

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8583:2010

ISO 14161:2009

**TIỆT KHUẨN SẢN PHẨM CHĂM SÓC SỨC KHỎE -
CHẤT CHỈ THỊ SINH HỌC - HƯỚNG DẪN LỰA CHỌN,
SỬ DỤNG VÀ TRÌNH BÀY KẾT QUẢ.**

*Sterilization of health care products - Biological indicators -
Guidance for the selection, use and interpretation of results.*

HÀ NỘI - 2010

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu	5
Lời giới thiệu	6
1 Phạm vi áp dụng	7
2 Tài liệu viện dẫn	7
3 Thuật ngữ và định nghĩa.....	8
4 Quy định chung	13
5 Đặc tính của chất chỉ thị sinh học	15
6 Lựa chọn nhà cung cấp.....	18
7 Chất chỉ thị sinh học trong triển khai quá trình.....	21
8 Chất chỉ thị sinh học dùng trong đánh giá xác nhận tiệt khuẩn.....	24
9 Chất chỉ thị sinh học dùng trong theo dõi thường quy	26
10 Kết quả.....	28
11 Áp dụng các tiêu chuẩn về chất chỉ thị sinh học	29
12 Điều kiện nuôi cấy.....	37
13 Yêu cầu đối với bên thứ ba	39
14 Đào tạo nhân sự.....	41
15 Bảo quản và xử lý	41
16 Thải chất chỉ thị sinh học.....	41
Phụ lục A (tham khảo) - Tính động học của sự khử hoạt tính vi sinh vật và kỹ thuật đếm.....	42
Phụ lục B (tham khảo) - Thiết bị kiểm chứng quá trình	48
Phụ lục C (tham khảo) - Công thức dùng cho phương pháp tỷ lệ âm tính để tính giá trị D	50
Phụ lục D (tham khảo) - Ví dụ tài liệu về chất chỉ thị sinh học do người sử dụng chuẩn bị	68
Phụ lục E (tham khảo) - Tính giá trị z	73
Phụ lục F (tham khảo) - Xác định giá trị D bằng phương pháp đường cong sống	76
Phụ lục G (tham khảo) - Đặc tuyến đáp ứng tồn tại-tiêu diệt.....	81
Thư mục tài liệu tham khảo.....	83

Lời nói đầu

TCVN 8583:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 14161:2009;

TCVN 8583:2010 do Viện Trang thiết bị và Công trình y tế biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này cung cấp hướng dẫn lựa chọn, sử dụng và trình bày kết quả của chất chỉ thị sinh học khi dùng để triển khai, đánh giá xác nhận và theo dõi các quá trình tiệt khuẩn. Các quy trình mô tả trong tiêu chuẩn này mang tính chất chung và bản thân chúng không cấu thành một chương trình triển khai, đánh giá xác nhận hoặc theo dõi toàn diện việc tiệt khuẩn các sản phẩm chăm sóc sức khỏe. Mục đích của tiêu chuẩn này không nhằm bắt buộc sử dụng các chất chỉ thị sinh học trong một quá trình nhưng nếu chúng được sử dụng thì tiêu chuẩn đưa ra hướng dẫn lựa chọn và sử dụng đúng nhằm ngăn ngừa các kết quả sai.

Trong tiêu chuẩn này, người sử dụng sẽ tìm thấy hướng dẫn về lựa chọn chất chỉ thị sinh học đúng cho quá trình tiệt khuẩn cụ thể và các thông số quan trọng cũng như hướng dẫn về sử dụng phù hợp.

Người sử dụng nên chọn chất chỉ thị sinh học phù hợp với phương pháp cụ thể được sử dụng. Có nhiều phương pháp tiệt khuẩn khác nhau được sử dụng phổ biến, và các nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học không thể lường trước được mọi khả năng sử dụng sản phẩm có thể xảy ra. Do đó, nhà sản xuất ghi nhãn chất chỉ thị sinh học theo mục đích sử dụng dự kiến của chúng. Trách nhiệm của người sử dụng là lựa chọn, sử dụng, khôi phục và giải thích các kết quả phù hợp với phương pháp tiệt khuẩn cụ thể sử dụng.

Tính năng được chứng nhận của chất chỉ thị sinh học có thể bị ảnh hưởng bất lợi bởi điều kiện bảo quản và vận chuyển trước khi sử dụng, bởi cách sử dụng chất chỉ thị sinh học hoặc do các thông số của phương pháp tiệt khuẩn. Ngoài ra, quy trình ủ sử dụng sau khi thực hiện quá trình, bao gồm cả nhiệt độ tăng nhanh và loại môi chất cấy, nhà cung cấp và lô cụ thể, có thể ảnh hưởng đến sức kháng xác định được như một chức năng phục hồi và tăng trưởng. Vì thế, cần phải tuân thủ các khuyến nghị của nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học đối với việc bảo quản và sử dụng. Sau khi tiếp xúc, chất chỉ thị sinh học cần được chuyển (nếu có thể) và ủ vô khuẩn như quy định của nhà sản xuất.

Cần chú ý rằng chất chỉ thị sinh học không nhằm chỉ ra rằng sản phẩm được tiệt khuẩn là vô khuẩn. Chất chỉ thị sinh học được dùng để kiểm nghiệm hiệu lực của phương pháp tiệt khuẩn cho trước và thiết bị sử dụng, bằng cách đánh giá khả năng tiệt khuẩn theo khái niệm mức đảm bảo vô khuẩn. Nhân viên được đào tạo phù hợp cần tiến hành những nghiên cứu này.

Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học – Hướng dẫn lựa chọn, sử dụng và trình bày kết quả

Sterilization of health care products –

Biological indicators – Guidance for the selection, use and interpretation of results

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này cung cấp hướng dẫn lựa chọn, sử dụng và trình bày kết quả từ việc ứng dụng chất chỉ thị sinh học khi được sử dụng trong triển khai, đánh giá xác nhận và theo dõi thường quy các quá trình tiệt khuẩn.

CHÚ THÍCH 1 Xem ví dụ, bộ tiêu chuẩn ISO 11138.

CHÚ THÍCH 2 Thông tin chung trong tiêu chuẩn này có thể áp dụng hữu ích đối với các phương pháp và các chất chỉ thị sinh học hiện chưa được đề cập trong các tiêu chuẩn hiện hành, ví dụ như các phương pháp tiệt khuẩn mới và đang xây dựng.

Tiêu chuẩn này không xem xét các phương pháp chỉ dựa trên việc loại trừ vi sinh vật tự nhiên, ví dụ như lọc.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho các quá trình kết hợp sử dụng, ví dụ, máy giặt tẩy hoặc rửa và làm nóng đường ống.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho các quá trình tiệt khuẩn chất lỏng.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là cần thiết để áp dụng tiêu chuẩn này. 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, bổ sung (nếu có).

TCVN 7392-1 (ISO 11135-1), Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Etylen oxit – Phần 1: Yêu cầu về triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiệt khuẩn thiết bị y tế

ISO 11138-1:2006, Sterilization of health care products – Biological indicators – Part 1: General requirements (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học – Phần 1: Yêu cầu chung)

TCVN 8583:2010

ISO 11138-2, Sterilization of health care products – Biological indicators – Part 2: Biological indicators for ethylene oxide sterilization processes (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học – Phần 2: Chất chỉ thị sinh học dùng cho quá trình tiệt khuẩn etylen oxit)

ISO 11138-3, Sterilization of health care products – Biological indicators – Part 3: Biological indicators for moist heat sterilization processes (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học – Phần 3: Chất chỉ thị sinh học dùng cho quá trình tiệt khuẩn nóng ẩm)

ISO 11138-4, Sterilization of health care products – Biological indicators – Part 4: Biological indicators for dry heat sterilization processes (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học – Phần 4: Chất chỉ thị sinh học dùng cho quá trình tiệt khuẩn nóng khô)

ISO 11138-5, Sterilization of health care products – Biological indicators – Part 5: Biological indicators for low-temperature steam and formaldehyde sterilization processes (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học – Phần 5: Chất chỉ thị sinh học dùng cho quá trình tiệt khuẩn hơi nhiệt độ thấp và fomandehyd)

ISO 11737-1, Sterilization of medical devices — Microbiological methods — Part 1: Determination of a population of microorganisms on products (Tiệt khuẩn thiết bị y tế – Phương pháp vi sinh – Phần 1: Xác định quần thể vi sinh vật trên sản phẩm)

TCVN 8582 (ISO 14937), Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Yêu cầu chung đối với đặc tính của tác nhân tiệt khuẩn, triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiệt khuẩn thiết bị y tế

ISO 17665-1, Sterilization of health care products – General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development validation and routine control of a sterilization process for medical devices (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Nóng ẩm – Phần 1: Yêu cầu về việc triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiệt khuẩn thiết bị y tế)

ISO 18472:2006, Sterilization of health care products – Biological and chemical indicators – Test equipment (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất chỉ thị sinh học và hóa học – Thiết bị thử)

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau

3.1

Công nhận (accreditation)

Quy trình trong đó cơ quan được ủy quyền đưa ra thừa nhận chính thức rằng tổ chức hoặc cá nhân đủ năng lực để tiến hành những nhiệm vụ cụ thể

CHÚ THÍCH 1 Xem ISO/IEC 17011 [3].

CHÚ THÍCH 2 Công nhận không phải là thừa nhận một phòng thí nghiệm để phê chuẩn một sản phẩm cụ thể bất kỳ. Tuy nhiên, việc công nhận có thể liên quan đến các cơ quan có thẩm quyền phê duyệt và chứng nhận khi họ quyết định việc có chấp nhận dữ liệu do phòng thí nghiệm đưa ra liên quan đến hoạt động của họ hay không.

3.2

Kỹ thuật vô khuẩn (aseptic technique)

Điều kiện và quy trình dùng để loại trừ việc nhiễm khuẩn

3.3

Vi sinh vật tạp nhiễm (bioburden)

Quần thể vi sinh vật sống trên, trong sản phẩm và/hoặc hệ thống ngăn vô khuẩn

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.2]

3.4

Chất chỉ thị sinh học (biological indicator)

BI

Hệ thống thử chứa vi sinh vật sống có sức đề kháng nhất định đối với quá trình tiệt khuẩn quy định

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.3]

3.5

Giá trị D (D value)

Giá trị D_{10} (D_{10} value)

Thời gian hoặc liều cần thiết để khử 90 % hoạt tính quần thể vi sinh vật thử trong các điều kiện quy định

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.11]

3.6

Thời gian duy trì (holding time)

Khoảng thời gian để việc tiệt khuẩn thay đổi trong phạm vi máy tiệt khuẩn và tại mọi điểm trong tải liên tục trong phạm vi giới hạn quy định cho giai đoạn tiệt khuẩn đó

3.7

Vật liệu mang chủng (inoculated carrier)

Vật liệu phụ trợ trên hoặc trong đó có đặt một số lượng xác định các sinh vật sống để thí nghiệm

CHÚ THÍCH 1 Xem ISO/IEC 11138-1.

CHÚ THÍCH 2 Sinh vật thí nghiệm là vi sinh vật dùng để sản xuất các vật liệu mang chủng.

3.8

Chứng nhận lắp đặt (installation qualification)

IQ

Quá trình thu và ghi lại bằng chứng mà thiết bị đã được cung cấp và lắp đặt theo đúng quy định kỹ thuật

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.22]

TCVN 8583:2010

3.9

Cấy chủng (inoculation)

Việc bổ sung một lượng xác định của một thực thể vi khuẩn đặc trưng vào hoặc lên một cá thể

3.10

Giảm theo loga (log reduction)

LR

Việc giảm số lượng vi sinh vật sống, tính theo đơn vị loga

3.11

Xác nhận chất lượng vận hành (operational qualification)

OQ

Quá trình thu và ghi lại bằng chứng thiết bị được lắp đặt, vận hành trong phạm vi giới hạn xác định trước khi được sử dụng theo quy trình vận hành của thiết bị

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.27]

3.12

Xác nhận chất lượng tính năng (performance qualification)

PQ

Quá trình thu và ghi lại bằng chứng rằng thiết bị, khi lắp đặt vận hành theo quy trình vận hành thiết bị, tuân thủ theo đúng các tiêu chí xác định trước và từ đó rút ra sản phẩm đáp ứng quy định kỹ thuật

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.30]

3.13

Thiết bị kiểm chứng quá trình (process challenge device)

PCD

Hạng mục được thiết kế để tạo nên một khả năng xác định chịu quá trình tiệt khuẩn và dùng để đánh giá hiệu năng của quá trình

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.33]

3.14

Vị trí kiểm chứng quá trình (process challenge location)

PCL

Vị trí mô phỏng điều kiện được cho là "trường hợp xấu nhất" trong hàng hóa cần được tiệt khuẩn khi đưa (các) tác nhân tiệt khuẩn vào

3.15

Thông số quá trình (process parameter)

Giá trị quy định đối với một biến quá trình

CHÚ THÍCH Quy định về một quá trình tiệt khuẩn bao gồm các thông số quá trình và dung sai của chúng.
[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.34]

3.16

Biến số quá trình (process variable)

Điều kiện có thể thay đổi trong quá trình tiệt khuẩn làm thay đổi tính hiệu lực của tác nhân tiệt khuẩn
VÍ DỤ Thời gian, nhiệt độ, áp suất, nồng độ, độ ẩm, bước sóng.
[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.35]

3.17

Vì sinh vật đối chứng (reference microorganism)

Dòng vi khuẩn thu được từ chủng vi sinh vật được công nhận
[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.39]

3.18

Thiết bị đo các tổ hợp đối chứng (resistometer)

Thiết bị thử được thiết kế để đo các tổ hợp đối chứng xác định gồm các biến vật lý và/hoặc hóa học của quá trình tiệt khuẩn

CHÚ THÍCH 1 Lấy từ ISO 11138-1, định nghĩa 3.15 và ISO 18472:2006, định nghĩa 3.11.

CHÚ THÍCH 2 Còn được gọi là Resistometer đánh giá chỉ số sinh học (BIER).

3.19

Giảm loga bào tử (spore-log-reduction)

SLR

Loga của quần thể bào tử ban đầu, N_0 , trừ đi loga của quần thể cuối, N_f

3.20

Vô khuẩn (sterile)

Không có các vi sinh vật sống
[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.43]

3.21

Mức đảm bảo vô khuẩn (sterility assurance level)

SAL

Số vi sinh vật sống trên một cá thể sau khi tiệt khuẩn

CHÚ THÍCH Thuật ngữ SAL có giá trị định lượng, thường là 10^{-6} hoặc 10^{-3} . Khi áp dụng giá trị định lượng này nhằm đảm bảo tính vô khuẩn, SAL bằng 10^{-6} có giá trị thấp hơn nhưng cho mức đảm bảo vô khuẩn cao hơn là SAL bằng 10^{-3} .

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.46]

3.22

Sự tiệt khuẩn (sterilization)

Quy trình đã được xác nhận dùng để làm cho sản phẩm không còn các vi sinh vật sống

CHÚ THÍCH Trong quá trình tiệt khuẩn, tính chất của sự khử hoạt tính vi khuẩn là hàm mũ và do đó sự sống của vi sinh vật trên một cá thể riêng có thể biểu thị theo xác suất. Trong khi xác suất này có thể giảm tới một số rất nhỏ nhưng không bao giờ có thể giảm về không.

[ISO/TS 11139, định nghĩa 2.47]

3.23

Triển khai chu trình tiệt khuẩn (sterilization cycle development)

Quy trình xác định các thông số xử lý phù hợp nhất quán với việc đạt được các quy định mong muốn và tuyên bố trên nhãn đối với một sản phẩm hoặc nhóm sản phẩm xác định

3.24

Đánh giá xác nhận chu trình tiệt khuẩn (sterilization cycle validation)

Quy trình được lập thành văn bản đối với việc thu nhận, ghi lại và thể hiện các kết quả cần thiết để thiết lập việc quá trình sẽ làm cho sản phẩm tuân thủ với các quy định xác định trước

3.25

Nhà cung cấp (supplier)

Tổ chức hoặc cá nhân cung cấp sản phẩm

VÍ DỤ Người sản xuất, người phân phối, người bán lẻ sản phẩm hoặc người cung cấp dịch vụ hoặc thông tin.

CHÚ THÍCH 1 Người cung cấp có thể ở bên trong hoặc bên ngoài tổ chức.

CHÚ THÍCH 2 Trong trường hợp hợp đồng, người cung cấp đôi khi được gọi là "nhà thầu".

[TCVN ISO 9000, định nghĩa 3.3.6]

3.26

Cửa sổ tồn tại-tiêu diệt (survival-kill window)

Mức độ tiếp xúc quá trình tiệt khuẩn trong các điều kiện xác định, tại đó có sự chuyển đổi từ tất cả các chất chỉ thị sinh học thể hiện sự tăng trưởng (thời gian tồn tại) sang tất cả các chất chỉ thị sinh học thể hiện sự không tăng trưởng (thời gian bị tiêu diệt)

[ISO/TS 11138-1, định nghĩa 3.18]

3.27

Bên thứ ba (third party)

Cá nhân hoặc tổ chức được thừa nhận là độc lập với các bên liên quan, như liên quan tới vấn đề được nói đến

CHÚ THÍCH 1 Xem TCVN 6450 (ISO/IEC Guide 2)[1].

CHÚ THÍCH 2 Các bên liên quan thường là người cung cấp ("bên thứ nhất") và người mua ("bên thứ hai").

3.28**Người sử dụng (user)**

Cá nhân hoặc tổ chức sử dụng các chất chỉ thị sinh học cho một mục đích xác định

CHÚ THÍCH 1 Xem TCVN ISO 9000[4].

CHÚ THÍCH 2 Người sử dụng là khách hàng tiếp nhận sản phẩm từ nhà cung cấp. Trong trường hợp hợp đồng, người sử dụng được gọi là "người mua". Người sử dụng có thể là khách hàng, người hưởng lợi hoặc người mua. Người sử dụng có thể ở bên trong hoặc bên ngoài tổ chức và đại diện cho "bên thứ hai".

3.29**Giá trị z (z value)**

Thay đổi về nhiệt độ tiếp xúc của quá trình tiệt khuẩn bằng nhiệt, tương ứng với mười lần thay đổi giá trị D

CHÚ THÍCH Xem ISO 11138-3 và ISO 11138-4.

4 Quy định chung

4.1 Tiêu chuẩn này cung cấp hướng dẫn về chất chỉ thị sinh học có thể dùng phổ biến cho bất kỳ quá trình tiệt khuẩn nào, bao gồm cả các quá trình tiệt khuẩn mới chưa được đề cập trong các tiêu chuẩn.

4.2 Việc sử dụng các chất chỉ thị sinh học thường được lập thành văn bản trong các thủ tục và/hoặc hướng dẫn.

CHÚ THÍCH Việc áp dụng các hệ thống quản lý chất lượng như TCVN ISO 13485^[7] (ISO 13485) thường đáp ứng quy định này.

4.3 Chất chỉ thị sinh học cần luôn được sử dụng kết hợp với các phép đo vật lý và/hoặc hóa học trong việc mô phỏng hiệu lực của quá trình tiệt khuẩn. Khi một biến vật lý và/hoặc hóa học của quá trình tiệt khuẩn nằm ngoài giới hạn quy định của nó thì cần đánh giá nguyên nhân sự không ổn định của thiết bị tiệt khuẩn nhằm thu được thông số quá trình và hiệu chỉnh vấn đề. Cần thiết lập các hệ thống và/hoặc thủ tục để đánh giá mọi sai lệch so với giới hạn quá trình chu kỳ và nguyên nhân chấp nhận sai lệch bất kỳ cần được lập thành văn bản đầy đủ.

4.4 Chất chỉ thị sinh học phù hợp gồm vật liệu mang, bao gói và có một thành phần vi sinh vật đã biết là phù hợp để xử lý mà không cần phương tiện chứa đặc biệt nào. Các điều kiện phát triển phải được lập thành văn bản đầy đủ và việc sử dụng chất chỉ thị càng đơn giản mô tả kỹ càng tốt nhằm tránh sự hiểu sai của người sử dụng.

4.5 Không có một hệ thống quốc tế chính thức nào phê duyệt quy định đối với các chất chỉ thị sinh học được bán, sử dụng với các mục đích và các điều kiện rõ ràng. Tuy nhiên, một số cơ quan có thẩm quyền quốc gia có các yêu cầu cụ thể cho chất chỉ thị sinh học về việc lựa chọn, sử dụng các chất chỉ thị sinh học đối với việc đánh giá xác nhận, kiểm tra sản phẩm được bán để vô khuẩn hoặc tiệt khuẩn.

4.6 Chất chỉ thị sinh học đại diện vi sinh vật kiểm chứng quá trình tiệt khuẩn và được dùng để đánh giá xác nhận rằng quá trình tiệt khuẩn có khả năng khử hoạt tính các vi sinh vật có sức kháng đối với quá trình tiệt khuẩn đối chứng đã biết. Các sinh vật thử nghiệm sử dụng trong chất chỉ thị sinh học thường có khả năng kháng tiệt khuẩn vượt quá khả năng của các vi sinh vật tạp nhiễm thông thường, mặc dù một số sinh vật có thể thể hiện sức kháng tiệt khuẩn vượt quá so với khả năng của các sinh vật thử nghiệm. Chất chỉ thị sinh học thích hợp tạo kiểm chứng cho quá trình tiệt khuẩn vượt quá của vi sinh vật tạp nhiễm thông qua sự kết hợp giữa quần thể và sức kháng. Nếu có lý do để tin rằng sản phẩm được xử lý có thể nhiễm sinh vật đặc biệt thì cần tiến hành tiệt khuẩn kéo dài thêm dựa theo vi sinh vật tạp nhiễm đó.

4.7 Các chất chỉ thị sinh học không được dùng cho quá trình bất kỳ khác với quá trình quy định của nhà sản xuất trên nhãn sản phẩm. Các loại và dòng vi sinh vật được chọn làm chất chỉ thị sinh học tham gia dựa trên sức kháng biết trước của chúng đối với phương pháp tiệt khuẩn cụ thể do nhà sản xuất chứng nhận. Việc sử dụng chất chỉ thị sinh học không thích hợp có thể cho các kết quả sai.

Người sử dụng cần đảm bảo rằng chất chỉ thị sinh học được xác nhận đủ điều kiện để dùng trong dãy điều kiện tiệt khuẩn cụ thể được sử dụng. Điều này có thể đòi hỏi thông tin thêm ngoài thông tin ghi trên nhãn. Khi chất chỉ thị sinh học được sử dụng ngoài các điều kiện chuẩn, người sử dụng có thể yêu cầu thông tin về phản ứng mong đợi từ chất chỉ thị đó, ví dụ ảnh hưởng của điều kiện độ ẩm dưới tối ưu tới chất chỉ thị sinh học sử dụng trong quá trình oxit etylen. Người sử dụng dùng chất chỉ thị sinh học ngoài những khuyến cáo ghi trên nhãn của nhà sản xuất cần mô tả kỹ sức kháng của chất chỉ thị sinh học với quá trình tiệt khuẩn cụ thể. Mối quan hệ giữa đáp ứng của chất chỉ thị sinh học với các thông số quá trình cần được chứng minh rõ.

4.8 Người chịu trách nhiệm cho việc tiệt khuẩn sản phẩm cần đảm bảo rằng loại chất chỉ thị sinh học sử dụng để đánh giá xác nhận và/hoặc theo dõi thường quy một quá trình tiệt khuẩn cho trước là phù hợp với sử dụng đó.

4.9 Cần phải luôn tuân thủ các khuyến cáo của nhà sản xuất về sử dụng và bảo quản chất chỉ thị sinh học. Việc không tuân thủ các khuyến cáo này có thể làm tổn hại đến tính toàn vẹn của chất chỉ thị sinh học. Nếu người sử dụng loại bỏ phần tử mang chủng khởi bao gói chính của chất chỉ thị sinh học thì có thể xảy ra những thay đổi về các đặc tính kháng khuẩn. Cần tìm hướng dẫn của nhà sản xuất về mức độ của thay đổi này hoặc người sử dụng có thể đánh giá các thay đổi về đặc tính kháng khuẩn. Người sử dụng cần chứng minh bằng tài liệu rằng các đặc trưng tính năng của phần tử mang chủng là phù hợp với sử dụng của chúng.

4.10 Không được dùng các chất chỉ thị sinh học quá hạn sử dụng do nhà sản xuất quy định.

4.11 Những người sử dụng chất chỉ thị sinh học để đánh giá xác nhận và/hoặc theo dõi việc tiệt khuẩn cần được huấn luyện cách sử dụng. Thời gian từ khi hoàn thành quá trình tiệt khuẩn và thử nghiệm của BI cần được chứng minh như mô tả trong 8.2.4. Sự chuyển đổi của vi sinh vật qua quá

trình tiệt khuẩn sang môi chất phục hồi thích hợp cần được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật vô khuẩn.

4.12 Bộ tiêu chuẩn ISO 11138 đưa ra các yêu cầu về thông tin mà nhà sản xuất cần cung cấp về chất chỉ thị sinh học. Thông tin có thể được đưa ra trên nhãn, như bản cài thêm hoặc quy định chung kèm theo chất chỉ thị sinh học. Bộ tiêu chuẩn này cũng bao gồm các yêu cầu tối thiểu đối với đặc tính kháng khuẩn. Điều kiện và phương pháp thử được nêu như phương pháp chuẩn.

4.13 Người sử dụng chất chỉ thị sinh học đến từ rất nhiều ngành công nghiệp, các hãng tư nhân và cơ sở chăm sóc sức khỏe. Người sử dụng thường không yêu cầu thực hiện phép thử khả năng kháng khuẩn nhưng có thể có các yêu cầu khác nhau đối với hệ thống đảm bảo chất lượng của họ, bao gồm đánh giá người bán và/hoặc nhà sản xuất (xem 6.2.2).

