



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
CENTRUL NAȚIONAL DE TRANSFUZIE A SÎNGELUI

I N S T R U C Ț I U N E A
privind controlul la sterilitate a produselor sanguine umane
și soluțiilor perfuzabile

Chișinău 2013

Autori:

Centrul Național de Transfuzie a Sîngelui

Svetlana Cebotari - director Centrul Național de Transfuzie a Sîngelui

Natalia Piscorschii – șef Laborator Control Calitate Preparate sanguine și soluții
perfuzabile

Lilea Rotaru – laborant superior Laborator Control Calitate Preparate sanguine și soluții
perfuzabile

Prezenta instrucțiune este destinată specialiștilor Serviciului de Sînge, sectorul producere și controlul calității preparatelor sanguine. Lucrarea cuprinde cele mai actuale metode de cercetări la sterilitate a condițiilor de producere, componente și preparate biomedicale din sînge, componentă importantă în asigurarea biosecurității hemotransfuzionale.

Recenzenți:

Valentin Gudumac d.h.ș.m., profesor universitar, specialist comisia de specialitate a
Ministerului Sănătății în medicina de laborator

Ion Corcimaru d.h.ș.m., profesor universitar, specialist comisia de specialitate a
Ministerului Sănătății în hematologie și trasfuziologie

Constantin Spînu d.h.ș.m., profesor universitar, specialist comisia de specialitate a
Ministerului Sănătății în microbiologie, virusologie și
parazitologie

Radu Cojocaru d.ș.m., specialist comisia de specialitate a Ministerului Sănătății în
microbiologie, virusologie și parazitologie

Instrucțiunea privind controlul la sterilitate a produselor sanguine umane și soluții
perfuzabile este aprobată și recomandată pentru editare de Consiliul de Experți al
Ministerului Sănătății, Proces verbal nr.3 din 05.09.2013

I. Dispoziții generale

1. Controlul la sterilitate este o componentă obligatorie ce determină calitatea produselor sanguine umane și soluțiilor perfuzabile. Sterilitatea produselor sanguine umane și soluțiilor perfuzabile se asigură prin respectarea condițiilor sanitaro-igienice la etapele recoltare, procesare și producere.
2. Determinarea sterilității eșantioanelor componentelor sanguine, preparatelor biomedicale din sânge și soluțiilor perfuzabile, materialelor consumabile și condițiilor de producere a acestora se efectuează în condiții aseptice, prin examinarea la prezența germenilor microbieni aerobi și anaerobi, metoda clasică și automată, în corespundere cu algoritmlele aprobate în acest scop de Ministerul Sănătății.

II. Controlul la sterilitate a componentelor sanguine

3. Scopul controlului calității după criteriul contaminării bacteriene a componentelor sanguine constă în realizarea controlului procedurii de recoltare, procesare sânge și componente sanguine, stabilit de standardele naționale. Statistic este dovedit că selectarea probelor concentratului de plachete pentru însămânțare, ca metodă de validare, reprezintă un indice de încredere privind nivelul contaminării pentru toate componentele din sânge recoltate și/sau produse din sânge total.
4. Controlului la sterilitate se supun eșantioanele de la toate unitățile de concentrat de plachete produse în zi, care se consideră serie în examinare. Ca eșantion în realizarea controlului la sterilitate se preia tubulatura de transfer a componentului sanguin (concentratul de plachete) sau proba-satelit.
5. Fiecare eșantion va fi etichetat și însoțit cu Indreptare examinare de laborator la controlul calității.
6. Concentratul de plachete se examinează la sterilitate prin metoda clasică și automată.
7. Mediu de însămânțare pentru metoda clasică va servi mediul tioglicolic și pentru metoda automată flaconașe cu mediu de nutriție pentru germeni aerobi și anaerobi.
8. Tehnica de efectuare a examinării la sterilitate prin metoda clasică includ activități bine delimitate, conform zonelor de realizare:

a) activitatea în presala de însămânțare (preboxă)

În presală eșantioanele (satelite/tubulatura) predestinate pentru examinări se verifică vizual la integritatea ambalării și apoi se prelucrează cu soluție biodistructivă aplicată la nivel de instituție sau alcool etilic de 70°. Colaboratorii laboratorului cu căciuliță, ciupici sau bahile, spală minuțios mâinile cu săpun, le șterg cu șervet steril, prelucrează mâinile cu alcool etilic de 70° și îmbracă halate, mască și mănuși sterile.

b) activitatea în sala de însămânțare

Înainte de a începe lucrul și pe parcursul activității în sală, colaboratorii prelucrează mănușile de protecție cu alcool etilic de 70°. Pentru fiecare eșantion se va folosi numai instrumente sterile. La însămânțare se acceptă numai eșantioanele ce corespund cerințelor expuse în pct.5.

