

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 7391-5 : 2005**

**ISO 10993-5 : 1999**

Xuất bản lần 1

**ĐÁNH GIÁ SINH HỌC TRANG THIẾT BỊ Y TẾ –  
PHẦN 5: PHÉP THỬ ĐỘC TÍNH TẾ BÀO IN VITRO**

*Biological evaluation of medical devices –  
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

**HÀ NỘI – 2008**



## Lời nói đầu

TCVN 7391-5 : 2005 hoàn toàn tương đương với ISO 10993-5 : 1999.

TCVN 7391-5 : 2005 do Tiểu ban Kỹ thuật Tiêu chuẩn TCVN/TC210/SC1 *Trang thiết bị y tế* biên soạn, trên cơ sở dự thảo đề nghị của Viện Trang thiết bị và Công trình y tế – Bộ Y tế, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng xét duyệt, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.

TCVN 7391 gồm các tiêu chuẩn sau, với tên chung *Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế*:

- TCVN 7391-1 : 2004 (ISO 10993-1 : 2003) Phần 1: Đánh giá và thử nghiệm.
- TCVN 7391-2 : 2005 (ISO 10993-2 : 1992) Phần 2: Yêu cầu sử dụng động vật.
- TCVN 7391-3 : 2005 (ISO 10993-3 : 2003) Phần 3: Phép thử độc tính di truyền, khả năng gây ung thư và độc tính sinh sản.
- TCVN 7391-4 : 2005 (ISO 10993-4 : 2002) Phần 4: Chọn phép thử tương tác với máu.
- TCVN 7391-5 : 2005 (ISO 10993-5 : 1999) Phần 5: Phép thử độc tính tế bào *in vitro*.
- TCVN 7391-7 : 2004 (ISO 10993-7 : 1995) Phần 7: Dư lượng sau tiệt trùng bằng etylen oxit.

Bộ tiêu chuẩn ISO 10993 còn các tiêu chuẩn sau:

- ISO 10993-6 : 1994 Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation.
- ISO 10993-9 : 1999 Biological evaluation of medical devices – Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products.
- ISO 10993-10 : 2002 Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity .
- ISO 10993-11 : 1993 Biological evaluation of medical devices – Part 11: Tests for systemic toxicity.

## **TCVN 7391-5 : 2005**

- ISO 10993-12 : 2002 Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials.
- ISO 10993-13 : 1998 Biological evaluation of medical devices – Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices.
- ISO 10993-14 : 2001 Biological evaluation of medical devices – Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics.
- ISO 10993-15 : 2000 Biological evaluation of medical devices – Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys.
- ISO 10993-16 : 1997 Biological evaluation of medical devices – Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables.
- ISO 10993-17 : 2002 Biological evaluation of medical devices – Part 17: Establishment of allowable limits for leachable substances.
- ISO 10993-18 : 2005 Biological evaluation of medical devices – Part 18: Chemical characterization of materials.

và ISO đang biên soạn:

- ISO 10993-19 Biological evaluation of medical devices – Part 19: Physico-chemical, mechanical and morphological characterization.
- ISO 10993-20 Biological evaluation of medical devices – Part 20: Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices.

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.

## Lời giới thiệu

Do khả năng áp dụng tổng hợp của phép thử độc tố *in vitro* sử dụng rộng rãi của phép thử trong đánh giá nhiều loại trang thiết bị và vật liệu y tế nên mục tiêu của phần này của TCVN 7391 (ISO 10993) rộng hơn là qui định cho một phép thử đơn, để xác định được chương trình thử nghiệm đòi hỏi đưa ra các qui định trong nhiều bước. Điều đó dẫn đến việc lựa chọn phép thử thích hợp nhất.

Có ba loại phép thử được liệt kê, bao gồm: phép thử chiết, phép thử tiếp xúc trực tiếp và phép thử tiếp xúc gián tiếp.

Việc lựa chọn một hoặc nhiều phép thử trên phụ thuộc vào bản chất mẫu thử được đánh giá, nơi sử dụng và bản chất sử dụng.

