

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 1023 : 1991**

**THUỐC VÀ DỤNG CỤ Y TẾ –  
PHƯƠNG PHÁP THỬ VÔ KHUẨN**

*Medicine and apparatus – Test for sterility*

**HÀ NỘI - 2008**



## Lời nói đầu

TCVN 1023 : 1991 thay thế TCVN 1023 : 1970.

TCVN 1023 : 1991 do Hội đồng dược điển – Bộ Y tế biên soạn, Vụ Dược – Trang thiết bị – Bộ Y tế đề nghị, Bộ Y tế ban hành.

Tiêu chuẩn này được chuyển đổi năm 2008 từ Tiêu chuẩn Việt Nam cùng số hiệu thành Tiêu chuẩn Quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.



## Thuốc và dụng cụ y tế – Phương pháp thử vô khuẩn

*Medicine and apparatus – Test for sterility*

Tiêu chuẩn này áp dụng để thử vô khuẩn nhằm phát hiện sự có mặt của vi khuẩn, nấm mốc và nấm men trong các nguyên liệu, chế phẩm và dụng cụ mà theo tiêu chuẩn riêng cần phải vô khuẩn.

### I Yêu cầu chung

Thử vô khuẩn phải được tiến hành trong lồng kính hoặc trong buồng thổi không khí vô khuẩn để tránh ô nhiễm thêm. Trong quá trình thử, mẫu không được tiếp xúc với các tác nhân có ảnh hưởng đến vi khuẩn, nấm mốc, nấm men có trong mẫu kiểm tra (tia tử ngoại, chất sát khuẩn, nhiệt độ...). Các dụng cụ, dung môi, môi trường phải được tiệt khuẩn trước khi dùng.

### II Lấy mẫu thử

Tiến hành lấy mẫu thử theo TCVN 974 : 1970.

### III Phương pháp thử

**1 Nguyên tắc:** Nếu vi khuẩn, nấm mốc, nấm men được cấy vào môi trường có chất dinh dưỡng và nước, được giữ ở điều kiện nhiệt độ thích hợp thì chúng sẽ phát triển. Sự có mặt của chúng làm cho môi trường biến đổi trạng thái từ trong sang đục, hoặc có vầng trên bề mặt hoặc có cặn lắng ở đáy môi trường.

Có 2 phương pháp thử. Phương pháp màng lọc (phương pháp trọng tài) và phương pháp cấy trực tiếp. Khi tiến hành thử phải làm sạch bề ngoài của ống (chai, lọ, bình ...) đựng chế phẩm bằng một chất sát khuẩn thích hợp. Sau đó lấy một lượng chế phẩm đủ dùng theo quy định, cấy trực tiếp vào các môi trường (nếu theo phương pháp cấy trực tiếp) hoặc lọc qua các màng lọc (nếu theo phương pháp màng lọc) sau khi đã được hoà loãng thích hợp, rồi cắt màng lọc thành miếng nhỏ đem nhúng vào môi trường. Ủ môi trường trong thời gian quy định.

### 2 Chuẩn bị môi trường và dung môi

#### 2.1 Môi trường để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí

- Môi trường thioglycolat có thạch (dùng cho thử nghiệm những chế phẩm lỏng và trong);

## TCVN 1023 : 1991

- Môi trường thioglycolat không có thạch (dùng cho thử nghiệm những chế phẩm đặc hoặc sền sệt dạng cao).

### 2.2 Môi trường Soybean-casein để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và nấm mốc.

Cả 2 loại môi trường trên phải được pha chế và được kiểm tra chất lượng theo đúng quy định tại Phụ lục.

**2.3** Dung môi dùng để hoà loãng khi những chế phẩm thử không ở dạng dung dịch lỏng. Chỉ được dùng làm dung môi hoà loãng bất kỳ một chất lỏng nào không có tính kháng khuẩn và không tác động đến độ xốp của màng lọc. Thường dùng các dung môi sau đây:

- Dung môi A: hoà tan 1 g pepton vào nước cho vừa đủ 1 lít. Lọc (hoặc ly tâm) cho trong. Điều chỉnh pH =  $7,1 \pm 0,1$ . Đựng vào nhiều bình, mỗi bình khoảng 100 ml. Hấp ở 121 °C trong 18 phút đến 20 phút;
- Dung môi B: như dung môi A nhưng cho thêm 1 ml polysorbat 80 cho 1 lít dung môi, dùng để hoà loãng những chế phẩm thử có leucithin.