4.14 Việc kiểm tra các đặc tính kháng bởi người sử dụng là một lựa chọn và/hoặc bổ sung cho việc đánh giá, khi cần.

5 Đặc tính của chất chỉ thị sinh học

5.1 Quy định chung

5.1.1 Chất chỉ thị sinh học cung cấp phương tiện để đánh giá trực tiếp khả năng diệt khuẩn của quá trình tiệt khuẩn (xem tài liệu tham khảo [8] và [9]). Khi sử dụng kết hợp với máy theo dõi quá trình vật lý và/hoặc hóa học, chất chỉ thị sinh học có thể cung cấp chỉ thị về hiệu lực của quá trình tiệt khuẩn cho trước.

5.1.2 Quá trình tiệt khuẩn cần được coi là thỏa mãn chỉ khi các thông số vật lý và/hoặc hóa học và các kết quả vi sinh đạt mong muốn, như xác định bằng chương trình triển khai, đánh giá xác nhận và theo dõi chu trình tiệt khuẩn thích hợp được thừa nhận. Việc không đạt được các thông số vật lý và/hoặc hóa học mong muốn và/hoặc thử vi sinh sẽ tạo cơ sở để công bố quá trình tiệt khuẩn là không phù hợp (xem TCVN ISO 13485^[7] và TCVN ISO 9001^[22]).

5.1.3 Chất chỉ thị sinh học bao gồm một quần thể xác định các sinh vật thử được thể hiện theo cách cho phép chúng phục hồi sau quá trình tiệt khuẩn. Ví dụ, sinh vật thử sử dụng cho quá trình tiệt khuẩn oxit etylen có thể là các bào tử thuộc dòng *Bacillus subtilis* hoặc *Bacillus atrophaeus* phù hợp, như chú thích trong ISO 11138-2. Đối với tiệt khuẩn bằng hơi hoặc nóng ẩm, các sinh vật thử sử dụng có thể là các bào tử thuộc dòng *Geobacillus stearothermophilus*, như chú thích trong ISO 11138-3. Sinh vật thử không thuộc dòng vi khuẩn có thể được sử dụng nếu chúng chứng tỏ có khả năng chịu quá trình tiệt khuẩn.

5.1.4 Cơ sở của tất cả các cách thức sử dụng để xác định các đặc tính kháng của chất chỉ thị sinh học như các giá trị D là phản ứng khử tiếp sau động lực học bậc nhất, với yêu cầu là giá trị đối với hệ số xác định, r^2 , đối với tính tuyến tính của đường cong sống sót không được nhỏ hơn 0,8 (xem Phụ lục E

và Phụ lục F). Dòng, phương pháp sản xuất, chất lỏng dịch treo, chất mang và vật liệu bao gói đều ảnh hưởng đến đặc tính kháng của sản phẩm cuối (xem ISO 11138-1).

5.1.5 Thiết kế và kết cấu của chất chỉ thị sinh học có thể dẫn đến các đặc tính kháng duy nhất và có thể thay đổi tùy thuộc vào việc chất chỉ thị sinh học có được dự kiến để sử dụng trong việc triển khai và đánh giá xác nhận quá trình tiệt khuẩn hay dùng để theo dõi thường quy. Nếu thiết kế của chất chỉ thị sinh học để sử dụng cho theo dõi thường quy khác biệt với sử dụng để đánh giá xác nhận các quá trình tiệt khuẩn thì kiểm chứng quá trình trong khi đánh giá xác nhận cần kết hợp với thử quá trình trong khi theo dõi thường quy.

5.1.6 Đặc tính kháng của chất chỉ thị sinh học khác nhau theo phương pháp sản xuất và điều kiện thử nghiệm. Tùy theo bố trí trong phạm vi tải và các điều kiện khử cụ thể tại những vị trí riêng biệt mà các chất chỉ thị sinh học từ cùng một lô có thể có khả năng sống khác nhau (xem 7.2.3). Người sử dụng chất chỉ thị sinh học cần chú ý rằng mười chỉ thị trải suốt toàn bộ tải không được coi là tái tạo do sự khác biệt về tính khử trong toàn bộ phòng và tải đó (xem Chú thích 11.3.1).

5.2 HỖN DỊCH VI SINH VẬT THỬ NGHIỆM ĐỂ CẮY TRỰC TIẾP VÀO SẢN PHẨM

5.2.1 Cấy chủng trực tiếp sinh vật thử nghiệm lên hoặc vào sản phẩm có thể cần thiết trong chu trình phát triển và các nghiên cứu khác khi việc sử dụng chất chỉ thị sinh học là không khả thi. Cấy chủng trực tiếp có thể thích hợp để đánh giá các yếu tố như khả năng tiệt khuẩn sản phẩm, việc nhận biết khó khăn hơn đối với các vị trí tiệt khuẩn trong thiết bị và hiệu ứng vi trùng học cục bộ, ví dụ, môi trường nóng ẩm với môi trường nóng khô.

Lý giải cho việc chọn (các) vị trí "khó tiệt khuẩn nhất" trên một thiết bị y tế hoặc trong phạm vi tải vô khuẩn cần được lập thành văn bản dựa trên dữ liệu thực nghiệm hoặc rút ra từ kiến thức trước đó về phương pháp tiệt khuẩn cụ thể. Trên thực tế, vị trí "khó tiệt khuẩn nhất" thể hiện những vị trí có nhiều khả năng tạo sức kháng cao đối với quá trình tiệt khuẩn. Cần tham khảo các tiêu chuẩn tiệt khuẩn cụ thể (ví dụ ISO 17665-1 và TCVN 7392-1 (ISO 11135-1)) về hướng dẫn xác định và lựa chọn các vị trí khó tiệt khuẩn.

5.2.2 Để đánh giá hiệu lực của việc tiệt khuẩn tại một vị trí hoặc điểm cụ thể trên sản phẩm, loại và quần thể sinh vật thử mong muốn có thể được cấy tại những vị trí đó. Việc sử dụng các hỗn dịch vi sinh vật để chuẩn bị chất mang cấy hoặc sản phẩm cấy đòi hỏi sự cẩn trọng. Vật liệu trên đó sinh vật thử được cấy có thể làm thay đổi các đặc tính kháng của sinh vật thử. Khả năng kháng có thể cao hơn hoặc thấp hơn do sự lắng đọng thành một lớp hoặc nhiều lớp, ảnh hưởng của lớp phủ và/hoặc hiệu ứng kim hãm vi khuẩn hoặc diệt vi khuẩn của vật liệu. Các phương pháp sử dụng để phục hồi sinh vật thử sau khi xử lý cần được đánh giá xác nhận để đảm bảo mức độ phục hồi thích hợp từ sản phẩm (xem ISO 11737-1). Sinh vật thử phục hồi cần được thể hiện bằng phần trăm phục hồi của quần thể của chủng ban đầu.

5.2.3 Cấy hỗn dịch vi sinh vật trực tiếp vào sản phẩm hoặc vật liệu có thể làm kéo dài hoặc giảm sự sống của sinh vật thử. Điều này có thể ảnh hưởng đến phần trăm phục hồi của chủng ban đầu quan sát được so với số mong muốn trong điều kiện tiết khuẩn quy định. Sản phẩm được cấy có thể được thử với đường cong sống sót (liệt kê/đếm trực tiếp) hoặc các quy trình tỷ lệ âm tính (xem Hình A.4). Việc thử này đòi hỏi kỹ thuật vô khuẩn.

5.2.4 Giá trị D và, khi thích hợp, giá trị z , là giá trị không đổi chỉ trong các điều kiện xác định và quy định. Đặc tính kháng của hỗn dịch bào tử cung cấp bởi nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp chất chỉ thị sinh học có thể không tương ứng với các đặc tính kháng khuẩn đối với các nghiên cứu cấy chủng trực tiếp sản phẩm. Đặc tính kháng khuẩn cần được đo đối với chất mang sử dụng (vật liệu mang thể rắn hoặc lỏng) cũng như đối với chu trình tiết khuẩn cụ thể sử dụng.

5.3 Vật liệu cấy chủng

5.3.1 Vật liệu cấy chủng gồm một quần thể sinh vật thử xác định được tiêm trên hoặc trong vật liệu mang phù hợp (xem ISO 11138-1:2006, Phụ lục B). Cần chú ý để đảm bảo rằng tính toàn vẹn của vật liệu mang được chọn là phù hợp để chịu được quá trình tiết khuẩn mà không bị suy giảm và giảm thiểu hao tổn sinh vật thử đã được cấy trong quá trình vận chuyển và xử lý.

5.3.2 Các đặc tính kháng khuẩn của sinh vật thử ở hỗn dịch có thể thay đổi đáng kể theo sự lắng đọng trên hoặc trong vật mang. Nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng đến đặc tính kháng khuẩn, như bề mặt trên đó được cấy hỗn dịch (ví dụ, vật liệu rắn, sản phẩm sệt hoặc chất lỏng), cách thức các dòng được phân tán và xử lý, phương pháp làm khô, v.v...

5.3.3 Nếu vật liệu cấy chủng được loại bỏ khỏi bao bì chính của chất chỉ thị sinh học đối với các nghiên cứu phát triển theo chu trình, đánh giá xác nhận chu trình hoặc quá trình thử thiết bị dùng cho việc theo dõi quá trình thường quy thì người sử dụng có trách nhiệm đưa ra lý giải cho ứng dụng này. Cần thừa nhận rằng, khả năng kháng của vi sinh vật trên vật liệu cấy chủng có thể khác so với khả năng kháng ghi trên nhãn của chất chỉ thị sinh học được đóng gói.

5.3.4 Đặc tính kháng khuẩn của vật liệu cấy chủng cung cấp bởi nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học có thể không tương ứng với đặc tính kháng khuẩn được thiết lập trong nghiên cứu cấy chủng trực tiếp vào sản phẩm.

5.3.5 Vật liệu mang cần được đánh giá bởi nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học hoặc người sử dụng để thiết lập tác nhân tiết khuẩn dự kiến làm chất chỉ thị sinh học không giữ lại và cũng không giải phóng các chất ngăn (ví dụ dư lượng tác nhân tiết khuẩn) tới mức ngăn sự phục hồi số lượng thấp (xem ISO 11138-1:2006, 5.2).

5.4 Chất chỉ thị sinh học độc lập

Chất chỉ thị sinh học độc lập gồm a) hoặc b).

TCVN 8583:2010

a) Một ống tiêm chứa môi trường tăng trưởng và vật liệu mang được cấy sinh vật thử chứa trong lọ nhỏ sao cho tác nhân tiết khuẩn tiếp cận vật liệu mang chủng thâm nhập qua một rào cản vô khuẩn hoặc đường gấp khúc.

Sau khi tiếp xúc với quá trình tiết khuẩn, môi trường tăng trưởng được đem tiếp xúc với vật liệu cấy chủng bằng cách bẻ gãy ống tiêm chứa môi trường tăng trưởng, theo đó loại trừ nhu cầu truyền vô khuẩn vật liệu cấy chủng sang một lọ môi trường tăng trưởng riêng. Cần tuân thủ các khuyến cáo của nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học đối với việc ủ chất chỉ thị sinh học độc lập.

CHÚ THÍCH Do thể tích nhỏ và khả năng bay hơi của môi trường tăng trưởng, không nên ủ kéo dài sau tiết khuẩn.

Tồn dư hóa chất do các quá trình như etylen oxit hoặc hydro peroxit dạng hơi có thể ngăn sự tăng trưởng của sinh vật sống. Cần tuân thủ các khuyến nghị của nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học đối với việc xử lý đúng (bao gồm cả việc thông khí) chất chỉ thị sinh học trước khi ủ (xem 8.2.4).

b) Ống tiêm gắn kín chứa dịch treo các sinh vật thử trong môi trường tăng trưởng.

Đây được gọi là chất chỉ thị sinh học trong ống tiêm kín. Sau quá trình tiết khuẩn, ống tiêm kín được ủ nguyên và không cần cấy truyền vô khuẩn.

CHÚ THÍCH Loại chất chỉ thị sinh học này chỉ nhạy với thời gian và nhiệt độ tiếp xúc và chủ yếu được dùng để theo dõi tiết khuẩn bằng hơi nước.

Chất chỉ thị sinh học độc lập thường lớn hơn chất chỉ thị sinh học chỉ gồm vật liệu chủng trong bao gói sơ cấp, và có thể không đặt vừa những vị trí trong thiết bị có các vị trí thử quá trình. Nếu không thể đặt chất chỉ thị sinh học vào tải mà không làm biến dạng nó hoặc sắp xếp bao gói khác đi thì không thể sử dụng được chất chỉ thị sinh học đó. Người sử dụng cũng cần nhận thức rằng các đặc tính kháng khuẩn công bố có thể phụ thuộc vào phương pháp thoát khí sử dụng trong chu trình tiết khuẩn.

5.5 Các chất chỉ thị sinh học khác

Các chất chỉ thị sinh học ở dạng đơn giản nhất gồm có vật liệu mang chủng trong bao gói sơ cấp. Vật liệu mang chủng có thể có nhiều dạng, bao gồm cả mảnh giấy, sợi dây, phiếu kim loại hoặc chất mang khác thích hợp để cấy. Bao bì sơ cấp được chọn để cho phép tác nhân tiết khuẩn xâm nhập vào vật liệu mang chủng trong khi vẫn duy trì rào cản vô khuẩn sau khi xử lý.

6 Lựa chọn nhà cung cấp

6.1 Quy định chung

6.1.1 Người sử dụng chất chỉ thị sinh học, khi có thể, cần dựa vào các quy định tiêu chuẩn, ví dụ các chất chỉ thị sinh học được sản xuất theo quy định nêu trong bộ tiêu chuẩn ISO 11138, chuyên khảo được diễn hoặc các tiêu chuẩn khác. Người sử dụng cần xem quá trình tiết khuẩn cụ thể làm cơ sở để chọn chất chỉ thị sinh học.

6.1.2 Khi người sử dụng có một quá trình đòi hỏi các đặc trưng tính năng khác với công bố trên nhãn của chất chỉ thị sinh học thì người sử dụng cần xác nhận rằng chất chỉ thị sinh học có các đặc trưng tính năng cần thiết.

6.1.3 Người sử dụng chất chỉ thị sinh học cần có hệ thống thích hợp đưa ra đảm bảo rằng chất chỉ thị sinh học đáp ứng các đặc tính quy định. Đảm bảo này có thể được đưa ra nhờ một hoặc nhiều phương thức sau:

a) thông tin từ nhà sản xuất đề cập các đặc trưng tính năng của lô chất chỉ thị sinh học được chuẩn bị;

CHÚ THÍCH Các yêu cầu về thông tin mà nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cần cung cấp được nêu trong bộ tiêu chuẩn ISO 11138.

b) tuyên bố về sự phù hợp của nhà sản xuất rằng chất chỉ thị sinh học đáp ứng các quy định thỏa thuận;

c) nếu cần, mức độ thử nghiệm khác nhau của từng lô chất chỉ thị sinh học mà người sử dụng tiếp nhận, nhằm xác nhận rằng các đặc trưng tính năng đáp ứng các quy định.

6.1.4 Khi người sử dụng thiết lập được mức độ tin cậy cao đối với nhà cung cấp (xem 6.1.3), thì có thể giảm thiểu việc thử nghiệm bởi người sử dụng. Ít nhất là người sử dụng có cơ sở để đảm bảo rằng một lô chất chỉ thị sinh học có tất cả các tài liệu theo thỏa thuận, như thông tin ghi nhãn thích hợp, tài liệu kèm theo, hướng dẫn bảo quản và xử lý, ... Cần có cơ sở đảm bảo rằng người mua liên tục duy trì chất lượng mong muốn và các tiêu chuẩn sản xuất, như công bố của người bán hoặc nhà sản xuất về sự phù hợp với tiêu chuẩn. Nếu người sử dụng không thiết lập được mối quan hệ người bán cần thiết để đảm bảo tính năng của chất chỉ thị sinh học nhất quán thì cần có thử nghiệm bổ sung cho đến khi thiết lập đảm bảo thích hợp rằng chất chỉ thị sinh học đáp ứng tuyên bố trên nhãn của người bán và hoặc nhà sản xuất và/hoặc các yêu cầu của người sử dụng.

6.1.5 Việc thử bởi người sử dụng, nếu được coi là cần thiết, có thể gồm các phép thử quản thể và phép thử khả năng tiêu diệt sự sống trên các mẫu lấy từ mỗi lô chất chỉ thị sinh học mới tiếp nhận (xem thêm 8.6 và Điều 11). Với điều kiện nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học sản xuất theo quy định kỹ thuật chuẩn cụ thể, nghĩa là bộ tiêu chuẩn ISO 11138, và người sử dụng dùng chất chỉ thị sinh học như dự kiến của nhà sản xuất thì việc thử các đặc tính kháng khuẩn do người sử dụng thực hiện được coi là không cần thiết.

Tuyên bố trên nhãn của nhà sản xuất về khả năng kháng khuẩn, như giá trị D , giá trị z (nếu có) và kết quả diệt sự sống được xác định bằng cách dùng thiết bị đo các tổ hợp đối chứng (xem ISO 18472).

6.2 Hệ thống tài liệu

6.2.1 Quy định chung

6.2.1.1 Yêu cầu về ghi nhãn chất chỉ thị sinh học được nêu trong ISO 11138-1:2006, 4.3.

6.2.1.2 Nhãn bao gồm thông tin thể hiện trên bao bì sơ cấp và thứ cấp của chất chỉ thị sinh học cũng như bao bì kèm theo bất kỳ cung cấp thông tin bổ sung ngoài thông tin được in trên bao bì. Người mua có thể cần hoặc muốn giấy chứng nhận về sự phù hợp với tiêu chuẩn sản phẩm và/hoặc tiêu chuẩn hệ thống quản lý bao gồm trong hồ sơ tài liệu thích hợp.

6.2.1.3 Khi tuyên bố về tính năng hoặc sự phù hợp với tiêu chuẩn được nhà sản xuất cung cấp như một giấy chứng nhận, người sử dụng cần xác nhận năng lực của nhà sản xuất như chỉ ra trong câu thứ hai của 6.2.2.1.

6.2.1.4 Nếu phòng thử nghiệm độc lập (bên thứ ba) được sử dụng để xác nhận các đặc trưng tính năng của chất chỉ thị sinh học thì phòng thử nghiệm đó cần được công nhận đối với phương pháp thử cụ thể được sử dụng (xem TCVN ISO IEC 17025^[2] và TCVN ISO IEC 17011^[3]).

6.2.1.5 Tình trạng của nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học liên quan đến sự phù hợp với tiêu chuẩn chất lượng thích hợp, như TCVN ISO 13485^[7] hoặc chương trình đảm bảo chất lượng khác cần phải được xác nhận. Nếu có thể chứng tỏ sự phù hợp với tiêu chuẩn thích hợp thì việc đánh giá là không cần thiết.

6.2.2 Đánh giá nhà sản xuất

6.2.2.1 Nếu cần, người sử dụng cần xác nhận rằng tổ chức đánh giá có đủ điều kiện, ví dụ như tổ chức chứng nhận, đã thực hiện đánh giá nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học. Một cách khác là nhà sản xuất có thể thực hiện việc đánh giá.

CHÚ THÍCH Tiêu chuẩn đánh giá TCVN ISO 19011^[9] đưa ra hướng dẫn về yêu cầu đối với quá trình đánh giá, các tiêu chí năng lực đối với chuyên gia đánh giá hệ thống chất lượng và việc quản lý chương trình đánh giá.

6.2.2.2 Chuyên gia đánh giá có đủ năng lực cần thực hiện việc đánh giá, như một phần của hệ thống chất lượng của người mua. Nếu việc đánh giá nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học được thực hiện thì cần xem xét các vấn đề sau:

a) sinh vật thử:

- 1) chọn và duy trì giống;
- 2) nhân giống sinh vật thử, bao gồm cả môi trường và thành phần tăng trưởng, nhiệt độ và quá trình ủ;
- 3) việc thu hoạch, sự tinh khiết và thuần chủng của sinh vật thử;
- 4) đếm sinh vật thử sống và đặc tính sinh hóa của sinh vật thử;

b) chất chỉ thị sinh học:

- 1) xác định điều kiện của thành phần sử dụng để chuẩn bị chất chỉ thị sinh học, như vật liệu mang và bao gói sơ cấp, xem xét về các tác nhân độc có thể có bất kỳ của các vật liệu này đến sinh vật thử;
- 2) quản thể sinh vật thử danh nghĩa trong quá trình sản xuất chất chỉ thị sinh học;

- 3) tính nhất quán (ví dụ đẩy mạnh tăng trưởng, pH, độ ổn định, v.v...) và thể tích điền đầy của môi trường tăng trưởng bất kỳ được cung cấp cùng với chất chỉ thị sinh học;
 - 4) khả năng kháng khuẩn của chất chỉ thị sinh học, bao gồm cả loại thiết bị thử và việc hiệu chuẩn thiết bị, môi chất phục hồi sử dụng và điều kiện ủ;
 - 5) độ ổn định bảo quản và khả năng kháng khuẩn liên tục của chất chỉ thị sinh học cho đến khi hết thời hạn sử dụng;
- c) kiểm tra chất lượng:
- 1) tuyên bố trên nhãn đối với sản phẩm cuối;
 - 2) độ ổn định bảo quản và sự phù hợp liên tục của sản phẩm cuối với các công bố trên nhãn.

6.2.2.3 Nhà sản xuất cần cung cấp đủ tài liệu về hệ thống chất lượng được duy trì cho quá trình sản xuất chất chỉ thị sinh học và cung cấp tài liệu về sự phù hợp của sản phẩm với các quy định công bố.

7 Chất chỉ thị sinh học trong triển khai quá trình

7.1 Quy định chung

7.1.1 Thông tin bổ sung về triển khai quá trình, tham khảo các tiêu chuẩn tiết khuẩn đối với các quá trình đó (ví dụ ISO 17665-1, TCVN 7392-1 (ISO 11135-1) và TCVN 8582 (ISO 14937)).

7.1.2 Nếu chất chỉ thị sinh học được sử dụng cho triển khai quá trình thì cần xác định tính thích hợp của chất chỉ thị đó.

7.1.3 Các quá trình tiết khuẩn rất khác nhau về đặc điểm vận hành và loại sản phẩm được tiết khuẩn. Trong khi mỗi ứng dụng là đơn nhất thì các nhóm sản phẩm tương tự trong cùng một loại dùng cho mục đích triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiết khuẩn cũng có thể được chấp nhận. Cần xem xét thận trọng những khía cạnh thiết kế của sản phẩm hoặc bao gói có thể dẫn đến việc thử bổ sung cho quá trình tiết khuẩn. Chất chỉ thị sinh học có thể dùng để xác định những vị trí của sản phẩm thể hiện kiểm chứng khác nghiệt cho quá trình và cũng để thiết lập mức độ liên quan của các loại sản phẩm khác nhau về kiểm chứng đối với quá trình tiết khuẩn. Việc này có thể dẫn đến sự lựa chọn cấu hình sản phẩm cụ thể để phân tích thêm.

7.1.4 Các thông số vật lý và/hoặc hóa học và các kết quả vi sinh cần được xem xét và thể hiện khả năng chấp nhận trước khi chấp nhận quá trình.

7.1.5 Chất chỉ thị sinh học cần luôn được sử dụng kết hợp với các phép đo vật lý và/hoặc hóa học thích hợp các thông số quá trình để chứng tỏ hiệu lực của quá trình tiết khuẩn.

7.1.6 Không thể đưa ra lời khuyên chung về số lượng chất chỉ thị sinh học trên thể tích tiết khuẩn, vì điều này phụ thuộc vào khả năng tái lập của các chu trình cũng như khả năng khác biệt trong các thông số quá trình có thể có trong quá trình tiết khuẩn. Tuy nhiên, các tiêu chuẩn tiết khuẩn khác có thể cung cấp hướng dẫn về số lượng khuyến nghị chất chỉ thị sinh học cần sử dụng, ví dụ TCVN 7392-1 (ISO 11135-1). Số lượng đúng chất chỉ thị sinh học cần sử dụng có thể xác định từ dữ

TCVN 8583:2010

liệu thu thập về việc sử dụng chất chỉ thị sinh học và/hoặc các nghiên cứu vi sinh vật tạp nhiễm cũng như từ hệ thống tài liệu về phân bố chất vô khuẩn trong toàn bộ tải.

7.2 Phương pháp tiệt khuẩn quá mức

7.2.1 Phương pháp này thường được gọi là “phương pháp nửa chu kỳ” hay “phương pháp tiệt khuẩn quá mức” và được đề cập trong TCVN 8582 (ISO 14937). Phương pháp này dựa trên các giả định sau:

- a) chất chỉ thị sinh học (vi sinh vật đối chứng) cung cấp mẫu chứng lớn hơn vi sinh vật tạp nhiễm;
- b) quá trình tiệt khuẩn đầy đủ ít nhất phải giảm chất chỉ thị sinh học 12 loga (xem TCVN 7392-1 (ISO 11135-1) và TCVN 8582 (ISO 14397) hoặc giải phóng F_{bio} 12 (xem ISO 17665-1) với đặc tính kháng tối thiểu (xem Hình A.1 và A.2 và ISO 11138-3);
- c) tại nửa chu kỳ, người sử dụng thường có thể chứng tỏ quá trình tiệt khuẩn giảm ít nhất 6 loga.

CHÚ THÍCH Bộ tiêu chuẩn ISO 11138 cho phép đặc tính kháng khác với đặc tính tối thiểu yêu cầu cho mục đích kiểm soát.

