

PHỤ LỤC 13

13.1 PHÉP THỬ HISTAMIN

Dùng chuột lang nặng 250 g đến 350 g. Để chuột nhịn đói trong 24 h, cho uống nước theo nhu cầu của chuột. Giết chuột đột ngột bằng một cú đánh mạnh vào đầu chuột.

Mở bụng chuột, dùng kẹp, kẹp vào manh tràng, nâng lên và kéo ra phía trước, sẽ thấy hồi tràng nổi vào manh tràng. Cắt lấy một đoạn hồi tràng dài khoảng 2 cm, cho vào khay đựng dung dịch B (nếu làm chậm phải sục khí carbogen). Loại bỏ các chất còn trong đoạn ruột bằng cách dùng một pipet có dung dịch B lỏng vào đầu đoạn ruột rồi để cho dung dịch B trong pipet chảy tự nhiên qua đoạn ruột. Cần để pipet ở tư thế nghiêng sao cho mặt thoáng của dung dịch B không cao quá 2 cm so với đoạn ruột trong khay. Thay dung dịch B mới vào khay. Buộc vào mỗi đầu của đoạn ruột một sợi chỉ mảnh và rạch một đường ngang nhỏ ở giữa đoạn ruột.

Cho đoạn ruột vào bình nuôi cơ quan cô lập có dung tích 10 ml đến 20 ml, chứa dung dịch B, và giữ ở nhiệt độ hằng định 34 °C đến 36 °C. Sục một hỗn hợp khí có 95 thể tích oxygen và 5 thể tích carbon dioxyd qua bình nuôi. Một đầu sợi chỉ buộc vào gần đáy bình nuôi, đầu kia nối với đầu ghi của một kymograph hoặc thiết bị thích hợp để ghi sự co bóp của ruột. Nếu dùng bút ghi trên giấy thì điều chỉnh sao cho biên độ có thể khuếch đại lên khoảng 20 lần. Sức căng của ruột nên vào khoảng 9,8 mN và điều chỉnh theo độ nhạy của ruột.

Thay dung dịch B trong bình nuôi cơ quan. Để yên 10 min. Tiếp tục thay dung dịch B 2 đến 3 lần như vậy nữa.

Thêm vào bình nuôi cơ quan, chính xác khoảng 0,2 ml đến 0,5 ml dung dịch histamin dihydroclorid có nồng độ nhất định để gây nên một đáp ứng gần tối đa có thể lặp lại được. Liều này gọi là liều "cao".

Thay dung dịch B ở bình nuôi 3 lần trước mỗi lần thêm histamin. Nên thêm histamin vào những khoảng thời gian cách đều để ruột giãn hoàn toàn giữa các lần thêm (khoảng 2 min).

Tương tự, thêm những thể tích bằng nhau của dung dịch có nồng độ histamin thấp để cho đáp ứng có biên độ bằng khoảng một nửa biên độ của liều "cao" và có thể lặp lại được. Liều này gọi là liều "thấp".

Tiếp tục thêm đều đặn các liều "cao" và liều "thấp" histamin như đã nêu ở trên và xen kẽ thêm cùng một thể tích dung dịch pha từ mẫu thử. Điều chỉnh độ pha loãng của dung dịch thử để cho sức co của ruột nhỏ hơn sức co của liều "cao".

Kiểm tra xem sức co của dung dịch thử có lặp lại không và xem đáp ứng với liều cao và liều thấp có như trước không.

Tính hoạt lực của chất thử ra microgam histamin base căn cứ vào độ pha loãng đã xác định ở trên. Lượng histamin xác định được không được vượt quá lượng ghi trong chuyên luận.

Nếu chất thử không gây co bóp ruột, pha một dung dịch khác và cho thêm một lượng histamin tối đa dung nạp được ghi trong chuyên luận và thử với dung dịch này. Theo dõi xem sự co cơ của dung dịch này có tương ứng với lượng histamin đã thêm không. Nếu dung dịch này không gây ra sự co cơ tương ứng hoặc sự co của dung dịch thử không lặp lại được, hoặc sau khi thử chất thử rồi, thử lại với histamin chuẩn liều "cao" và liều "thấp" mà đáp ứng có giảm đi thì kết quả thử là không có giá trị và phải thử chất hạ áp của thuốc theo chuyên luận "Phép thử các chất hạ áp, Phụ lục 13.3".