Vì vậy, việc lựa chọn xác định chi tiết cách chuẩn bị mẫu, chuẩn bị tế bào cấy và cách thức mà các tế bào tiếp xúc với mẫu thử hoặc chất chiết.

Việc đánh giá sự hiện diện và ảnh hưởng của độc tố diễn ra vào điểm cuối của thời gian tiếp xúc. Phần này của TCVN 7391 (ISO 10993) nhằm mở ra việc lựa chọn kiểu đánh giá. Cách thức này đòi hỏi có sẵn pin thử, phản ánh sự tiệm cận của nhiều nhóm ủng hộ cho phép thử sinh học *in vitro*.

Có thể nhóm một loạt phương pháp thử đã sử dụng và đo tại điểm cuối của phép xác định độc tố vào các kiểu nhóm đánh giá sau:

- a) đánh giá sự hư hỏng tế bào bằng phương pháp hình thái học;
- b) đo sự hư hỏng tế bào;
- c) đo sự sinh sôi tế bào;
- d) đo diện mạo đặc biệt của sự trao đổi chất tế bào.

Do vậy, ở mỗi kiểu đánh giá đều đưa ra các kết quả khác nhau. Để có thể so sánh được các kết quả trên thiết bị hoặc vật liệu giống nhau và để thực hiện được các phép thử nghiệm liên phòng, người nghiên cứu phải nắm rõ từng kiểu thử nghiệm và mỗi kiểu phải phù hợp với kỹ thuật riêng của nó.



## **Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế – Phần 5: Phép thử độc tính tế bào *in vitro***

*Biological evaluation of medical devices –  
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này mô tả các phương pháp thử để đánh giá độc tính tế bào *in vitro* của trang thiết bị y tế.

Các phương pháp này quy định việc ủ tế bào được nuôi cấy trực tiếp hoặc khuếch tán:

- a) với các chất chiết của một trang thiết bị, và/hoặc
- b) tiếp xúc với trang thiết bị.

Các phương pháp này được thiết kế để xác định phản ứng sinh học của các tế bào động vật có vú *in vitro* sử dụng các thông số sinh học phù hợp.

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 7391-1 : 2004 (ISO 10993-1 : 2003), Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế – Phần 1: Đánh giá và thử nghiệm.

## TCVN 7391-5 : 2005

ISO 10993-12 : 1996, Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials (Đánh giá sinh học trang thiết bị y tế – Phần 12: Chuẩn bị mẫu và vật liệu đối chứng).

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 7391-1 : 2004 (ISO 10993-1 : 2003) và các thuật ngữ định nghĩa sau:

#### 3.1

##### **Vật liệu đối chứng âm tính** (negative control material)

Vật liệu mà khi được thử theo tiêu chuẩn này không gây ra phản ứng độc tính của tế bào.

CHÚ THÍCH: Mục đích của đối chứng âm tính là để chứng minh phản ứng cơ sở. Ví dụ như polyetylen tỷ trọng cao<sup>1)</sup> để chế tạo polyme tổng hợp và chụp nhôm ôxit cần sử dụng trong nha khoa được sử dụng làm vật liệu đối chứng âm tính.

#### 3.2

##### **Vật liệu đối chứng dương tính** (positive control material)

Vật liệu mà khi được thử theo tiêu chuẩn này gây ra phản ứng độc tính tế bào có thể tái lập được.

CHÚ THÍCH: Mục đích của đối chứng dương tính là để chứng minh phản ứng hệ thống thử thích hợp. Ví dụ như thiếc organo-poly(vinylclorua)<sup>2)</sup> bền vững được dùng làm đối chứng dương tính cho các vật liệu rắn và các chất chiết. Ví dụ, độ pha loãng của phenol được dùng làm đối chứng dương tính cho các chất chiết.

#### 3.3

##### **Thuốc thử đối chứng** (reagent control)

Môi trường truyền không có vật liệu thử chịu các điều kiện chiết và các quy trình thử.

CHÚ THÍCH: Do mục đích của tiêu chuẩn này, định nghĩa này thay thế định nghĩa trong 3.1 của ISO 10993-12 :1996.

