

VYR-33 Sterilizace ethylenoxidem, radiační sterilizace a odhad populace mikroorganismů

Tento pokyn doplňuje pokyn VYR-12 s platností od 1.1.2005.

Cílem tohoto pokynu je seznámit výrobce léčiv s interpretací požadavků SVP na sterilizaci ethylenoxidem a radiační sterilizaci. Současně uvádí principy odhadování populace mikroorganismů na předmětech, které jsou určeny ke sterilizaci. Tyto požadavky jsou definovány v Českém lékopisu 2002 a jeho Doplncích v odstavcích 5.1.1. Metody přípravy sterilních výrobků, 5.1.2. Biologické indikátory pro sterilizaci a v Pokynech pro správnou výrobní praxi VYR-32, včetně Doplnku 1 Výroba sterilních léčivých přípravků. Dokument rozšiřuje pokyn VYR-12 a je určen především výrobcům léčivých přípravků.

1. Sterilizace ethylenoxidem

1.1. Všeobecné zásady

1.1.1. Vzhledem k velké reaktivitě ethylenoxidu je nutné pro bezpečný provoz ethylenoxidového sterilizátoru dodržovat všechny aspekty instalace a provozu tohoto zařízení.

1.1.2. Účinnost sterilizace může být ovlivněna stavem předmětu (teplota, vlhkost) krátce před vložením do sterilizátoru i obalem použitým pro zabalení předmětu pro sterilizaci.

1.1.3. Bezpečnost vysterilizovaných předmětů může záviset na zbytkovém ethylenoxidu nebo jeho reakčních produktů (při jejich nedostatečném odstranění po ukončení sterilizace).

1.1.4. Jsou používány dva typy ethylenoxidových sterilizátorů:

typ A: jsou uživatelem programovatelné,

typ B: menších rozměrů, vybaveny předem nastavenými pracovními cykly, které nemůže uživatel měnit.

1.1.5. U předmětů, které mohou být sterilizovány parou, má být přednostně využit tento způsob jejich sterilizace.

Tento pokyn znovu neuvádí požadavky na sterilizaci ethylenoxidem uvedené v bodech 76 – 81 Doplnku 1 (VYR-32) a v článku 5.1.1. ČL 2002.

1.2. Některé technické požadavky na sterilizátory a zkušební postupy

1.2.1. U sterilizátorů menších než 8000 l musí být v celých číslech určen počet sterilizačních modulů (kvádr o definovaných rozměrech), které mohou být umístěny do využitelného prostoru sterilizační komory. U sterilizátorů větších než 8000 l se uvádí počet palet s definovanými rozměry, které se do nich mohou umístit.

1.2.2. Pro zabránění nepříznivého vlivu blízkosti sterilizační náplně k vnitřním povrchům komory nesmí být hranice využitelného prostoru komory vzdáleny méně než 15 mm od vyhřívaných povrchů a méně než 30 mm od nevyhřívaných povrchů.

1.2.3. Povrchy (včetně svárů), které přicházejí do kontaktu s ethylenoxidem musí být z materiálů, které za daných pracovních podmínek nejsou touto látkou korodovány, nereagují s ní (nebo s nečistotami v ní obsaženými) ani nepodporují její rozklad nebo polymerizaci.

1.2.4. Sterilizátory musí mít vstupní přípoj pro měření teploty v komoře, zkušební přípoj pro vakuum a přípoj pro odběr vzorku (měření koncentrace ethylenoxidu a vlhkosti v komoře).

1.2.5. Jsou definovány specifické požadavky na součásti, potrubí, šroubení, těsnicí vložky a těsnění použitá v konstrukci sterilizátorů. Výrobce sterilizátoru má prokázat, že každá součástka je schopna pracovat v souladu se specifikací součástí minimálně 500 sterilizačních cyklů.

1.2.6. Jsou definovány požadavky na dveře sterilizátorů, jejich ovládání a zablokování.

1.2.7. Na každém napájecím přípoji, který je ve směru proudění k prvnímu ventilu sterilizátoru, musí být vhodný zachycovač nečistot.

