỏ hơn 1,9 kGy. Phải kiểm tra để bảo đảm không còn vi khuẩn sống sau khi cho chỉ thị sinh học tiếp xúc với bức xạ ion hóa ở liều hấp thu 25 kGy (liều hấp thu tối thiểu).

Tiệt khuẩn bằng chất khí

Chỉ thị sinh học được sử dụng trong tất cả các quy trình tiệt khuẩn bằng chất khí, cả trong thẩm định hiệu quả tiệt khuẩn của quy trình lẫn trong điều kiện vận hành bình thường. Với tác nhân tiệt khuẩn là ethylen oxyd, thường dùng bào tử của vi khuẩn *Bacillus subtilis* (ví dụ: var. *niger* ATCC 9372, NCIMB 8058, CIP 77.18). Số lượng bào tử sống trên mỗi vật mang không được ít hơn 5×10^5 . Trị số D phải lớn hơn 2,5 min khi tiến hành tiệt khuẩn ở 54 °C, độ ẩm tương đối là 60 % và nồng độ ethylen oxyd trong khí mang là 600 mg/l. Phải kiểm tra để bảo đảm không còn vi khuẩn sống sau khi xử lý chỉ thị sinh học trong 60 min ở điều kiện nêu trên, nhưng phải còn vi khuẩn sống khi xử lý trong 15 min ở 30 °C (30 °C, độ ẩm tương đối là 60 %, 600 mg/l). Để kiểm tra khả năng sức đề kháng của bào tử với tác nhân tiệt khuẩn khi thiếu độ ẩm, cho chỉ thị sinh học tiếp xúc với ethylen oxyd nồng độ 600 mg/l ở nhiệt độ 54 °C trong 60 min không có độ ẩm, phải còn vi khuẩn sống.