7.2.2 Các tiêu chí này cần được tập trung bằng cách đặt chất chỉ thị sinh học hoặc vật liệu mang chủng, ví dụ, với một quần thể gồm 10^6 sinh vật thử đáp ứng yêu cầu kháng tối thiểu tại (các) vị trí kiểm chứng quá trình trong sản phẩm toàn bộ tải. Các vị trí nằm trong tải này cần được chứng minh trước đó là có kiểm chứng đối với quá trình tiệt khuẩn và tương quan với các vị trí “khó tiệt khuẩn nhất, sao cho việc chọn các vị trí này sẽ đảm bảo sự giảm theo loga thích hợp đối với toàn bộ tải sản phẩm. Ít nhất cần chứng tỏ giảm 6 loga trong quần thể sinh vật trong một nửa thời gian duy trì tải bình thường của chu trình cần xác nhận khi tất cả các chất chỉ thị sinh học là các mẫu tương đương thỏa đáng. Phần trăm chất chỉ thị sinh học thể hiện sự tăng trưởng có thể tương quan với sự giảm theo loga đạt được [xem Chú thích cho 11.3.1 c)]. Nếu thử trong điều kiện nửa chu kỳ chứng tỏ sự giảm quần thể sinh vật thử vượt quá 6 loga thì có khả năng không dẫn đến sự tăng trưởng sinh vật thử, tùy thuộc vào cỡ mẫu. Như minh họa trên Hình A.1, 1 % xác suất tăng trưởng dương tính có giảm loga bảo tử là 8 loga tại đầu trên của cửa sổ nửa chu kỳ.

7.2.3 Việc bố trí chất chỉ thị sinh học trong sản phẩm hoặc trong tải có thể làm thay đổi đặc tính kháng bên ngoài của nó so với sức kháng ghi trên nhãn của chất chỉ thị sinh học. Điều này có thể đòi hỏi điều chỉnh khoảng thời gian tiếp xúc nửa chu kỳ để bù sức kháng bổ sung do việc bố trí chất chỉ thị sinh học trong sản phẩm hoặc tải gây ra. Việc điều chỉnh tương tự có thể cần thiết khi sinh vật thử dịch treo được sử dụng để chuẩn bị sản phẩm ủ (xem 5.2).

7.2.4 Cần sử dụng đầu dò vật lý và/hoặc hóa học thích hợp để thiết lập phân bố nhiệt độ, v.v... có thể hỗ trợ việc xác định các vị trí cho chất chỉ thị sinh học. Cần chuẩn bị đủ số lượng đầu dò với chất chỉ thị sinh học đặt tại vị trí xác định trước trong sản phẩm.

CHÚ THÍCH Đối với tiệt khuẩn nóng ẩm, giá trị z của chất chỉ thị sinh học có thể khác với giá trị z của 10°C , thường được giả định cho khả năng hủy diệt của quá trình dựa trên các phép đo nhiệt độ. Điều này có thể dẫn đến sự khác nhau giữa khả năng hủy diệt của quá trình tích hợp xác định nhờ sử dụng chất chỉ thị sinh học và khả năng hủy diệt xác định bằng phép đo nhiệt độ trực tiếp.

7.3 Phương pháp kết hợp chất chỉ thị sinh học và vi sinh vật tạp nhiễm

7.3.1 Phương pháp kết hợp chất chỉ thị sinh học và vi sinh vật tạp nhiễm đòi hỏi phải biết về quần thể và sức kháng vi sinh vật của vi sinh vật tạp nhiễm sản phẩm. Phương pháp này có ưu điểm là cho phép giảm thời gian tiếp xúc chu trình và giảm thiểu tiếp xúc sản phẩm với tác nhân tiệt khuẩn và được đề cập trong TCVN 8582 (ISO 14937).

7.3.2 Phương pháp kết hợp chất chỉ thị sinh học và vi sinh vật tạp nhiễm đòi hỏi lựa chọn các điều kiện quá trình cho khả năng tiêu diệt đủ để khử hoạt tính của vi sinh vật tạp nhiễm tới mức đảm bảo tiệt khuẩn sản phẩm ghi trên nhãn. Số chu trình lặp lại cần thiết để chứng minh hiệu lực thích hợp sẽ phụ thuộc vào độ tin cậy về độ chính xác và mức độ khả năng lặp lại khử hoạt tính vi sinh vật tạp nhiễm trong các đánh giá về vi sinh vật tạp nhiễm. Hình A.1 cho thấy mối quan hệ chung giữa việc khử hoạt tính của chất chỉ thị sinh học và khử hoạt tính của vi sinh vật tạp nhiễm trong sản phẩm. Vì vi sinh vật tạp nhiễm thường có sức kháng với tác nhân tiệt khuẩn kém hơn so với chất chỉ thị sinh học nên mức đảm bảo vô khuẩn mong muốn thường đạt được với xử lý ít hơn so với khuyến nghị khi sử dụng phương pháp khả năng hủy diệt. Mức độ xử lý yêu cầu phụ thuộc vào mối quan hệ giữa chất chỉ thị sinh học và vi sinh vật tạp nhiễm so với quần thể và sức kháng với tác nhân tiệt khuẩn.

7.3.3 Đối với quy trình này, có thể sử dụng chất chỉ thị sinh học thích hợp với quần thể nhỏ hơn 10^6 , với điều kiện có thể chứng minh được mức đảm bảo vô khuẩn mong muốn. Cần xem xét sự biến động của vi sinh vật tạp nhiễm khi xác định quần thể chất chỉ thị sinh học tối thiểu cần sử dụng để đánh giá xác nhận quá trình tiệt khuẩn. Quần thể chất chỉ thị sinh học không nên nhỏ hơn 10^3 sinh vật trên vật liệu mang (xem Hình A.1).

7.3.4 Quy trình ước lượng vi sinh vật tạp nhiễm sản phẩm được đề cập trong ISO 11737-1. Độ sự biến động vi sinh vật tạp nhiễm nên cần mô tả đặc trưng vi sinh vật tạp nhiễm và sức kháng vi sinh vật tạp nhiễm trên cơ sở thường quy.

Có thể cần các nghiên cứu về sức kháng của toàn bộ quần thể vi sinh vật tạp nhiễm để đảm bảo kiểm chứng đưa ra nhỏ hơn so với chất chỉ thị sinh học. Một phương pháp có thể sử dụng để xác định điều này là vận hành chu trình tiệt khuẩn phân đoạn để xác định rằng quần thể vi sinh vật tạp nhiễm không sống sót cũng lớn như với chất chỉ thị sinh học.

7.3.5 Thực hiện phương pháp kết hợp chất chỉ thị sinh học/vi sinh vật tạp nhiễm đòi hỏi việc xem xét nhiều yếu tố như nêu trong 5.4 và 7.2, về việc bố trí chất chỉ thị sinh học ở những vị trí trong sản phẩm và khối thể hiện kiểm chứng ngặt nghèo cho quá trình tiệt khuẩn. Phương pháp chỉ áp dụng được khi dữ liệu đủ để phân tích thống kê và có mức độ tin cậy cao rằng dữ liệu về vi sinh vật tạp nhiễm và đại diện cho điều kiện "trường hợp xấu nhất". Có nhiều nguyên nhân gây biến động, như nguyên liệu thô, kiểm soát quá trình và biến động mùa. Cần xem xét đến sự có mặt và tính chất của phân bố vi sinh vật tạp nhiễm trong sản phẩm. Vì phân bố của vi sinh vật tạp nhiễm trong sản phẩm có thể thay đổi đáng kể nên điều quan trọng là xác định được việc phân bố này có thể ảnh hưởng tới kiểm chứng sản phẩm trước quá trình tiệt khuẩn như thế nào và từ đó ảnh hưởng tới việc lựa chọn chất chỉ thị sinh học.

TCVN 8583:2010

7.3.6 Việc xác định vi sinh vật tạp nhiễm sản phẩm và các loại, phân bố sức kháng đòi hỏi xem xét các yếu tố nêu trong bộ tiêu chuẩn ISO 11737. Phương pháp lựa chọn phải được xác nhận theo các yêu cầu của các tiêu chuẩn và độ tin cậy thống kê của ước lượng vi sinh vật tạp nhiễm phải được thiết lập.

7.3.7 Tiêu chí cơ bản của phương pháp kết hợp chất chỉ thị sinh học/vi sinh vật tạp nhiễm đòi hỏi lựa chọn các điều kiện xử lý làm giảm quần thể vi sinh vật tạp nhiễm tới 10^0 . Hệ số an toàn bổ sung nhất quán với nhãn sản phẩm cần được sử dụng cho thời gian duy trì (xem Hình A.1). Số chu trình lặp cần được chứng minh trong quá trình triển khai chu trình tiệt khuẩn tùy thuộc vào độ chính xác và giới hạn tin cậy của các ước lượng vi sinh vật tạp nhiễm.

7.3.8 Dòng vi sinh vật có sức kháng lớn hơn sức kháng tổng thể của vi sinh vật tạp nhiễm sản phẩm có thể được dùng như chất chỉ thị sinh học nếu tính động học tiệt khuẩn của chúng thỏa mãn các tiêu chí đối với chất chỉ thị sinh học (đường cong tiêu diệt loga tuyến tính trong phạm vi hệ số xác định là 0,8). Tuy nhiên, các sinh vật chỉ thị này có thể có sức kháng quá trình thấp hơn quy định trong bộ tiêu chuẩn ISO 11138 (xem Hình A.2).

7.3.9 Nếu sức kháng của vi sinh vật tạp nhiễm cao hơn của các chất chỉ thị sinh học bán sẵn thì dòng kháng tách biệt với vi sinh vật tạp nhiễm cần được xem xét để bao gồm trong các nghiên cứu triển khai quá trình (xem TCVN 7392-1 (ISO 11135-1) và ISO 17665-1). Cách khác, thời gian duy trì cần được tăng lên một hệ số xác định bằng sức kháng tương đối của vi sinh vật tạp nhiễm và chất chỉ thị sinh học hoặc chất chỉ thị sinh học có quần thể lớn hơn tạo kiểm chứng lớn hơn hoặc bằng dòng kháng có thể sử dụng.

7.4 Phương pháp vi sinh vật tạp nhiễm

7.4.1 Cần tham khảo bộ tiêu chuẩn ISO 11737 về các phương pháp vi sinh thích hợp để ước lượng vi sinh vật tạp nhiễm. Một số vi sinh vật tạp nhiễm có thể có sức kháng cao hơn các chất chỉ thị sinh học nêu trong bộ tiêu chuẩn ISO 11138. Các vi sinh vật tạp nhiễm có sức kháng hơn có thể được dùng như chất chỉ thị sinh học mẫu (xem 7.3); các phương pháp đề cập trong TCVN 8582 (ISO 14937).

7.4.2 Thông tin về việc đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy cũng như khả năng áp dụng của các phương pháp vi sinh vật tạp nhiễm tuyệt đối, tham khảo các tiêu chuẩn liên quan đối với quá trình tiệt khuẩn cụ thể (xem Điều 2). Quy định kỹ thuật chi tiết về phương pháp vi sinh vật tạp nhiễm tuyệt đối, không có đối chứng chất chỉ thị sinh học bất kỳ, được nêu trong bộ tiêu chuẩn ISO 11737.

8 Chất chỉ thị sinh học dùng trong đánh giá xác nhận tiệt khuẩn

8.1 Quy định chung

Nếu chất chỉ thị sinh học được dùng trong quá trình đánh giá xác nhận thì cần xem xét (các) loại chất chỉ thị sinh học có thể dùng trong kiểm soát thường quy. Các chất chỉ thị sinh học khác có thể cung

cấp mức độ kiểm chứng khác nhau cho quá trình tiệt khuẩn (xem Hình A.2). Nếu các chất chỉ thị sinh học khác được dùng để đánh giá xác nhận và theo dõi thường quy thì cả hai cần được đưa vào nghiên cứu đánh giá xác nhận sao cho mối quan hệ về sức kháng giữa chúng có thể được thiết lập và ghi thành văn bản.

8.2 Bố trí và xử lý chất chỉ thị sinh học

8.2.1 Đánh giá xác nhận quá trình tiệt khuẩn đòi hỏi tài liệu chứng minh rằng quá trình có khả năng tạo ra sản phẩm thỏa mãn các qui định xác định trước (xem ISO 17665-1, TCVN 7392-1 (ISO 11135-1) và TCVN 8582 (ISO 14937)).

8.2.2 Số lượng chất chỉ thị sinh học trong sản phẩm và/hoặc khối sản phẩm cần được lập thành văn bản.

8.2.3 Người sử dụng cần ghi lại bố trí của các chất chỉ thị sinh học được chọn trong khoang tiệt khuẩn, trong khối sản phẩm hoặc thiết bị thử quá trình (xem Phụ lục B). Các xem xét khác cần tập trung vào việc bố trí chất chỉ thị sinh học trong khối sản phẩm là các dạng chất tải, tỷ trọng và dạng hình học của tải, (các) vị trí thử quá trình, bố trí của các bộ cảm biến hoặc đầu dò vật lý và/hoặc hóa học, sự phân tầng của các thành phần vật lý, ảnh hưởng của bao gói, v.v...

8.2.4 Chất chỉ thị sinh học cần được loại khỏi khối vô khuẩn ngay sau quá trình, không làm ảnh hưởng đến an toàn của con người. Chúng cần được thử trong khoảng thời gian quy định được thiết lập cho sản phẩm và quá trình đó. Các khoảng thời gian từ khi chuẩn bị chất chỉ thị sinh học đến khi sử dụng cho quá trình tiệt khuẩn, và từ khi kết thúc quá trình đến khi cấy chất chỉ thị sinh học cần được đánh giá để chứng tỏ rằng các khoảng thời gian này không làm ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm sinh học của máy tiệt khuẩn hoặc quá trình tiệt khuẩn. Không được vượt quá các khoảng thời gian được đánh giá này. Nếu chất chỉ thị sinh học được xử lý theo cách khác với quy định của nhà sản xuất, thì quy trình cần được xác nhận để xác định xem chúng có ảnh hưởng đến tính năng của chất chỉ thị sinh học hay không. Cần tuân thủ mọi khoảng thời gian được thiết lập.

8.2.5 Cần tuân thủ các yêu cầu quốc gia hoặc khu vực về an toàn của công nhân khi loại bỏ chất chỉ thị sinh học khỏi máy tiệt khuẩn.

8.3 Xác nhận chất lượng thiết bị tiệt khuẩn

8.3.1 Việc xác nhận chất lượng ban đầu được thực hiện để đạt được và ghi lại bằng chứng rằng thiết bị tiệt khuẩn, hoạt động của nó và thiết bị phụ trợ được cung cấp và lắp theo đúng qui định kỹ thuật, và máy tiệt khuẩn hoạt động trong phạm vi giới hạn xác định trước khi vận hành theo hướng dẫn (xem ISO 17665-1 và TCVN 7392-1 (ISO 11135-1)).

Có thể sử dụng chất chỉ thị sinh học trong quá trình OQ/PQ, ví dụ, để thiết lập bằng chứng về sự phân bố đồng đều của các tác nhân tiệt khuẩn.

8.3.2 Nhà sản xuất thiết bị tiệt khuẩn có thể phải thực hiện các phép thử trong nhà máy trước khi giao hàng bằng cách sử dụng chất chỉ thị sinh học dùng cho các loại tải cụ thể (xem Phụ lục B).

8.4 Xác nhận chất lượng tính năng

Sau khi kết thúc việc xác nhận chất lượng máy tiệt khuẩn (xem 8.3), việc thử xác nhận chất lượng tính năng được thực hiện để ghi lại độ tái lập và hiệu lực của quá trình tiệt khuẩn, bao gồm cả khả năng tạo ra các sản phẩm đáp ứng các quy định kỹ thuật chất lượng xác định trước. Việc xác nhận thiết lập sự phù hợp của sản phẩm với các quy định xác định trước; áp dụng các tiêu chuẩn quốc tế liên quan như ISO 17665-1, TCVN 7392-1 (ISO 11135-1) và TCVN 8582 (ISO 14937). Các chất chỉ thị sinh học khác nhau có thể cung cấp mức độ kiểm chứng khác nhau đối với quá trình tiệt khuẩn (xem Hình A.2). Mỗi tương tác giữa chất chỉ thị sinh học sử dụng cho chu trình triển khai và xác nhận, xác nhận chất lượng tính năng và theo dõi thường quy cần được thiết lập và lập thành văn bản.

8.5 Xem xét và phê chuẩn việc đánh giá xác nhận

Khi kết thúc thành công các xác nhận chất lượng, việc xem xét tài liệu đánh giá xác nhận, bao gồm cả tính năng của chất chỉ thị sinh học, là cần thiết trước khi bắt đầu sản xuất, nhằm chứng nhận rằng quá trình tuân thủ các yêu cầu.

8.6 Xác nhận chất lượng lại

8.6.1 Khi thực hiện việc xác nhận chất lượng lại, cần sử dụng cùng các đặc tính kháng, số lượng chất chỉ thị sinh học, bố trí của chúng trong sản phẩm, v.v... Nếu chất chỉ thị sinh học mới được xác nhận chất lượng cho quá trình thì điều quan trọng là cần thiết lập và ghi lại mối tương quan giữa chất chỉ thị sinh học mới và chất chỉ thị sinh học trước đó.

8.6.2 Khi sử dụng tiệt khuẩn nóng ẩm hoặc etylen oxit thì áp dụng ISO 17665 hoặc TCVN 7392-1 (ISO 11135-1).

8.6.3 Cần phải lập tần suất tối thiểu để đánh giá đặc tính kháng của lô chất chỉ thị sinh học. Các xem xét dẫn đến khoảng thời gian khác nhau để xác nhận lại chất lượng hệ thống chất chỉ thị sinh học cần bao gồm các thay đổi theo mùa, thay đổi về sản phẩm và vật liệu cũng như thay đổi thiết bị, v.v... Nếu các đặc tính kháng của chất chỉ thị sinh học thay đổi nằm ngoài giới hạn xác định trước thì cần xác nhận lại chất lượng. Nếu môi trường phục hồi thay đổi thì môi trường tăng trưởng mới cần tương quan với loại sử dụng trước đó và việc chọn môi trường tăng trưởng mới cần được đánh giá xác nhận (xem thêm 12.4).

9 Chất chỉ thị sinh học dùng trong theo dõi thường quy

9.1 Quy định chung

9.1.1 Chất chỉ thị sinh học cung cấp phương pháp để chứng tỏ khả năng diệt khuẩn trong quá trình tiệt khuẩn; tuy nhiên, có thể cần tiến hành phân đoạn (ví dụ nửa chu trình) trong quá trình đánh giá xác

nhận để xác nhận chất lượng tiệt khuẩn. Đối với các quá trình được xây dựng kỹ trong đó việc tháo dỡ theo thông số đã được xác nhận, thì chất chỉ thị sinh học có thể không cần cho việc theo dõi thường quy một số quá trình tiệt khuẩn (ví dụ tiệt khuẩn nóng ẩm, xem ISO 17655-1, etylen oxit, xem ISO 11135-1 hoặc nóng khô, xem ISO 20857).

9.1.2 Loại chất chỉ thị sinh học và bố trí của nó trong sản phẩm hoặc khối sản phẩm cần nhất quán với các vị trí khối sản phẩm được xác định trong quá trình triển khai tiệt khuẩn hoặc đánh giá xác nhận. Nếu hệ thống thử vi sinh sử dụng cho theo dõi thường quy quá trình tiệt khuẩn khác biệt so với sử dụng trong đánh giá xác nhận quá trình thì mối quan hệ giữa hệ thống để đánh giá xác nhận và dùng cho theo dõi thường quy cần được ghi thành văn bản.

9.1.3 Khoảng thời gian quy định từ khi chuẩn bị chất chỉ thị đến khi tiệt khuẩn, và từ khi kết thúc quá trình đến khi cấy chất chỉ thị cần được đánh giá để chứng tỏ rằng các khoảng thời gian này không có ảnh hưởng đến sự tăng trưởng quá nhanh của chất chỉ thị sinh học (xem 8.2.4).

9.1.4 Chất chỉ thị sinh học dùng cho theo dõi thường quy được sử dụng trong phương pháp kết hợp chất chỉ thị sinh học/vi sinh vật tạp nhiễm (7.3) sẽ không tuân thủ tất cả các phần của bộ tiêu chuẩn 11138 nếu quần thể và/hoặc sức kháng thấp hơn yêu cầu tối thiểu của các phản tương ứng (xem ISO 11138-1:2006, 6.1.3).

9.2 Bố trí và xử lý chất chỉ thị sinh học

9.2.1 Trong chu trình triển khai và đánh giá xác nhận, chất chỉ thị sinh học được đặt ở những vị trí trong sản phẩm và khối sản phẩm thể hiện kiểm chứng ngặt nghèo cho quá trình tiệt khuẩn. Trong theo dõi thường quy, chất chỉ thị sinh học cần được đặt ở những vị trí dễ tiếp cận hơn sử dụng thiết bị thử quá trình (xem 9.3). Trong trường hợp này, bố trí của chất chỉ thị sinh học cần tương quan với các vị trí sử dụng trong chu trình triển khai hoặc đánh giá xác nhận nhằm đảm bảo tính toàn vẹn của quá trình tiệt khuẩn không bị ảnh hưởng. Cũng cần đảm bảo bố trí thống nhất chất chỉ thị sinh học dùng cho theo dõi thường quy.

9.2.2 Hướng dẫn của nhà cung cấp chất chỉ thị sinh học cần được tuân thủ đối với việc xử lý đúng chất chỉ thị sinh học sau tiệt khuẩn. Nói chung, chất chỉ thị sinh học cần được loại khỏi khối sản phẩm mà không ảnh hưởng đến an toàn con người và trong khoảng thời gian quy định được đánh giá (xem Điều 11). Sau đó, chúng cần được chuyển vô khuẩn sang môi chất tăng trưởng trong khoảng thời gian xác định và nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp (xem Điều 12).

9.2.3 Ngoài các yêu cầu xác nhận chất lượng các thuộc tính tăng trưởng trong môi trường (xem Điều 12), và khả năng sống sót của chất chỉ thị sinh học (xem Điều 11), người sử dụng cũng cần thực hiện các kiểm tra này trong quá trình theo dõi thường quy quá trình tiệt khuẩn. Ví dụ, sử dụng chất chỉ thị sinh học chưa xử lý cấy trong môi trường tăng trưởng thể hiện cả khả năng sống sót của chất chỉ thị lẫn tính thích hợp của điều kiện tăng trưởng.

CHÚ THÍCH Các tài liệu hướng dẫn của quốc gia có thể yêu cầu sử dụng kiểm soát không tiếp xúc.

9.2.4 . Quá trình được xem là chấp nhận được chỉ khi các thông số vật lý và/hoặc hóa học mong muốn đã được xem xét và các kết quả vi sinh được thể hiện, và cả hai đều tuân thủ các tiêu chí mong muốn.

9.3 Thiết bị kiểm chứng quá trình (PCD)

9.3.1 Thiết bị kiểm chứng quá trình kết hợp với chất chỉ thị sinh học có thể sử dụng cho đánh giá xác nhận và theo dõi thường quy chu trình tiệt khuẩn cũng như cho thiết bị tiệt khuẩn thử bởi nhà sản xuất. Thiết bị kiểm chứng quá trình được thiết kế sao cho bố trí của chất chỉ thị sinh học trong thiết bị kiểm chứng quá trình tạo nên vị trí được xem là thể hiện kiểm chứng ngặt phù hợp với quá trình. Thiết kế của thiết bị có thể thay đổi theo tính chất của sản phẩm cần kiểm chứng (xem Phụ lục B về các ví dụ của thiết bị kiểm chứng quá trình).

9.3.2 Thiết bị kiểm chứng quá trình cần được thiết kế với xem xét đến các thông số quá trình khác nhau ảnh hưởng tới quá trình tiệt khuẩn. Kết cấu của thiết bị kiểm chứng quá trình phụ thuộc vào kiểu chu trình cần theo dõi cũng như loại sản phẩm cần tiệt khuẩn.

9.3.3 Thiết bị kiểm chứng quá trình có thể bán sẵn như thiết bị làm sẵn, thường gọi là "gói thử sinh học". Gói thử sinh học dùng một lần được sản xuất bởi nhiều công ty và có thể dùng thay cho các thiết bị kiểm chứng quá trình dùng nội bộ. Thiết bị kiểm chứng quá trình và việc bố trí chúng trong khối sản phẩm cần thể hiện kiểm chứng quá trình tương đương hoặc cao hơn kiểm chứng đại diện bởi khối sản phẩm.

10 Kết quả

10.1 Quy định chung

10.1.1 Tiêu chí chấp nhận một quá trình tiệt khuẩn là thỏa mãn cần được xác định trong quá trình triển khai chu trình tiệt khuẩn, sử dụng các tiêu chuẩn liên quan để đánh giá xác nhận và kiểm soát quá trình tiệt khuẩn.

10.1.2 Để thu được kết quả tin cậy, quy trình thường quy cần được thiết lập và duy trì, đồng thời cần được tiến hành với các chuyên gia kỹ thuật được đào tạo sử dụng thiết bị thích hợp.

10.2 Biểu thị kết quả

10.2.1 Quá trình tiệt khuẩn được đánh giá xác nhận trong đó tất cả thông số đặt trước đều được đáp ứng cần cho thấy không có sự tăng trưởng của chất chỉ thị sinh học.

10.2.2 Dựa trên các nguyên tắc sử dụng chất chỉ thị sinh học trong TCVN 7392-1 (ISO 11135-1), quá trình tiệt khuẩn trong đó tất cả thông số đặt trước đều không được đáp ứng có thể cho thấy có sự tăng trưởng của chất chỉ thị sinh học.