Dung dịch A:

Natri clorid	160 g
Kali clorid	4,0 g
Calci clorid khan	2,0 g
Magnesi clorid khan	1,0 g
Dinatri hydrophosphat	50 mg
Nước cất pha tiêm	vừa đủ 1000 ml

Dung dịch B:

Dung dịch A	50 ml
Atropin sulfat	0,5 mg
Natri hydrocarbonat	1,0 g
D - glucose	0,5 g
Nước cất pha tiêm	vừa đủ 1000 ml

Dung dịch B chỉ pha ngay trước khi dùng và phải dùng trong vòng 24 h.

13.2 PHÉP THỬ NỘI ĐỘC TỔ VI KHUẨN

Phép thử nội độc tố vi khuẩn dùng để phát hiện hoặc định lượng nội độc tố của vi khuẩn gram âm có trong mẫu thử cần kiểm tra. Phương pháp sử dụng thuốc thử lysat là dịch phân giải tế bào dạng amip có trong máu một loài sam biển, *Limulus polyphemus* hoặc *Tachypleus tridentatus*.

Hiện nay có 3 phương pháp để thực hiện phép thử này: Phương pháp tạo gel dựa trên sự tạo thành gel khi cho thuốc thử vào dung dịch có chứa nội độc tố; phương pháp đo độ đục, dựa vào sự thay đổi độ đục của thuốc thử lysat khi tạo gel; phương pháp đo màu dựa trên sự thay đổi màu của phức hợp màu - peptid.

Tùy theo điều kiện và tính chất của mẫu thử, có thể áp dụng một trong các kỹ thuật thích hợp để thực hiện phép thử. Tuy nhiên, khi có nghi ngờ hoặc tranh chấp, kết luận cuối cùng sẽ dựa vào phương pháp tạo gel trừ khi có chỉ dẫn khác.

Phép thử được thực hiện trong điều kiện tránh nhiễm khuẩn.

Thiết bị và dụng cụ:

Tất cả dụng cụ dùng trong phép thử này đều phải không có chứa nội độc tố.

Với những dụng cụ thủy tinh hoặc bằng chất liệu chịu được nhiệt, loại chất gây sốt bằng cách sấy ở 250 °C trong ít nhất 30 min. Nếu dùng các dụng cụ là chất dẻo, như các đầu hút của micropipet hay các khay lỗ để làm phản ứng, chỉ dùng các loại có chất liệu không ảnh hưởng tới phép thử và không có chứa nội độc tố.

Nước để thử nội độc tố (nước BET): Là nước cất pha tiêm cho kết quả âm tính trong phép thử nội độc tố ở điều kiện quy định. Có thể dùng nước cất 3 lần hoặc một loại nước cất pha tiêm thu được bằng phương pháp thích hợp khác đạt yêu cầu trên.

Nếu không có chỉ dẫn gì khác, dùng nước BET làm dung môi để pha tất cả các dung dịch dùng trong phép thử.

Dung dịch acid hydrochloric 0,1 M BET và natri hydroxyd 0,1 M BET: Là dung dịch được pha từ acid hydrochloric (TT) hoặc natri hydroxyd (TT) với nước BET trong một dụng cụ không có chứa nội độc tố. Các dung dịch này đạt yêu cầu nếu sau khi điều chỉnh đến pH 6,0 đến 8,0, cho kết quả âm tính trong điều kiện của phép thử.

Nội độc tố chuẩn và dung dịch chuẩn gốc: Nội độc tố chuẩn được sử dụng trong phép thử như một chất đối chiếu. Chuẩn được thiết lập và đánh giá theo nội độc tố chuẩn quốc tế. Hoạt lực của chuẩn được biểu thị theo đơn vị quốc tế quy định bởi Tổ chức Y tế Thế giới (International Unit - IU) hoặc đơn vị nội độc tố (Endotoxin Unit - EU). 1 IU tương đương với 1 EU.

Dung dịch chuẩn gốc nội độc tố được pha theo quy định đóng gói của từng nhà sản xuất. Trên nhãn và tờ hướng dẫn sử dụng kèm theo ghi rõ cách pha, điều kiện bảo quản và số đơn vị nội độc tố có trong dung dịch chuẩn gốc sau khi pha theo hướng dẫn.

Pha dung dịch chuẩn: Pha dung dịch chuẩn gốc với nước BET để được dãy chuẩn có nồng độ thích hợp. Trước khi pha, thường yêu cầu lắc mạnh dung dịch chuẩn gốc trong ít nhất 15 min, và mỗi lần pha loãng, trộn các dung dịch pha loãng ít nhất 30 s. Dùng các dung dịch chuẩn đã pha loãng càng sớm càng tốt để tránh mất hoạt lực.