Procesul de însămânțare se efectuează în sala destinată acestui scop sau în hota cu flux laminar continuu, prealabil pregătite conform procedurii standard de operare ce

reglementează activitatea în sală/echipament. Însămînțarea fiecărui eșantion de component sanguin se efectuează din tubulatură, direct în mediul nutritiv: tubul se strânge cu pensa imediat după linia de sudură a segmentului și se taie cu foarfece sterile. Bontul tăiat al tubului repede se flambează, slăbind pensa și prin apăsarea tubului aranjat vertical se elimină o cantitate nu mai mică de 1(unu) ml, pentru fiecare din cele două eprubete, care conțin câte 20 ml mediu tioglicolic, cantități de material suficiente pentru însămînțare.

9. Tehnica de efectuare a examinării la sterilitate prin metoda automată.

Colaboratorii laboratorului cu căciuliță, ciupici sau bahile, spală minuțios mâinile cu săpun, le șterg cu șervet steril, prelucrează mâinile cu alcool etilic de 70° și îmbracă halate, mască și mănuși sterile. Procesul de însămînțare se efectuează în sala destinată acestui scop sau în hota cu flux laminar continuu, prealabil pregătite conform procedurii standard de operare ce reglementează activitatea în sală/echipament. Se înlătură pesarile flacoanelor și se prelucrează fiecare separat cu un tampon îmbibat în alcool etilic 70⁰. Eșantioanele se prelucrează cu alcool etilic de 70⁰, se taie cu foarfece sterilă și se aspiră cu acul de seringă steril. Înainte de a inocula, se va ține cont că suprafața capacului flaconului să nu fie umedă după dezinfectare, asigurându-se o pauză de cel puțin 60 secunde, din momentul prelucrării. Se aspiră în seringă sterilă materialul cercetat. Se substituie acul cu care a fost aspirat materialul cercetat cu un alt ac steril. Însămînțarea se face primar în flaconul cu mediu de nutriție pentru microorganismele anaerobe, introducând material cercetat. Se substituie acul cu un alt ac steril și în continuare se însămînțează materialul cercetat în flaconul cu mediu de nutriție pentru microorganismele aerobe. Cantitatea de material cercetat ce urmează a se introduce în flaconaș va corespunde cu prescripțiile producătorului. Flacoanele însămînțate se prelucrează cu alcool etilic de 70⁰ și se transmit pentru incubare în echipamentul corespunzător.

8. Rămășițele tubulaturii sau probe-satelite se vor neutraliza ca deșeuri medicale, cu ulterioara autoclavare.

9. Însămînțările pe mediu tioglicolic se încubează la temperatura de la plus 20°C pînă la plus 25°C și de la plus 30°C pînă la plus 35°C. Acestea se mențin 2 zile la temperatura corespunzătoare, apoi se supun reînsămînțării, câte 0,5 ml din fiecare eprubetă în alte 2 (două) eprubete, care conțin câte 10 ml mediu tioglicolic. Reînsămînțările se mențin la aceleași temperaturi ca și eprubetele în care a fost făcută însămînțarea inițială. Perioada totală de incubare este 3 zile.

Flacoanele cu mediu de nutriție pentru germeni aerobi și anaerobi însămînțate se plasează pentru incubare în echipamentul corespunzător, la temperatura 37⁰C, pentru o perioadă de 5 zile.

10. Monitorizarea însămînțărilor realizate prin metoda clasică se va efectua prin vizualizare zilnică, pe parcursul a 3 zile. Vizualizarea se efectuează zilnic la lumină dispersă. Creșterea microorganismelor în mediile nutritive se identifică vizual, prin aparența peliculei, opalescenței, precipitatelor și a altor schimbări microscopice. Produsul sanguin cercetat se consideră corespunzător cerințelor controlului la sterilitate numai în cazul lipsei creșterii microorganismelor. Rezultatul negativ se constată la ziua a 3 din momentul incubării. Însămînțările realizate prin metoda automată se

monitorizează automat, în regim continuu, pe parcursul a 5 zile din momentul incubării, prin vizualizarea parametrilor la monitorul echipamentului sau a calculatorului, care este direct conectat la sistemul de SOFT al incubatorului. La descoperirea creșterii în unul din flacoane, urmează a se efectua confirmarea prin microscopia frotiului, colorare după Gram.

11. Se permite eliberarea avizului la sterilitate preventiv (primele 3 zile de la momentul colectării și producerii lor) până la finisarea cercetării, dacă pe parcursul ultimelor 3 luni cercetarea zilnică a eșantioanelor a demonstrat că sunt sterile.

12. În caz de suspecție la creștere de microorganisme toate unitățile de componente sanguine cu același cod de donare (produse din unitatea de componente/sînge total) se vor stopa sau retrage din circulație, pentru a se repeta cercetarea. Lipsa creșterii microorganismelor în însămînțarea repetată a produsului cercetat se califică ca control satisfăcător cerințelor de sterilitate. Creșterea microorganismelor la însămînțarea repetată, cu aceeași morfologie a microorganismelor, constatate în însămînțarea inițială, califică preparatul cercetat ca nesteril. Dacă unitățile de componente sanguine cu același cod de donare preparate din unitatea de component/sînge total sunt eliberate din centrul de transfuzie, prin sistemul de trasabilitate se identifică și informează instituția căreia i-a fost eliberate unitățile de produse sanguine, pentru a întreprinde măsurile de rigoare.