#### 3.4

##### **Dụng cụ nuôi cấy** (culture vessels)

---

<sup>1)</sup> Polyetylen tỷ trọng cao có thể nhận được từ U.S. Pharmacopeia (Rockville, Maryland, USA) và trung tâm an toàn thuốc và thực phẩm thuộc Viện Nghiên cứu Hatano (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257 – Japan). Đưa ra thông tin này nhằm giúp người sử dụng tiêu chuẩn dễ hiểu hơn và không phải là xác nhận của ISO về các sản phẩm.

<sup>2)</sup> Vật liệu đối chứng dương tính thiếc organo-poly(vinyl clorua) có sẵn từ SIMS Portex Ltd. Hythe, Ken, CT21 6JL, UK (số sản phẩm 499-300-000). Polyurethan ZDEC và ZDBC có sẵn tại trung tâm an toàn thuốc và thực phẩm thuộc Viện nghiên cứu Hatano (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257. Japan). Đưa ra thông tin này nhằm giúp người sử dụng tiêu chuẩn dễ hiểu hơn và không phải là xác nhận của ISO về sản phẩm.



Các dụng cụ phù hợp cho nuôi cấy tế bào, bao gồm đĩa thuỷ tinh Petri, bình nuôi cấy bằng nhựa hoặc đĩa nhiều khoang và vi chuẩn bằng nhựa.

CHÚ THÍCH: Các dụng cụ này có thể dùng thay thế cho nhau trong những phương pháp này, miễn là các dụng cụ này đáp ứng yêu cầu về loại nuôi cấy mô và phù hợp để dùng cho các tế bào động vật có vú.

### **3.5**

#### **Tiền hợp (subconfluency)**

Sự tụ hợp gần 80 %, ví dụ cuối giai đoạn sinh trưởng logarit.

## **4 Chuẩn bị mẫu**

### **4.1 Quy định chung**

Phép thử phải được tiến hành trên:

- a) chất chiết của vật liệu và/hoặc
- b) chính bản thân vật liệu.

Chuẩn bị mẫu theo ISO 10993-12.

### **4.2 Chuẩn bị chất chiết lỏng của vật liệu**

#### **4.2.1 Nguyên lý chiết**

Các điều kiện chiết mô phỏng hoặc khuyếch đại các điều kiện được sử dụng lâm sàng sao cho xác định được nguy cơ độc tính tiềm tàng mà không gây ra những thay đổi có ý nghĩa trong vật liệu thử, ví dụ như sự chảy hoặc biến đổi cấu trúc hoá học.

CHÚ THÍCH: Nồng độ của bất kỳ chất chiết trong hoặc ngoài, và lượng tiếp xúc với tế bào thử phụ thuộc vào vùng giao diện, thể tích chiết, pH, độ hoà tan hoá học, tốc độ khuyếch tán, độ thẩm thấu, nhiệt độ khuấy, thời gian và các yếu tố khác.

#### **4.2.2 Môi trường chiết**

Để khảo nghiệm tế bào động vật có vú, một hoặc các dung môi sau đây được sử dụng. Chọn môi trường chiết phải được xác minh là đúng:

- a) môi trường nuôi cấy có huyết thanh;
- b) môi trường nuôi cấy không có huyết thanh;
- c) dung dịch muối sinh lý (đẳng trương);

d) dung môi phù hợp khác.

CHÚ THÍCH: Chọn dung môi phải phản ảnh được mục đích của sự chiết và phải xem xét việc sử dụng cả dung môi có cực và dung môi không cực. Các dung môi phù hợp bao gồm nước tinh khiết, dầu thực vật và dimethyl sulfoxit (DMSO). Được biết DMSO là độc trong các hệ thống thử chọn lọc ở nồng độ lớn hơn 0,5 % (tỷ lệ thể tích).

### **4.2.3 Điều kiện chiết**

**4.2.3.1** Chiết phải được tiến hành trong hộp chứa kín, trơ về hoá học và vô trùng, sử dụng các kỹ thuật tiệt trùng, nhìn chung là phải tuân theo ISO 10993-12.