**2.4** Chất nhũ hoá isopropyl myristat dùng cho những chế phẩm dạng dầu hay dung dịch dầu.

## 3 Tiến hành thử theo phương pháp màng lọc

**3.1** Dụng cụ phải được tiệt khuẩn trước khi dùng gồm:

- 1 bình lọc có: phễu đựng dung dịch chế phẩm có nắp trong đặt giá đỡ màng lọc và nối với 1 bình đựng nước lọc nối với 1 bình hút chân không;
- Màng lọc;
- Các ống nghiệm hoặc các bình đựng môi trường;
- Kéo cắt màng lọc.

**3.2** Lượng mẫu thử cần dùng để thử nghiệm: tùy theo từng loại mẫu thử, lấy số lượng thích hợp theo quy định ở Bảng 1.

**Bảng 1**

STT	Loại mẫu thử	Lượng tối thiểu chế phẩm cần lấy
1	Dung dịch thuốc tiêm trong 1 đơn vị đóng gói dưới 1 ml Từ 1 ml đến 4 ml Từ 4 ml đến 20 ml Từ 20 ml đến 100 ml Lớn hơn 100 ml	Toàn bộ 1 đơn vị đóng gói  1/2 đơn vị đóng gói 2 ml 2 ml đến 10 ml 1/2 đơn vị đóng gói
2	Dung dịch thuốc đau mắt và các chế phẩm lỏng không tiêm	5 ml đến 10 ml của dung dịch đã hoà loãng đến 10 lần (thể tích/thể tích) bằng dung môi thích hợp nêu trên ( 2.3)
3	Những chế phẩm là chất rắn, dịch treo, nhũ, dịch, kem hoặc thuốc mỡ	0,5 g đến 1 g của dung dịch đã hoà loãng với tỉ lệ 1 % (khối lượng/thể tích) bằng dung môi thích hợp nêu trên ( 2.3).

**3.3** Kỹ thuật thử: dùng một dung môi A ( 2.3) vừa đủ để thấm ướt màng lọc. Rót lên màng lọc một lượng chế phẩm cần thử như quy định ở Bảng 1. Dùng máy hút chân không để rút ngắn thời gian lọc. Lấy màng lọc ra khỏi giá đỡ trong phễu lọc. Lấy kéo cắt màng lọc thành 2 phần, nhúng chìm vào 2 loại môi trường. Ủ môi trường phát hiện vi khuẩn ở 20 °C đến 35 °C, ủ môi trường phát hiện nấm mốc ở 20 °C đến 25 °C. Thời gian ủ ít nhất là 7 ngày.

Nếu mẫu thử là dụng cụ (bộ dây chuyền, túi lọc máu ...) dùng 100 ml dung môi B cho chảy qua thiết bị. Hứng dung môi ấy, rót lên màng lọc đã được thấm ướt bằng dung môi A rồi làm tiếp theo kỹ thuật ghi ở trên.

#### 4 Tiến hành thử theo phương pháp nuôi cấy trực tiếp

**4.1** Dụng cụ gồm bơm tiêm, pipét, các ống nghiệm hoặc các bình đựng môi trường phải được tiệt khuẩn trước khi dùng.

**4.2** Lượng mẫu thử cần dùng để thử nghiệm

Tùy theo từng loại mẫu thử, lấy số lượng thích hợp theo quy định ở Bảng 2.