13. Rezultatele finale se înregistrează după 3 zile metoda clasică și 5 zile metoda automată în fișa/registru de monitorizare investigării sterilității sîngelui conservat și componentelor sanguine. La înregistrarea rezultatului se va indica codul donării (unității) cercetate, tipul produsului examinat, data controlului, rezultatul, în cazul rezultatului pozitiv, germele identificat și data eliberării rezultatului.

III. Controlul la sterilitate a preparatelor biomedicale din sînge și soluțiilor perfuzabile

14. Controlul calității în sectorul de producere a preparatelor biomedicale din sînge și soluțiilor perfuzabile includ controlul la sterilitate a formelor medicale și gata (finală) a acestora.

15. Eșantioane pentru cercetarea preparatelor biomedicale din sînge, pentru fiecare preparat separat, servesc flacoanele sterile cu un volum de produs pentru metoda clasică nu mai mic de 5ml iar pentru metoda automată nu mai mic de 25ml.

16. Selectarea eșantioanelor în controlul de producere se efectuează în fiecare zi de lucru, la fiecare bloc de producere, pentru fiecare metodă de sterilizare și fiecare aparat de sterilizare și de sublimare. În laboratorul de control a calității se prezintă seriile de preparate și soluții produse.

17. La selectarea numărului de eșantioane se va ține cont de particularitățile procesului tehnologic și numărul de unități în seria de preparate în serie.

18. Ca serie de preparate biomedicale din sînge și soluții perfuzabile se aprobă:

a) pentru preparatele sub formă lichidă - cantitatea de produs de la o singură capacitate supusă sterilizării prin filtrare și turnare ce are loc pe parcursul unei zile;

b) pentru preparate sanguine sub formă liofilizată – cantitatea de flacoane și fiole a unui aparat de liofilizare la un ciclu de liofilizare;

c) pentru preparate sanguine supuse sterilizării cu aburi sub presiune – cantitatea de flacoane și fiole a unui sterilizator de aburi.

19. Pentru preparatele și soluțiile perfuzabile procesul tehnologic de producere include:

a) etapa de sterilizare prin filtrare și turnare, eșantioane se preiau la începutul, mijlocul și sfârșitul etapei;

b) etapa de liofilizare, eșantioane se preiau pentru polibiolină și trombină câte 2 (două) unități, din fiecare casetă a liofilizatorului;

20. În dependență de numărul de unități produse în serie, numărul de eșantioane supuse controlului sterilității va constitui:

a) de pînă la 100 de unități - 2 unități de eșantioane;

b) de la 101 unități pînă la 150 unități - 3 unități de eșantioane;

c) de la 151 unități pînă la 250 – 4 unități de eșantioane;

d) de la 250 unități pînă la 300 unități - 5 unități de eșantioane;

e) de la 301 unități pînă la 350 unități - 6 unități de eșantioane;

f) de la 351 unități pînă la 400 unități - 7 unități de eșantioane;

g) de la 401 unități pînă la 450 unități - 8 unități de eșantioane;

h) de la 451 unități pînă la 500 unități - 9 unități de eșantioane;

j) de la 501 și mai mult - 10 unități de eșantioane.

21. Pe lîngă eșantioanele selectate nemijlocit pentru cercetare, sînt selectate de asemenea și eșantioane dublicate, numărul acestora fiind echivalent numărului de eșantioane selectat inițial. Acestea se folosesc în caz de necesitate, pentru controlul repetat. În cazul absenței creșterii de cultură microbiană în eșantioanele inițiale, eșantioanele dublicate destinate pentru controlul repetat se returnează în secția de producere preparate sanguine pentru prelucrarea ulterioară. Deasemenea, ținînd cont de specificul procesului tehnologic de producere a unor preparate, metoda de ambalare, în documentele ce reglementează procesul tehnologic de producere a acestora, pot fi reglementate cerințe suplimentare către cantitatea necesară a eșantioanelor, care în final asigură siguranța controlului sterilității.

22. Fiecare eșantion va fi etichetat și însoțit cu Indreptare examinare de laborator la controlul calității.

23. Preparatele biomedicale din sînge se examinează la sterilitate prin metoda clasică și automată.

24. Pentru controlul sterilității preparatelor bimedicale se folosește numai mediu tioglicolic. Pentru controlul sterilității a soluțiilor perfuzabile – mediul tioglicolic și mediul lichid Saburo. În aceste cazuri se folosește metoda de însămînțare directă pe mediu nutritiv sau metoda de filtrare membranică.

25. Tehnica de efectuare a examinării la sterilitate prin metoda clasică includ activități bine delimitate, conform zonelor de realizare:

a) *activitatea în presala de însămînțare (preboxă)*

În presală eșantioanele (fiole/flacoane) predestinate pentru examinări se verifică vizual la integritatea ambalării și apoi se prelucrează cu soluție biodistructivă aplicată la nivel de instituție sau alcool etilic de 70°. Colaboratorii laboratorului cu căciuliță, ciupici sau bahile, spală minuțios mâinile cu săpun, le șterg cu șervet steril, prelucrează mâinile cu alcool etilic de 70° și îmbracă halate, mască și mănuși sterile.

b) activitatea în sala de însămînțare

Înainte de a începe lucrul și pe parcursul activității în sală, colaboratorii prelucrează mănușile de protecție cu alcool etilic de 70°.