**4.2.3.2** Điều kiện chiết được khuyến nghị là :

- a) không ít hơn 24 giờ ở  $(37 \pm 2)$  °C;
- b)  $(72 \pm 2)$  giờ ở  $(50 \pm 2)$  °C;
- c)  $(24 \pm 2)$  giờ ở  $(70 \pm 2)$  °C;
- d)  $(1 \pm 0,2)$  giờ ở  $(121 \pm 2)$  °C.

Các điều kiện khuyến nghị có thể được áp dụng theo các đặc trưng trang thiết bị và điều kiện sử dụng cụ thể.

Các quy trình chiết sử dụng môi trường nuôi cấy có huyết thanh có thể chỉ được sử dụng trong điều kiện quy định trong 4.2.3.2.a).

**4.2.3.3** Nếu chất chiết được lọc, ly tâm hoặc xử lý bởi các phương pháp khác trước khi ứng dụng vào tế bào, thì bắt buộc phải có báo cáo tổng kết (xem điều 9). Bất kỳ sự điều chỉnh pH của chất chiết nào đều phải được báo cáo. Thao tác với chất chiết, ví dụ bằng cách điều chỉnh pH, có thể ảnh hưởng đến kết quả.

### **4.3 Chuẩn bị vật liệu cho các phép thử tiếp xúc trực tiếp**

**4.3.1** Vật liệu có hình dạng, cỡ hoặc trạng thái vật lý khác nhau (ví dụ lỏng hoặc rắn) có thể được thử nghiệm không cần biến đổi trong các khảo nghiệm độc tính tế bào.

Mẫu thử dạng rắn nên có ít nhất một bề mặt bằng phẳng.

Phải tiến hành điều chỉnh đối với các dạng và các trạng thái vật lý khác.

**4.3.2** Phải xem xét độ vô trùng của các mẫu thử.

**4.3.2.1** Vật liệu thử từ các trang thiết bị vô trùng phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng trong suốt quá trình thử.

**4.3.2.2** Vật liệu thử là các trang thiết bị được cung cấp thường không tiệt trùng, nhưng trước khi sử dụng phải được tiệt trùng bằng phương pháp được nhà sản xuất khuyến nghị và tiến hành trong điều kiện vô trùng trong suốt quá trình thử.

Ảnh hưởng của các phương pháp tiệt trùng hoặc tác nhân đến trang thiết bị phải được xem xét cụ thể khi chuẩn bị vật liệu thử trước khi sử dụng trong hệ thống thử.

**4.3.2.3** Vật liệu thử là các trang thiết bị không yêu cầu vô trùng khi sử dụng phải được cung cấp và tiến hành trong điều kiện vô trùng trong suốt quá trình thử.

**4.3.3** Các chất lỏng phải được thử bằng:

- a) lỏng đọng trực tiếp; hoặc
- b) lỏng đọng trên một chất nền hấp thụ trở về mặt sinh học.

CHÚ THÍCH: Các đĩa lọc phải phù hợp.

**4.3.4** Nếu phù hợp thì các vật liệu được xem là siêu hấp thụ phải được nhấn chìm trong môi trường nuôi cấy trước khi thử nghiệm để ngăn cản sự hút thấm của môi trường nuôi cấy trong dụng cụ thử nghiệm.

## 5 Các dòng tế bào

**5.1** Các dòng tế bào đã thiết lập được ưu tiên và khi được sử dụng phải nhận từ kho chứa đã được công nhận<sup>3)</sup>.

**5.2** Khi cần độ nhạy riêng, thì nuôi tế bào gốc, các dòng tế bào và cơ quan nuôi cấy nhận được trực tiếp từ các mô sống chỉ được sử dụng nếu chứng minh được độ tái lập và độ chính xác của phản ứng.

**5.3** Nếu nuôi cấy dự trữ của một dòng tế bào được dự trữ, phải bảo quản ở – 80 °C hoặc thấp hơn trong môi trường tương ứng nhưng chứa chất chống tạo tinh thể, ví dụ dimethylsulfoxit hoặc glycerol. Bảo quản lâu dài (vài tháng đến nhiều năm) chỉ có thể tiến hành ở – 130 °C hoặc thấp hơn.