**Bảng 2**

STT	Loại mẫu thử	Lượng tối thiểu chế phẩm cần lấy	Thể tích tối thiểu môi trường nuôi cấy	Ghi chú
1	Chế phẩm là chất lỏng trong 1 đơn vị đóng gói dưới 1 ml	Toàn bộ một đơn vị đóng gói	15 ml	Nếu chất lỏng là dầu hay dung dịch dầu phait thêm vào môi trường 1 % polyethoxyetanol  Hoặc 1 % polysorbat để nhũ hoá
	Từ 1 ml đến 5 ml	1/2 đơn vị đóng gói	15 ml	
	Từ 5 ml đến 20 ml	2 ml	20 ml	
	Từ 20 ml đến 50 ml	5 ml	40 ml	
	Từ 50 ml đến 100 ml	10 ml	80 ml	
2	Chế phẩm là chất rắn thuốc mỡ hay kem, trong một đơn vị đóng gói dưới 50 mg	Toàn bộ 1 đơn vị đóng gói		Nếu mẫu thử là thuốc mỡ hay kem thì cần hoà loãng với dung môi B theo tỷ lệ 1/10 (khối lượng/thể tích) trước khi cấy vào môi trường.
	Từ 50 mg đến 200 mg	1/2 khối lượng		
	Lớn hơn 200 mg	100 mg		

### **4.3 Kỹ thuật thử**

Dùng bơm tiêm hoặc pipét lấy chế phẩm cấy vào 2 loại môi trường theo số lượng quy định ở Bảng 2. Nếu chế phẩm là chất rắn thì cấy trực tiếp vào môi trường và chú ý lắc để chế phẩm phân tán đều trong môi trường. Ủ môi trường phát hiện vi khuẩn từ 30 °C đến 35 °C, ủ môi trường để phát hiện nấm mốc từ 20 °C đến 25 °C. Thời gian ủ ít nhất là 7 ngày. Nếu chế phẩm làm đục môi trường, để có thể dễ dàng quan sát sự mọc của vi khuẩn, sau khi ủ môi trường 3 ngày đến 7 ngày, nên chuyển một phần nhỏ môi trường này sang một loạt môi trường mới cùng loại. Tiếp tục ủ các ống môi trường đã cấy lại ít nhất 7 ngày.

Khi mẫu thử là băng, gạch, chỉ khâu phẫu thuật ... nếu kích thước và hình dạng cho phép, nhúng toàn bộ chế phẩm vào 100 ml môi trường tương ứng. Khi chế phẩm là dụng cụ (dây chuyền, ống lọc máu ...) dùng dung môi A hoặc B cho chảy qua để thu được ít nhất 15 ml dịch rửa ấy, mang cấy vào ít nhất 100 ml mỗi loại môi trường nuôi cấy. Ủ môi trường như đã ghi trên.

## **5 Theo dõi và đánh giá kết quả**

Trong suốt thời gian ủ hàng ngày phải quan sát các môi trường đã cấy màng lọc hoặc chế phẩm.

- Nếu không thấy có vi khuẩn hoặc nấm mốc mọc trong suốt thời gian quy định, chế phẩm được coi là **ĐẠT TIÊU CHUẨN VÔ KHUẨN**;
- Nếu thấy có từ 1 trở lên trong số các môi trường nuôi cấy, có vi khuẩn hoặc nấm mốc mọc, cần phải:
  - + Rà soát lại qui trình thử;
  - + Thử lại các môi trường có vi khuẩn, nấm mốc mọc.

Tiến hành phân lập so sánh với vi khuẩn hoặc nấm trên môi trường cấy lại.

Nếu trên tiêu bản phân lập, vi khuẩn (hay nấm mốc) giống với tiêu bản làm lần đầu, chế phẩm được coi là **KHÔNG ĐẠT TIÊU CHUẨN VÔ KHUẨN**.

Nếu trên tiêu bản phân lập, vi khuẩn (hay nấm mốc) khác biệt so với lần thí nghiệm đầu, cần thực hiện phép thử lặp lại với số lượng mẫu gấp đôi. Nếu không phát hiện thấy vi khuẩn (hoặc nấm mốc), chế phẩm được coi là **ĐẠT TIÊU CHUẨN VÔ KHUẨN**. Nếu vẫn thấy vi khuẩn (hoặc nấm mốc) mọc ở lần lặp lại này, chế phẩm được coi là **KHÔNG ĐẠT TIÊU CHUẨN VÔ KHUẨN**.