10.2.3 Kết quả thử chất chỉ thị sinh học bất kỳ cho thấy sự tăng trưởng chất chỉ thị khi có thể là một chỉ số của quá trình không thích đáng, chất chỉ thị sinh học khiếm khuyết hoặc lỗi hệ thống thử và cần đưa đến một cuộc điều tra. Hành động cần thực hiện đối với sự tăng trưởng của chất chỉ thị sinh học

sau quá trình tiệt khuẩn có thể thay đổi theo các chính sách thiết lập và quy định, và có thể đòi hỏi lô sản phẩm bị loại thành chưa vô khuẩn. Việc nhận biết sự tăng trưởng như của sinh vật thử cần được xác nhận và cần xác định nguyên nhân của sự tăng trưởng. Sự tăng trưởng của chất chỉ thị sinh học với các thông số đã xác nhận, quá trình tiệt khuẩn không thích đáng hoặc có thể do việc sử dụng lô chất chỉ thị sinh học có tính kháng cao bất thường với tác nhân tiệt khuẩn. Nếu điều tra chỉ ra rằng quá trình tiệt khuẩn được thực hiện phù hợp và không có thay đổi đáng kể về chất chỉ thị sinh học có thể ảnh hưởng đến tính năng của nó trong quá trình tiệt khuẩn thì quá trình tiệt khuẩn cần được lặp lại. Nhuộm gram kết hợp với quang và hình thái học tế bào có thể hữu ích trong việc xác định rằng tăng trưởng không phải là sinh vật chỉ thị.

CHÚ THÍCH Một số sinh vật chỉ thị có thể là biến gram.

10.2.4 Thiết bị tiệt khuẩn cụ thể, loại sản phẩm và khối sản phẩm đều ảnh hưởng tới quá trình tiệt khuẩn. Các đặc tính kháng của hệ chất chỉ thị sinh học sử dụng trong quá trình nên thiết lập cho toàn bộ hệ thống một cách hiệu quả. Dữ liệu chấp nhận được từ chất chỉ thị sinh học chỉ là một phần dữ liệu cần thiết để chứng tỏ rằng quá trình tiệt khuẩn đã thành công.

10.2.5 Vi khuẩn cấy cho thấy sự tăng trưởng không được xác nhận là sinh vật chỉ thị cần được nghiên cứu thêm để xác định nguyên nhân gây tăng trưởng dương. Chất gây ô nhiễm thử có thể chỉ thị hệ thống thử sai hoặc đào tạo nhân sự không phù hợp.

11 Áp dụng các tiêu chuẩn về chất chỉ thị sinh học

11.1 Người sử dụng đánh giá chung tính năng chất chỉ thị sinh học

11.1.1 Hai đặc trưng chính của chất chỉ thị sinh học là quần thể vi sinh vật và sức kháng của chất chỉ thị sinh học với quá trình tiệt khuẩn, biểu thị bằng giá trị D .

11.1.2 Chất chỉ thị sinh học cần được vận chuyển, lưu kho và xử lý nhằm đảm bảo rằng quần thể và đặc tính kháng được duy trì trong suốt thời hạn sử dụng. Tiệt khuẩn môi trường nuôi cấy, điều kiện ủ, bảo trì thiết bị và huấn luyện nhân sự phòng thí nghiệm là một số vấn đề cần được xác định và kiểm soát nhằm đảm bảo tính năng phù hợp của chất chỉ thị sinh học. Người sử dụng có thể kiểm tra định kỳ quần thể chất chỉ thị sinh học. Khi các vấn đề đề cập ở trên được kiểm soát và xác nhận, việc thử chất chỉ thị sinh học thường xuyên bởi người sử dụng có thể không cần thiết.

11.1.3 Người sử dụng cần chú ý mọi sai lệch khỏi quá trình được sử dụng và tập hợp thông số quy chiếu được xác định cho quá trình đó. Nếu các thông số chu trình tiệt khuẩn hoặc khối tải là lý do làm sai lệch đặc tính kháng của chất chỉ thị sinh học, người sử dụng cần nghiên cứu khả năng loại trừ những sai lệch này và xác nhận lại chất lượng quá trình.

11.1.4 Sai lệch về tính năng của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng trong một số trường hợp có thể đưa ra kết quả đặc tính kháng khác nhau cho chất chỉ thị. Trong trường hợp như vậy, nhà sản xuất cần cung cấp thông tin theo yêu cầu các điều kiện thử liên quan chi tiết.

11.1.5 Nếu người sử dụng thiết lập dữ liệu về số quần thể hoặc giá trị D và các giá trị này nằm ngoài giới hạn yêu cầu của tiêu chuẩn liên quan hoặc nằm ngoài thông tin trên nhãn, thì người sử dụng nên tìm kiếm thông tin từ nhà sản xuất để đảm bảo rằng cùng các kỹ thuật, phương pháp và điều kiện được sử dụng để thu được dữ liệu (xem tài liệu tham khảo [12], [14], [18], [19], [20], [21], [30], [31] và [32]).

11.2 Quần thể sinh vật thử danh nghĩa

11.2.1 Nhà sản xuất phải cung cấp quần thể sinh vật thử của từng chất chỉ thị sinh học như một phần thông tin ghi nhãn. Các yêu cầu được nêu trong tiêu chuẩn về số vi sinh vật tối thiểu trên chất chỉ thị sinh học hoặc vật liệu mang chủng để đảm bảo sức kháng tối thiểu của chất chỉ thị. Khi thử, quần thể cần đạt từ 50 % đến 300 % quần thể danh nghĩa. Nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cần được tham khảo vấn đề đảm bảo cùng kỹ thuật và quy trình được sử dụng vì độ biến động trong các quy trình thử có thể ảnh hưởng đến kết quả của việc xác định quần thể. ISO 11138-1 yêu cầu nhà sản xuất cung cấp thông tin này theo yêu cầu.

11.2.2 Các bào tử, như *Geobacillus stearothermophilus*, có thể đòi hỏi quy trình sốc nhiệt để đạt được độ chính xác cao hơn khi đếm. Nhiều sự kết hợp giữa nhiệt độ và thời gian đã được sử dụng thành công. Kết quả có thể ảnh hưởng bởi xử lý cơ học vật liệu mang chủng và do đó bởi các vi sinh vật trong quá trình chuẩn bị các ước số (xem tài liệu tham khảo [18]). Thực tiễn của các phòng thí nghiệm khác nhau và ngay cả sự khác nhau khi thực hiện của mỗi cá nhân có thể dẫn đến các kết quả khác nhau.

11.2.3 Phương pháp loại bỏ bào tử khỏi vật liệu mang chủng cần được xác nhận và có thể bao gồm phân hủy cơ học vật liệu mang hoặc các phương pháp khác như siêu âm. Nếu người sử dụng dùng phương pháp khác với khuyến nghị của nhà sản xuất thì phương pháp đó cần được xác nhận.

11.2.4 Lưu chất để phân hủy không được ảnh hưởng đến số lượng vi sinh vật sống sót (ví dụ nó không được là môi trường tăng trưởng) và cũng không được ảnh hưởng âm tính đến kết quả do tác động ngăn chặn bất kỳ đối với sự tăng trưởng của vi sinh vật (xem Điều 12).

11.2.5 Người sử dụng cần tuân thủ các quy trình khuyến nghị của nhà sản xuất về phục hồi để đảm bảo các kết quả có khả năng so sánh.

11.2.6 Lưu chất diệt khuẩn và vật liệu mang chủng phải được xử lý vô khuẩn nhằm tránh sự nhiễm vi khuẩn hoặc nhiễm khuẩn chéo có thể gây sai lệch các kết quả.

11.2.7 Cần chú ý tới độ chính xác của tấm đếm. Độ chính xác của bảng đếm phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm cả sự pha loãng và sai số pipet, hiệu chuẩn thiết bị pipet, đào tạo kỹ thuật viên và số khuẩn lạc (CFU) trên mỗi đĩa. Đĩa đếm có từ 30 CFU đến 300 CFU thường được chấp nhận cho độ chính xác thống kê cao nhất.

11.2.8 Bộ tiêu chuẩn ISO 11138 giới hạn độ lệch so với số danh nghĩa được ghi trên nhãn. Người sử dụng cần chú ý rằng nếu quần thể danh nghĩa của chất chỉ thị từ một mẻ hoặc lô chất chỉ thị cho trước được thử bởi người sử dụng thì sai lệch có thể vượt quá giới hạn cho trong (các) phần liên quan của tiêu chuẩn ISO 11138. Điều này có thể do, ví dụ, sử dụng môi trường nuôi cấy khác nhau hoặc kỹ thuật đếm khác nhau (xem Tài liệu tham khảo [17]).

11.3 Xác định sức kháng

11.3.1 Quy định chung

Nếu người sử dụng chọn kiểm tra công bố nhãn hoặc xác định giá trị D của chất chỉ thị sinh học trên hoặc trong cá thể cần tiệt khuẩn thì họ cần sử dụng cùng điều kiện như nhà sản xuất sử dụng. Việc này bao gồm sử dụng các thông số cụ thể cho thiết bị đo các tổ hợp đối chứng liên quan. Sức kháng của chất chỉ thị sinh học có thể ước lượng hoặc tính bằng cách sử dụng ba phương pháp: phương pháp đường cong sống sót, phương pháp tỷ lệ âm tính và tính cửa sổ sống-chết. Sau khi tiếp xúc trong khoảng thời gian tăng lên của quá trình tiệt khuẩn (nghĩa là thời gian duy trì), chất chỉ thị được thử bằng phương pháp nêu trong các điểm từ a) đến c). Bộ tiêu chuẩn ISO 11138 cung cấp yêu cầu cho từng phương pháp có thể sử dụng kết hợp để ước lượng sức kháng.

Sự khác biệt chính giữa ba phương pháp này được nêu dưới đây.

a) Phương pháp đường cong sống sót

Phương pháp này yêu cầu đếm số các khuẩn lạc. Tùy thuộc vào loại vật liệu mang chủng và thuộc tính của vi sinh vật, phương pháp này thường sử dụng sự suy giảm cơ học của vật liệu mang chủng (sử dụng kỹ thuật vô khuẩn) với sự phục hồi sau đó và đếm tổng số khuẩn lạc phục hồi trên môi trường đặc (ví dụ các khuẩn lạc riêng rẽ trên đĩa thạch).

b) Phương pháp tỷ lệ âm tính

Phương pháp này đòi hỏi việc xác định tăng trưởng/không tăng trưởng và sử dụng việc cấy truyền vô khuẩn vật liệu mang chủng nguyên vẹn vào môi trường lỏng. Việc cấy truyền được thực hiện không gây ảnh hưởng bất kỳ về cơ học, vi trùng học hoặc nhiệt tới vật liệu mang chủng.

c) Phương pháp cửa sổ tồn tại – tiêu diệt

Phương pháp này dựa trên phương pháp tỷ lệ âm tính, đưa ra giới hạn dưới khi tất cả các mẫu cho thấy tăng trưởng và giới hạn trên khi không chất chỉ thị nào thể hiện sự tăng trưởng sau khi tiếp xúc với toàn bộ quá trình tiệt khuẩn hoặc sau các khoảng thời gian của quá trình tiệt khuẩn (xem ISO 11138-1:2006, Phụ lục E).

CHÚ THÍCH Việc xác định giá trị D từ loạt tiếp xúc bất kỳ thường lấy trung bình dạng nhất định của kết quả từ tập hợp mẫu. Dữ liệu tổng hợp ở dạng này có một giới hạn thống kê. Dữ liệu chỉ có thể kết hợp khi các mẫu tương đương về mặt thống kê. Ví dụ, nếu mười mẫu được phân bố trong toàn bộ phòng tiệt khuẩn thì chúng không phải đều tương đương thực sự. Tuy nhiên, nhiều mẫu được nhóm trong cùng một vị trí trong phòng tiệt khuẩn có thể được coi là tương đương thực sự (xem tài liệu tham khảo [25] và [28]).

11.3.2 Phương pháp đường cong sống sót

Phương pháp này còn được gọi là “phương pháp đếm trực tiếp” và “phương pháp số đếm”. Phương pháp này sử dụng quy trình đếm trực tiếp (xem ISO 11138-1) và cần được thực hiện trên vật liệu mang chủng (xem Hình A.4).

Thông tin chi tiết về các quy trình, xem 11.2 và Phụ lục F.

11.3.3 Phương pháp tỷ lệ âm tính

Có nhiều phương pháp như vậy được sử dụng, gọi là phương pháp tỷ lệ âm tính hoặc phương pháp lượng tử. Sự tăng trưởng hoặc không tăng trưởng được quan sát trên số lượng được thử (xem Hình A.4).

Tiêu chuẩn này đưa ra phương pháp tham khảo chung cho bộ tiêu chuẩn ISO 11138, đó là quy trình Holcomb-Spearman-Karber giới hạn (LHSKP). Hai phương pháp thống kê thường được sử dụng khác là quy trình Holcomb-Spearman-Karber (HSKP) và quy trình Stumbo-Murphy-Cochran (SMCP) có thể được dùng trong các điều kiện cụ thể (xem Phụ lục C).

a) Quy trình Holcomb-Spearman-Karber giới hạn (LHSKP).

Quy trình này có thể được sử dụng nếu khoảng thời gian tiếp xúc liên tục, như số lần hoặc liều, chênh nhau một khoảng thời gian không đổi và nếu số lần lặp giống nhau được áp dụng tại mỗi khoảng thời gian tiếp xúc. Ví dụ, khoảng tiếp xúc có thể ở 3 min, 5 min, 7 min và 9 min, thể hiện khoảng thời gian 2 min. ISO 11138-1 quy định ít nhất 20 phép lặp ở mỗi khoảng đối với LHSKP (xem Bảng 1 và Hình A.4).

CHÚ THÍCH Thông số tới hạn “thời gian” có thể thay bằng “liều” ở một số quá trình tiệt khuẩn như bức xạ và ôzon.

Giá trị trung bình của D , \bar{D} , được tính bằng cách sử dụng công thức (1).

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (1)$$

trong đó

N_0 là chất cấy chủng ban đầu của sinh vật thử trên mẫu thử;

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i \quad (2)$$

Các ví dụ tính toán được nêu trong Phụ lục C. Thông tin thêm về LHSKP, xem ISO 11138-1 và Block^[9].

b) Quy trình Holcomb-Spearman-Karber (HSKP):

Phương pháp này tương tự với LHSKP nhưng sử dụng công thức chung không đòi hỏi dùng cùng số phép lặp cũng như không sử dụng các khoảng thời gian không đổi.

Giá trị D được tính theo công thức (3).

$$D = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (3)$$

trong đó

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i \quad (4)$$

Các ví dụ tính toán nêu trong Phụ lục C.

c) Quy trình Stumbo–Murphy–Cochran (SMCP):

Công thức dùng cho quy trình Stumbo–Murphy–Cochran đòi hỏi dẫn đến dải tỷ lệ âm, gồm thời gian, t , số đơn vị tăng trưởng âm, r và số phép lặp, n , tại một thời điểm tiếp xúc trong phạm vi dải tỷ lệ âm và số vi sinh vật ban đầu trên một lần lặp, N_0 .

Giá trị D được tính sử dụng công thức (5).

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left(\ln \frac{n}{r} \right)} \quad (5)$$

Để thu được mức tin cậy cao hơn khi sử dụng quy trình Stumbo–Murphy–Cochran, giá trị D cần được tính là giá trị trung bình của ít nhất ba lần trong dải tỷ lệ âm nhằm xác nhận độ tái lặp.

Thông tin thêm về các qui trình, xem Phụ lục C.

11.3.4 Đặc tính đáp ứng tồn tại-tiêu diệt

Phương pháp này đòi hỏi tổng số chất chỉ thị sinh học là 100 với 50 lần lặp ở hai điều kiện xác định là thời gian tại đó tất cả các chất chỉ thị cho thấy sự tăng trưởng và thời gian tại đó không có chất chỉ thị nào cho thấy sự tăng trưởng sau khi đặt trong các điều kiện quy định (xem Phụ lục G).

11.4 Xác định giá trị z

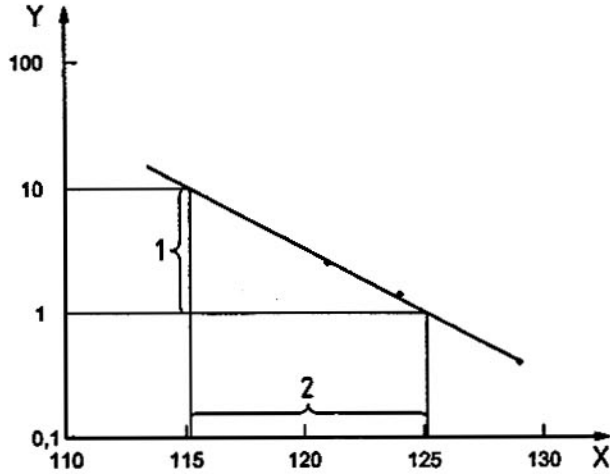
11.4.1 Quy định chung

Giá trị z là thay đổi nhiệt độ tiếp xúc của quá trình tiệt khuẩn nhiệt, tương ứng với mười lần thay đổi giá trị D . Giá trị z cho phép người sử dụng biểu thị khả năng tiêu diệt tương đương đối với các quá trình tiệt khuẩn. Việc tính giá trị z chỉ có ý nghĩa biểu thị khả năng tiêu diệt đo được trong các điều kiện quá trình biến đổi có thể trải từ các tải lớn chậm gia nhiệt tới tải tỷ trọng thấp đạt các điều kiện trạng thái ổn định nhanh hơn.

Giá trị z có thể được xác định chỉ với hai giá trị D của quá trình. Tuy nhiên, giá trị thu được sẽ có giới hạn tin cậy rộng. Vì lý do này, tốt nhất là tính giá trị z từ ba hoặc nhiều giá trị D , như quy định trong ISO 11138-3 (xem Hình A.3).

11.4.2 Vẽ đồ thị giá trị z

Giá trị z có thể được xác định bằng cách vẽ đồ thị loga của giá trị D theo nhiệt độ trên thang bán loga (xem tài liệu [33]). Đường phù hợp nhất sẽ là tuyến tính (Hình 1) và ước lượng giá trị z là nghịch đảo âm của đường dốc.



CHÚ DẪN

- Y giá trị D (min) (vẽ theo thang logarit)
- X nhiệt độ (°C)
- 1 giảm một loga
- 2 giá trị z (°C)

Hình 1 – Vẽ đồ thị giá trị z

11.4.3 Phương pháp toán học tính toán giá trị z

Phương pháp toán học tính toán đường phù hợp nhất là phương pháp thống kê để biểu thị chính xác độ dốc của dữ liệu. Đường phù hợp nhất có thể được rút ra từ công thức của đường hồi quy tuyến tính.

Công thức (6) và (7) được dùng để rút ra công thức của đường hồi quy tuyến tính.

$$\sum_{i=1}^n y_i = b + m \sum_{i=1}^n x_i \tag{6}$$

$$\sum_{i=1}^n x_i y_i = b \sum_{i=1}^n x_i + m \sum_{i=1}^n x_i^2 \tag{7}$$

trong đó

b là phần bị chặn y của đường hồi qui;

m là độ dốc;

n là số điểm x, y .

Các công thức trên được sửa đổi để bao gồm các cặp $x, \log y$ để phản ánh thang đo loga tuyến tính, do đó:

$$\sum_{i=1}^n \log y_i = bn + m \sum_{i=1}^n x_i \quad (8)$$

$$\sum_{i=1}^n x_i \log y_i = b \sum_{i=1}^n x_i + m \sum_{i=1}^n x_i^2 \quad (9)$$

Sử dụng phương pháp bình phương nhỏ nhất, công thức (10) được lập cho độ dốc của đường thẳng:

$$m = \frac{n \sum_{i=1}^n (x_i \log y_i) - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n \log y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \quad (10)$$

trong đó

n là số cặp giá trị D /nhiệt độ (điểm dữ liệu);

x biểu thị nhiệt độ;

y biểu thị giá trị D .

Từ công thức này, giá trị z có thể được tính bằng giá trị tuyệt đối của phần bị chắn của đường dốc này:

$$z = \left| \frac{1}{m} \right| \quad (11)$$

Các ví dụ tính toán nêu trong Phụ lục E (xem thêm ISO 11138-3 và ISO 11138-4).

11.4.4 Hệ số tương quan, r , đối với giá trị z

Hệ số tương quan, r , là giá trị toán học chỉ thị độ đúng để dự đoán giá trị D bằng hồi quy tuyến tính nhiệt độ và các giá trị D tương ứng. Hệ số tương quan + 1,000 0 hoặc - 1,000 0 có thể chỉ ra rằng tất cả các điểm dữ liệu nằm trên đường hồi quy tuyến tính. Bình phương của hệ số tương quan, r^2 , được gọi là hệ số xác định. Hệ số xác định là thước đo đường hồi qui thể hiện dữ liệu tốt đến đâu. Giá trị r^2 bằng 0,800 0 hoặc lớn hơn được coi là mẫu phù hợp chấp nhận được. Chi tiết các tính toán được nêu trong Phụ lục E.

CHÚ THÍCH Giá trị D cần được biểu thị đến bốn chữ số thập phân nhằm tăng độ chính xác của các hệ số nêu trên khi sử dụng trong các tính toán ở 11.4.3.

11.5 Xác định giá trị tiệt khuẩn tương đương $F_{(T, z)}$

$F_{(T, z)}$ được định nghĩa là số phút tương đương của quá trình ở nhiệt độ chuẩn T_{ref} . Việc tính $F_{(T_{ref}, z)}$ đòi hỏi phải biết giá trị z .

$$F_{(T_{ref}, z)} = 10^{\left(\frac{T - T_{ref}}{z}\right)} \quad (12)$$

Giá trị F phổ biến nhất là F_0 , dùng trong tiệt khuẩn nóng ẩm. F_0 là giá trị F cụ thể đối với các phút tương đương tại 121,1 °C sử dụng giá trị z là 10,0 °C. Đây đã trở thành tiêu chuẩn toàn cầu cho thiết kế quá trình nóng ẩm. Các giá trị F tương đương đã được sử dụng trong các quá trình tiệt khuẩn nóng ẩm, nóng khô và gần hơn là etylen oxit (xem tài liệu [29]). Khi xác nhận và theo dõi các quá trình bằng chất chỉ thị sinh học, thời gian thực tế tại nhiệt độ bất kỳ được tính theo nhiệt độ chuẩn cụ thể như một hàm số của giá trị z cụ thể dùng cho chất chỉ thị sinh học cụ thể đó. Điều này cho phép sự tích hợp của khả năng tiêu diệt và được sử dụng để tính giá trị giảm loga bào tử (SLR) thực tế đối với quá trình.

11.6 Thiết lập giảm loga bào tử (SLR)

Đồ thị thời gian-chết-nhiệt độ là phương pháp so sánh các giá trị F trên thang logarit theo nhiệt độ. Phương pháp này cho phép biểu thị quá trình so với hiệu quả của nó trong việc giảm kiểm chứng bào tử. Giá trị F biểu thị thời gian tương đương tại một nhiệt độ xử lý quy định, kết hợp với giá D , cho phép tính sự giảm số lượng bào tử của một quần thể đồng nhất xuống còn một lượng cụ thể. Kết quả này là khả năng tiêu diệt trong quá trình biểu thị bằng giảm loga bào tử (SLR) và có thể biểu thị bằng log của quần thể bào tử ban đầu, N_0 , trừ đi loga của quần thể cuối, N_F . Công thức tính F_T sử dụng thay đổi này trong quần thể vi khuẩn ở các điều kiện qui định được cho bởi công thức (13).

$$F_{(T, z)} = D_T (\log N_0 - \log N_F) \quad (13)$$

trong đó

T là nhiệt độ;

z là giá trị z cụ thể;

D_T là giá trị D tại nhiệt độ T qui định;

N_0 là quần thể bào tử hoặc vi sinh vật tạp nhiễm ban đầu;

N_F là quần thể bào tử hoặc vi sinh vật tạp nhiễm cuối cùng.

Thay đổi trong quần thể bào tử này là giảm loga bào tử (SLR) được biểu thị bằng công thức (14).

$$SLR = \log N_0 - \log N_F \quad (14)$$

Do đó, thời gian-chết-nhiệt có thể được biểu thị bằng cách sử dụng công thức (15):

$$F_T = D_T \times SLR \quad (15)$$

Khi đó, giảm loga bào tử được dùng để tính mức đảm bảo vô khuẩn của sản phẩm (SAL).

11.7 Tính mức đảm bảo vô khuẩn (SAL)

Xác suất của một đơn vị không vô khuẩn từ một quá trình kiểm soát vi khuẩn được biểu thị bằng mức đảm bảo vô khuẩn (SAL). Tính SAL bằng công thức (16).

$$SAL = 10^{-(SLR \cdot \log N_0)} \quad (16)$$

trong đó N_0 là quần thể bào tử hoặc vi sinh vật tạp nhiễm ban đầu.

SAL nhỏ nhất thường được chấp nhận là 10^{-6} hoặc nhỏ hơn một phần triệu trường hợp có đơn vị không vô khuẩn. Do đó, tổng khả năng tiêu diệt tích hợp phải đưa ra từ sáu giảm loga bào tử tương đương trở lên cao hơn so với kiểm chứng vi khuẩn đã được tiệt khuẩn.

CHÚ THÍCH Khái niệm này được biểu thị bằng đồ thị ở Hình A.1 và A.2.

11.8 Thiết bị thử

11.8.1 Cần chú ý đặc biệt đến loại thiết bị đo các tổ hợp đối chứng sử dụng. ISO 18472 đưa ra yêu cầu đối với thiết bị đo các tổ hợp đối chứng cần sử dụng để phù hợp với các yêu cầu của tiêu chuẩn này. Nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học phải tuân thủ các tiêu chuẩn liên quan trong bộ tiêu chuẩn ISO 11138 nếu họ công bố phù hợp với các tiêu chuẩn này.

11.8.2 Thiết bị tiệt khuẩn cấy thí điểm hoặc thiết bị tiệt khuẩn sản xuất có thể cung cấp thông tin hữu ích nhưng không nên dựa vào đó để xác nhận công bố trên nhãn của nhà sản xuất. Cần chú ý đến tập hợp các thông số và số lượng xung chân không cũng như độ sâu chân không.

11.8.3 Tất cả các thiết bị kỹ thuật, bao gồm cả pipet tự động hoặc điều chỉnh, cần được hiệu chuẩn và/hoặc kiểm tra định kỳ.