1.2.8. Pro vlhčení komory nesmí být použito přímé injektování vody. Sterilizátory jsou konstruovány pro provoz s vodou, pro tvorbu páry k vlhčení komory nebo pro provoz s dodávkou páry.

1.2.9. Vzduch nebo inertní plyny vpouštěné do komory musí být filtrovány filtry zachycujícími mikroorganismy.

1.2.10. Při dodávkách sterilizačního prostředku z patrony (sterilizátory typu B) musí být poloha patrony zabezpečena tak, aby její propíchnutí bylo provedeno v souladu se specifikací výrobce sterilizátoru. Expoziční teplota u těchto typů sterilizátorů má být v rozmezí 30 – 60 °C. Patrona nesmí být pro usnadnění odpařování ethylenoxidu přímo ohřívána.

1.2.11. Při dodávkách sterilizačního prostředku z tlakových lahví nebo tanků musí být:

- a) sterilizátor vybaven zařízením pro udržení konstantního tlaku (je definována přípustná tolerance) během celého sterilizačního cyklu,
- b) sterilizátor vybaven zařízením zabraňujícím vniknutí kapalného ethylenoxidu do komory,
- c) vřazen zpětný ventil do každého potrubí pro dodávku sterilizačního prostředku do komory (obvykle umístěn mezi zařízením dodávající sterilizační prostředek a odpařovač) a odpojovací ventil citlivý na teplo (75 °C),
- d) odpařovač (výměník tepla) konstruován tak, aby maximální teplota plynného ethylenoxidu nepřekročila 70 °C.

1.2.12. Při dodávkách sterilizačního prostředku z tlakových lahví musí být zajištěno dostatečné množství sterilizačního prostředku pro provedení kompletního sterilizačního cyklu.

1.2.13. Při dodávkách sterilizačního prostředku z tanků musí být:

- a) k dispozici zařízení k odběru vzorků sterilizačního prostředku pro účely analýzy,
- b) k dispozici zařízení pro vyprázdnění tanku za účelem jeho vyčištění,
- c) skladován odděleně zpětně získávaný sterilizační prostředek do doby, než je znovu nastaveno jeho složení a potvrzeno analýzou.

1.2.14. V případě používání směsi ethylenoxidu a roztředčovacího plynu (např. CO₂) musí být z komory odebrány vzorky k analýze tak, aby bylo možno stanovit odchylky v koncentraci ethylenoxidu uvnitř využitelného prostoru prázdné komory.

1.2.15. Musí být k dispozici zařízení umožňující nezávislé ověřování řízení procesu.

1.2.16. Pro měření teploty v komoře musí být použita alespoň dvě nezávislá čidla umístěná v místě, kde je reprezentativní teplota celé komory.

1.2.17. Musí být měřeny a zaznamenávány následující hodnoty: tlak a teplota v komoře, relativní vlhkost v komoře, teplota v dvojitém plášti nebo obložení komory. K dispozici musí rovněž být indikátor fáze sterilizačního cyklu, indikátor poruchy, indikátor tlaku v potrubí dodávající sterilizační látku, indikátor tlaku pro monitorování netěsnosti, indikátor otevření, zavření a blokování dveří a počítadlo sterilizačních cyklů (indikace všech zahájených pracovních cyklů).

1.2.18. Musí být k dispozici způsob stanovení množství sterilizačního prostředku dodávaného do komory, nezávislý na systému řídicím vpouštěním tohoto prostředku do komory.

1.2.19. Sterilizátory musí být vybaveny automatickou regulací, která řídí reprodukovatelně sterilizační cyklus uvnitř mezi přesností specifikovaných pro každou fázi cyklu. Systém musí indikovat jako závadu pracovní cyklus se zkrácenou dobou expozice. Po úspěšném dokončení každého specifikovaného sterilizačního cyklu musí automatické řízení indikovat konec cyklu. Pro účely validací zajistí výrobce sterilizátoru postup (např. použitím speciálních klíčů nebo kódů) zkrácení expozice (doby působení sterilizačního prostředku).