## Phụ lục

## Cách pha chế và kiểm tra chất lượng của môi trường

## 1 Môi trường để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí

## 1.1 Môi trường thioglycolat

Dùng cho thử nghiệm những chế phẩm lỏng và trong

L.Cystin	0,5 g
Natriclorua	2,5 g
Dextrose ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )	5,5 g
Thạch bột (có độ ẩm nhỏ hơn 15 %)	0,75 g
Cao men bia (có khả năng tan trong nước)	5,0 g
Natrithioglycolat hoặc	0,5 g
Axit thioglycolic	0,3 g
Resazurin (dung dịch 1 % mới pha)	10 ml
Nước cất	1000 ml
pH sau khi tiệt trùng	$7,1 \pm 0,2$

Trộn tất cả các thành phần theo thứ tự đã ghi ở trên trừ thioglycolat và resazurin trong cối nghiền, thêm vào 1 lít nước nóng, trộn kỹ, chuyển sang dụng cụ thích hợp, thêm số nước còn lại, đun hỗn hợp ở nồi cách thủy sôi đến khi tạo thành dung dịch trong. Thêm natrithioglycolat, dùng dung dịch natri hydroxyt 1 N điều chỉnh sao cho môi trường sau khi tiệt trùng có pH =  $7,1 \pm 0,2$ . Đun nóng lại dung dịch, tránh đun sôi, lọc (nếu cần) qua giấy lọc đã thấm ướt, rồi thêm dung dịch resazurin trộn đều, đóng vào các ống nghiệm (hoặc bình) thích hợp đem hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 18 phút đến 20 phút. Lấy ra làm lạnh nhanh tới 25 °C tiếp tục bảo quản ở nhiệt độ 20 °C đến 30 °C tránh ánh sáng. Nếu 1/3 thể tích phía trên của ống (hoặc bình) môi trường có màu hồng, môi trường sẽ không thích hợp để thử nghiệm. Có thể phục hồi lại môi trường bằng cách đun cách thủy cho mất màu rồi mang làm lạnh đột ngột. Nhưng chỉ sử dụng môi trường đã phục hồi này một lần, không dùng môi trường phục hồi lần 2. Các môi trường thioglycolat lỏng chỉ dùng trong khoảng 3 tuần.

## 1.2 Môi trường thioglycolat không có thạch

Dùng cho thử nghiệm những chế phẩm đục hoặc đặc sền sệt dạng cao.

L.Cystin	0,5 g
----------	-------

## TCVN 1023 : 1991

Natriclorua	2,5 g
Dextrose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .H <sub>2</sub> O)	5,5 g
Cao men bia (có thể tan trong nước)	5,5 g
Casein pancreatic	15,0 g
Natrithioglycolat hoặc	0,5 g
Axit thioglycolic	0,3 g
Nước cất	1000 ml
pH sau khi tiệt trùng	7,1 ± 0,2

Cho tất cả các thành phần trên vào một dụng cụ thích hợp, đun cách thủy, khuấy đều đến khi thành dung dịch, dùng dung dịch natri hydroxyt 1 N (TT) điều chỉnh để cho pH sau khi tiệt trùng đạt 7,1 ± 0,2. Có thể lọc (nếu cần). Phân chia vào các ống nghiệm (hoặc bình) thích hợp. Hấp tiệt trùng 121 °C trong khoảng 18 phút đến 20 phút. Sau khi tiệt trùng mang làm lạnh ngay tới 25 °C môi trường không được đun nóng trở lại.

## 2 Môi trường phát hiện vi khuẩn hiếu khí và nấm

Môi trường Soybean – casein

Casein pancreatic	17,0 g
Bột papaic soybean	3,0 g
Natriclorua	3,0 g
Dinatri hydrophosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5 g
Dextrose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .H <sub>2</sub> O)	2,5 g
Nước cất	1000 ml
pH sau khi tiệt trùng	7,1 ± 0,2

Hoà tất cả các chất rắn trong nước, đun nóng nhẹ để cho tan hoàn toàn. Để nguội ở nhiệt độ phòng. Dùng NaOH 0,1 N (TT) để điều chỉnh (nếu cần) để cho pH sau khi tiệt trùng ở trong khoảng 7,1 đến 7,5. Lọc (nếu cần) để cho môi trường trong. Phân chia vào những dụng cụ thích hợp, hấp tiệt trùng 121 °C trong khoảng 20 phút.