11.8.4 Việc kiểm tra và bảo trì thiết bị kỹ thuật cần được lập thành văn bản.

12 Điều kiện nuôi cấy

12.1 Quy định chung

12.1.1 Nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cần cung cấp thông tin như yêu cầu trong ISO 11138-1 cho người sử dụng về các điều kiện nuôi cấy (nghĩa là nhiệt độ cấy, thời gian cấy và lựa chọn môi trường tăng trưởng). Nếu người sử dụng dùng các điều kiện nuôi cấy khác thì các điều kiện đó cần được xác nhận.

12.1.2 Các quy trình cần được thực hiện trong khu vực phòng thí nghiệm xác định cho mục đích này, đưa ra lưu ý thích hợp đến kỹ thuật vô khuẩn và thực hành phòng thí nghiệm tốt. Một thực hành tốt cần bao gồm các kiểm soát âm với từng phép thử được thực hiện khi sử dụng các khu vực phòng thí nghiệm chung cho các phép thử này. Nếu không thể có khu vực xác định cho mục đích này hoặc nếu có bất kỳ rủi ro nhiễm bẩn chéo nào, thì cần thực hiện quy trình này trong một vùng tới hạn xác định (ví dụ như băng ghế vô khuẩn hoặc tủ an toàn sinh học không có trao đổi không khí giữa vùng đó và khu

TCVN 8583:2010

vực xung quanh nơi chất chỉ thị sinh học hoặc vi sinh vật có cùng thuộc tính tăng trưởng hoặc tương tự nhau được sản xuất, đóng gói hoặc xử lý).

12.1.3 Cần tuân thủ điều kiện nuôi cấy khuyến cáo của nhà sản xuất. Nếu sử dụng điều kiện nuôi cấy khác với khuyến cáo của nhà sản xuất thì chúng cần được xác nhận để xác định ảnh hưởng của chúng tới tính năng của chất chỉ thị sinh học.

12.1.4 Đối với mục đích đánh giá xác nhận, điều kiện nuôi cấy cần được xem xét cẩn thận. Người sử dụng cần tìm kiếm thông tin trong các tiêu chuẩn sẵn có như bộ ISO 11737 (xem Điều 2).

12.2 Nhiệt độ nuôi cấy

12.2.1 Cần tham khảo nhãn của chất chỉ thị sinh học liên quan đến nhiệt độ nuôi cấy khuyến cáo. Việc sai lỗi trong nuôi cấy chất chỉ thị sinh học ở nhiệt độ nuôi cấy thích hợp có thể làm mất hiệu lực các kết quả thử.

12.2.2 Sinh vật thử đã tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn có thể làm tăng độ nhạy tới các biến thiên trong nhiệt độ nuôi cấy. Một số sinh vật thử có thể tăng sự phục hồi ở nhiệt độ nuôi cấy thấp hơn nhiệt độ khuyến cáo và giảm sự phục hồi ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nuôi cấy khuyến cáo. Nói chung, chất chỉ thị sinh học *Geobacillus stearothermophilus* có thể nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 °C đến 60 °C, và chất chỉ thị sinh học *Bacillus atrophaeus* và *Bacillus subtilis* có thể nuôi cấy ở nhiệt độ trong khoảng 30 °C đến 39 °C hoặc theo quy định của nhà sản xuất.

12.3 Khoảng thời gian nuôi cấy

12.3.1 Khoảng thời gian cấy cần thiết có thể thay đổi theo tính chất của chất chỉ thị sinh học và quá trình tiệt khuẩn; ISO 11138-1:2006, 7.3.2 khuyến cáo thời gian là 7 ngày đối với chất chỉ thị sinh học để thiết lập quá trình. Vấn đề này cần tham khảo nhãn của chất chỉ thị sinh học hoặc thông tin khác do nhà sản xuất cung cấp.

Thông tin do nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cung cấp được thiết lập trong các điều kiện quy định có thể không áp dụng trong cơ sở của người sử dụng. Do đó, người sử dụng cần xem xét xác nhận các khuyến cáo của nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học về thời gian nuôi cấy.

12.3.2 Đối với các quá trình phi tiêu chuẩn hoặc quá trình tiệt khuẩn mới không được đề cập trong tiêu chuẩn quốc tế hiện hành thì khoảng thời gian cấy cần được xác nhận dựa trên yêu cầu quốc gia; ISO 11138-1:2006, 7.3.2 khuyến cáo khoảng thời gian cấy là 14 ngày.

Chất chỉ thị sinh học độc lập có thể không được thiết kế đủ lượng môi trường để cho phép phục hồi trong khoảng thời gian cấy kéo dài.

Cần chú ý khi xem xét sử dụng chất chỉ thị sinh học độc lập trong việc xác nhận và theo dõi các quá trình có khả năng tăng trưởng chậm do tồn dư tác nhân tiệt khuẩn.

12.3.3 Nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học có thể xác nhận thiết kế của tổ hợp môi trường bào tử mang/phục hồi (ví dụ dải bào tử bán cùng môi trường phục hồi như một bộ hoặc chất chỉ thị sinh học độc lập). Việc xác nhận thời gian cấy rút ngắn cho sản phẩm này không được thực hiện lại bởi người sử dụng, chùng nào người sử dụng cuối sử dụng sản phẩm với cùng tác nhân tiết khuẩn như đã được sử dụng trong xác nhận (ví dụ xác nhận thiết kế và sử dụng trong etylen oxit). Nếu người sử dụng cuối dự kiến sử dụng kết hợp nhiệt độ cấy/môi trường phục hồi/chất mang bào tử chưa được đánh giá xác nhận bởi nhà sản xuất (ví dụ dải bào tử sử dụng môi chất phục hồi không bán như một phần của bộ kit), thì người sử dụng cuối cần đánh giá xác nhận thời gian cấy rút ngắn sử dụng phương án lấy mẫu thống kê xác định và quy trình có các tiêu chí chấp nhận thiết lập trước.

12.4 Chọn môi trường tăng trưởng

12.4.1 Hầu hết các nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cung cấp trực tiếp môi trường cấy hoặc cung cấp thông tin liên quan đến việc chuẩn bị môi trường cấy thích hợp. Môi trường cấy sử dụng bởi các nhà sản xuất khác nhau có thể khác nhau đáng kể; do đó, điều quan trọng là tuân theo các khuyến cáo của nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học.

12.4.2 Để đánh giá xác nhận thời gian cấy chất chỉ thị sinh học, độ biến động vốn có của môi trường cấy đòi hỏi sàng lọc tính năng của nhiều lô môi trường và bảo toàn một lượng thích hợp các lô phát hiện là cung cấp tính năng tăng trưởng mong muốn. Điều này cho phép so sánh với các lô mới.

12.4.3 Việc chọn môi trường cấy phù hợp đòi hỏi xem xét nhiều biến, như pH của môi trường cấy và sự có mặt của các chất ức chế như muối, chất chỉ thị pH hoặc kháng sinh. Các chất khác trong môi trường cấy có thể ảnh hưởng đến sự phục hồi của tác nhân tiết khuẩn-sinh vật thử ứng suất.

12.4.4 Người sử dụng không nên xử lý quá mức môi trường cấy, vì tiết khuẩn quá mức có thể tạo ra các thay đổi gây ảnh hưởng tới các thuộc tính tăng trưởng của nó. Khả năng của môi trường cấy tạo sự tăng trưởng thấp của số lượng vi sinh vật cần được chứng minh (xem tài liệu [10], [12], [13] và [21]).

12.4.5 Mỗi lô môi trường tăng trưởng cần được kiểm tra bằng phép thử tăng trưởng phù hợp và so sánh với lô sử dụng trước đó, sao cho có thể xác định được tinh nhất quán giữa các lô.

13 Yêu cầu đối với bên thứ ba

13.1 Quy định chung

13.1.1 Thử nghiệm bổ sung, nội bộ hoặc bởi phòng thí nghiệm bên thứ ba, có thể không giống với công bố trên nhãn của nhà sản xuất do độ biến động vốn có của hệ thống thử và nhân sự thử. Vì lý do này, dung sai được quy định trong ISO 11138-1:2006, 6.3.2 và 6.4.3 (xem tài liệu [31], [32] và [33]).

13.1.2 Cơ sở bên thứ ba cần sử dụng thiết bị thử và phương pháp thử, bao gồm các phép thử song song và lặp lại, yêu cầu bởi tiêu chuẩn liên quan.

TCVN 8583:2010

13.1.3 Cơ sở thử của bên thứ ba cần phải là phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN ISO IEC 17025^[2] hoặc có hệ thống chất lượng được thừa nhận để thực hiện dịch vụ.

13.2 Yêu cầu tối thiểu đối với phép lặp và tổng số chất chỉ thị sinh học

Bảng 1 – Số mẫu tối thiểu theo phương pháp

Phương pháp thử theo ISO 11138-1	Số mẫu thử tối thiểu	Số khoảng thời gian tiếp xúc tối thiểu	Tổng số mẫu thử tối thiểu
Số đếm ban đầu của sinh vật thử sống ^a	4	–	4
Phương pháp đường cong sống (xem Phụ lục F)	4	5	20
Phương pháp tỷ lệ âm tính (xem Phụ lục C)	20	5 ^b	100 ^b
Cửa sổ sống–chết (ISO 11138-1:2006, Phụ lục E)	50	2	100
Tổng số tối thiểu phụ thuộc vào việc lựa chọn kết hợp các phương pháp			124 hoặc 204

^a Đếm số sống của vật liệu mang chủng hoặc chất chỉ thị sinh học chưa được xử lý.

^b Tập hợp điều kiện thử thêm ở lần tiếp xúc sau t_0 (xem Bảng C.1) không được dùng để tính toán nhưng là một điều kiện để chấp nhận kết quả thử là hợp lệ.

Tổng số cần ít nhất là 20 chất chỉ thị sinh học cho phương pháp đường cong sống (xem Phụ lục F), với ít nhất năm giai đoạn tiếp xúc và bốn lần lặp cho mỗi giai đoạn. Phụ lục C đề cập đến yêu cầu tối thiểu đối với LHSKP, với tổng số ít nhất là 100 chất chỉ thị sinh học. Tối thiểu là năm giai đoạn tiếp xúc phân cấp được dùng với 20 lần lặp cho mỗi giai đoạn. Một giai đoạn tiếp xúc cần dẫn đến tất cả các chất chỉ thị sinh học dương. Cần có ít nhất hai giai đoạn tiếp xúc liên tiếp dẫn đến không có chất chỉ thị sinh học nào dương tính. Cần có ít nhất hai giai đoạn tiếp xúc trung gian dẫn đến đáp ứng tỷ lệ. Mô tả cửa sổ sống–chết đòi hỏi tổng số 100 chất chỉ thị sinh học với 50 lần lặp ở hai điều kiện (ISO 11138-1:2006, Phụ lục E). Đặc trưng kháng được xác định theo ISO 11138-1 đòi hỏi áp dụng ít nhất hai phương pháp trong số ba phương pháp nêu trên. Điều này có nghĩa là sử dụng ít nhất 124 hoặc 204 chất chỉ thị sinh học tương ứng, tùy thuộc vào các phương pháp được chọn.

Cần ít nhất ba lần xác định giá trị D tại ba nhiệt độ khác nhau để ước lượng giá trị z cho quá trình tiệt khuẩn nóng ẩm theo ISO 11138-3 và quá trình tiệt khuẩn nóng khô theo ISO 11138-4. (Xem tài liệu [32].

ISO 11138-1:2006, Phụ lục A yêu cầu bốn lần lặp để xác định số đếm sống.

13.3 Thiết bị thử

Phòng thử nghiệm thực hiện các phép thử theo bộ tiêu chuẩn ISO 11138 cần áp dụng thiết bị thử yêu cầu, bao gồm cả thiết bị đo các tổ hợp đối chứng liên quan (xem ISO 18472).

Thông tin thêm xem 11.8.

14 Đào tạo nhân sự

Những người chịu trách nhiệm bố trí, khôi phục, thử nghiệm và tất cả các việc xử lý chất chỉ thị sinh học khác cần được đào tạo thích hợp. Việc đào tạo này cần được lập thành văn bản và cần định kỳ đánh giá tính thích hợp của việc đào tạo. Cần có các quy trình bằng văn bản đối với việc thử và xử lý chất chỉ thị sinh học cũng như đối với các hoạt động hỗ trợ như chuẩn bị và tiệt khuẩn môi trường cấy. Khi sử dụng kỹ thuật vô khuẩn, cần chú ý đặc biệt đến nhân sự được đào tạo trong kỹ thuật này.

15 Bảo quản và xử lý

15.1 Người bán hoặc người cung cấp chịu trách nhiệm vận chuyển tới người sử dụng và cần đảm bảo rằng biến thiên nhiệt độ xảy ra trong quá trình vận chuyển không gây ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính kháng ghi trên nhãn. Người bán hoặc cung cấp cần thỏa thuận với người sử dụng về phương tiện vận chuyển, nhằm đảm bảo rằng các điều kiện là thích đáng để duy trì đặc trưng tính năng của chất chỉ thị sinh học trong quá trình vận chuyển.

15.2 Cần phải luôn tuân thủ các khuyến cáo của nhà sản xuất về việc bảo quản và xử lý chất chỉ thị sinh học. Việc không tuân thủ các khuyến cáo này có thể gây ảnh hưởng bất lợi tới tính toàn vẹn và tính năng của chất chỉ thị sinh học và dẫn đến việc giả định sai về hiệu lực của quá trình tiệt khuẩn. Nói chung, chất chỉ thị sinh học cần luôn được duy trì trong bao gói bảo vệ cho đến khi sử dụng. Chất chỉ thị sinh học là loại dùng ngay và trong hệ thống bao gói bảo vệ nó khỏi các ảnh hưởng vi sinh vật học bên ngoài. Việc bảo quản chất chỉ thị sinh học cần tính đến nhiệt độ, độ ẩm tương đối, các ảnh hưởng hóa học và ánh sáng.

15.3 Chất chỉ thị sinh học gồm các vi sinh vật không nguy hại có thể được sử dụng không giới hạn, việc chuyên chở và vận chuyển cần tuân theo quy tắc quốc tế về vận chuyển vi sinh vật không nguy hại.

16 Thái bỏ chất chỉ thị sinh học

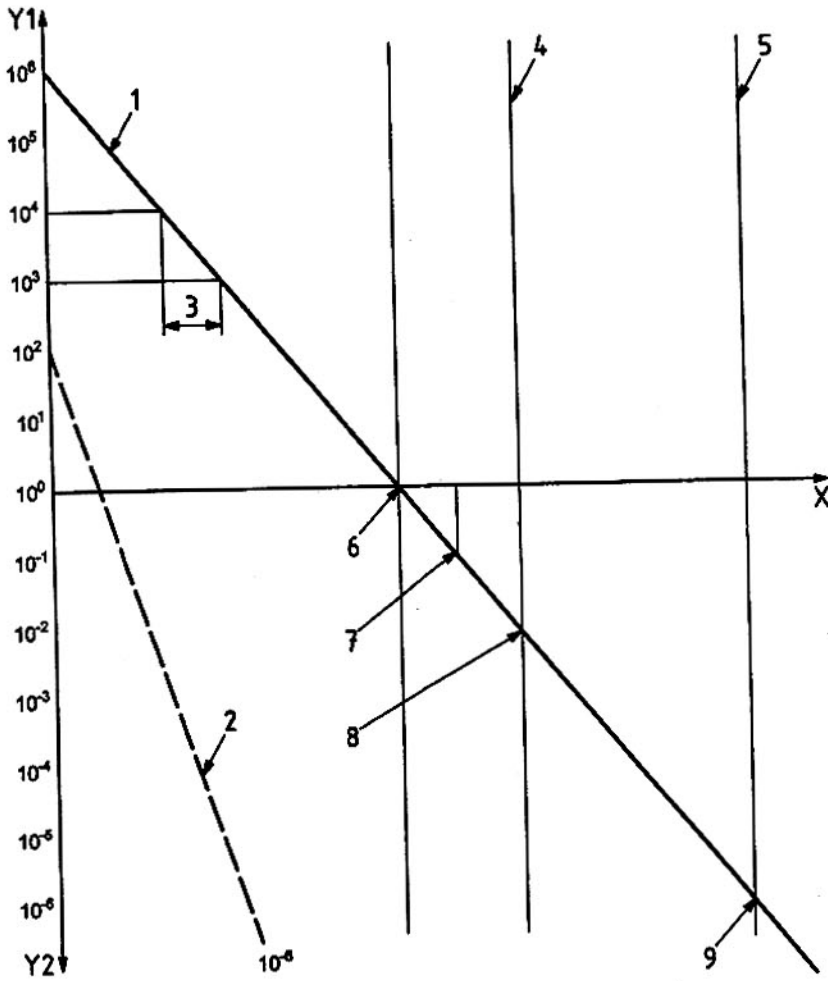
Theo ISO 11138-1, nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cần cung cấp hướng dẫn thái bỏ. Chất chỉ thị sinh học đã khử hoạt tính có thể được loại bỏ như rác thải gia đình. Chất chỉ thị quá hạn hoặc chưa sử dụng cũng có thể được hủy như rác thải gia đình nếu vi sinh vật là loại không nguy hại. Tuy nhiên, cần tuân thủ hướng dẫn thái bỏ của nhà sản xuất thường đòi hỏi tiệt khuẩn trước khi thái bỏ.

CHÚ THÍCH Quy định quốc gia có thể xác định các chất chỉ thị sinh học là rác thải bệnh viện và việc thái bỏ các chất chỉ thị sinh học này cần được đề cập trong quy định khu vực hoặc quốc gia.

Phụ lục A

(tham khảo)

Tính động học của sự khử hoạt tính vi sinh vật và kỹ thuật đếm



CHÚ DẪN

X thời gian hoặc liều

Y1 số vi sinh vật sống sót (vẽ đồ thị theo thang logarit)

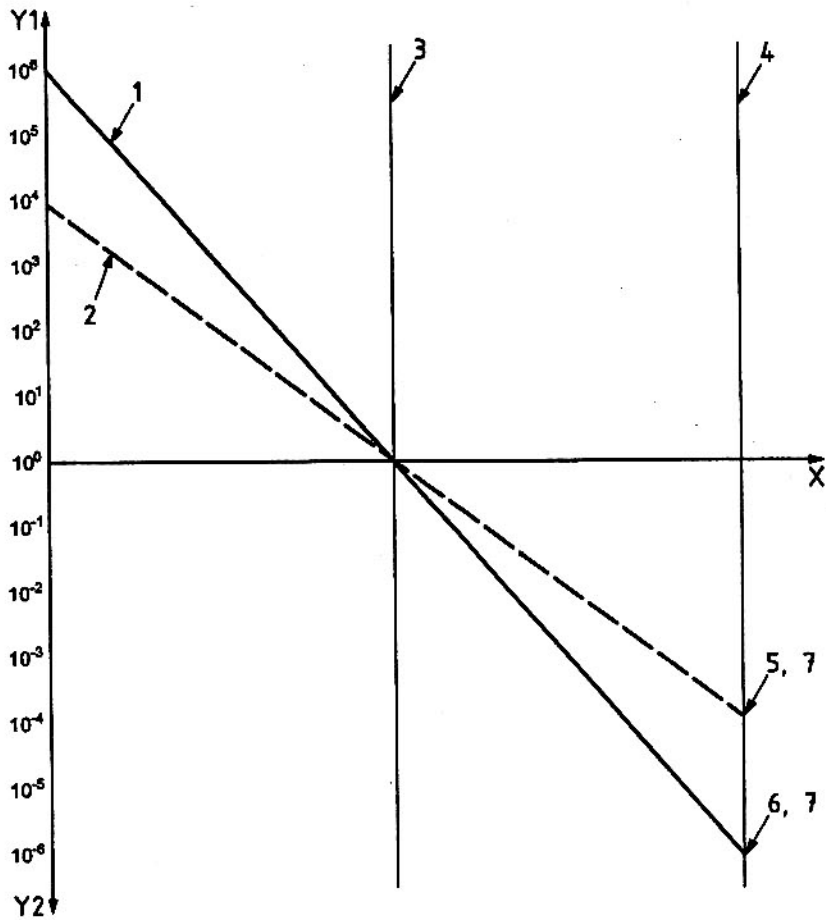
Y2 xác suất vi sinh vật sống sót (vẽ đồ thị theo thang logarit)

- | | |
|--|--|
| 1 chất chỉ thị sinh học | 6 giảm loga sáu (63 % dương tính) |
| 2 vi sinh vật tạp nhiễm | 7 giảm loga bảy (10 % dương tính) |
| 3 giá trị D | 8 giảm loga tám (1 % dương tính) |
| 4 cửa sổ nửa chu kỳ | 9 giảm loga mười hai theo lý thuyết (0,000 1 % dương tính) |
| 5 thời gian tối thiểu của quá trình tiệt khuẩn | |

CHÚ THÍCH 1 Giảm loga đối với sản phẩm đạt trước thời gian tối thiểu của quá trình tiệt khuẩn (xem 3.10).

CHÚ THÍCH 2 Với mục đích của minh họa này, thời gian và liều được thể hiện là điều kiện trạng thái ổn định được kiểm soát chặt và có thể không áp dụng cho các điều kiện thông số quá trình.

Hình A.1 – Ví dụ về quan hệ giữa chất chỉ thị sinh học và vi sinh vật tạp nhiễm trên sản phẩm theo phương pháp vi sinh vật chuẩn



CHÚ DẪN

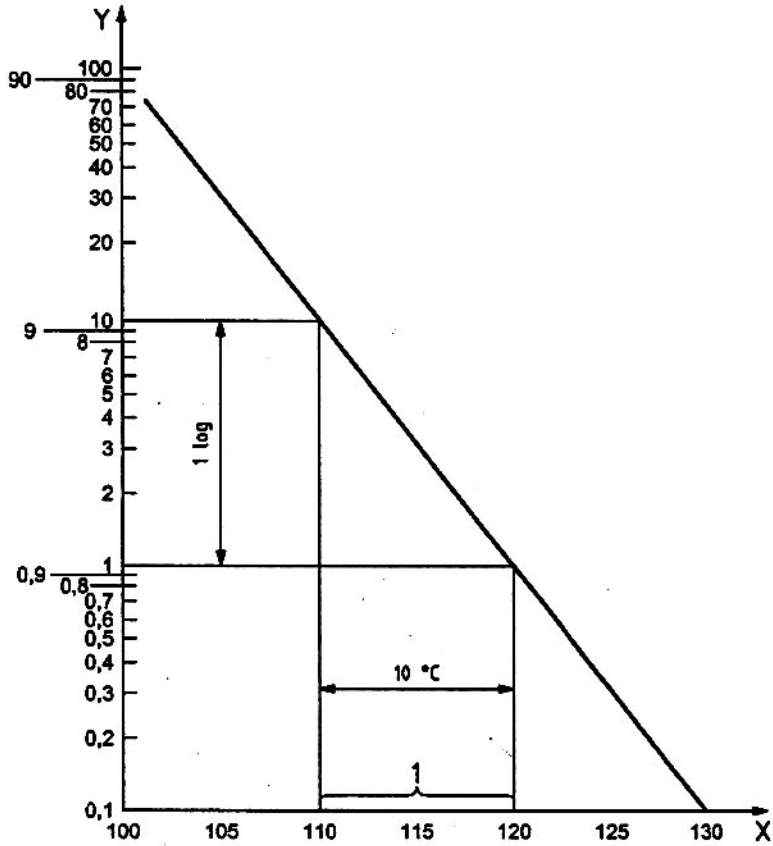
X thời gian hoặc liều

Y1 số vi sinh vật sống (vẽ đồ thị theo thang logarit)

Y2 xác suất vi sinh vật sống (vẽ đồ thị theo thang logarit)

- 1 đường cong biểu diễn giảm loga sáu của BI với sức kháng tối thiểu quy định
- 2 đường cong biểu diễn giảm loga bốn của BI với 1,5 x sức kháng tối thiểu quy định
- 3 cửa sổ nửa chu kỳ tối thiểu
- 4 thời gian tối thiểu của quá trình tiệt khuẩn
- 5 giảm loga tám lý thuyết ($D_{BI} = 1,5 \times D_{min}$)
- 6 giảm loga mười hai lý thuyết ($D_{BI} = D_{min}$)
- 7 các kiểm chứng tương đương

Hình A.2 – Ví dụ về các kiểm chứng sinh học tương đương với các chuẩn bị sức kháng khác nhau

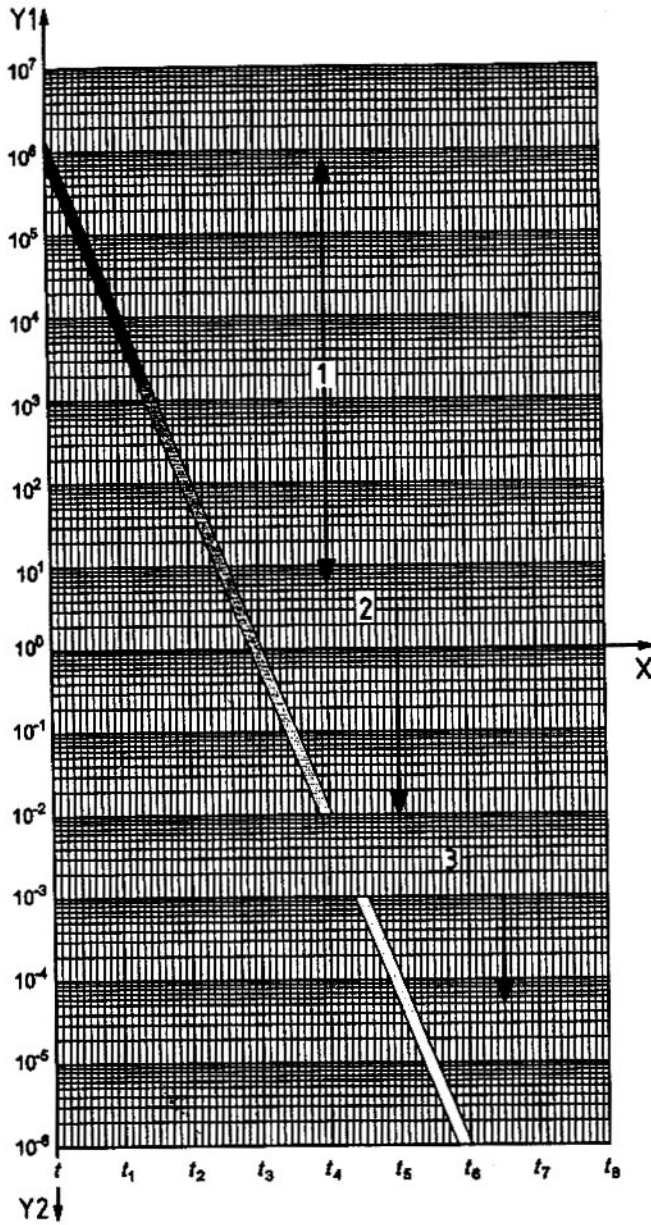
**CHÚ DẪN**

X nhiệt độ (°C)

Y giá trị D , tối thiểu (vẽ đồ thị theo thang logarit)

1 giá trị z (°C)

Hình A.3 – Ví dụ về xác định giá trị z (xem 11.4)



CHÚ DẪN

X thời gian tiếp xúc hoặc liều

Y1 số vi sinh vật sống sót (vẽ đồ thị theo thang logarit)

Y2 xác suất vi sinh vật sống sót (vẽ đồ thị theo thang logarit)

- 1 phương pháp đếm trực tiếp: số vi sinh vật xác định bằng cách đếm các cụm hình thành bởi các vi sinh vật sống
- 2 phương pháp tỷ lệ âm tính: số vi sinh vật ước lượng từ phương pháp tỷ lệ âm tính
- 3 phương pháp tổng số khử hoạt tính (hoặc "chết"): phương pháp tỷ lệ âm tính để thể hiện không có sự tăng trưởng của chất chỉ thị

Hình A.4 – Các khu vực dùng cho phương pháp xác định giá trị D trong các điều kiện đồng nhất

Phụ lục B

(tham khảo)

Thiết bị kiểm chứng quá trình

B.1 Quy định chung

Thiết bị kiểm chứng quá trình có thể có nhiều cấu hình và ứng dụng. Đó là một hạng mục thiết kế để tạo nên một sức kháng xác định với quá trình tiệt khuẩn và dùng để đánh giá tính năng của quá trình đó. Thiết bị kiểm chứng quá trình bán sẵn cần cung cấp kiểm chứng cho quá trình tiệt khuẩn của người sử dụng tương đương hoặc lớn hơn so với đại diện bởi tải.