Procesul de însămînțare se efectuează în sala destinată acestui scop sau în hota cu flux laminar continuu, prealabil pregătite conform procedurii standard de operare ce reglementează activitatea în sală/echipament.

La însămînțare se acceptă numai eșantioanele ce corespund cerințelor. Fiolele/flacoanele cu preparate lichide se agită, astfel ca în cazul prezenței microbilor contaminatori, aceștea să se ridice de pe partea inferioară a recipientelor. Înainte de deschidere, fiolele și flacoanele se supun flambării la flacăra arzătorului. Eșantioanele cu preparate liofilizate preventiv se dizolvă cu dizolvantul steril în volum, conform indicațiilor de pe etichetă. Pentru însămînțare se folosește o pipetă sterilă, conectată la un balon din cauciuc sau tub lung de cauciuc, la vârful căreia se află muștiucul de sticlă cu dop din bumbac, scopul căreia este de a crea presiune de vacum în pipetă, necesară în procesul de însămînțare. Înainte de însămînțare pipeta se trece prin flacăra arzătorului, însă fără a o căli. În pipetă se aspiră cel puțin 2 (doi) ml de preparat, se pipetează câte 1 (unu) ml în 2 (două) eprubete care conțin câte 20ml de mediu tioglicolic, atent în centrul acestora.

26. După folosire pipetele folosite se introduc în soluție biodistructivă aplicată la nivel de instituție, cu ulterioara dezinfectare și prelucrare conform procedurilor standard de operare. Se interzice călirea vârfului fiolelor și a pipetelor la flacăra arzătorului și crearea presiunii de vacum cu ajutorul cavității bucale.

27. La cercetarea preparatelor biomedicale din sânge însămînțările pe mediu tioglicolic se încubează la temperatura de la plus 20°C până la plus 25°C și de la plus 30°C până la plus 35°C. Cercetarea soluțiilor perfuzabile pe însămînțări în mediul tioglicolic se încubează la o temperatură de la plus 30°C până la 35°C, iar în mediul Saburo de la plus 20°C până la plus 25°C. Durata de incubare a însămînțărilor în ambele medii nutritive este de 14 zile.

28. La controlul eșantioanelor preparatelor biomedicale sanguine, care nu produc opalescența mediului nutritiv (soluție de albumină 5, 10 și 20%, imunoglobuline umane, dizolvanți pentru preparate liofilizate, soluțiile perfuzabile), însămînțările se mențin pe parcursul a 14 zile la temperaturile sus menționate, cu înregistrarea ulterioară a rezultatelor.

29. La controlul eșantioanelor preparatelor biomedicale sanguine care produc opalescența mediului nutritiv (trombină, polibiolină, crioprecipitat liofilizat) reînsămînțarea se efectuează peste 7 zile, a câte 0,5 ml în alte eprubete cu 10 ml de mediu tioglicolic, fiecare eprubetă se menține corespunzător la aceleași temperaturi. Perioada totală de incubare a însămînțării inițiale și reînsămînțării este de 14 zile.

Eprubetele, din care se efectuează reînsămînțarea se păstrează pînă la sfîrșitul controlului sterilității în termostat.

30. Eșantioanele peliculei de fibrină izogenă se însămînțează în 2 (două) eprubete cu 20 ml de mediu tioglicolic fiecare. Însămînțările se mențin la temperatura de plus 30°C plus 35°C și plus 20°C plus 25°C pe un termen de 14 zile.

31. Sterilitatea soluției de dizolvare, folosită pentru dizolvarea preparatelor liofilizate și pregătirea soluțiilor de protecție (tampon-bufer) se cercetează prin însămînțarea a cîte 2 ml în 2 (două) eprubete, care conțin fiecare cîte 20 ml de mediu tioglicolic. Dacă la însămînțarea preparatelor liofilizate se folosesc cîteva flacoane de soluție dizolvanță sterilitatea fiecărei se cercetează prin aceeași modalitate.

32. Tehnica de efectuare a examinării la sterilitate prin metoda automată.

Colaboratorii laboratorului cu căciuliță, ciupici sau bahile, spală minuțios mîinile cu săpun, le șterg cu șervet steril, prelucrează mîinile cu alcool etilic de 70° și îmbracă halate, mască și mănuși sterile. Procesul de însămînțare se efectuează în sala destinată acestui scop sau în hota cu flux laminar continuu, prealabil pregătite conform procedurii standard de operare ce reglementează activitatea în sală/echipament. Se înlătură pesarile flacoanelor și se prelucrează fiecare separat cu un tampon îmbibat în alcool etilic 70⁰. Eșantioanele se prelucrează cu alcool etilic de 70⁰ și se înțeapă cu acul de seringă steril. Înainte de a inocula, se va ține cont că suprafața capacului flaconului să nu fie umedă după dezinfectare, asigurîndu-se o pauză de cel puțin 60 secunde, din momentul prelucrării. Se aspiră în seringă sterilă material cercetat. Se substituie acul cu care a fost aspirat materialul cercetat cu alt ac steril. Însămînțarea se face primar în flaconul cu mediu de nutriție pentru microorganismele anaerobe, introducînd material cercetat. Se substituie acul cu un alt ac steril și în continuare se însămînțează 10ml material cercetat în flaconul cu mediu de nutriție pentru microorganismele aerobe. Cantitatea de material cercetat ce urmează a se introduce în flaconaș va corespunde cu prescripțiile producătorului. Flacoanele însămînțate se prelucrează cu alcool etilic de 70⁰ și se transmit pentru incubare în echipamentul corespunzător.