**5.4** Chỉ được dùng những tế bào không mang nấm nguyên sinh để thử. Trước khi sử dụng, dịch nuôi cấy dự trữ phải được kiểm tra xem có nấm nguyên sinh hay không.

---

<sup>3)</sup> Ví dụ, các dòng tế bào được khuyến nghị là bộ sưu tập giống chuẩn của Hoa Kỳ CCL 1 (dòng NCTC 929), CCL 163 (dòng Balb/3T3 A31), CCL (MRC – 5), CCL 81 (Vero) và CCL 10 [(BHK – 21 C 13)] và V – 79 397A. Đưa ra thông tin này nhằm giúp người sử dụng tiêu chuẩn này để hiểu hơn và không phải là xác nhận của ISO về các sản phẩm đã nêu tên. Các dòng tế bào khác có thể được sử dụng nếu chúng có thể cho các kết quả tương tự hoặc tương ứng.

## 6 Môi trường nuôi cấy

6.1 Môi trường nuôi cấy phải vô trùng.

6.2 Môi trường nuôi cấy có hoặc không có huyết thanh phải đáp ứng các yêu cầu sinh trưởng của dòng tế bào đã chọn.

CHÚ THÍCH: Kháng sinh có thể thêm vào môi trường miễn là chúng không ảnh hưởng có hại đến khảo nghiệm.

Sự ổn định môi trường nuôi cấy biến đổi theo thành phần và điều kiện bảo quản. Môi trường chứa huyết thanh và glutamin phải được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C trong thời gian không lâu hơn một tuần. Môi trường glutamin không có huyết thanh phải được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C trong thời gian không lâu hơn hai tuần.

6.3 Môi trường nuôi cấy phải được duy trì ở độ pH từ 7,2 đến 7,4.

## 7 Chuẩn bị nuôi cấy dự trữ tế bào

7.1 Sử dụng dòng tế bào và môi trường nuôi cấy đã chọn, chuẩn bị đủ tế bào để hoàn thành phép thử. Nếu tế bào được nuôi cấy từ dịch nuôi cấy dự trữ, phải loại chất chống tạo tinh thể nếu có. Tiền nuôi cấy tế bào phải được tiến hành ít nhất một lần trước khi sử dụng.

7.2 Loại bỏ và hoà tan tế bào nhờ phân tách bằng enzym và/hoặc cơ học, sử dụng một phương pháp phù hợp cho dòng tế bào.

## 8 Quy trình thử

### 8.1 Số lần thử

Tối thiểu là ba lần đối với mẫu thử và đối chứng.

### 8.2 Phép thử trên chất chiết

8.2.1 Phép thử này cho phép đánh giá độc tính tế bào cả về lượng và chất.

8.2.2 Dùng pipét lấy một lượng dịch huyền phù tế bào khuấy liên tục, cho vào mỗi bình vừa đủ để tiếp xúc với chất chiết. Quay nhẹ bình để phân bố đều tế bào trên bề mặt mỗi bình.

8.2.3 Ủ dịch nuôi cấy ở  $(37 \pm 2)$  °C trong môi trường không khí có hoặc không có 5 % cacbon dioxit (tỷ lệ thể tích) phù hợp cho hệ thống đệm đã chọn cho môi trường nuôi cấy.

Phép thử phải tiến hành trên một tầng đơn tiền hợp hoặc trên các tế bào mới hoà tan.

Trong khảo nghiệm hình thành khuẩn lạc, phải sử dụng mật độ tế bào thấp phù hợp.

**8.2.4** Phải xác nhận độ tiền hợp và hình thái của dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu thử.

**8.2.5** Tiến hành phép thử trên

a) chất chiết gốc; và

b) các nồng độ pha loãng chất chiết, dùng môi trường nuôi cấy làm chất pha loãng.

Nếu dùng các tầng đơn cho phép thử, loại bỏ môi trường nuôi cấy khỏi dịch nuôi cấy và thêm một lượng nhỏ chất chiết hoặc dịch pha loãng vào mỗi bình.

Nếu dùng các tầng đơn cho phép thử, thêm chất chiết hoặc dịch pha loãng vào mỗi bình lặp lại ngay sau khi chuẩn bị dịch huyền phù tế bào.