Thiết bị được kết cấu sao cho chất chỉ thị sinh học có thể được bố trí ở vị trí mà tác nhân tiệt khuẩn khó tiếp cận nhất. Thiết kế của thiết bị kiểm chứng quá trình tùy thuộc vào loại hàng hóa cần tiệt khuẩn và quy trình tiệt khuẩn. Chất chỉ thị sinh học không được can thiệp vào hoạt động của thiết bị kiểm chứng quá trình.

Trong một số thiết bị kiểm chứng quá trình, chất mang chủng có thể được sử dụng thay cho chất chỉ thị sinh học.

B.2 Helix

Helix gồm một ống uốn khúc với đầu kín khí cho vật liệu mang chủng ở một đầu, dự kiến để kiểm chứng sự xâm nhập của tác nhân tiệt khuẩn vào trong thiết bị.

CHÚ THÍCH Tiêu chuẩn quốc gia đối với thiết bị tiệt khuẩn cụ thể cần đề cập các yêu cầu về helix.

B.3 Gói thử chuẩn

Gói thử chuẩn được sử dụng trong thiết bị tiệt khuẩn hơi cỡ lớn dùng cho tải xếp để kiểm tra sự xâm nhập nhanh và đồng đều của hơi vào trong gói được duy trì ở mức đạt được của các biến quá trình.

Gói thử chuẩn bao gồm các tấm xếp quấn theo một cấu hình cụ thể có các chất chỉ thị sinh học bên trong. Chúng được thiết kế để thử hiệu lực của quá trình tiệt khuẩn bằng hơi cho tải xếp.

CHÚ THÍCH Tiêu chuẩn quốc gia đối với thiết bị tiệt khuẩn cụ thể cần đề cập các yêu cầu về gói thử tiêu chuẩn.

B.4 Thiết bị kiểm chứng quá trình của người sử dụng

Loại thiết bị kiểm chứng quá trình này được thiết kế đặc biệt nhằm đáp ứng các tiêu chí đối với (các) vị trí kiểm chứng quá trình trong tải. Bao gói và thiết kế cần phản ánh tải tiêu chuẩn cần kiểm tra và thay đổi theo tải. Thiết bị kiểm chứng quá trình của người sử dụng dùng như "tải giả" để thay cho hàng hóa

thực đối với vị trí này và cho phép tháo dỡ chất chỉ thị sinh học mà không phá hỏng hàng hóa cần tiết kiệm. Người sử dụng có thể cần một hoặc nhiều thiết bị để cho (các) vị trí kiểm chứng quá trình.

B.5 Gói thử sinh học

Đây là mô tả chung của thiết bị kiểm chứng quá trình bán sẵn có mức kháng công bố. Gói thử sinh học có thể là loại dùng nhiều lần hoặc dùng một lần, tùy thuộc vào vật liệu sử dụng và các thông số quá trình.

Phụ lục C

(tham khảo)

Công thức dùng cho phương pháp tỷ lệ âm tính để tính giá trị D

(lấy từ ISO 11138-1:2006, Phụ lục D)

C.1 Quy định chung

C.1.1 Phương pháp này thiết lập số lượng sinh vật thử sống sót bằng cách tính gián tiếp dựa trên số lượng vi sinh vật có khả năng phục hồi như xác định bởi quan sát bằng mắt sự tăng trưởng trong môi trường tăng trưởng dạng lỏng. Phương pháp đề cập là "phân tích tỷ lệ âm tính" là phương pháp trong đó tỷ lệ mẫu thử cho thấy không tăng trưởng (dải tỷ lệ âm tính) và tính toán dựa trên kết quả thu được với các dữ liệu này. "Phân tích tổng số chết" cũng là một phương pháp tỷ lệ âm tính trong đó tất cả các mẫu thử chứng tỏ không có tăng trưởng và tính toán được dựa trên các kết quả thu được với yêu cầu này. Phương pháp tỷ lệ âm tính được dùng khi số lượng sinh vật thử có khả năng phục hồi nhỏ hơn 5×10^0 CFUs/đơn vị đo.

C.1.2 Quy trình Holcomb-Spearman-Karber (xem C.3.1) và quy trình Holcomb-Spearman-Karber giới hạn (xem C.3.2) đòi hỏi tiếp xúc liên tục kéo dài trong dải tỷ lệ âm tính.

CHÚ THÍCH Có thể áp dụng các phương pháp khác, đặc biệt khi đã biết dải tỷ lệ âm tính. Một phương pháp khác như vậy là Quy trình Stumbo-Murphy-Cochran (xem C.3.3).

C.1.3 Mẫu thử cần trải qua các khoảng thời gian tiếp xúc xác định với tất cả các biến quá trình, ngoại trừ thời gian, duy trì trong cửa sổ xác định (trạng thái ổn định). Khi các biến quá trình được coi là hẹp ở mức chấp nhận được, thời gian được biểu thị bằng "f". Khi việc kiểm soát các biến quá trình là quá rộng để coi là hằng số thì có thể sử dụng các phương pháp tích hợp để tính thời gian tương đương "U". Cả hai thuật ngữ đều được nêu trong tài liệu tham khảo.

C.1.4 Số lượng mẫu tiếp xúc, n , trong mỗi lần tiếp xúc và các khoảng giữa các lần tiếp xúc liên tiếp, d , đều ảnh hưởng đến độ tin cậy của thử nghiệm.

C.2 Vật liệu

C.2.1 Mẫu thử cần đại diện cho các hỗn dịch bào tử, vật liệu mang chủng hoặc chất chỉ thị sinh học bao gói.

C.2.2 Nên sử dụng thiết bị đo các tổ hợp đối chứng liên quan.

CHÚ THÍCH Phương pháp thử được nêu trong các phần sau của bộ ISO 11138. Các quy định kỹ thuật đối với thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được cho trong ISO 18472.

C.2.3 Tủ nuôi cấy cần được đặt để cung cấp, và theo dõi để xác nhận, nhiệt độ quy định trong điều kiện cấy.

C.2.4 Môi trường tăng trưởng cần phù hợp trong điều kiện cấy.

C.3 Phương pháp

C.3.1 Quy trình Holcomb–Spearman–Karber (HSKP)

C.3.1.1 Giới thiệu

C.3.1.1.1 Mẫu thử cần trải qua các lần tiếp xúc phân cấp tới khoảng thời gian tiếp xúc xác định với tất cả các biến quá trình, trừ thời gian, duy trì ổn định. Tổng số mẫu thử không được nhỏ hơn 100. Số lần lặp tối thiểu là 20 cần sử dụng cho mỗi lần tiếp xúc.

C.3.1.1.2 Khi tác nhân tiệt khuẩn để lại một dư lượng trong hoặc trên mẫu thử, lượng này cần được trung hòa càng nhanh càng tốt sao cho không ảnh hưởng đến kết quả thử. Nếu cần quy trình trung hòa thì quy trình đó cần được đánh giá xác nhận.

C.3.1.1.3 Để thu được mức tin cậy cao hơn khi sử dụng HSKP, các mẫu cần được cấy sau khi tiếp xúc phù hợp với phương pháp quy định của nhà sản xuất.

C.3.1.1.4 Mỗi vật liệu mang chủng được cấy truyền vô khuẩn vào ống thử chứa một lượng môi trường tăng trưởng thích hợp quy định. Lượng môi trường này cần giống nhau trong mỗi lần lặp. Nếu môi trường tăng trưởng được cung cấp bởi nhà sản xuất như một phần tích hợp của chất chỉ thị sinh học thì cần tuân thủ hướng dẫn cấy truyền của nhà sản xuất. Nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cần nhận biết hoặc cung cấp sẵn môi trường phục hồi thích hợp và/hoặc dữ liệu hoàn chỉnh để chuẩn bị môi trường phục hồi (xem thêm 12.1 và 12.4).

C.3.1.1.5 Mẫu thử cần được ủ theo phương pháp quy định của nhà sản xuất. Vi khuẩn cấy cần được kiểm tra sau khoảng thời gian ủ khuyến cáo của nhà sản xuất hoặc thời gian ủ được đánh giá xác nhận (xem thêm 12.2 và 12.3). Sự tăng trưởng của sinh vật thử có thể được chỉ ra thông qua độ đục của môi trường lỏng, tăng trưởng trên bề mặt của môi trường lỏng hoặc cặn ở đáy ống, tùy thuộc vào các đặc trưng của sinh vật thử. Nếu môi trường tăng trưởng là một phần tích hợp của chất chỉ thị sinh học (ví dụ chất chỉ thị sinh học độc lập) thì sự tăng trưởng hoặc không tăng trưởng của sinh vật thử cần được biểu thị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sự phát triển của sinh vật thử trong chất chỉ thị sinh học độc lập có thể được thể hiện bằng sự thay đổi màu do thay đổi độ pH.

C.3.1.1.6 Kết quả được ghi lại là tỷ lệ vật liệu mang với sinh vật thử không có khả năng phục hồi và tổng số vật liệu mang thử ở từng lần tiếp xúc thay thế.

C.3.2 Tính toán sử dụng HSKP

C.3.2.1 Tính toán được dựa trên ít nhất năm giai đoạn tiếp xúc và phải bao gồm ít nhất:

- một bộ mẫu trong đó tất cả các mẫu thử đều thể hiện sự tăng trưởng;
- hai bộ mẫu trong đó một phần mẫu thể hiện sự tăng trưởng;
- hai bộ mẫu, từ các lần tiếp xúc liên tiếp, trong đó không quan sát thấy sự tăng trưởng (xem Bảng C.1).

TCVN 8583:2010

CHÚ THÍCH HSKP tương tự với LHSKP (xem C.3.2), ngoại trừ việc nó sử dụng công thức chung không giới hạn ở cùng số lượng lặp ở mỗi giai đoạn tiếp xúc hay các khoảng thời gian không đổi giữa các tiếp xúc.

C.3.2.1.1 Giá trị trung bình của D , \bar{D} , được tính bằng cách sử dụng công thức (1) và (4). Xem 11.3.3.

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \tag{1}$$

trong đó

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i \tag{4}$$

N_0 là số sống sót trung bình đếm được trên một chất chỉ thị xác định bằng phương pháp tổng số sống sót đếm được (xem ISO 11138-1:2006, Phụ lục A).

Dữ liệu cần thiết để tính toán được cho trong Bảng C.1.

Bảng C.1 – Ví dụ về dữ liệu thu thập dùng cho HSKP

Khoảng thời gian tiếp xúc với tác nhân tiệt khuẩn (min) t	Số lượng mẫu thử tiếp xúc n	Số lượng mẫu thử cho thấy không có sự tăng trưởng r_i
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r=0)^a$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5(U_{k-1})$	n_5	r_5
$t_6(U_k)$	n_6	$r_6(r=n_6)$
t_7	n_7	$r_7(r=n_7)^a$

^a Phép thử là hợp lệ nếu không có đơn vị âm, nghĩa là không có mẫu thử âm tính ($r = 0$), với tất cả các đơn vị thể hiện sự tăng trưởng ở lần tiếp xúc trước t_1 , và tất cả các mẫu thử âm tính ($r=n_7$), nghĩa là không thấy sự tăng trưởng ở lần tiếp xúc sau t_6 .

CHÚ THÍCH t_1 được xác định là thời gian tiếp xúc với tác nhân tiệt khuẩn dài nhất trong tập hợp tiếp xúc trong đó tất cả các mẫu thử thể hiện sự tăng trưởng. Thời gian tiếp xúc t_2 đến t_5 là thời gian tiếp xúc tăng lên trong khu vực tỷ lệ âm tính. Khoảng thời gian tiếp xúc t_6 đến t_7 là hai khoảng thời gian tiếp xúc liên tiếp tại đó tất cả các mẫu chứng tỏ không có sự tăng trưởng.

C.3.1.2.3 Đối với các lần tiếp xúc với tác nhân tiết khuẩn, t_1 đến t_6 , các hệ số χ và γ được tính bằng cách sử dụng công thức (C.1) và (C.2).

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2} \quad (C.1)$$

$$\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1} - \frac{r_i}{n_i} \quad (C.2)$$

trong đó

r_i là số mẫu thử thể hiện không có tăng trưởng trong khoảng thời gian tiếp xúc t_i ;

n_i là số mẫu thử tiếp xúc trong khoảng thời gian tiếp xúc t_i .

Tại t_i , tất cả các mẫu thử thể hiện sự tăng trưởng và do đó γ_i là số mẫu thử $\frac{r_i + 1}{n_i + 1}$.

Từ các giá trị χ_i và γ_i tính được ở trên, có thể tính giá trị U_i cho mỗi giai đoạn tiếp xúc, t_i sử dụng công thức (C.3).

$$U_i = \chi_i \gamma_i \quad (C.3)$$

C.3.1.2.4 Thời gian tiết khuẩn trung bình, U_{HSK} , từ bất kỳ trong số các mẫu thử khi đó có thể được tính bằng tổng của U_i cho từng giai đoạn tiếp xúc t_i đến t_6 :

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{i=6} U_i \quad (C.4)$$

C.3.1.2.5 Khi khoảng thời gian giữa giai đoạn tiếp xúc, d , là hằng số và cùng số lượng mẫu thử, n , được sử dụng tại mỗi giai đoạn tiếp xúc thì thời gian tiết khuẩn trung bình, U_{HSK} , có thể được tính bằng cách sử dụng công thức (C.5).

$$U_{\text{HSK}} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{i=6} r_i \quad (C.5)$$

C.3.1.2.6 Giá trị trung bình của D , \bar{D} , có thể được tính bằng cách sử dụng công thức (1). Xem 11.3.3.

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (1)$$

CHÚ THÍCH 1 Hằng số OIe = 0,577 2.

CHÚ THÍCH 2 0,577 2/ln 10 = 0,250 7.

trong đó N_0 là số sinh vật thử sống sót ban đầu đếm được trên một mẫu thử (xem ISO 11138-1:2006, Phụ lục A).

C.3.1.2.7 Với độ tin cậy 95 % \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} được tính bằng công thức (C.6).

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V} \quad (\text{C.6})$$

C.3.1.2.8 Phương sai, V , được tính bằng công thức (C.7).

$$V = a \left(\frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2 \quad (\text{C.7})$$

C.3.1.2.9 "a" dùng cho phương sai được tính bằng công thức (C.8).

$$a = 0,25 \sum_{i=1}^{i=6} \left[(t_{(i+1)} - t_{(i-1)})^2 \left(r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_i - 1)} \right) \right] \quad (\text{C.8})$$

C.3.1.3 Ví dụ tính toán quy trình Holcomb-Spearman-Karber (HSKP)

Bảng C.2 – Ví dụ dữ liệu với khoảng thời gian không phải là hằng số và số mẫu không ổn định

Khoảng thời gian tiếp xúc với tác nhân tiết khuẩn (min) t	Số lượng mẫu thử tiếp xúc n_i	Số lượng mẫu thử cho thấy không có sự tăng trưởng r_i
$t_1 = 10$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0$
$t_2 = 18$	$n_2 = 19$	$r_2 = 4$
$t_3 = 28$	$n_3 = 21$	$r_3 = 8$
$t_4 = 40$	$n_4 = 20$	$r_4 = 12$
$t_5 = 50$	$n_5 = 20$	$r_5 = 16$
$t_6 = 60$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20$
$t_7 = 70$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20$

C.3.1.3.1 Tính χ_i và γ_i cho mỗi giai đoạn tiếp xúc, t_i :

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2} \quad (\text{C.9})$$

$$\gamma_i = \frac{t_1 + t_{(1+1)}}{2}$$

$$\chi_1 = \frac{10+18}{2} = 14$$

$$\chi_2 = \frac{18+28}{2} = 23$$

$$\chi_3 = \frac{28+40}{2} = 34$$

$$\chi_4 = \frac{40+50}{2} = 45$$

$$\chi_5 = \frac{50+60}{2} = 55$$

$$\chi_6 = \frac{60+70}{2} = 65$$

$$\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1} - \frac{r_i}{n_i}$$

$$\gamma_1 = \frac{r_1 + 1}{n_1 + 1} - \frac{r_1}{n_1}$$

$$\gamma_1 = \frac{4}{19} - \frac{0}{20} = 0,21$$

$$\gamma_2 = \frac{8}{21} - \frac{4}{19} = 0,17$$

$$\gamma_3 = \frac{12}{20} - \frac{8}{21} = 0,22$$

$$\gamma_4 = \frac{16}{20} - \frac{12}{20} = 0,2$$

$$\gamma_5 = \frac{20}{20} - \frac{16}{20} = 0,2$$

$$\gamma_6 = \frac{20}{20} - \frac{20}{20} = 0$$

CHÚ THÍCH Đối với phép tính γ_4 và γ_5 , cả hai đều = 0,2. Điều này xảy ra do số mẫu thử thể hiện sự tăng trưởng tăng theo tỷ lệ không đổi trong mẫu này.

C.3.1.3.2 Tính U_i cho mỗi giai đoạn tiếp xúc, t_i :

$$U_i = \chi_i \times \gamma_i \tag{C.10}$$

$$U_1 = \chi_1 \times \gamma_1 = 14 \times 0,21 = 2,94$$

TCVN 8583:2010

$$U_2 = 23 \times 0,17 = 3,91$$

$$U_3 = 34 \times 0,22 = 7,48$$

$$U_4 = 45 \times 0,2 = 9,0$$

$$U_5 = 55 \times 0,2 = 10,0$$

$$U_6 = 65 \times 0 = 0$$

C.3.1.3.3 Thời gian tiết khuẩn trung bình, U_{HSK} , được tính bằng công thức (C.11):

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{i=6} U_i \quad (\text{C.11})$$

$$U_{\text{HSK}} = U_1 + U_2 + U_3 + U_4 + U_5 + U_6$$

$$U_{\text{HSK}} = 2,94 + 3,91 + 7,48 + 9,0 + 11,0 + 0 = 34,33$$

C.3.1.3.4 Giá trị trung bình của D , \bar{D} , được tính bằng cách sử dụng công thức (1). Xem 11.3.3.

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (1)$$

trong đó

N_0 là quần thể ban đầu của 1×10^5 ;

$$\bar{D} = \frac{34,33}{5,000 + 0,2507} = 6,54 \text{ min.}$$

C.3.1.3.5 Khoảng 95 % độ tin cậy đối với \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} , được tính bằng công thức (C.6). Xem C.3.1.2.7.

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V} \quad (\text{C.6})$$

C.3.1.3.6 Phương sai, V , được tính bằng công thức (C.7). Xem C.3.1.2.8.

$$V = a \left(\frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2 \quad (\text{C.7})$$

C.3.1.3.7 "a" trong công thức tính phương sai dùng cho mỗi t_i và tổng tất cả các kết quả được tính bằng công thức (C.8). Xem C.3.1.2.9.

$$a = 0,25 \sum_{i=1}^{i=6} \left[(t_{(i+1)} - t_{(i-1)})^2 \left(r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_i - 1)} \right) \right] \quad (\text{C.8})$$

$$\begin{aligned}
 a = 0,25 & \left[(t_{(1+1)} - t_{(1-1)})^2 \left(r_1 \frac{(n_1 - r_1)}{n_1^2 (n_1 - 1)} \right) + (t_{(2+1)} - t_{(2-1)})^2 \left(r_2 \frac{(n_2 - r_2)}{n_2^2 (n_2 - 1)} \right) + (t_{(3+1)} - t_{(3-1)})^2 \left(r_3 \frac{(n_3 - r_3)}{n_3^2 (n_3 - 1)} \right) \right. \\
 & + (t_{(4+1)} - t_{(4-1)})^2 \left(r_4 \frac{(n_4 - r_4)}{n_4^2 (n_4 - 1)} \right) + (t_{(5+1)} - t_{(5-1)})^2 \left(r_5 \frac{(n_5 - r_5)}{n_5^2 (n_5 - 1)} \right) + \\
 & \left. (t_{(6+1)} - t_{(6-1)})^2 \left(r_6 \frac{(n_6 - r_6)}{n_6^2 (n_6 - 1)} \right) \right]
 \end{aligned}$$

$$a = 0,25 \times (28-10)^2 \times 4 \left(\frac{19-4}{361 \times 18} \right) = 2,9917 +$$

$$(40-18)^2 \times 8 \left(\frac{21-8}{441 \times 20} \right) = 5,7070 +$$

$$(50-28)^2 \times 12 \left(\frac{20-12}{400 \times 19} \right) = 6,1137 +$$

$$(60-40)^2 \times 16 \left(\frac{20-16}{400 \times 19} \right) = 3,3684 +$$

$$(70-50)^2 \times 20 \left(\frac{20-20}{400 \times 19} \right) = 0,0000$$

$$a = 0,25 (2,9917 + 5,7070 + 6,1137 + 3,3684 + 0,0000) = 0,25 \times 18,1808$$

$$a = 0,25 \times 18,1808 = 4,5452$$

C.3.1.3.8 Phương sai, V , được tính bằng công thức (C.7) với a đã được tính. Xem C.3.1.2.8.

$$V = a \left(\frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2 \quad (C.7)$$

trong đó

$$N_0 = 1 \times 10^5;$$

$$\begin{aligned}
 V &= 4,5452 \left(\frac{2,3026}{\ln(1 \times 10^5) + 0,5772} \right)^2 = 4,5452 \left(\frac{2,3026}{11,513 + 0,5772} \right)^2 = 4,5452 \times (0,19045)^2 = \\
 &= 4,5452 \times 0,03627 = 0,1649.
 \end{aligned}$$

TCVN 8583:2010

C.3.1.3.9 Khoảng 95 % độ tin cậy đối với \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} , được tính bằng công thức (C.6). Xem C.3.1.2.7.

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V} \quad (\text{C.6})$$

C.3.1.3.10 Giới hạn độ tin cậy dưới được tính bằng công thức (C.12):

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} - 2\sqrt{V} \quad (\text{C.12})$$

$$= 6,54 - 2\sqrt{0,1649}$$

$$= 6,54 - (2 \times 0,4061) = 5,73$$

C.3.1.3.11 Giới hạn độ tin cậy trên được tính bằng công thức (C.13):

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} + 2\sqrt{V} \quad (\text{C.13})$$

$$= 6,54 + 2\sqrt{0,1649}$$

$$= 6,54 + (2 \times 0,4061) = 7,35$$

C.3.2 Quy trình Holcomb–Spearman–Karber đã giới hạn (LHSKP)

C.3.2.1 Tính toán sử dụng LHSKP

C.3.2.1.1 Tính toán đối với LHSKP được dựa trên ít nhất năm giai đoạn tiếp xúc và cần gồm ít nhất:

- một bộ mẫu trong đó tất cả các mẫu thử đều thể hiện sự tăng trưởng;
- hai bộ mẫu trong đó một phần mẫu thể hiện sự tăng trưởng;
- hai bộ mẫu trong đó không quan sát thấy sự tăng trưởng (xem Bảng C.1).

C.3.2.1.2 Quy trình LHSKP tương tự như HSKP (xem C.3.1) ngoại trừ việc sử dụng công thức đòi hỏi cùng số lần lặp tại mỗi giai đoạn tiếp xúc và các khoảng thời gian không đổi giữa các lần tiếp xúc.