Flacoanele cu mediu de nutriție pentru germeni aerobi și anaerobi însămînțate se plasează pentru incubare în echipamentul corespunzător, la temperatura 37⁰C, pentru o perioadă de 14 zile.

33. Monitorizarea însămînțărilor realizate prin metoda clasică și automată se va efectua pe parcursul a 14 zile. Pentru metoda clasică vizualizarea se efectuează zilnic la lumină dispersă. Creșterea microorganismelor în mediile nutritive se identifică vizual, prin aparența peliculei opalescente, precipitatelor și a altor schimbări microscopice. Produsul sanguin cercetat se consideră corespunzător cerințelor controlului la sterilitate numai în cazul lipsei creșterii microorganismelor. Însămînțările realizate prin metoda automată se monitorizează automat, în regim continuu, prin vizualizarea parametrilor la monitorul echipamentului sau a calculatorului, care este direct conectat la sistemul de SOFT al incubatorului. Produsul sanguin cercetat se consideră corespunzător cerințelor controlului la sterilitate numai în cazul lipsei creșterii microorganismelor. La descoperirea creșterii în una din eprubete, urmează a se efectua confirmarea prin microscopia frotiului, colorare după Gram.

34. În caz de suspexie la creștere de microorganismele în una din eprubete (retortă, flacon) urmează confirmarea prin microscopie și se repetă cercetarea pe același număr de eșantioane ca în etapa inițială. Lipsa creșterii microorganismelor în însămînțarea repetată a preparatului cercetat se consideră că controlul este satisfăcător cerințelor de sterilitate. Creșterea microorganismelor la însămînțarea repetată, cu aceeași morfologie a microorganismelor, constatate în însămînțarea inițială, califică preparatul cercetat ca nesteril. Dacă la însămînțarea repetată se observă creșterea microorganismelor, deosebite morfologic de la cele evidențiate inițial, cercetarea este repetată pentru a treia cercetare pe o cantitate dublă de eșantioane. În cazul lipsei de creștere a microorganismelor după incubare a însămînțărilor în controlul trei, preparatul se consideră suficient cerințelor de sterilitate. La constatarea creșterii în una din eprubete, preparatul cercetat se consideră nesteril.

35. Rezultatele controlului la sterilitate se înregistrează la a 14 zi, din momentul realizării însămînțării inițială, în fișa/registru de monitorizare investigației sterilității sîngelui conservat și componentelor sanguine. La înregistrarea rezultatului se va indica numărul seriei (unității) cercetate, tipul produsului examinat, data controlului, rezultatul, în cazul rezultatului pozitiv, germele identificat și data eliberării rezultatului.

IV. Cerințele către materialele consumabile și condițiile de producere a preparatelor biomedicale din sînge și soluțiilor perfuzabile și controlul la sterilitate a acestora

36. Condițiile de colectare sînge/componente sanguine și producere produse sanguine și soluții perfuzabile necesită un control permanent la sterilitate. Obiectele de cercetare la executarea controlului la sterilitate sunt:

- a) sălile (boxele) de producere și efectuare a controlului la sterilitate;
- b) regimului de sterilizare realizat de sterilizatoare, autoclave, etc.;
- c) materialul utilizat în procesele tehnologice de producere (vesela, instrumentele, materiale din diverse țesături, etc.);
- d) mediile nutritive;
- e) mediul aerian a sălilor (boxelor);
- f) mîinile personalului implicat în procesele de producere a produselor biomedicale sanguine și soluțiilor perfuzabile;
- g) tegumentele plicii cubitale a donatorilor de sînge/componente sanguine.

37. Sălile (boxele) de producere și efectuare a controlului la sterilitate reprezintă camere separate, cu suprafață și geamuri suficiente pentru a executa activitatea în condiții aseptice. Sălile trebuie să fie bine luminate și asigurate cu ventilație. Amenajarea interioară a sălilor trebuie să asigure siguranța curățeniei și posibilitatea de a face prelucrarea și dezinfectarea. Tuburile de apeduct și gaze, instalațiile electrice vor fi montate în afara sălilor sau în pereți. Sistemul de încălzire (calorifer) vor fi plate, fără muchii, care aduce la cumulara prafului. Pereții și podeaua se acoperă cu gresie sau linoleum ce permite prelucrare și acțiune antibacteriană. Tavanul se vopsește în culoare deschisă, vopsele pe bază de ulei. Sala se va asigura cu mobilă în număr suficient pentru a efectua procesul de producere și control la sterilitate. În sălile destinate controlului

sterilității preparatelor biomedicale din sânge activitatea cu culturile de microbi vii nu se permite. Sălile de lucru vor fi anticipate de presăli (preboxă), despărțită de sală prin paravan de sticlă, cu ușă și fereastră de transmitere pentru preparatele și eșantioanele pregătite pentru însămânțare, mediile nutritive, pipetele și casoletele cu materiale, pesare, diverse țesături sterile. În presală personalul î-și îmbracă echipamentul de protecție steril și încălțăminte specială pentru activitatea în sală.