1.2.20. Pro údržbu, zkoušení a případ nouze musí být k dispozici ruční ovládání dalšího postupu programu. Má-li obsluha možnost přerušit sterilizační cyklus, musí být takový případ indikován jako závada.

1.2.21. Topný systém sterilizační komory musí být opatřen odpojením, nezávislým na automatickém řízení, při překročení nastavené teploty o 6 °C.

1.2.22. Musí být specifikována činnost automatického řízení poté, co byla indikována závada.

1.2.23. Sterilizační cyklus má specifikovány tyto fáze: předohřev komory, odvzdušnění, automatickou kontrolu těsnosti, kondicionování (ohřev a vlhčení náplně na stanovené hodnoty), napuštění sterilizačního prostředku, působení sterilizačního prostředku, odstranění sterilizačního prostředku, proplachování, vpuštění vzduchu, větrání (může probíhat ve sterilizátoru nebo ve zvláštní komoře), konec cyklu.

1.2.24. Je-li tlak v komoře v každé fázi sterilizačního cyklu nižší než atmosférický, musí být sterilizátor vybaven cyklem pro kontrolu těsnosti. Obsluha musí mít k dispozici indikaci správné funkce časovače pro tuto kontrolu. Automatický regulátor musí indikovat, že byla zvolena a provedena kontrola těsnosti.

1.2.25. Mezi základní zkoušky zařízení patří:

- a) zkouška profilu teploty ve sterilizační komoře,
- b) zkouška plynotěsnosti sterilizační komory,
- c) zkouška biologické účinnosti ethylenoxidového sterilizátoru (jako biologický indikátor pro ethylenoxid jsou doporučovány ČL 2002 Doplněk 2003 spory *Bacillus subtilis*),
- d) zkoušky jakosti páry (suchost, přehřátí).

1.3. Validace a průběžná kontrola sterilizace ethylenoxidem

1.3.1. Předmět a obal musí být uzpůsobeny tak, aby bylo umožněno proniknutí páry a ethylenoxidu. Musí být známo místo uvnitř předmětu, kde sterilizace a odvětrávání probíhají nejobtížněji.

1.3.2. Musí se prokázat, že sterilizace neovlivní funkci předmětu ani jeho obalu.

1.3.3. Pokud je prováděna resterilizace, je třeba zhodnotit její vliv na předmět.

1.3.4. Součástí validace jsou

1.3.4.1. instalační atest spočívající v prokázání splnění podmínek pro předkondicionování (je-li použito), sterilizaci a odvětrání,

1.3.4.2. stanovení reziduí ethylenoxidu nebo jeho reakčních zplodin po fázi odvětrání a prokázání, že jsou nalezené hodnoty pod hodnotami stanovenými, které jsou pro suroviny a konečné produkty 1 µg/g, pro obaly 1µg/ml objemu obalu,

1.3.4.3. fyzikální kontrola účinnosti, která se zavádí v případě nových nebo pozměněných předmětů a obalů. Zvolené zkušební předměty se balí způsobem, který se předpokládá při pravidelné sterilizaci. Cílem je prokázat zejména, že:

- a) na konci stanovené doby předkondicionování má celá náplň předepsané teplotní a vlhkostní rozmezí,
- b) došlo k napuštění plynného sterilizačního prostředku do komory,
- c) fyzikální podmínky jsou zachovány po celou dobu expozice v celém sterilizovaném obsahu,
- d) ve všech místech náplně bude dosaženo požadované teploty pro větrání.