Dung dịch thử:

Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách hòa tan hoặc pha loãng mẫu thử với nước BET đến độ pha loãng thích hợp. Một số chất hoặc chế phẩm có thể cần phải hòa tan hoặc pha loãng trong dung dịch thân nước khác. pH của hỗn hợp phản ứng phải nằm trong khoảng quy định cho mỗi loại thuốc thử, thông thường trong khoảng 6,0 đến 8,0. Do vậy, nên điều chỉnh pH của dung dịch thử cho phù hợp bằng các dung dịch acid hydrochloric 0,1 M BET, natri hydroxyd 0,1 M BET hoặc một đệm thích hợp theo khuyến cáo của nhà sản xuất thuốc thử.

Phép thử không thích hợp với một số loại mẫu thử như các loại nhũ dịch, hỗn dịch... Một số chất có thể cho phản ứng dương tính hoặc âm tính giả với thuốc thử như các chế phẩm từ máu, polynucleotid; chế phẩm có chứa kim loại nặng, chất điện hoạt, nồng độ ion cao. Do vậy, cần phải khảo sát, tìm phương pháp xử lý và đánh giá trước khi áp dụng phép thử cho chế phẩm.

Độ pha loãng tối đa:

Độ pha loãng tối đa (MVD) là hệ số pha loãng lớn nhất cho

phép để thu được dung dịch thử có chứa lượng nội độc tố có thể phát hiện được.

MVD được tính như sau:

$$MVD = \frac{\text{Giới hạn nội độc tố} \times \text{nồng độ dung dịch thử}}{\lambda}$$

Trong đó:

Giới hạn nội độc tố (Endotoxin Limit - EL): Giới hạn nội độc tố thường được quy định trong các chuyên luận riêng. Chế phẩm đạt yêu cầu nếu lượng nội độc tố có trong chế phẩm thấp hơn giới hạn quy định. Giới hạn nội độc tố của các chế phẩm được tính trên cơ sở liều dùng cho người theo công thức sau:

$$EL = K/M$$

Trong đó:

K là ngưỡng nội độc tố tính cho 1 kg cân nặng cơ thể người có thể chịu đựng được mà không xảy ra phản ứng độc hại; Giá trị K được tham khảo trong Bảng 13.2.1 dưới đây;

M là liều tối đa của sản phẩm tính cho 1 kg cân nặng cơ thể dùng dưới dạng đơn liều trong thời gian khoảng 1 h. Liều này được hiểu là lượng thuốc tối đa có thể được dùng trong vòng 1 h. Với các loại thuốc tiêm dưới da, tiêm bắp hoặc tiêm tĩnh mạch một lần sẽ được coi như dùng đơn liều. Với các dịch truyền tĩnh mạch trong thời gian dài, tính M theo lượng thuốc của liều có thể được truyền tối đa trong một giờ, dựa trên tốc độ truyền tiêu chuẩn nếu không có quy định riêng nào cho chế phẩm. Giá trị được dùng là liều tối đa theo khuyến cáo của nhà sản xuất, có thể mức liều đó vượt quá mức liều theo chỉ dẫn của thầy thuốc.

Nếu một sản phẩm có thể được dùng theo cả 2 đường tiêm trong màng cứng và các đường tiêm khác thì giới hạn nội độc tố cho sản phẩm được tính theo giá trị K của đường tiêm trong màng cứng vì có yêu cầu chặt chẽ hơn.

Bảng 13.2.1

Loại sản phẩm	K (tính cho 1 kg cân nặng cơ thể)
Các loại thuốc tiêm trong màng cứng	0,2
Các thuốc phóng xạ tiêm tĩnh mạch	2,5
Tất cả các thuốc tiêm trừ loại tiêm trong màng cứng hoặc thuốc phóng xạ	5,0

Trên thực tế, các nhà sản xuất thường quy định giới hạn nội độc tố cho sản phẩm thấp hơn nhiều so với giới hạn tính theo ngưỡng chịu đựng của người bệnh, để khi dùng liều tối đa sản phẩm vẫn đảm bảo an toàn cho người bệnh.

Nồng độ của dung dịch thử:

Tính bằng mg/ml nếu giới hạn nội độc tố trong chuyên luận riêng quy định theo khối lượng (EU/mg).

Tính bằng đơn vị/ml nếu giới hạn nội độc tố trong chuyên luận riêng quy định theo đơn vị hoạt lực sinh học (EU/đơn vị).

Tính bằng ml/ml nếu giới hạn nội độc tố trong chuyên luận riêng quy định theo thể tích (EU/ml).

λ là độ nhạy của thuốc thử được ghi trên nhãn (kỹ thuật tạo gel) hoặc nồng độ nội độc tố thấp nhất đã dùng để xây dựng đường cong chuẩn (phương pháp đo độ đục hoặc đo màu).