În apropierea presălii urmează a organiza păstrarea mediilor nutritive și vasele sterile utilizate la controlul sterilității, prelucrarea eșantioanelor, stivelor pentru medii nutritive cu soluție biodistructivă aplicată la nivel de instituție, marcarea eprubetelor și altele.

Zilnic sala și presala se supun unei curățenii minuțioase și dezinfectării prin ștergerea pereților, podelelor, mobilei cu o țesătură moale îmbibată în soluție de spălare și dezinfectare, compusă din soluție biodistructivă aplicată la nivel de instituție și detergent chimic neutru. Norma de consum a soluției de spălare și dezinfectare va fi în corespundere cu standardele de supraveghere și control a infecțiilor nozocomiale. Înainte de intrarea în presală se plasează un covoraș din stofă ori burete, umezit cu soluție biodistructivă aplicată la nivel de instituție, pentru a asigura prelucarea încălțăminte prin ștergere.

Pentru asigurarea unui mediu steril în presăli și săli se folosesc lămpi bactericide reieșind din calculul o lampă la 12 m³ de aer sau 2-2,5 W la un m² de suprafață (puterea în W este indicată de producător pe lampa bactericidă). Lampa poate fi plasată pe tavan, perete, suport fix sau mobil. Iradierea sălilor se face pînă la începutul lucrului în decurs de 1,5-2 ore. În timpul lucrului lampa trebuie să fie deconectată. Este necesar să se țină cont de durata exploatării lămpilor, la sfârșitul termenului de activitate acestea se substituie cu altele noi. Monitorizarea activității lămpilor bactericide se va fixa în fișa/registru de monitorizare a iradierii cu raze ultraviolete

38. Controlul regimului de sterilizare reprezintă un element important în asigurarea și controlul calității prin sterilitate în procesul de producere a produselor sanguine.

Sterilizatoarele cu aburi (autoclavele) se supun controlului tehnic și la sterilitate, în corespundere cu programul aprobat în acest scop. Controlul curent (operativ) a procesului de sterilizare se realizează prin înregistrarea indicatorilor manometrului sterilizatorului cu aburi pe tot parcursul timpului de sterilizare. Controlul regimului de lucru a sterilizatorului cu aburi se efectuează săptămînal, cu ajutorul testelor-biologice, *Bacillus Stearothermophilus*, care se pregătesc și se cercetează de către laboratorul controlul calității sau subdiviziunea acestuia, responsabilă de controlul la sterilitate. Este foarte important ca testele biologice să se localizeze în 5 puncte (locuri) diferite a sterilizatorului, conform instrucțiunii de utilizare a indicatorilor.

Indicii de temperatură a regimului de lucru a sterilizatorului cu aburi se verifică de două ori pe lună cu ajutorul termometrelor maxime și la fiecare ciclu de sterilizare cu indicatori chimici, plasați pe interiorul și exteriorul casoletelor, supuse procesului de sterilizare.

Controlul curent (operativ) pentru metoda de sterilizare aeriană (aburi fierbinți uscați) se realizează cu indicatori chimici localizați în 5 puncte (locuri) diferite a sterilizatorului, conform instrucțiunii de utilizare a indicatorilor.

Monitorizarea regimului de executare a sterilizării se înregistrează în Registrul de evidența a controlului lucrului sterilizator cu aer, cu aburi (autoclav).

39. Materialele consumabile (vesela, instrumente, materiale din diverse țesături, etc.) folosite în procesul de producere produse sanguine și controlul la sterilitate se supun procesului de sterilizare în casolete. Casoletele cu materialele sterile sunt valabile 72 ore din momentul sterilizării.

Controlul calității a procesului de sterilizare a materialelor se efectuează săptămânal, la 24 ore din momentul finalizării procesului de sterilizare. Însămânțarea lavajelor de pe materialul sterilizat se efectuează în 2 (două) eprubete care conțin câte 10 ml de mediu tioglicolic. Eprubetele se mențin în termostat: una din eprubete la o temperatură de plus 30°C plus 35°C, și alta la plus 20°C plus 25°C pe parcursul a 8 zile. La apariția opalescenței mediului nutritiv se va recurge la identificarea microorganismelor, colorarea după Gram și microscopia.

40. Mediile de nutriție se supun unui control de calitate riguros. Validarea mediului nutritiv include obligatoriu controlul "de intrare" a fiecărei serii de mediu tioglicolic și prevede aprecierea calității mediului: sterilitatea și proprietatea de creștere a microorganismelor. Controlul calității a mediului tioglicolic, livrat ulterior în alte tranșe, dar parte din aceeași serie de preparat uscat (care a trecut controlul "de intrare" deplin), include aprecierea calității numai la sterilitate. Se consideră valid pentru întrebuințare mediul nutritiv tioglicolic steril și care asigură creșterea tulpinei-test în 48 ore de la incubare.