1.3.5. Validační zpráva musí zohlednit

1.3.5.1. předkondicionování (je-li využito): dobu, teplotu, vlhkost, nejnižší teplotu, kterou může mít předmět před předkondicionováním, strukturu náplně a rozdělení předmětů v průběhu předkondicionování, teplotu a vlhkost sterilizované náplně, čas mezi předkondicionováním a začátkem sterilizace (fáze předkondicionování může probíhat ve sterilizátoru nebo v samostatném prostoru poblíž sterilizátoru),

1.3.5.2. kondicionování: hodnotu počátečního vakua a dobu potřebnou k jeho dosažení, dobu trvání vakua, dobu, teplotu, tlak a vlhkost, teplotu a vlhkost sterilizované náplně,

1.3.5.3. sterilizaci: vzestup tlaku při napuštění sterilizačního plynu, dobu trvání této fáze a konečný tlak, koncentraci ethylenoxidu, teplotu v komoře, dobu působení, teplotu náplně,

1.3.5.4. větrání: dobu a teplotu, změnu tlaku uvnitř komory nebo jiného prostoru pro odvětrávání, rychlost výměny vzduchu nebo jiných plynů, teplotu náplně.

1.3.6. Pro řízení a kontrolu procesu je třeba stanovit vhodné parametry. Tyto parametry by měly zahrnout alespoň následující údaje:

- a) teplotu a vlhkost v prostoru předkondicionování (je-li použito) a to sledováním hodnot v místě, kde se požadovaných hodnot dosahuje nejobtížněji,
- b) dobu vložení a vyjmutí každé náplně z předkondicionování,
- c) dobu začátku sterilizačního cyklu každé náplně,
- d) teplotu a tlak v komoře během sterilizačního cyklu, měřené na reprezentativním místě,
- e) prokázání prostupu sterilizačního plynu do komory,
- f) měření koncentrace ethylenoxidu nebo jeho množství v komoře,
- g) dobu působení,
- h) dobu, teplotu, změny tlaku a přívodu vzduchu v průběhu větrání,
- i) výsledky inaktivace kontrolních indikátorů pro sterilizaci ethylenoxidem.

1.3.7. Ke kritériím pro uvolnění předmětu po sterilizaci patří:

- a) shoda se stanovenými fyzikálními parametry sterilizačního cyklu,
- b) výsledky zkoušení vzorků každé šarže na sterilitu,
- c) negativní výsledky kultivace všech biologických indikátorů,

d) jestliže ve výše uvedených kritériích jeden z parametrů nevyhověl, předmět musí být považován za nevyhovující.

2. **Radiační sterilizace**

Sterilizace zářením je fyzikální proces, při kterém je sterilizovaný materiál vystaven gama záření produkovanému radionuklidy ^{60}Co nebo ^{137}Cs nebo svazku elektronů z urychlovače.

2.1. **Všeobecné zásady**

2.1.1. Je třeba experimentálně určit sterilizační dávku záření specifickou pro daný předmět (udávána v jednotkách Gray) tak, aby při zvolené dávce bylo dosaženo požadované hladiny sterilizační jistoty.

2.1.2. Nelze-li předpovědět vliv ozařování na předmět, má se provést zkouška ke zjištění účinků záření. Podle výsledků této zkoušky lze upravit výrobní proces předmětu (např. volbou jiných vstupních materiálů a podmínek jejich zpracování) nebo podmínky sterilizace (absorbovaná dávka, dávková rychlost, teplota, hladina ozonu, podmínky skladování po ozaření).

2.1.3. K určení absorbované dávky se má použít dozimetrický systém nebo systémy se známou přesností a shodností. Kalibrace tohoto systému musí být vztažena k příslušnému národnímu etalonu. O všech fázích ozařování se mají vést dozimetrické záznamy.

2.1.4. Hodnota bioburden předmětu má být stabilní a co nejnižší a má být pravidelně hodnocena. Pro odhad hodnoty bioburden předmětu má být vypracována validovaná metoda.

2.1.5. Vyžaduje-li předmět vícenásobné ozaření spojené se změnou v uspořádání předmětů, musí toto být součástí specifikace procesu.

2.1.6. Zvláštní pozornost má být věnována postupům při přerušení procesu ozařování a jeho pokračování, zejména z pohledu dosažení cílové dávky radiační energie stanovené k dosažení požadované hladiny sterilizační jistoty.

Tento pokyn znovu neuvádí požadavky na radiační sterilizaci uvedené v bodech 70 – 75 Doplnku 1 (VYR-32) a v článku 5.1.1. ČL 2002.