## 3 Kiểm tra chất lượng môi trường

### 3.1 Độ vô trùng

Lấy ngẫu nhiên một vài ống (hoặc bình) môi trường mới sản xuất, đem ủ ở nhiệt độ 30 °C đến 35 °C trong 4 ngày đối với những loại môi trường dùng nuôi cấy vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí. Ủ ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C đối với những loại môi trường dùng nuôi cấy nấm mốc – ít nhất 7 ngày. Các loại môi trường phải không được có vi khuẩn nấm mốc mọc.

### 3.2 Khả năng dinh dưỡng

Cấy vào mỗi loại môi trường dùng để thí nghiệm khoảng 100 tế bào sống của những loại vi khuẩn sau:

- Loại vi khuẩn hiếu khí dùng staphylococcus aureus (ATCC 12228);
- Loại vi khuẩn hiếu khí có nha bào dùng Bacillus Subtilis (ATCC 6633);
- Loại vi khuẩn kỵ khí dùng Clostridium sporogenes (ATCC 11437);
- Loại nấm dùng candida albicans (ATCC 10231).

Mỗi loại chủng chỉ thí đã được cấy vào loại môi trường tương ứng, mang ủ ở nhiệt độ thích hợp cho từng loại ít nhất 7 ngày. Trên mỗi loại môi trường sau thời gian ủ đều phải thấy vi khuẩn mọc tốt.

### 3.3 Kiểm tra tác dụng ức chế ở chế phẩm mang thử

Một số chế phẩm do yêu cầu của sản xuất người ta đã cho thêm những chất bảo quản, hoặc ở những chế phẩm mới, ảnh hưởng của chế phẩm đến sự phát triển của vi khuẩn, nấm chưa xác định nên cần phải kiểm tra tác dụng ức chế của chúng đối với vi khuẩn, nấm mốc.

#### 3.3.1 Đối với vi khuẩn kỵ khí

Dùng 4 ống môi trường phát hiện vi khuẩn kỵ khí. Hai ống dùng làm chứng chỉ cấy vào mỗi ống này 100 nha bào vi khuẩn kỵ khí clostridium sporogenes (khoảng 0,1 ml nhũ dịch nha bào đã pha loãng thích hợp). Hai ống còn lại cấy vào mỗi ống một lượng bằng nhau chế phẩm cần kiểm tra, rồi cũng cấy vào mỗi ống 100 nha bào clostridium sporogenes. Đem ủ tất cả các ống ở 30 °C đến 35 °C ít nhất 7 ngày.

#### 3.3.2 Đối với vi khuẩn hiếu khí

Dùng 4 ống môi trường phát hiện vi khuẩn hiếu khí. Hai ống dùng làm chứng chỉ cấy vào mỗi ống 100 tế bào Staphylococcus aureus (khoảng 0,1 ml nhũ dịch vi khuẩn đã pha loãng thích hợp). Hai ống còn lại cấy vào mỗi ống một lượng bằng nhau chế phẩm và cũng cấy vào mỗi ống 100 tế bào Staphylococcus aureus. Đem ủ tất cả các ống ở 30 °C đến 35 °C ít nhất 7 ngày.

#### 3.3.3 Đối với nấm mốc

Dùng 4 ống môi trường phát hiện nấm mốc, hai ống dùng làm chứng chỉ cấy vào mỗi ống 100 tế bào nấm Candida albicans. Hai ống kiểm tra cấy 100 tế bào Candida albicans và một lượng chế phẩm bằng nhau. Ủ tất cả các ống ở 20 °C đến 25 °C trong ít nhất 7 ngày.

#### 3.3.4 Đánh giá kết quả

Nếu trong thời gian ủ, vi khuẩn, nấm mốc mọc tốt (dễ dàng và phong phú), đối với từng loại, mọc giống nhau giữa ống kiểm tra và ống chứng. Chế phẩm không có tác dụng ức chế. Nếu trên các ống môi trường có chế phẩm mà vi khuẩn, nấm mốc yếu, chậm phát triển hoặc không phát triển so với ống chứng vẫn mọc tốt. Chế phẩm có tác dụng ức chế. Ta phải loại bỏ tác dụng này.

Tác dụng ức chế của chế phẩm có thể loại bỏ được một cách có kết quả bằng cách cấy truyền nhắc lại sang một loại môi trường mới.