Aprecierea sterilității mediului nutritiv tioglicolic pregătit se efectuează după cum urmează: după autoclavarea acestuia se pregătesc eprubetele cu mediu, numărul acestora constituind nu mai puțin de 2% din tranșa livrată și se introduc în termostat la o temperatură de plus 37°C. Monitorizarea rezultatelor se face peste 48 ore, prin cercetarea vizuală a tuturor eprubetelor cu mediu. În caz de creștere (opalescență) a mediului în eprubetele lăsate pentru control, cantitatea livrată în tranșă se supune rebutului. Modelele de medii care nu au trecut controlul la sterilitate sau constatate nesterile nu se folosesc.

Sensibilitatea mediului tioglicolic se apreciază prin controlul la creșterea anumitor microorganisme-test. Se supune testării fiecare serie de mediu nutritiv. Pentru mediul tioglicolic în calitate de test-cultură destinate acestui scop, și anume *Stafilococcus aureus*, *Bacillus Cereus*.

Înainte de însămânțarea preparatului pe o serie nouă de mediu, în fiecare din două eprubete de mediu cercetat se introduce 0,1 ml emulsie de celule (spor) de microorganisme-test corespunzătoare, care conțin 100 celule într-un mililitru. Însămânțările pe mediu nutritiv tioglicolic se mențin la o temperatură de plus 37°C pe o perioadă de 48 ore. Dacă în mediul cercetat se observă o creștere slabă a culturei-test sau în general lipsește, mediul nu se validează pentru utilizare.

Rezultatele de control a mediilor nutritive se înregistrează în fișă/registrul de evidența a pregătirii și controlul mediilor nutritive.

41. Vasele pentru mediile nutritive (cutia Petri, eprubetele, retortele, sticlele, pipetele) pot fi de unică folosință sau reutilizabile. Pregătirea vaselor reutilizabile pentru mediile nutritive se supun procesului de pregătire, folosindu-se metode automatizate sau

manuale. În cazul spălării manuale, vasele se vor spăla minuțios cu apă fierbinte și detergenți, pînă la primirea unei curățiri ideale, după ce se spală cu apă distilată și se usucă. Vasele noi, preliminar procesului de spălare, se fierb în decurs de 30 min în soluție de acid clorhidric 2% cu ulterioara spălare abundentă cu apă distilată, pînă la stabilirea reacției neutre a apei de spălare, care are ca scop de a evita prezența alcalinității. Eprubetele, retortele, flacoanele destinate pentru sterilizare se închid cu dopuri din tifon-bumbac. Retortele și sticlele se înfășoară cu pesare din hîrtie de semipergament. Eprubetele, cutiile Petri și pipetele gradate se învelesc cu hîrtie de semipergament. Pipetele Paster și cutiile Petri pot fi plasate în penal de metal. Vasele se sterilizează cu aer fierbinte uscat sau cu aburi sub presiune prin metoda de sterilizare cu:

- a) aer fierbinte uscat la o temperatură de plus 180°C timp de 60 min;
- b) aburi de apă saturați sub presiune excendentă la 20 KgP/cm²/plus 132°C timp de 20 minute, la 1,1 KgP/cm²/ plus 120 °C timp de 45 minute.

La folosirea metodei de sterilizare cu aburi uscați, se va ține cont ca materialul să se plaseze în așa mod, încît să se asigure circulația liberă a aerului.

42. Mediul aerian a sălilor (boxelor) de producere a preparatelor biomedicale din sînge și soluțiilor perfuzabile se realizează prin verificarea purității aerului în săli și presăli, monitorizîndu-se în fiecare zi de lucru, la începutul și sfîrșitul activității. Mediul aerian se cercetează prin metoda sedimentare, clasică și automată. Prelevarea probelor de aer se realizează respectind obligatoriu condițiile: nivelul de sus a probei trebuie să coincidă cu nivelul mesei de lucru, ferestrele și ușile vor fi închise. Proba de aer nu se va preleva înainte de finisarea curățeniei umede și timpului de acțiune a lampei bactericide.

43. Cercetarea aerului prin metoda de sedimentare, se efectuează prin plasarea pe masa de lucru a cutiei Petri cu mediu geloză nutritivă de 2% (geloză/sînge și geloză /carne-peptonă), deschizînd-o pentru 15 min. Pentru determinarea conținutului total la bacterii la m³ de aer, colectarea probei se va face pe 2 (două) cutii Petri cu geloză nutritivă. Însămîntările se incubează inițial pentru 24 ore la temperatura cuprinsă între plus 30°C plus 35°C, apoi încă 24 ore la temperatura cuprinsă între plus 20°C plus 25°C.

44. Cercetarea aerului prin metoda automată se realizează prin probe de aer aspirate cu ajutorul echipamentului, conform instrucțiunii producătorului de echipament și procedura standard de operare aprobată în acest scop. Culturile se incubează la temperatura de plus 37⁰C timp de 24 ore, apoi 24 ore la temperatura cuprinsă între plus 20⁰C pînă la plus 25⁰C.