2.2. **Validace**

Proces validace zahrnuje instalační atest (zjišťování parametrů procesu) a hodnocení účinnosti. Validační kritéria jsou v některých bodech odlišná, jde-li o ozařovny gama nebo o ozařovny s urychlovači.

2.2.1. **Instalační atest**

2.2.1.1. **Provedení**

Cílem je stanovení takových postupů, aby materiály určené ke sterilizaci byly správně ozařeny. Má být proto přihlédnuto k prostorovému oddělení materiálů, používání štítků a barevných indikátorů. Všechny odchylky od standardního průběhu ozařování mají být zaznamenány (např. přerušení dodávky el. proudu, chyba v pohybu dopravníku) a mají být definovány podmínky pro zahájení nového ozařování. Předměty v případě přerušení ozařování musí být příslušně označeny.

- Během ozařování je signalizováno, že je zdroj ve správné ozařovací poloze a že funguje transportní systém posunující předměty. Je zajištěn návrat zdroje do stíněné polohy, dojde-li k poruše časovače nebo transportního systému.
- Rozhodujícími faktory pro velikost absorbované dávky jsou: aktivita a geometrie zdroje, vzdálenost mezi zdrojem a předmětem, složení, hustota a struktura vsázky předmětu, složení a hustota materiálu mezi zdrojem a ozařovaným předmětem nebo jeho částí. Tyto faktory souvisejí s dráhou, rychlostí transportního zařízení a nastavením časovače (kontinuální ozařovací zařízení) nebo dobou ozařování (šaržové ozařovací zařízení).
- Rozhodujícími faktory pro velikost absorbované dávky jsou pro ozařovny s urychlovači: parametry elektronového svazku, rychlost posunu dopravníku, složení předmětu a jeho hustota, složení, hustota a tloušťka materiálu mezi výstupním okénkem a určitou částí předmětu, vzdálenost mezi výstupním okénkem a předmětem.

2.2.1.2. **Dokumentace**

Musí být sledovány a kontrolovány provozní parametry, záznamy se archivují. Nezbytnou součástí dokumentace tvoří popis ozařovacího zařízení a dopravníkový systém (je-li součástí) a pracovní postupy. Dále popis aparatury používané k řízení, kontrole a zaznamenávání doby cyklu, doby ozařování nebo rychlosti transportu (ozařovny gama) a parametrů svazku a rychlosti dopravníku během ozařování (ozařovny s urychlovači). Dále dokumentace obsahuje:

- specifikace a vlastnosti ozařovacího zařízení,
- popis budovy včetně umístění ozařovacího zařízení, ze kterého vyplývá, jak je zajištěno oddělení ozářených a neozařených předmětů,

- c) popis konstrukce a způsobu práce každého přičleněného dopravníkového systému,
- d) rozměry popis materiálů a konstrukce ozařovacích kontejnerů,
- e) popis způsobu práce a údržby ozařovacího zařízení,
- f) měření aktivity zdroje včetně osvědčení a popis poloh jednotlivých zářičů v nosné konstrukci zdroje.

2.2.1.3. Měření rozložení dávky

Měření má poskytovat informace o rozložení a homogenitě dávky v ozařovacím poli a při různých známých tloušťkách materiálu známé hustoty. Měření jsou prováděna s materiály na dolní a horní hranici rozmezí hustoty, pro které je ozařovací zařízení používáno. Toto měření slouží k určení předpokládané oblasti s minimální a maximální dávkou uvnitř náplně kontejneru, ve kterém je materiál ozařován.

2.2.1.4. Nový instalační atest

Instalační atest musí být opakován při změně ozařovacího zařízení, která by ovlivnila rozložení dávky v ozařovaném materiálu (rozdíl v prostorovém rozložení absorbované dávky).

2.3. Hodnocení účinnosti

2.3.1. Požadavky na dávku

Před vlastním hodnocením je třeba určit pro každý předmět minimální dávku (dávka nutná ke sterilizaci) a maximální dávku (dávka, která způsobuje nepřijatelné změny v předmětu nebo jeho obalu).