Bảng C.3 – Ví dụ dữ liệu thu thập đối với LHSKP với các khoảng thời gian không đổi và số mẫu không đổi

Khoảng thời gian tiếp xúc với tác nhân tiết khuẩn (min) t	Số lượng mẫu thử tiếp xúc n	Số lượng mẫu thử cho thấy không có sự tăng trưởng r_i
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r=0)^a$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5(U_{k-1})$	n_5	r_5
$t_6(U_k)$	n_6	$r_6(r=n)$
t_7	n_7	$r_7(r=n)^a$

^a Phép thử là hợp lệ nếu không có đơn vị âm, nghĩa là không có mẫu thử âm tính ($r = 0$), với tất cả các đơn vị thể hiện sự tăng trưởng ở lần tiếp xúc trước U_1 , và tất cả các bản sao âm tính ($r = n$), nghĩa là không thấy sự tăng trưởng ở lần tiếp xúc sau U_k .

C.3.2.1.3 Thời gian tiết khuẩn trung bình, U_{HSK} , được tính bằng cách sử dụng công thức (C.14).

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} \frac{d \sum_{i=1}^{k-1} r_i}{n} \quad (C.14)$$

trong đó

U_{HSK} là thời gian tiết khuẩn trung bình;

U_k là lần tiếp xúc đầu tiên chứng tỏ không có tăng trưởng của các bản sao;

d là khoảng thời gian hoặc liều giữa các lần tiếp xúc (giống nhau);

n là số bản sao tại mỗi lần tiếp xúc (số lượng như nhau tại mỗi lần tiếp xúc, ví dụ 20);

$\sum_{i=1}^{k-1} r_i$ là tổng của U_2 và U_{k-1} gồm cả số âm.

C.3.2.1.4 Giá trị trung bình của D , \bar{D} , có thể được tính bằng cách sử dụng công thức (1). Xem 11.3.3.

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (1)$$

CHÚ THÍCH Khi thực hiện theo phương pháp trên, quy trình LHSK tính phương sai, V , độ lệch chuẩn (SD) và khoảng tin cậy 95 % (giới hạn tin cậy trên và dưới).

C.3.2.1.5 Phương sai, V , được tính bằng cách sử dụng công thức (C.15).

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i) \quad (C.15)$$

C.3.2.1.6 Độ lệch chuẩn (SD) được tính bằng cách sử dụng công thức (C.16).

$$SD = \sqrt{V} \quad (C.16)$$

C.3.2.1.7 Giới hạn tin cậy 95 % đối với \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} , được tính bằng cách sử dụng công thức (C.17), (C.18) và (C.19).

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2SD \quad (C.17)$$

C.3.2.1.8 Giới hạn tin cậy dưới

$$D_{\text{calc}} = \frac{U_{\text{HSK}} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (C.18)$$

C.3.2.1.9 Giới hạn tin cậy trên

$$D_{\text{calc}} = \frac{U_{\text{HSK}} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (C.19)$$

C.3.2.2 Ví dụ tính toán theo Quy trình Holcomb–Spearman–Karber giới hạn (LHSKP)

Bảng C.4 – Ví dụ dữ liệu với các khoảng thời gian không đổi và số mẫu không đổi

Khoảng thời gian tiếp xúc với tác nhân tiết khuẩn (min) t	Số lượng mẫu thử tiếp xúc n	Số lượng mẫu thử cho thấy không có sự tăng trưởng r_i
$t_1 = 20 (U_1)$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0 (r = 0)^a$
$t_2 = 22$	$n_2 = 20$	$r_2 = 1$
$t_3 = 24$	$n_3 = 20$	$r_3 = 7$
$t_4 = 26$	$n_4 = 20$	$r_4 = 15$
$t_5 = 28 (U_{k-1})$	$n_5 = 20$	$r_5 = 19$
$t_6 = 30 (U_k)$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20 (r = n)^a$
$t_7 = 32$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20 (r = n)$

^a Phép thử là hợp lệ nếu không có đơn vị âm, nghĩa là không có lặp lại âm tính ($r = 0$), ở lần tiếp xúc trước U_1 , và tất cả các mẫu thử âm tính, nghĩa là tất cả lặp lại thể hiện sự tăng trưởng, ($r = n$) ở lần tiếp xúc sau U_k .

C.3.2.2.1 Giá trị trung bình của D , \bar{D} , được tính bằng cách sử dụng công thức (1). Xem 11.3.3.

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (1)$$

trong đó

$$N_0 = 1 \times 10^6.$$

C.3.2.2.2 Khoảng thời gian tiếp xúc (thời gian tiết khuẩn) trung bình, U_{HSK} , cần thiết để không có sự tăng trưởng (vô khuẩn) được tính bằng cách sử dụng công thức (C.14). Xem C.3.2.1.3.

$$U_{\text{HSK}} = U_k - \frac{d}{2} \frac{d^{k-1}}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i \quad (\text{C.14})$$

trong đó

$$U_k = 30;$$

$$d = 2;$$

$$n = 20;$$

$$U_{\text{HSK}} = 30 - \frac{2}{2} \frac{2}{20} \times (0 + 0 + 1 + 7 + 15 + 19) = 24,8$$

$$\bar{D} = \frac{24,8}{6,000 + 0,2507} = 3,97 \text{ min (làm tròn đến một chữ số thập phân } D = 4,0 \text{ min)}$$

C.3.2.2.3 Phương sai, V , được tính bằng cách sử dụng công thức (C.15). Xem C.3.2.1.5.

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i) \quad (\text{C.15})$$

$$= \frac{2^2}{(20)^2(20-1)} \times [(1 \times 19) + (7 \times 13) + (15 \times 5) + (19 \times 1)] = 0,1074$$

C.3.2.2.4 Độ lệch chuẩn (SD) được tính bằng cách sử dụng công thức (C.16). Xem C.3.2.1.6.

$$SD = \sqrt{V} \quad (\text{C.16})$$

$$SD = \sqrt{0,1074} = 0,3277$$

C.3.2.2.5 Giới hạn tin cậy 95 % đối với \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} , được tính bằng cách sử dụng công thức (C.17), (C.18) và (C.19). Xem C.3.2.1.7, C.3.2.1.8 và C.3.2.1.9.

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2SD \quad (\text{C.17})$$

C.3.2.2.6 Giới hạn tin cậy dưới

$$D_{\text{calc}} = \frac{U_{\text{HSK}} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (\text{C.18})$$

$$= \frac{24,8 - (2 \times 0,3227)}{6,000 + 0,2507} = \frac{24,144}{6,2507} = 3,86 \text{ min}$$

trong đó $N_0 = 1 \times 10^6$.

C.3.2.2.7 Giới hạn tin cậy trên

$$D_{\text{calc}} = \frac{U_{\text{HSK}} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} \quad (\text{C.19})$$

$$= \frac{24,8 + (2 \times 0,3227)}{6,000 + 0,2507} = \frac{25,455}{6,2507} = 4,07 \text{ min}$$

C.3.3 Quy trình Stumbo–Murphy–Cochran (SMCP)

C.3.3.1 Giới thiệu

C.3.3.1.1 Các phương pháp phân tích dữ liệu tỷ lệ âm khác có thể được sử dụng nếu chứng tỏ sự tương đương với các phương pháp C.3.1 và C.3.2.

C.3.3.1.2 Công thức dùng cho SMCP đòi hỏi phải đưa ra dãy tỷ lệ âm gồm thời gian, t , số đơn vị tăng trưởng âm, r , số lần lặp, n , tại một giai đoạn tiếp xúc trong phạm vi dãy tỷ lệ âm và số vi sinh vật ban đầu trên một lần lặp, N_0 .

C.3.3.1.3 Để có được mức độ tin cậy cao hơn khi sử dụng SMCP, cần tính giá trị D là trung bình của ít nhất ba lần trong dãy tỷ lệ âm để xác nhận độ tái lập.

C.3.3.1.4 Sử dụng các nguyên vật liệu tương tự như nêu trong C.2.

C.3.3.1.5 Đối với khoảng tin cậy 95 %, cần sử dụng ít nhất là 50 lần lặp tại mỗi giai đoạn tiếp xúc và cần đáp ứng điều kiện $rn < 0,9$ để thiết lập tiêu chí thử tương ứng với C.3.1 và C.3.2. (Xem tài liệu [35].) Mẫu thử cần trải qua một giai đoạn tiếp xúc xác định trong phạm vi dãy tỷ lệ âm của lô/đợt đó.

C.3.3.2 Tính toán sử dụng SMCP

C.3.3.2.1 Giá trị D được tính bằng công thức C.20.

$$D = \frac{t}{\log_{10} A - \log_{10} B} \quad (\text{C.20})$$

trong đó

t là khoảng thời gian tiếp xúc;

$\log_{10} A$ là \log_{10} của quần thể ban đầu, N_0 , trên lần lặp;

$\log_{10} B$ là \log_{10} của quần thể sau khoảng thời gian tiếp xúc, t .

C.3.3.2.2 Có thể phát biểu lại công thức này đối với tập hợp dữ liệu tỷ lệ âm. Xem 11.3.3.

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left(\ln \frac{n}{r} \right)} \quad (5)$$

hoặc

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} N_{\mu}} \quad (\text{C.21})$$

trong đó

N_{μ} là logarit tự nhiên của tỷ số giữa số lần lặp trên phép thử chia cho số mẫu âm;

n là số lần lặp trên khoảng thời gian tiếp xúc;

r là số đơn vị vô khuẩn hoặc không có sự tăng trưởng.

C.3.3.2.3 Khoảng tin cậy 95 % đối với \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} , được tính bằng cách sử dụng công thức (C.22).

$$D_{calc} = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{a} \right) \right]} \quad (C.22)$$

trong đó $a = \frac{r}{n} \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r/n}{n}}$

C.3.3.2.4 Công thức trên chỉ có thể sử dụng nếu $n \times \frac{r}{n} \times \frac{n-r}{n} \geq 0,9$.

C.3.3.3 Ví dụ tính toán của Quy trình Stumbo–Murphy–Cochran (SMCP)

Bảng C.5 – Tính giá trị D chỉ sử dụng một tập dữ liệu trong vùng tỷ lệ âm tính

Khoảng thời gian tiếp xúc với tác nhân tiệt khuẩn (min) t	Số lượng mẫu thử tiếp xúc n	Số lượng mẫu thử cho thấy không có sự tăng trưởng \bar{n}
24	100	37

C.3.3.3.1 Tính giá trị D bằng công thức (5). Xem 11.3.3.

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left(\ln \frac{n}{r} \right)} \quad (5)$$

trong đó

t là khoảng thời gian tiếp xúc;

N_0 là số sống sót ban đầu trên sinh vật thử trên mẫu = 1×10^6 ;

n là số lần lặp trên khoảng thời gian tiếp xúc;

r là số đơn vị vô khuẩn hoặc không có sự tăng trưởng.

$$D = \frac{24}{6,000 - \log_{10} (\ln 2,7027)}$$

$$D = \frac{24}{6,000 - \log_{10} (0,9943)}$$

$$D = \frac{24}{6,000 - (-0,0025)}$$

$$D = \frac{24}{6,0025} = 4,00 \text{ min (làm tròn đến một chữ số thập phân } D = 4,0 \text{ min)}$$

C.3.3.3.2 Khoảng tin cậy 95 % đối với \bar{D} ($p = 0,05$), D_{calc} , được tính như dưới đây.

Nếu $n \times \frac{r}{n} \times \frac{n-r}{n} \geq 0,9$ thì khi đó khoảng tin cậy 95 % có thể được tính bằng cách sử dụng công thức

(C.22). Xem C.3.3.2.3.

Giới hạn tin cậy dưới:

$$D_{\text{calc}} = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{a} \right) \right]} \quad (\text{C.22})$$

trong đó $a = \frac{r}{n} + 1,96 \times \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r/n}{n}}$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{a} \right) \right]}$$

trong đó

$$a = \frac{37}{100} + 1,96 \times \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}}$$

$$= 0,37 + 1,96 \times \sqrt{0,37 \times \frac{0,63}{100}}$$

$$= 0,37 + 1,96 \times \sqrt{0,37 \times 0,0063}$$

$$= 0,37 + 1,96 \times \sqrt{0,002331}$$

$$= 0,37 + 1,96 \times 0,04828$$

$$a = 0,465$$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{0,465} \right) \right]}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{24}{6,000 - \log_{10} [\ln(0,7657)]} \\
 &= \frac{24}{6,000 - (-0,1159)} \\
 &= \frac{24}{6,000 + 0,1159} \\
 D_{\text{cal}} &= \frac{24}{6,1159} = 3,92
 \end{aligned}$$

Giới hạn tin cậy trên:

$$D_{\text{calc}} = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{a} \right) \right]} \quad (\text{C.22})$$

trong đó $a = \frac{r}{n} - 1,96 \times \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r/n}{n}}$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{a} \right) \right]}$$

trong đó

$$a = \frac{37}{100} - 1,96 \times \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}}$$

$$= 0,37 - 1,96 \times \sqrt{0,37 \times \frac{0,63}{100}}$$

$$= 0,37 - 1,96 \times \sqrt{0,37 \times 0,0063}$$

$$= 0,37 - 1,96 \times \sqrt{0,002331}$$

$$= 0,37 - 1,96 \times 0,04828$$

$$a = 0,37 - 0,095 = 0,275$$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10} \left[\ln \left(\frac{1}{0,275} \right) \right]}$$

$$= \frac{24}{6,000 - \log_{10} [\ln(1,291)]}$$

$$= \frac{24}{6,000 - 0,111}$$

$$D_{\text{cat}} = \frac{24}{5,889} = 4,08$$

Phụ lục D

(tham khảo)

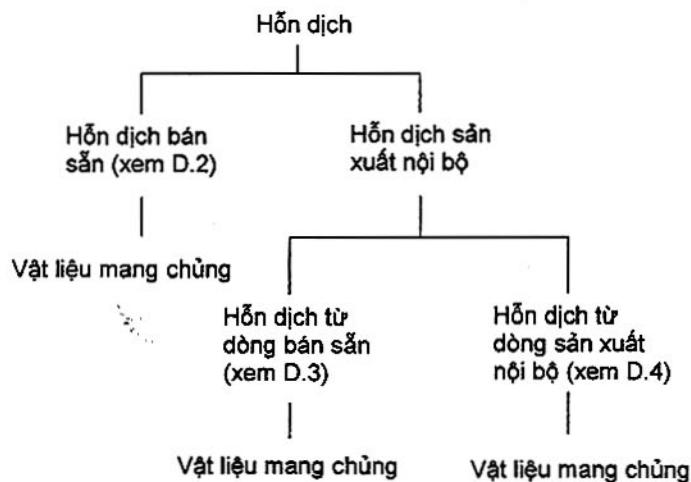
Ví dụ tài liệu về chất chỉ thị sinh học do người sử dụng chuẩn bị

D.1 Quy định chung

D.1.1 Nguồn vi sinh vật

Có các nguồn vi sinh vật khác nhau dùng cho chất chỉ thị sinh học. Chất chỉ thị sinh học cần được giao từ nhà sản xuất như một hệ thống sẵn sàng để sử dụng với các đặc tính kháng tuân thủ theo bộ tiêu chuẩn ISO 11138. Tham khảo tài liệu chính đối với chất chỉ thị sinh học bán sẵn. Hỗn dịch vi sinh vật bán sẵn do nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học giao đến có thể dùng để cấy sản phẩm, do đó sử dụng sản phẩm như vật liệu mang. Cách khác, hỗn dịch có thể được sản xuất nội bộ từ một dòng bán sẵn. Trong trường hợp đặc biệt, vi sinh vật tách biệt khỏi nhà máy sản xuất (cách ly nội bộ) có thể có các vi sinh vật kháng cao nhất có khả năng tìm thấy trong hoặc trên sản phẩm cần tiệt khuẩn. Trong trường hợp như vậy, chất chỉ thị sinh học có thể được sản xuất bằng cách sử dụng vi sinh vật liên quan (xem 7.3 và 7.4).

Chất chỉ thị sinh học có thể được chuẩn bị từ vi sinh vật bắt nguồn từ một trong ba nguồn:



Hình D.1 – Nguồn vi sinh vật

D.1.2 Tài liệu

Danh mục các tài liệu liên quan có thể bao gồm:

- a) hướng dẫn công việc sản xuất và xử lý dòng vi sinh vật học, chuẩn bị hỗn dịch sản xuất nội bộ, cấy chủng vật liệu mang và xử lý vật liệu mang chung và chất chỉ thị sinh học sản xuất nội bộ;
- b) hướng dẫn công việc xử lý hệ thống vi sinh vật học sau chu trình tiệt khuẩn;
- c) phương thức đánh giá xác nhận các nghiên cứu và các kết quả.

Người sử dụng cần xác định các yếu tố cơ bản như:

- d) phương pháp tiệt khuẩn được sử dụng trong sản xuất thường xuyên sản phẩm, ví dụ phương pháp nóng ẩm, nóng khô, khí hoặc phương pháp tiệt khuẩn khác;
- e) tham số nào trong số các thông số tiệt khuẩn quan trọng được đo trực tiếp trong quá trình sản xuất thường xuyên sản phẩm, ví dụ thời gian, nhiệt độ, áp suất, v.v...

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

D.2 Hỗn dịch bán sẵn

Khi sử dụng hỗn dịch bán sẵn, các yếu tố sau đây cần được lập thành văn bản:

- a) tên nhà sản xuất hỗn dịch;
- b) tên và dấu hiệu nhận biết của vi sinh vật;
- c) nguồn gốc của dòng/viện dẫn số tập hợp cấy được thừa nhận;
- d) số vi sinh vật cần được phát hiện trên một lượng hỗn dịch xác định;
- e) dung môi tạo hỗn dịch;
- f) số lô hoặc phương tiện nhận biết khác;
- g) đặc tính kháng do nhà sản xuất hỗn dịch đưa ra (xem 5.2 và 5.3);
- h) điều kiện nuôi cấy khuyến cáo đối với sự phục hồi của vi sinh vật sống từ hỗn dịch, ví dụ thời gian, nhiệt độ và môi trường tăng trưởng;
- i) điều kiện bảo quản;
- j) thông tin về độ ổn định (thời gian sử dụng hoặc tương đương).

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

D.3 Hỗn dịch từ dòng bán sẵn

Khi sử dụng hỗn dịch từ một dòng bán sẵn, các yếu tố sau đây cần được lập thành văn bản:

- a) tên nhà sản xuất hoặc cung cấp dòng đó;
- b) tên vi sinh vật;
- c) viện dẫn số tập hợp cấy được thừa nhận;

TCVN 8583:2010

- d) hướng dẫn xử lý dòng của nhà sản xuất;
- e) thông tin liên quan đến các thành phần xử lý để chuẩn bị hỗn dịch từ dòng đó;
- f) điều kiện bảo quản;
- g) phương tiện nhận biết số lô/dòng được bảo quản và xử lý;
- h) thông tin về độ ổn định.

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

D.4 Hỗn dịch tự phân lập

Khi sử dụng hỗn dịch tự phân lập, nghĩa là dòng vi sinh vật cách ly khỏi khu vực sản xuất chính, các yếu tố sau đây cần được lập thành văn bản:

- a) vị trí cách ly;
- b) thời gian phục hồi;
- c) phương pháp cách ly/phương pháp phục hồi;
- d) dấu hiệu nhận biết vi sinh vật;
- e) điều kiện nuôi cấy, ví dụ môi trường cấy, nhiệt độ và thời gian ủ;
- f) phương pháp xử lý hỗn dịch;
- g) lưu chất hỗn dịch;
- h) phương tiện nhận biết số lô/hỗn dịch;
- i) xác định sức kháng;
- j) điều kiện bảo quản;
- k) thông tin về độ ổn định.

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

D.5 Vật liệu mang chủng

D.5.1 Quy định chung

Vật liệu mang cần đại diện vật liệu mang dự định tiết khuẩn trong sản xuất chính. Vật liệu mang có thể là chất lỏng hoặc bề mặt rắn đại diện cho sản phẩm cần đánh giá xác nhận quá trình tiết khuẩn. Vật liệu mang được chọn như một vật liệu mang kiểm chứng chặt chẽ dựa trên đánh giá xác nhận.

D.5.2 Tài liệu của vật liệu mang chủng dạng lỏng

Một số thành phần liên quan đối với tài liệu về sử dụng chất lỏng làm vật liệu mang được liệt kê dưới

đây:

- a) phương pháp sử dụng để đảm bảo sự phân tán đều vi sinh vật trong hỗn dịch trước khi sử dụng;
- b) mô tả về vật liệu mang, ví dụ giá trị pH của vật liệu mang;
- c) mô tả về thùng chứa chất lỏng;
- d) phương pháp sử dụng để cấy hỗn dịch vào chất lỏng;
- e) phương pháp sử dụng để đảm bảo phân tán đều vi sinh vật trong các lọ thử trước khi tiến hành thử nghiệm đặc tính kháng;
- f) số vi sinh vật trong chất lỏng cấy;
- g) bảo quản các lọ thử trước khi thử;
- h) phương pháp khôi phục vi sinh vật sau khi thử;
- i) điều kiện cấy đối với vi sinh vật sau khi thử.

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

D.5.3 Tài liệu của vật liệu mang chủng dạng rắn

Một số thành phần liên quan đối với tài liệu về sử dụng bề mặt rắn làm vật liệu mang được nêu dưới đây:

- a) phương pháp sử dụng để đảm bảo sự phân tán đều vi sinh vật trong hỗn dịch trước khi sử dụng;
- b) mô tả về vật liệu mang, ví dụ giá trị pH của vật liệu mang;
- c) phương pháp sử dụng để cấy hỗn dịch vào vật liệu mang;
- d) quy trình kiểm tra sự phân tán đều của vi sinh vật trên vật liệu mang chủng;
- e) số vi sinh vật trong vật liệu mang chủng;
- f) điều kiện bảo quản vật liệu mang chủng trước khi thử;
- g) (các) phương pháp khôi phục vi sinh vật;
- h) điều kiện cấy đối với vi sinh vật phục hồi.

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

D.5.4 Tài liệu của vật liệu mang chủng dạng lỏng

Vật liệu mang chủng, dù được sử dụng như được cung cấp hay với hệ thống bao gói, ví dụ như chất lỏng trong lọ, được sử dụng để xác định giá trị D hoặc các nghiên cứu đặc tính kháng khác, đều có các đặc trưng được mô tả bởi dữ liệu thu được. Các phương pháp lựa chọn có tác động đến các dữ liệu này.

TCVN 8583:2010

Để người sử dụng so sánh các xác định giá trị D của vật liệu mang chủng sản xuất nội bộ, với chất chỉ thị sinh học bán sẵn tuân thủ bộ tiêu chuẩn ISO 11138, các xác định giá trị D cần tuân thủ yêu cầu liên quan của bộ tiêu chuẩn ISO 11138 (xem 11.3).

Một số thành phần cơ bản cần được lập thành văn bản:

- a) mô tả thiết bị đo các tổ hợp đối chứng, thiết bị tiệt khuẩn thí điểm hoặc thiết bị tiệt khuẩn sản xuất;
- b) mô tả phương pháp đo vật lý trực tiếp, như số lượng và vị trí của đầu đo nhiệt độ;
- c) xác định quần thể ban đầu;
- d) phương pháp sử dụng để xác định các đặc tính kháng như cửa sổ tồn tại-tiệt diệt, phương pháp tỷ lệ âm hoặc phương pháp đường cong sống;
- e) số lượng đồng thời và số vòng xác định sức kháng;
- f) phương pháp khôi phục vi sinh vật;
- g) điều kiện cấy.

CHÚ THÍCH Danh mục các thành phần tài liệu này là chưa đầy đủ.

Phụ lục E

(tham khảo)

Tính giá trị z

(lấy từ ISO 11138-3:2006, Phụ lục B)

E.1 Sử dụng tất cả các dữ liệu thu được từ Phụ lục C hoặc Phụ lục F, vẽ đồ thị \log_{10} của giá trị D (min) = y theo nhiệt độ tiếp xúc tính bằng độ C. Giá trị z bằng nghịch đảo âm của độ dốc đường cong phù hợp nhất như xác định bởi phân tích hồi quy.

CHÚ THÍCH Xem 11.4 về yêu cầu liên quan đến tính toán giá trị z.

E.2 Độ dốc đường cong phù hợp nhất được tính bằng công thức (E.1):

$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)} \quad (\text{E.1})$$

trong đó

m là độ dốc;

n là số cặp giá trị D /nhiệt độ (điểm dữ liệu);

$$G = \sum [t(\log_{10}y)];$$

$$A = \sum (t);$$

$$B = \sum (\log_{10}y);$$

$$C = \sum (t)^2.$$

Dữ liệu cần thiết để tính toán được cho trong Bảng E.1.

Bảng E.1 – Ví dụ về dữ liệu thu thập cho phân tích hồi quy

Giá trị D $y =$ min	Nhiệt độ tiếp xúc $t =$ °C	$\log_{10}y$	t^2	$t(\log_{10}y)$	$(\log_{10}y)^2$
y_1	t_1	$\log_{10}y_1$	$(t_1)^2$	$t_1(\log_{10}y_1)$	$(\log_{10}y_1)^2$
y_2	t_2	$\log_{10}y_2$	$(t_2)^2$	$t_2(\log_{10}y_2)$	$(\log_{10}y_2)^2$
y_3	t_3	$\log_{10}y_3$	$(t_3)^2$	$t_3(\log_{10}y_3)$	$(\log_{10}y_3)^2$
y_n	t_n	$\log_{10}y_n$	$(t_n)^2$	$t_n(\log_{10}y_n)$	$(\log_{10}y_n)^2$
	$A = \sum_{i=1}^{i=n} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=n} \log_{10}y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=n} (t_i)^2$	$G = \sum_{i=1}^{i=n} [t_i(\log_{10}y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=n} (\log_{10}y_i)^2$
Biến ẩn định	A	B	C	G	E

E.3 Bảng E.2 liệt kê các tính toán ví dụ đối với độ dốc của đường cong phù hợp nhất.