**8.2.6** Khi dùng chất chiết phi sinh lý, ví dụ như nước, chất chiết phải được thử ở nồng độ tương hợp sinh lý cao nhất sau khi pha loãng trong môi trường nuôi cấy.

CHÚ THÍCH: Môi trường nuôi cấy đậm đặc, ví dụ gấp 2 lần, 5 lần, được khuyến nghị sử dụng khi pha loãng các chất chiết lỏng.

**8.2.7** Thêm lượng đã biết của các tác nhân và các đối chứng âm tính và dương tính vào các bình lặp lại bổ sung.

CHÚ THÍCH: Nếu thích hợp, có thể kiểm tra đối chứng là môi trường nuôi cấy tươi.

**8.2.8** Ủ các bình cùng điều kiện như đã mô tả trong 8.2.3, đối với một giai đoạn thích hợp tương ứng với khảo nghiệm cụ thể đã chọn.

**8.2.9** Sau giai đoạn ủ ít nhất 24 giờ, xác định độc tính tế bào theo 8.5.

### **8.3 Phép thử bằng tiếp xúc trực tiếp**

**8.3.1** Phép thử này cho phép đánh giá độc tính tế bào cả về lượng và chất.

**8.3.2** Dùng pipét lấy một lượng dịch huyền phù tế bào được khuấy liên tục cho vào mỗi bình một lượng vừa đủ để tiếp xúc với một chất chiết. Quay nhẹ bình để phân bố đều tế bào trên bề mặt mỗi bình.

**8.3.3** Ủ dịch nuôi cấy ở  $(37 \pm 2)$  °C trong môi trường không khí có hoặc không có 5 % cacbon dioxid (tỷ lệ thể tích) phù hợp cho hệ thống đệm đã chọn cho môi trường nuôi cấy đến khi dịch nuôi cấy phát triển thành dạng tiền hợp.

**8.3.4** Xác minh độ tiền hợp và hình thái dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu thử nghiệm.

**8.3.5** Loại bỏ môi trường nuôi cấy. Sau đó thêm môi trường nuôi cấy tươi vào mỗi bình.

**8.3.6** Đặt cẩn thận các mẫu riêng biệt của mẫu thử lên tầng tế bào ở trung tâm của mỗi bình lặp lại. Bảo đảm rằng mẫu bao phủ xấp xỉ 1/10 bề mặt tầng tế bào.

Chú ý ngăn cản sự dịch chuyển không cần thiết của mẫu, vì điều này có thể gây ra tổn thương vật lý cho tế bào, ví dụ như các miếng kết nối của các tế bào bị bật ra.

CHÚ THÍCH: Khi phù hợp, mẫu có thể được đặt trong bình nuôi cấy trước khi thêm tế bào.

**8.3.7** Chuẩn bị bình lặp lại cho vật liệu làm đối chứng cả âm tính và dương tính.

**8.3.8** Ủ các bình trong cùng điều kiện như mô tả trong 8.3.3 trong một giai đoạn phù hợp (tối thiểu là 24 giờ) tương ứng với khảo nghiệm cụ thể đã chọn.

**8.3.9** Loại bỏ môi trường nuôi cấy nổi trên mặt và xác định ảnh hưởng độc tính tế bào theo 8.5.

## **8.4 Phép thử bằng tiếp xúc gián tiếp**

### **8.4.1 Phép thử khuếch tán thạch**

**8.4.1.1** Phép thử này cho phép đánh giá định tính độc tính tế bào. Khảo nghiệm này không phù hợp cho các chất có thể thẩm thấu mà không khuếch tán được qua tầng thạch hoặc phản ứng với thạch.

**8.4.1.2** Lấy bằng pipét một lượng đã biết dịch huyền phù tế bào được khuấy liên tục cho vào mỗi bình trong số bình lặp lại vừa đủ cho phép thử. Quay ngang nhẹ mỗi bình để phân bố đều tế bào trên bề mặt.