2.3.2. Předmět, struktura vsázky předmětu, ozařovací kontejner

Před vlastním hodnocením je třeba stanovit a dokumentovat:

- a) popis zabaleného předmětu včetně rozměrů a hustoty, polohu předmětu a obalu, včetně možných odchylek,
- b) popis struktury vsázky předmětu v ozařovacím kontejneru,
- c) rozměry ozařovacího kontejneru,
- d) popis všech ostatních předmětů v ozařovacím zařízení.

2.3.3. Měření rozložení dávky

Rozložení dávky se zjišťuje rozmístěním určitého počtu dozimetrů v ozařovacím kontejneru v souladu se strukturou náplně. Rozložení je třeba zjišťovat v dostatečném počtu ozařovacích kontejnerů, aby se zjistilo kolísání absorbovaných dávek mezi jednotlivými kontejnery. Dále je třeba rozložení zjistit pro každý předmět nebo kategorii předmětů, strukturu náplně a používanou dráhu. Musí být specifikovány a zaznamenány absorbované dávky v místech extrémních hodnot a v místě, které se průběžně kontroluje.

2.3.4. Specifikace procesu

2.3.4.1. Musí být vypracován písemný postup ošetřování každého předmětu před, během a po sterilizaci. Specifikace procesu musí zahrnovat popisy:

- a) zabaleného předmětu, včetně rozměrů a hustoty, definované polohy předmětu v obalu a možných odchylek od těchto specifikací,
- b) struktury uložení předmětu v ozařovacím kontejneru,
- c) rozměrů ozařovacího kontejneru,
- d) umístění dozimetrů při průběžné kontrole,
- e) úpravy, které je třeba aplikovat na měření běžným dozimetrem, aby je bylo možno převést na absorbované dávky v místě jak minimální, tak maximální dávky,
- f) sterilizační a maximální absorbované dávky,
- g) provozní podmínky ozařování.

2.3.4.2. Nové hodnocení účinnosti je třeba provést při každé změně rozložení dávky v materiálu.

2.4. Kontrola procesu ozařování

2.4.1. Pro daný předmět musí být nastaven časovač nebo transportní rychlost s ohledem na úbytek aktivity zdroje záření. Doba platnosti nastavení času nebo rychlosti má být dokumentována.

2.4.2. Dozimetry ve vhodném počtu je třeba rozmístit tak, aby ukazovaly dávku absorbovanou předmětem. Obvykle jsou umísťovány do místa minimální dávky. Na každou dráhu předmětu v ozařovacím zařízení je třeba umístit alespoň jeden dozimetr.

2.4.3. Záznamy o sterilizaci záření musí obsahovat alespoň:

- a) nastavení časovače nebo rychlost transportního systému,
- b) polohu zdroje,
- c) pořadí, ve kterém byl předmět ošetřen,
- d) výsledky běžné dozimetrie,
- e) dráhu předmětu.

2.4.4. Pro ozařovny s urychlovači musí být sledovány a zaznamenávány parametry svazku elektronů a rychlost dopravníku.

2.4.5. Vizuální indikátory dávky nesmějí být použity jako důkaz uspokojivého ošetření zářením.

2.4.6. Pro uvolnění předmětu po sterilizaci a jeho výdej má být vypracován postup zahrnující parametry uspokojivého průběhu sterilizačního procesu.

2.4.7. Jako doplněk stanovení účinnosti zvolené dávky radiační energie se doporučuje použití biologických indikátorů (spory *Bacillus pumilis*).

3. Odhad populace mikroorganismů na předmětu

Vzhledem k mnohotvárnosti sterilizovaných předmětů, jejich konfiguracím a podmínkám, za kterých je s nimi manipulováno (možné kontaminanty za dané výrobní situace), není možné přesné určení populace životaschopných mikroorganismů přítomných na předmětu (bioburden). Je však třeba provést odhad této hodnoty a vztáhnout k ní účinnost metody sterilizace předmětu. Toto porovnání je součástí validace a revalidace sterilizačního procesu. Odhad hodnoty bioburden je rovněž používán při hodnocení účinnosti čisticích postupů zaměřených na snížení počtu mikroorganismů (např. postupů čištění obalů předmětů vnášených do čistých prostor). Neméně důležitou roli hraje tato hodnota při sledování podmínek výroby (analýza trendů).