PHƯƠNG PHÁP TẠO GEL

Phương pháp tạo gel cho phép phát hiện hoặc xác định lượng nội độc tố dựa trên sự tạo gel của thuốc thử lysat với nội độc tố. Nồng độ nội độc tố yêu cầu để tạo gel với thuốc thử lysat trong điều kiện tiêu chuẩn là độ nhạy ghi trên nhãn của thuốc thử. Để đảm bảo độ chính xác và giá trị của phép thử, phải tiến hành phép thử kiểm tra để khẳng định độ nhạy ghi trên nhãn của thuốc thử lysat và kiểm tra các yếu tố ảnh hưởng theo hướng dẫn dưới đây.

Chuẩn bị thử

Kiểm tra độ nhạy của lysat:

Độ nhạy của thuốc thử lysat ghi trên nhãn là nồng độ nội độc tố thấp nhất cần thiết để tạo gel với thuốc thử trong điều kiện xác định.

Phép thử kiểm tra độ nhạy được thực hiện mỗi khi có lô thuốc thử mới hoặc khi có sự thay đổi điều kiện thí nghiệm có thể ảnh hưởng tới kết quả của phép thử.

Tiến hành:

Chuẩn bị các dung dịch nội độc tố chuẩn với ít nhất 4 nồng độ tương đương 2 λ; λ; 1/2 λ và 1/4 λ bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc với nước BET, mỗi nồng độ cần 4 ống. Trong đó λ là độ nhạy ghi trên nhãn của lysat muốn kiểm tra. Pha thuốc thử lysat với nước BET theo hướng dẫn trên nhãn. Trộn một thể tích thuốc thử với đồng lượng dung dịch chuẩn (thường dùng 0,1 ml) cho mỗi ống. Ủ các ống nghiệm có chứa hỗn hợp phản ứng trong một khoảng thời gian quy định theo khuyến cáo của nhà sản xuất thuốc thử lysat [thường ở (37 ± 1) °C trong (60 ± 2) min], tránh bị rung động mạnh.

Đọc kết quả sau một khoảng thời gian quy định. Phản ứng dương tính nếu gel tạo thành không bị chảy ra khi nhẹ nhàng dốc ngược ống nghiệm (180°). Phản ứng âm tính khi không tạo thành gel hoặc gel không đủ chắc, rất dễ bị rã khi dốc ngược ống nghiệm.

Phép thử không có giá trị nếu bất kỳ ống nào của dung dịch chuẩn nội độc tố có nồng độ thấp nhất (0,25 λ) cho

phản ứng dương tính. Khi đó, cần kiểm tra kỹ lại các điều kiện thử nghiệm và lặp lại thí nghiệm.

“Điểm dừng” là ống cuối cùng có hệ số pha loãng lớn nhất trong dãy cho phản ứng dương tính.

Độ nhạy của thuốc thử được biểu thị là trung bình nhân của nồng độ điểm dừng (EU/ml), được tính như sau: Tính giá trị trung bình của các logarit nồng độ nội độc tố tại điểm dừng, sau đó lấy đối - logarit của giá trị trung bình.

Trung bình nhân nồng độ điểm dừng = anti log (Σe/f).

Trong đó:

Σe là tổng các logarit nồng độ điểm dừng của mỗi dãy đã thử; f là số dãy chuẩn nội độc tố đã thử.

Độ nhạy ghi trên nhãn của thuốc thử được khẳng định là đúng nếu trung bình nhân nồng độ điểm dừng lớn hơn hoặc bằng 0,5 λ và nhỏ hơn hoặc bằng 2,0 λ.

Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng:

Phép thử được tiến hành để xác định xem trong mẫu thử có chứa các yếu tố làm tăng hay ức chế phản ứng hay không. Khi có bất kỳ sự thay đổi điều kiện nào đó có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm, cần thực hiện phép thử này.

Chuẩn bị các dung dịch A, B, C và D theo như Bảng 13.2.2. Các điều kiện thử nghiệm như nhiệt độ, thời gian ủ và đánh giá kết quả tương tự như trong phần *Kiểm tra độ nhạy của lysat*

Trung bình nhân nồng độ điểm dừng của dung dịch B và C được xác định theo hướng dẫn đã nêu trong phần *Kiểm tra độ nhạy của lysat*.

Phép thử có giá trị khi dung dịch A và D cho phản ứng âm tính và kết quả dung dịch C khẳng định đúng độ nhạy của thuốc thử.