**8.4.1.3** Ủ dịch nuôi cấy ở  $(37 \pm 2)$  °C trong môi trường không khí có hoặc không có 5 % cacbon dioxit (tỷ lệ thể tích) phù hợp cho hệ thống đệm đã chọn cho môi trường nuôi cấy đến khi dịch nuôi cấy phát triển xấp xỉ dạng tiền hợp ở cuối giai đoạn logarit của đường cong phát triển.

**8.4.1.4** Xác minh độ tiền hợp và hình thái học của dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu thử.

**8.4.1.5** Loại bỏ môi trường nuôi cấy khỏi bình. Sau đó trộn môi trường nuôi cấy tươi chứa huyết thanh với thạch chảy để nhận được nồng độ thạch cuối cùng từ 0,5 % đến 2 % và dùng pipét lấy một lượng thích hợp cho vào mỗi bình. Chỉ sử dụng thạch phù hợp cho sinh trưởng của tế bào động vật có vú khi nuôi cấy. Hỗn hợp môi trường nuôi cấy thạch phải ở trạng thái lỏng và ở nhiệt độ tương thích với tế bào động vật có vú.

CHÚ THÍCH: Thạch có sẵn với độ tinh khiết và khoảng phân tử lượng khác nhau.

**8.4.1.6** Đặt cẩn thận các mẫu lặp lại của mẫu thử lên tầng thạch rắn trong mỗi bình. Bảo đảm rằng mẫu bao phủ kín khoảng 1/10 bề mặt tầng tế bào.

Để tránh sự khử nước của thạch, phải nhúng vật liệu hấp thụ vào môi trường nuôi cấy trước khi đặt lên thạch.

**8.4.1.7** Chuẩn bị các bình lặp lại với cả các mẫu đối chứng âm tính và dương tính.

**8.4.1.8** Ủ các bình, sử dụng cùng điều kiện như mô tả trong 8.4.1.3 trong khoảng từ 24 đến 72 giờ.

**8.4.1.9** Kiểm tra tế bào để xác định độc tính tế bào trước và sau khi chuyển cẩn thận mẫu khỏi thạch.

Dùng một chất nhuộm sống, ví dụ như đỏ trung tính, có thể giúp phát hiện độc tính tế bào. Chất nhuộm sống có thể được thêm trước hoặc sau khi ủ với mẫu. Nếu chất nhuộm được thêm vào trước khi ủ, phải bảo vệ dịch nuôi cấy khỏi ánh sáng để ngăn cản sự phá huỷ tế bào gây ra bởi quá trình quang hoạt hoá của chất nhuộm.

## **8.4.2 Phép thử lọc khuếch tán**

**8.4.2.1** Phép thử này cho phép đánh giá độc tính tế bào về chất.

**8.4.2.2** Đặt một màng lọc không có chất hoạt tính bề mặt với kích thước lỗ 0,45 µm vào mỗi bình và thêm một lượng đã biết dịch huyền phù tế bào khuấy liên tục vào mỗi bình trong số bình lặp lại vừa đủ cho phép thử. Quay nhẹ bình để phân phối đều tế bào lên bề mặt của mỗi màng lọc.

**8.4.2.3** Ủ dịch nuôi cấy ở  $(37 \pm 2)$  °C trong môi trường không khí có hoặc không có 5 % cacbon dioxit (tỷ lệ thể tích) phù hợp cho hệ thống đệm đã chọn cho môi trường nuôi cấy đến khi dịch nuôi cấy phát triển xấp xỉ dạng tiền hợp ở cuối giai đoạn logarit của đường cong phát triển.

**8.4.2.4** Xác định độ tiền hợp và hình thái học của dịch nuôi cấy bằng kính hiển vi trước khi bắt đầu phép thử.

**8.4.2.5** Loại bỏ môi trường nuôi cấy khỏi các bình. Sau đó chuyển màng lọc quay mặt dưới có tế bào lên tầng thạch rắn (xem 8.4.1.6).

**8.4.2.6** Đặt cẩn thận mẫu thử lặp lại lên mặt không có tế bào (phía trên) của màng lọc. Giữ lại chất chiết lỏng và các hợp chất mới trộn trong vòng vô hoạt đặt trên màng lọc.