3.1. Všeobecné zásady

3.1.1. Cílem odhadu je stanovení přípustných limitních hodnot kontaminace předmětů mikroorganismy před jejich sterilizací.

3.1.2. Postupy při odhadu hodnoty bioburden mají být validovány, dokumentovány a archivovány.

3.1.3. U šarží živných půd připravených pro odhad mají být provedeny růstové zkoušky.

3.1.4. Média pro mikrobiologické účely a roztoky používané pro přenos mikroorganismů z předmětu (eluační roztoky, ředící roztoky) mají být připravovány způsobem zajišťujícím jejich sterilitu.

3.1.5. K odhadu má být použit typický vzorek předmětu (obsahuje mikroorganismy reprezentující rozložení populace mikroorganismů ve všech jednotkách).

3.1.6. Odhad hodnoty bioburden je prováděn pomocí korekčního faktoru, který vyjadřuje účinnost záchytu mikroorganismů (výtěžnost) při jejich přenosu ze zkoumaného předmětu. Při posuzování účinnosti se přihlídně k možným typům kontaminujících mikroorganismů a jejich rozložení na předmětu. Odhad hodnoty bioburden je prováděn na základě stanovení počtu mikroorganismů před sterilizací na předmětu nebo jeho části.

3.1.7. V případě, že předmět může svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi ovlivnit počet a druh zjišťovaných mikroorganismů, je třeba takové působení neutralizovat, eliminovat nebo minimalizovat.

3.1.8. Kultivační podmínky je třeba volit s ohledem na pravděpodobný výskyt jednotlivých druhů mikroorganismů. Výběr podmínek má být dokumentován.

3.2. Validace odhadu hodnoty bioburden

3.2.1. Součástí validačního postupu má být:

- a) zhodnocení vhodnosti techniky použité k přenosu mikroorganismů z předmětu,
- b) zhodnocení kultivačních podmínek včetně stanovení počtu přenesených mikroorganismů,
- c) zhodnocení účinnosti zpětného záchytu (účinnost techniky přenosu mikroorganismů z předmětu).

3.2.2. Je třeba zaznamenat každou změnu v metodice odhadu, zejména z pohledu účinnosti zpětného záchytu.

3.2.3. Potvrzování validace má být prováděno vhodně voleným intervalem revalidací.

3.2.4. Počet mikroorganismů na předmětu před sterilizací má být zjišťován na základě vzorkovacího plánu. Tento plán má být dokumentován a má vycházet z vhodných statistických metod.

3.2.5. U méně obvyklých (méně očekávaných) mikroorganismů je třeba provést jejich určení a posoudit jejich vliv na podmínky sterilizačního procesu (odhad rezistence určitého druhu mikroorganismu na sterilizační postup).