Bảng E.2 – Ví dụ về tính toán độ dốc

Giá trị D $y =$ min	Nhiệt độ tiếp xúc $t =$ °C	$\log_{10}y$	t^2	$t(\log_{10}y)$	$(\log_{10}y)^2$
$y_1 = 2,0$	$t_1 = 121$	$\log_{10}y_1 = 0,301\ 0$	$(t_1)^2 = 146\ 41$	$t_1(\log_{10}y_1) = 36,421\ 0$	$(\log_{10}y_1)^2 = 0,090\ 6$
$y_2 = 1,1$	$t_2 = 124$	$\log_{10}y_2 = 0,041\ 4$	$(t_2)^2 = 153\ 76$	$t_2(\log_{10}y_2) = 5,133\ 6$	$(\log_{10}y_2)^2 = 0,001\ 7$
$y_3 = 0,4$	$t_3 = 129$	$\log_{10}y_3 = -0,397\ 9$	$(t_3)^2 = 166\ 41$	$t_3(\log_{10}y_3) = -51,329\ 1$	$(\log_{10}y_3)^2 = 0,158\ 3$
	$A = \sum_{i=1}^3 t_i$	$B = \sum_{i=1}^3 \log_{10}y_i$	$C = \sum_{i=1}^3 (t_i)^2$	$G = \sum_{i=1}^3 [t_i(\log_{10}y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^3 (\log_{10}y_i)^2$
Biến ẩn định	$A = 374$	$B = -0,055\ 5$	$C = 466\ 58$	$G = -9,774\ 5$	$E = 0,250\ 6$

$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)} \quad (E.1)$$

$$m = \frac{[(3)(-9,7745)] - [(374)(-0,0555)]}{[(3)(46658)] - (374^2)} \quad (E.2)$$

$$m = \frac{(-29,3235) - (-20,7570)}{(139974) - (139876)} \quad (E.3)$$

$$m = \frac{-8,5665}{98} \quad (E.4)$$

$$m = -0,0874 \quad (E.5)$$

E.4 Giá trị z bằng nghịch đảo âm của độ dốc thu được và được tính bằng công thức (E.7).

$$z = -1 \left(\frac{1}{m} \right) \quad (E.6)$$

Sử dụng độ dốc tính được ở trên, giá trị z bằng:

$$z = -1 \left(\frac{1}{-0,0874} \right) = 11,4416\text{ °C làm tròn đến một chữ số thập phân} \quad (E.7)$$

$$z = 11,4\text{ °C}$$

E.5 Hệ số xác định, r^2 , được dùng để đánh giá tính tuyến tính của dữ liệu giá trị z và được tính bằng công thức (E.9).

$$r^2 = \frac{\{(G) - [(A)(B/n)]\}^2}{[(C) - (A^2/n)][(E) - (B^2/n)]} \quad (\text{E.8})$$

trong đó tất cả các biến như được xác định trong E.2 và

$$E = \sum (\log_{10} y)^2 \quad (\text{E.9})$$

E.6 Ví dụ tính hệ số xác định đối với độ tuyến tính của dữ liệu giá trị z được cho dưới đây sử dụng các giá trị từ Bảng E.2.

$$r^2 = \frac{\{(-9,7745) - [(374)(-0,0555/3)]\}^2}{[(46658) - (374^2/3)][(0,2506) - (-0,0555^2/3)]} \quad (\text{E.8})$$

$$r^2 = \frac{\{(-9,7745) - [(-6,9190)]\}^2}{[(46658) - (46625,3333)][(0,2506) - (0,0010)]}$$

$$r^2 = \frac{(-2,8855)^2}{(32,6667)(0,2496)}$$

$$r^2 = \frac{8,1539}{8,1536}$$

$$r^2 = 1,0000$$

CHÚ THÍCH ISO 11138-1 nhận biết sai thuật ngữ "hệ số tương quan" là r^2 . Hệ số tương quan được biểu thị đúng là r . Bình phương hệ số tương quan gọi là hệ số xác định, r^2 . ISO 11138-1 áp dụng đúng công thức toán học đối với r^2 nhưng ghi sai là hệ số tương quan.

Phụ lục F
(tham khảo)

Xác định giá trị D bằng phương pháp đường cong sống
(lấy từ ISO 11138-1:2006, Phụ lục C)

F.1 Quy định chung

Phương pháp này thiết lập số lượng sinh vật thử sống sót bằng cách đếm trực tiếp các đơn vị hình thành cụm (CFU). Phương pháp này còn gọi là "phương pháp đếm trực tiếp". Xem thêm ISO 11138-1:2006, Phụ lục A. Phương pháp này có giới hạn dưới thực tế xấp xỉ 5×10^1 CFU.

F.2 Vật liệu

F.2.1 Mẫu thử cần đại diện cho các hỗn dịch bào tử, vật liệu mang chủng hoặc chất chỉ thị sinh học bao gói.

CHÚ THÍCH Phương pháp thử được nêu trong 11.3. Quy định kỹ thuật đối với thiết bị đo các tổ hợp đối chứng nêu trong ISO 18472.

F.2.2 Tủ nuôi cấy cần được đặt để cung cấp, và theo dõi để xác nhận, nhiệt độ quy định trong điều kiện cấy.

F.2.3 Môi trường tăng trưởng phải phù hợp với quy định về điều kiện nuôi cấy.

F.3 Quy trình

F.3.1 Mẫu thử cần trải qua các giai đoạn tiếp xúc xác định. Dải tiếp xúc cần được quy định. Xem Bảng F.1.

F.3.2 Cần sử dụng ít nhất năm lần tiếp xúc và cần bao gồm:

a) một tiếp xúc trong đó các mẫu không chịu tác nhân tiệt khuẩn (ví dụ, thời gian tiếp xúc 0);

CHÚ THÍCH Có thể không có mặt tác nhân tiệt khuẩn hoặc được thay bằng khí trơ hoặc môi chất.

b) ít nhất một lần tiếp xúc trong đó tổng thể sống sót giảm còn 0,01 % chủng ban đầu (giảm $4 \log_{10}$);

c) ít nhất ba tiếp xúc trong khoảng giữa tiếp xúc a) và b).

F.3.3 Cần sử dụng ít nhất là bốn mẫu thử cho mỗi lần tiếp xúc trong mỗi lần xác định. Số lần lặp cần sử dụng cho mỗi lần tiếp xúc cũng là bốn.

F.3.4 Nếu tác nhân tiết khuẩn để lại dư lượng trong hoặc trên mẫu thử thì dư lượng này cần được trung hòa càng nhanh càng tốt sao cho không ảnh hưởng đến kết quả thử. Nếu cần quy trình trung hòa thì quy trình này cần được đánh giá xác nhận.

F.3.5 Mẫu thử cần được xử lý để loại bỏ sinh vật thử khỏi vật liệu mang và thực hiện phép thử đếm số sống (xem 11.2 và ISO 11138-1:2006, Phụ lục A) sử dụng điều kiện cấy quy định và phương pháp do nhà chế tạo quy định đối với việc phục hồi trong điều kiện sử dụng bình thường.

F.3.6 Hỗn dịch cần được điều chỉnh trong chất lỏng hòa tan vô khuẩn thích hợp. Đối với các vi khuẩn cấy rót vào aga mẫu chảy hoặc trái trên aga đặc trong đĩa cấy có kích thước thông thường [ví dụ (100x15) mm], số đơn vị hình thành cụm từ 30 đến 300 được coi là thích hợp cho thống kê.

F.3.7 Sử dụng tất cả các dữ liệu thu được, vẽ đồ thị \log_{10} của tổng thể sống theo khoảng thời gian tiếp xúc tính bằng phút hoặc liều là xác định đường cong phù hợp nhất bằng phân tích hồi quy sử dụng phương pháp bình phương nhỏ nhất. Các điểm dữ liệu sự sống trong khoảng 0,5 loga của quần thể ban đầu không cần tính đến trong phân tích hồi quy. Tính tỷ lệ nghịch âm của độ dốc đường thu được bằng giá trị D tính bằng phút ở giai đoạn tiếp xúc quy định.

F.3.8 Độ dốc của đường phù hợp nhất được tính bằng công thức (E.1). Xem E.2.

$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)} \quad (\text{E.1})$$

trong đó

m là độ dốc;

n là số điểm dữ liệu;

$$G = \sum [t(\log_{10} y)];$$

$$A = \sum (t);$$

$$B = \sum (\log_{10} y);$$

$$C = \sum (t)^2.$$

Dữ liệu cần thiết để tính toán được cho trong Bảng F.1.

Bảng F.1 – Ví dụ về dữ liệu thu thập cho phân tích hồi quy

Tổng thể phức hồi ^a <i>y</i>	Khoảng thời gian tiếp xúc (min) <i>t</i>	$\log_{10}y$	t^2	$t(\log_{10}y)$	$(\log_{10}y)^2$
y_1	$t_1 = 0,0$	$\log_{10}y_1$	$(t_1)^2 = 0$	$t_1(\log_{10}y_1) = 0$	$(\log_{10}y_1)^2$
y_2	t_2	$\log_{10}y_2$	$(t_2)^2$	$t_2(\log_{10}y_2)$	$(\log_{10}y_2)^2$
y_3	t_3	$\log_{10}y_3$	$(t_3)^2$	$t_3(\log_{10}y_3)$	$(\log_{10}y_3)^2$
y_4	t_4	$\log_{10}y_4$	$(t_4)^2$	$t_4(\log_{10}y_4)$	$(\log_{10}y_4)^2$
y_5	t_5	$\log_{10}y_5$	$(t_5)^2$	$t_5(\log_{10}y_5)$	$(\log_{10}y_5)^2$
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \log_{10}y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i)^2$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i(\log_{10}y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} (\log_{10}y_i)^2$
Biến ấn định	A	B	C	G	E

^a Theo F.3.7, điểm dữ liệu trong khoảng 0,5 loga của y_1 không cần tính trong phân tích hồi quy.

F.3.9 Bảng F.2 liệt kê các tính toán ví dụ đối với độ dốc của đường cong phù hợp nhất.

Bảng F.2 – Ví dụ về tính toán độ dốc

Tổng thể phức hồi ^a <i>y</i>	Khoảng thời gian tiếp xúc (min) <i>t</i>	$\log_{10}y$	t^2	$t(\log_{10}y)$	$(\log_{10}y)^2$
$y_1 = 2,5 \times 10^6$	$t_1 = 0,0$	$\log_{10}y_1 = 6,397\ 9$	$(t_1)^2 = 0$	$t_1(\log_{10}y_1) = 0$	$(\log_{10}y_1)^2 = 40,933\ 1$
$y_2 = 3,4 \times 10^5$	$t_2 = 2,0$	$\log_{10}y_2 = 5,531\ 5$	$(t_2)^2 = 4$	$t_2(\log_{10}y_2) = 11,063\ 0$	$(\log_{10}y_2)^2 = 30,597\ 5$
$y_3 = 3,1 \times 10^4$	$t_3 = 4,0$	$\log_{10}y_3 = 4,491\ 4$	$(t_3)^2 = 16$	$t_3(\log_{10}y_3) = 17,965\ 6$	$(\log_{10}y_3)^2 = 20,172\ 7$
$y_4 = 1,7 \times 10^3$	$t_4 = 6,0$	$\log_{10}y_4 = 3,230\ 4$	$(t_4)^2 = 36$	$t_4(\log_{10}y_4) = 19,382\ 4$	$(\log_{10}y_4)^2 = 10,435\ 5$
$y_5 = 1,9 \times 10^2$	$t_5 = 8,0$	$\log_{10}y_5 = 2,278\ 8$	$(t_5)^2 = 64$	$t_5(\log_{10}y_5) = 18,230\ 4$	$(\log_{10}y_5)^2 = 5,192\ 9$
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \log_{10}y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i)^2$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i(\log_{10}y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} (\log_{10}y_i)^2$
Biến ấn định	A = 20	B = 21,930 0	C = 120	G = 66,641 4	E = 107,331 7

^a Theo F.3.7, điểm dữ liệu trong khoảng 0,5 loga của y_1 không cần tính trong phân tích hồi qui.

$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)} \tag{E.1}$$

$$m = \frac{[(5)(66,6414)] - [(20)(21,9300)]}{[(5)(120)] - (20^2)} \quad (\text{F.1})$$

$$m = \frac{(33,2070) - (438,6000)}{(600) - (400)} \quad (\text{F.2})$$

$$m = \frac{-105,3930}{200} \quad (\text{F.3})$$

$$m = -0,5270 \quad (\text{F.4})$$

F.3.10 Giá trị D bằng nghịch đảo âm của độ dốc thu được và được tính bằng công thức (F.5).

$$D = -1\left(\frac{1}{m}\right) \quad (\text{F.5})$$

Sử dụng độ dốc tính được ở trên, giá trị D bằng:

$$D = -1\left(\frac{1}{-0,5270}\right) = 1,8975 \text{ min (làm tròn đến một chữ số thập phân, } D = 1,9 \text{ min)} \quad (\text{F.6})$$

F.3.11 Giá trị thu được cho hệ số xác định được dùng để đánh giá độ tuyến tính của đường cong sống sót không được nhỏ hơn 0,8.

F.3.12 Hệ số xác định đối với độ tuyến tính của đường cong sống sót được tính bằng công thức (F.7).

$$r^2 = \frac{\{(G) - [(A)(B/n)]\}^2}{[(C) - (A^2/n)][(E) - (B^2/n)]} \quad (\text{F.7})$$

trong đó tất cả các biến như được xác định trong F.3.8 và

$$E = \sum (\log_{10} y)^2 \quad (\text{F.8})$$

F.3.13 Ví dụ tính hệ số xác định đối với độ tuyến tính của đường cong sống sót được cho dưới đây sử dụng các giá trị từ Bảng F.2.

$$r^2 = \frac{\{(66,6414) - [(20)(21,9300/5)]\}^2}{[(120) - (20^2/5)][(107,3317) - (21,9300^2/5)]} \quad (\text{F.9})$$

$$r^2 = \frac{\{(66,6414) - [(87,7200)]\}^2}{[(120) - (80)][(107,3317) - (96,1850)]} \quad (\text{F.10})$$

$$r^2 = \frac{(-21,0786)^2}{(40)(11,1467)} \quad (\text{F.11})$$

$$r^2 = \frac{444,307\ 4}{445,868\ 0} \quad (F.12)$$

$$r^2 = 0,996\ 5$$

CHÚ THÍCH ISO 11138-1 nhận biết sai thuật ngữ "hệ số tương quan" là r^2 . Hệ số tương quan được biểu thị đúng là r . Bình phương hệ số tương quan gọi là hệ số xác định, r^2 . ISO 11138-1 áp dụng đúng công thức toán học đối với r^2 nhưng ghi sai là hệ số tương quan.

Phụ lục G

(tham khảo)

Đặc tuyến đáp ứng tồn tại-tiêu diệt

(lấy từ ISO 11138-1:2006, Phụ lục E)

G.1 Quy định chung

Theo dõi đặc tuyến đáp ứng tồn tại-tiêu diệt của lô/mẻ chất chỉ thị sinh học cung cấp thêm một phương tiện để đảm bảo tính năng nhất quán của các đơn vị trong lô/mẻ đó.

G.2 Vật liệu

G.2.1 Mẫu thử cần đại diện cho các hỗn dịch bào tử, vật liệu mang chủng hoặc chất chỉ thị sinh học bao gói.

G.2.2 Phải sử dụng thiết bị đo các tổ hợp đối chứng liên quan.

CHÚ THÍCH Phương pháp thử được nêu trong các phần tiếp theo của bộ tiêu chuẩn ISO 11138. Các quy định kỹ thuật đối với thiết bị đo các tổ hợp đối chứng nêu trong ISO 18472.

G.2.3 Tủ nuôi cấy cần được đặt để cung cấp, và theo dõi để xác nhận, nhiệt độ quy định trong điều kiện cấy.

G.2.4 Môi trường tăng trưởng cần theo quy định trong điều kiện cấy.

G.3 Phương pháp

G.3.1 Thực hiện ít nhất 50 lần xác định lặp lại để khẳng định thời gian tồn tại và thời gian tiêu diệt (xem 13.2 và Bảng 1). Giá trị D tính theo phương pháp đường cong sống sót (xem Phụ lục F) hoặc phương pháp tỷ lệ âm (xem Phụ lục C) phải sử dụng để mô phỏng đặc tuyến đáp ứng tồn tại-tiêu diệt.

G.3.2 Các mẫu phải được cấy sau khi tiếp xúc theo phương pháp quy định của nhà sản xuất.

G.3.3 Tính năng tồn tại được đánh dấu bằng thời gian tiếp xúc mà sinh vật thử tồn tại đối với mỗi chất chỉ thị sinh học. Tính năng tiêu diệt được đánh dấu bằng thời gian tiếp xúc mà sinh vật thử tiêu diệt đối với mỗi chất chỉ thị sinh học.

G.3.4 Đặc trưng tính năng tồn tại-tiêu diệt phải được xác định bằng thiết bị đo các tổ hợp đối chứng sử dụng các thông số quá trình liên quan.

TCVN 8583:2010

G.3.5 Các giá trị liên quan đối với thời gian tồn tại và thời gian tiêu diệt có thể thu được bằng cách sử dụng công thức (G.1) và(G.2).

$$\text{thời gian tồn tại} \geq (\log_{10} \text{quần thể danh nghĩa} - 2) \times \text{giá trị } D \quad (\text{G.1})$$

$$\text{thời gian tiêu diệt} \leq (\log_{10} \text{quần thể danh nghĩa} + 4) \times \text{giá trị } D \quad (\text{G.2})$$

G.3.6 Số đơn vị vòng trên một lần tiếp xúc sẽ phụ thuộc vào dung lượng và đặc tính vận hành của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được sử dụng. Có thể cần nhiều lần tiếp xúc ở thời gian tồn tại lẫn thời gian tiêu diệt để thử nghiệm tổng số đơn vị cần thiết.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6450 (ISO/IEC Guide 2), *Tiêu chuẩn hóa và các hoạt động liên quan – Từ vựng*
- [2] TCVN ISO/IEC 17025, *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*
- [3] TCVN ISO/IEC 17011, *Đánh giá sự phù hợp – Yêu cầu chung đối với tổ chức công nhận thực hiện việc công nhận tổ chức đánh giá sự phù hợp*
- [4] TCVN ISO 9000 (ISO 9000), *Hệ thống quản lý chất lượng – Cơ sở và từ vựng*
- [5] TCVN (ISO 19011), *Hướng dẫn đánh giá hệ thống quản lý chất lượng và/hoặc môi trường*
- [6] ISO/TS 11139:2006, *Sterilization of health care products — Vocabulary (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Từ vựng)*
- [7] TCVN ISO 13485 (ISO 13485), *Thiết bị y tế – Hệ thống quản lý chất lượng – Yêu cầu dùng cho mục đích chế định*
- [8] RUSSEL, A.D., *Phá hủy bào tử vi khuẩn*, Academic Press, London, 1982
- [9] BLOCK, S.S., *Khử khuẩn, tiệt khuẩn và bảo tồn, xuất bản lần thứ tư*, Lea & Febiger, Philadelphia, PA, 1991
- [10] QUESNEL, L.B., *Chất chỉ thị sinh học và quá trình tiệt khuẩn. Trong: The revival of injured microbes*, ANDREW and RUSSEL, A.D. (eds), Academic Press, London, pp. 257–284, 1984
- [11] ROBERTS, T.A., *Phục hồi bào tử hư hại do nhiệt, bức xạ ion hóa hoặc etylen oxit*, J.Appl. Bact., 33, pp 74–94, 1970
- [12] DAVIS, S.B., CARLS, R.A. và GILLIS, J.R., *Recovery of sublethal sterilization damaged Bacillus spores in various recovery media*, Dev. Ind. Micro., 18, pp.427–438, 1976
- [13] BUSTA, F.F., FOEGEDING, P.M. và ADAMS, D.M. *Injury and Resuscitation of Germination and outgrowth of bacterial Spores. Trong: Sporulation and germination*, LEVINSON, H.S., SONENSHEIN, A.L. và TIPPER, D.J., Proc. eighth Int. Spore Conf. Washington, DC, ASM, pp 261–265, 1981
- [14] CAPUTO, R.A., ROHN, K.J. và MASCOLI, C.C., *Đánh giá xác nhận sinh học của quá trình tiệt khuẩn EO*, Dev. Ind. Micro., 22, pp. 357–362, 1981
- [15] Eucomed, *Đánh giá xác nhận tiệt khuẩn thiết bị y tế và sản phẩm phẫu thuật*, Biên bản hội nghị, Eucomed, London, 1984
- [16] Eucomed, *Theo dõi sinh học tiệt khuẩn*, Biên bản hội nghị, Eucomed, London, 1986
- [17] MALLIDIS, C.G., và SCHOLEFIELD, J., *Đánh giá môi chất phục hồi dùng cho bào tử được gia*

nhiệt của Bacillus stearothermophilus, J.App. Bact., 61, pp. 517-523, 1986

- [18] TAHATA, T., HATAKEYAMA, K., SHINTANI, H., HAYASHI, H. và TAKAHASHI, M., *Nhiều thông số ảnh hưởng giá trị D 10 của chất chỉ thị sinh học trong quá trình chuẩn bị, J. Antibact. Antifung. Agents, 23 (12), pp. 751-754, 1995*
- [19] SPICHER, PETERS và BORCHERS, *Siêu gia nhiệt của chất mang làm sai lệch sức kháng của chất chỉ thị sinh học với hơi nước, Zbl. Hyg., 194, pp. 369-379, 1993*
- [20] SPICHER, PETERS và BORCHERS, *Thực nghiệm thêm về sự sai lệch sức kháng của chất chỉ thị sinh học với hơi nước do siêu gia nhiệt, Zbl. Hyg., 196, pp. 181-196, 1994*
- [21] BORIS, C. và GRAHAM, G.S., *Ảnh hưởng của môi chất phục hồi và phương pháp luận thử nghiệm trên chất chỉ thị sinh học, Thiết bị y tế và Công nghiệp chẩn đoán, 7, pp. 43-48, 1985*
- [22] TCVN ISO 9001 (ISO 9001), *Hệ thống quản lý chất lượng – Các yêu cầu*
- [23] AAMI TIR 31, *Thiết bị/gói thử kiểm chứng quá trình dùng cho các cơ sở chăm sóc sức khỏe*
- [24] EN 285, *Tiệt khuẩn – Thiết bị tiệt khuẩn hơi – Thiết bị tiệt khuẩn cỡ lớn*
- [25] MOSLEY, G.A., và GILLIS, J.R., *Yếu tố ảnh hưởng vật thải trong tiệt khuẩn bằng etylen oxit, Phần 1: Khi vật thải là thiếu hụt nhân tạo và khoa học trong ISO 11135 và EN 550, PDA Báo khoa học và công nghệ dược, 58, (2), pp. 81-95, 2004*
- [26] HOLCOMB, R.G. và PFLUG, I.J., *Phương pháp Spearman-Kärber phân tích dữ liệu phá hủy sinh học thử quantal. Trong: Các bài viết chọn lọc về vi sinh vật học và kỹ thuật của quá trình tiệt khuẩn, xuất bản lần thứ 5. I.J. PFLUG, (ed.) phòng thí nghiệm tiệt khuẩn môi trường, Minneapolis, pp. 83-100, 1988*
- [27] STUMBO, C.R., MURPHY, J.B. và COCHRAN, J., *Tính chất của đường thời gian chết do nhiệt đối với P.A. 3679 và Clostridium Botulinum, Công nghệ thực phẩm, 4, pp. 321-326, 1950*
- [28] PFLUG, I.J. HOLCOMB, R.G. và GOMEZ, M.M., *Phá hủy nhiệt vi sinh vật. Trong: Khử khuẩn, tiệt khuẩn và bảo quản, BLOCK, S.S., (ed) Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, pp 79-129, 2001*
- [29] MOSLEY, G.A., GILLIS, J.R., và KRUSHEFSKI, G., *Đánh giá công thức đối với khả năng tiêu diệt tích hợp trong tiệt khuẩn bằng etylen oxit sử dụng sáu dòng vi khuẩn hình thành nội bào tử khác nhau, và so sánh khả năng tiêu diệt tích hợp đối với etylen oxit và hệ thống hơi, PDA Báo khoa học và công nghệ dược, 59, (1), pp. 64-86, 2005*
- [30] OXBORROW, G.S., TWOHY, C.W. và DEMITRIUS, C.A., *Xác định tính biến động của bình BIER dùng cho EO và hơi, MDDI, 12 (5), pp. 78-83, 1990*

- [31] MOSLEY, G.A., *Ước lượng ảnh hưởng của bình EtO BIER vận hành chính xác theo tính toán giá trị D, MDDI, 24, (4), pp 46-52, 2002*
- [32] MOSLEY, G.A. và GILLIS, J.R., *Hoạt động chính xác của bình BIER hơi nước và ảnh hưởng tương tác của các van Z khác nhau lên độ tái lập của các giá trị D liệt kê, PDA báo khoa học và công nghệ dược, 56 (6), pp. 318-331, 2002*
- [33] PFLUG, I.J., *Vi sinh vật học và kỹ thuật của quá trình tiệt khuẩn, xuất bản lần thứ 11, 2003*
- [34] *Dược điển Mỹ. USP 2007, tập 1, mục 55*
- [35] ISO 20857, *Sterilization of health care products - Dry heat - Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Nóng khô – Yêu cầu đối với việc triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường qui quá trình tiệt khuẩn thiết bị y tế)*
- [36] ISO 11737-2, *Sterilization of medical devices - Microbiological methods - Part 2 : Test of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process (Tiệt khuẩn thiết bị y tế - Phương pháp vi sinh vật học – Phần 2: Phép thử tiệt khuẩn thực hiện trong xác định, đánh giá xác nhận và duy trì quá trình tiệt khuẩn).*
-