45. Controlul de contaminare microbiana a aerului (determinarea numărului de colonii care formează microorganisme, ce se conțin în 1 m³ de aer în încăperi) se realizează în sălile aseptice și încăperile de producere. Se calculează numărul total de colonii din cutia Petri și se recalculează numărul de microorganizme la 1 m³ de aer, cantitatea de spori de fungi se specifică separat.

În cazul creșterii pe cutiile Petri mai mult de 400 microorganizme în 1 m³ aer (nu mai mult de 5 colonii) la începutul lucrului și mai mult de 800 microorganizme în 1 m³ aer (nu mai mult de 10 colonii) la sfîrșitul lucrului, sălile vor fi supuse pentru o prelucrare suplimentară mult mai amănunțita. În cazul identificării microorganismelor

ce formeaza spori sau triburi, atunci la curățenia încăperii se vor folosi substante dezinfectante la o concentratie ce se utilizeaza în dezinfectia infectiilor fungice. In cazul aparitiilor coloniilor de fungi dupa dezinfectia efectuată, atunci se acorda atentie deosebita la reducerea umedității din presală și sală, care se elimină pe calea uscării încăperilor, utilizând încălzitoare electrice de uscare.

Aerul din sălile de proceduri, de recoltare a sîngelui și prepararea componentilor sanguine se verifică cel puțin o data în luna. Numărul total de colonii din cutia Petri în sumă nu trebuie sa depaseasca la inceputul lucrului 400 microorganizme la 1 m³.

Aerul din departamentele de sterilizare se monitorizeaza cel puțin de 2 ori pe lună. În încăperile pentru păstrarea și depozitarea materialului steril numărul total de colonii din cutia Petri nu trebuie să depășească 400 microorganizme în 1m³ la inceputul lucrului și 800 microorganizme în 1m³ în timpul lucrului. În zona nesterilă numărul de colonii în cutiile Petri la începutul lucrului nu trebuie să depășească în total mai mult de 800 microorganizme la 1m³.

46. Eficacitatea prelucrării mâinilor personalului implicat în procesele producere a produselor sanguine și soluțiilor perfuzabile și examinarea la sterilitate a proceselor și produselor sanguine se verifică la fiecare zi de lucru, nemijlocit în sala de activitate. Recolatarea probei pentru examinare are loc prin atingerea degetelor mâinilor personalului de suprafața mediului nutritiv și efectuarea unor mișcări circulare, după care cutia Petri se închide ermetic. Cutiile “însămânțate” se incubează la temperatura de plus 30°C plus 35°C în decurs de 48 ore. Rezultatele însămânțării mâinilor personalului trebuie să fie sterile.

47. Sterilitatea tegumentelor plicei cubitale a donatorilor de sînge/componente sanguine se verifică de 2 (două) ori pe săptămîină, prin însămânțarea lavajelor efectuate cu comprese de tifon special pregătite și sterilizate. Numărul lavajelor nu va fi mai mic de 3% din numărul de donatori deserviți în ziua examinării. După lavaj, compresa de tifon se introduce în eprubetă cu 10ml mediu tioglicolic. Însămânțările se incubează la temperatura plus 30°C plus 35°C în decurs de 48 ore. Însămânțările tegumentelor plicei cubitale a donatorului de sînge/componente sanguine trebuie să fie sterile.

48. Rezultatele de control a mâinilor și lavajelor se înregistrează în fișă/registru investigărilor microbiologice a lavajelor.

V. Dispoziții finale

49. Instrucțiunea privind controlul la sterilitate a produselor sanguine umane și soluțiilor perfuzabile este destinată pentru activitatea instituțiilor medico-sanitare care participă la recoltarea sîngelui/componentelor sanguine, producerea componentelor, preparatelor biomedicale din sînge și soluțiilor perfuzabile (centrele de transfuzie a sîngelui și instituțiile medico-sanitare ce realizează recoltarea sîngelui/componentelor sanguine umane).

50. Prezenta instrucțiune poate fi modificată și/sau completată la necesitate.

Bibliografie selectivă:

1. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 17 edition Strasbourg 2013;
2. Ghid de supraveghere și control în infecțiile nosocomiale, Chișinău 2009;
3. Ghid privind buna practică de fabricație a medicamentelor (GMP) de uz uman, Chișinău 2013;
4. Directiva Parlamentului European și a Consiliului 2003/94/CE din 08 octombrie 2003 despre stabilirea principiilor și orientărilor privind buna practică de fabricație cu privire la produsele medicamentoase de uz uman și medicamentele experimentale de uz uman;
5. Directiva Parlamentului European și a Consiliului 2002/98/CE din 27 ianuarie 2003 „Privind stabilirea standardelor de calitate și securitate pentru colectarea, testarea, prelucrarea, stocarea și distribuirea sângelui uman și a componentelor sanguine și de modificare a Directivei 2001/83/CE”;
6. Standardele internaționale ISO (ISO:15189 și ISO:15190) pentru laboratoarele medicale, îmbunătățirii calității investigațiilor de laborator și amplificării capacităților serviciului de laborator.