- 3.2.6. Stanovení přípustných limitních hodnot bioburden má být dokumentováno. V pravidelných intervalech mají být tyto hodnoty přezkoumány.
- 3.2.7. Při stanovení rozsahu sterilizačního procesu je třeba zohlednit rezistenci mikroorganismů tvořících populace na předmětu.
- 3.2.8. Dojde-li k překročení přípustných limitů hodnoty bioburden musí být posouzen vliv na hladinu sterilizační jistoty.
- 3.2.9. Změny předmětů a postupů manipulace s nimi musí být přezkoumány z pohledu jejich dopadu na změnu hodnoty bioburden. Tato přezkoumání mají být dokumentována. Je-li zjištěna změna odhadu hodnoty bioburden, je třeba přijmout příslušná opatření ve vztahu ke sterilizačním postupům.
- 3.2.10. Vzhledem k velké rozmanitosti předmětů je možné pro účely odhadu hodnoty bioburden jejich sdružování do skupin podle jejich povahy a způsobu manipulace. Toto má být dokumentováno a má být zdůvodněno, že získané údaje jsou reprezentativní pro všechny takto sdružené předměty.
- 3.2.11. Má být zváženo, zda do odhadu hodnoty bioburden je třeba zařadit rovněž obalové materiály (např. při provádění odhadu u pracovních oděvů určených pro čisté prostory zvážit obal, do kterého je oděv balen před sterilizací).
- 3.2.12. Při zkoušení rozměrných předmětů (např. oděvy, odnímatelné části plnicích zařízení) části je třeba volit co největší část předmětu (odhad hodnoty bioburden této části slouží pro odhad celého hodnoty předmětu).
- 3.2.13. Manipulace se vzorky má být prováděna tak, aby nedošlo k jejich další nežádoucí kontaminaci (např. mají-li se oddělit části předmětu, zvážit použití boxu s laminárním prouděním vzduchu).
- 3.2.14. Na počátku používání nového předmětu je četnost vzorkování pro odhad hodnoty bioburden vyšší, s přibývajícím znalostmi o hodnotě lze četnost snižovat. Četnost vzorkování obvykle závisí na údajích z předchozích odhadů, účelu pro který je odhad prováděn, používaných výrobních procesech, povaze předmětu.
- 3.2.15. Stupeň adheze mikroorganismů k předmětu je dán jeho fyzikálními a chemickými vlastnostmi a zdrojem kontaminace. Tyto skutečnosti ovlivňují způsoby úpravy vzorku pro přenos mikroorganismů. Má být přihlédnuto k možnostem tvorby tzv. biofilmu (mikroorganismy v biofilmu mají obecně vyšší odolnost proti sterilizačnímu procesu).
- 3.2.16. Má být stanovena maximální doba a podmínky uchování mezi odběrem vzorku předmětu a jeho zpracováním pro mikrobiologické zkoušení.
- 3.2.17. Do stanovení účinnosti přenosu mikroorganismů (zejména z pohledu možného snížení počtu mikroorganismů vlivem úpravy) je třeba zahrnout rovněž pomocné techniky, jako jsou např. dezintegrace vzorku a následná separace částic z eluačního roztoku.
- 3.2.18. Volba druhu eluačních a ředicích roztoků a jejich vlastností (koncentrace, pH, osmotická síla, přítomnost mikrobicidní a mikrobistatické složky) má být zvážena z pohledu ovlivnění mikroorganismů (podpora růstu, inhibice růstu).
- 3.2.19. Prostorové uspořádání předmětů a jejich vlastností ovlivňují výběr techniky přenosu mikroorganismů. Mezi nejčastější patří: přístrojové úpravy, výplach eluačním roztokem, stěr, přelití agarovou kultivační půdou, otisk na agarovou půdu.
- 3.2.20. Suspenzi mikroorganismů v eluačním roztoku lze dále zpracovat různými technikami přenosu na kultivační půdu: membránová filtrace, plotnové techniky, techniky stanovení nejvýše pravděpodobného počtu. Volba techniky přenosu má být dokumentována. U techniky počítání kolonií po inkubaci má být určena horní hranice jejich počtu.
- 3.2.21. Má být posouzena kombinace kultivačního média a podmínek inkubace z hlediska reprezentativnosti výsledků (předmět určený ke zkoušení, pravděpodobné zdroje mikrobiální kontaminace, druhy pravděpodobně přítomných mikroorganismů). Součástí validace odhadu hodnoty bioburden má být posouzení těchto různých kombinací.
- 3.2.22. Při validaci odhadu hodnoty bioburden jsou využívány dva přístupy: metoda opakovaných záchytů z předmětu určeného ke zkoušení a inokulace předmětu určeného ke zkoušení známým množstvím mikroorganismů (modelový systém). Druhá z metod je využívána u předmětů s nízkou přirozenou úrovní kontaminace.

Použitá literatura

1. Pokyny pro správnou výrobní praxi VYR-32, včetně Doplnků
2. Český lékopis 2002 včetně Doplnků
3. CPMP/QWP/159/01
4. Norma EN 550
5. Norma EN 552
6. Normy EN 1174-1, EN 1174-2 a En 1174-3