**8.4.2.7** Chuẩn bị các màng lọc lặp lại với cả các mẫu đối chứng âm tính và dương tính.

8.4.2.8 Ủ các bình, sử dụng cùng điều kiện như mô tả trong 8.4.2.3 trong 2 giờ  $\pm$  10 phút.

8.4.2.9 Chuyển cẩn thận mẫu khỏi màng lọc và tách màng lọc cẩn thận khỏi bề mặt thạch.

8.4.2.10 Xác minh các tác động độc tính tế bào bằng quy trình nhuộm phù hợp.

## 8.5 Xác định độc tính tế bào

8.5.1 Xác định các tác động độc tính tế bào bằng phương pháp định lượng hoặc định tính.

a) **Đánh giá định tính:** kiểm tra các tế bào hiển vi bằng cách dùng chất nhuộm tế bào nếu cần. Đánh giá các thay đổi, ví dụ về hình thái học khái quát, không bào hoá, sự tách ra, dung giải tế bào và hợp màng. Thay đổi về hình thái học thông thường có thể được ghi lại trong báo cáo thử theo kiểu mô tả hoặc định lượng. Có thể xếp loại các vật liệu thử theo các thang sau:

Thang độc tính tế bào	Giải thích
0	Không có độc tính tế bào
1	Độc tính tế bào nhẹ
2	Độc tính tế bào trung bình
3	Độc tính tế bào nặng

Phương pháp đánh giá và kết quả đánh giá phải được đưa vào báo cáo thử nghiệm.

b) **Đánh giá định lượng:** đo tham số tế bào chết, sự ức chế sinh trưởng tế bào, sự tăng sinh tế bào hoặc hình thành khuẩn lạc. Số lượng tế bào, lượng protein, sự giải phóng enzym, sự giải phóng chất nhuộm sống, sự giảm chất nhuộm sống hoặc các thông số có thể đo được có thể được xác định về lượng bằng các phương tiện cụ thể. Phương pháp đo và kết quả phải được ghi lại trong báo cáo thử nghiệm.

CHÚ THÍCH: Đối với các phương pháp cụ thể xác định độc tính tế bào, thời gian định điểm 0 hoặc đối chứng nuôi cấy tế bào nằm ở vạch ranh giới có thể cần thiết.

8.5.2 Bảo đảm lựa chọn cẩn thận các phương pháp đánh giá, vì các kết quả thử có thể không có giá trị nếu mẫu thử giải phóng các chất gây nhiễu hệ thống thử hoặc đo lường.

CHÚ THÍCH: Vật liệu có thể giải phóng formalđehit chỉ có thể được kiểm tra một cách tin cậy khi đánh giá được khả năng sống của tế bào.

8.5.3 Nếu có sự khác nhau rõ ràng trong kết quả thử cho các bình nuôi cấy lặp lại, thì các phép thử hoặc là không thích hợp hoặc là không có giá trị.



**8.5.4** Nếu các đối chứng âm tính, dương tính hoặc các đối chứng khác (tham khảo, môi trường, mẫu trắng, tác nhân,...) không có phản ứng mong đợi trong hệ thống thử, thì sau đó phải lặp lại khảo nghiệm.

## **9 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các chi tiết sau đây :

- a) mô tả mẫu;
- b) dòng tế bào và xác minh sự lựa chọn là đúng;
- c) môi trường nuôi cấy;
- d) phương pháp khảo nghiệm và thuyết minh cơ sở lựa chọn;
- e) phương pháp chiết (nếu phù hợp) và nếu có thể, bản chất và nồng độ của chất lọc;
- f) các đối chứng âm tính, dương tính và đối chứng khác;
- g) phản ứng tế bào và các quan sát khác; và
- h) bất kỳ số liệu tương ứng cần cho đánh giá kết quả.

## **10 Đánh giá kết quả**

Đánh giá đồng bộ kết quả phải được tiến hành bởi một nhân viên có khả năng xử lý được thông tin dựa trên số liệu thử. Nếu các kết quả không nhất quán trong số các lần lặp lại hoặc không có giá trị thì phải lặp lại phép thử.

---