Nếu độ nhạy của lysat tính theo dung dịch B lớn hơn 0,5 λ và nhỏ hơn 2,0 λ thì mẫu thử không chứa yếu tố ảnh hưởng và phép kiểm tra yếu tố ảnh hưởng đạt yêu cầu. Nếu không thỏa mãn các yêu cầu trên thì mẫu thử có chứa yếu tố ảnh hưởng tới phép thử.

Bảng 13.2.2 - Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng

Dung dịch	Nồng độ nội độc tố được thêm vào mỗi dung dịch	Dung môi	Hệ số pha loãng	Nồng độ nội độc tố sau khi pha loãng	Số ống nghiệm
A	0/dung dịch thử	-	-	-	4
B	2 λ/dung dịch thử	dung dịch thử	1	2 λ	4
			2	1 λ	4
			4	0,5 λ	4
			8	0,25 λ	4
C	2 λ/nước BET	Nước BET	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0,5 λ	2
			8	0,25 λ	2
D	0/nước BET	-	-	-	2

Trong đó:

Dung dịch A (dung dịch thử): Mẫu thử pha ở độ pha loãng ≤ MVD.

Dung dịch B (đối chứng dương tính có mẫu thử): Nội độc tố pha trong dung dịch thử để kiểm tra yếu tố ảnh hưởng.

Dung dịch C (khẳng định độ nhạy của lysat): Chuẩn nội độc tố pha trong nước BET với nồng độ khác nhau.

Dung dịch D (đối chứng âm tính): Nước BET.

Nếu mẫu thử có chứa yếu tố ảnh hưởng tới phép thử ở độ pha loãng nhỏ hơn MVD, làm lại phép thử *Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng*, dùng dung dịch thử có độ pha loãng lớn hơn nhưng không quá MVD.

Sử dụng thuốc thử có độ nhạy cao hơn sẽ cho phép mẫu thử được pha loãng nhiều hơn, khi đó có thể hạn chế được yếu tố ảnh hưởng. Ngoài ra, có thể xử lý để loại các yếu tố ảnh hưởng bằng phương pháp thích hợp như lọc, trung hòa, thấm tách hoặc đun nóng. Để đảm bảo phương pháp xử lý đã chọn chắc chắn loại được yếu tố ảnh hưởng mà không làm mất nội độc tố, cần thực hiện phép thử *Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng* với dung dịch thử sau khi xử lý và cho thêm chuẩn nội độc tố. Nếu phương pháp có hiệu quả, cần ghi vào tiêu chuẩn.

Phép thử giới hạn

Dựa trên sự tạo gel của thuốc thử lysat với nội độc tố, phương pháp này kiểm tra xem lượng nội độc tố có trong mẫu thử có lớn hơn giới hạn quy định hay không.

Tiến hành: Chuẩn bị dung dịch A, B, C và D theo Bảng 13.2.3, mỗi dung dịch 2 ống. Các điều kiện thử nghiệm như nhiệt độ, thời gian ủ và đánh giá kết quả tương tự như trong phần *Kiểm tra độ nhạy của lysat*.

Bảng 13.2.3

Dung dịch	Nồng độ nội độc tố được thêm vào mỗi dung dịch	Số ống nghiệm
A	0/dung dịch thử	2
B	2 λ/dung dịch thử	2
C	2 λ/nước BET	2
D	0/nước BET	2

Trong đó:

Dung dịch A (dung dịch thử): Mẫu thử pha ở độ pha loãng không được lớn hơn MVD.

Dung dịch B (đối chứng dương tính có mẫu thử): Nội độc tố pha trong dung dịch thử.

Dung dịch C (đối chứng dương tính): Chuẩn nội độc tố pha trong nước BET.

Dung dịch D (đối chứng âm tính): Nước BET.

Đánh giá kết quả:

Phép thử có giá trị nếu cả 2 ống của dung dịch B và C đều cho kết quả dương tính và dung dịch D âm tính.

Mẫu thử đạt yêu cầu nếu kết quả âm tính ở cả hai ống nghiệm của dung dịch A.

Mẫu thử không đạt yêu cầu nếu kết quả dương tính trên cả hai ống nghiệm của dung dịch A khi độ pha loãng bằng MVD.

Nếu hai ống của dung dịch A cho kết quả khác nhau, một ống dương tính và một ống âm tính thì làm lại phép thử.

Mẫu thử đạt yêu cầu nếu ở lần thử thứ hai cả hai ống đều cho kết quả âm tính.

Phép thử bán định lượng

Phép thử này xác định lượng nội độc tố có trong dung dịch mẫu thử bằng cách thực hiện phản ứng tiến dần tới điểm dừng trong quá trình tạo gel.

Tiến hành: Chuẩn bị dung dịch A, B, C và D theo Bảng 13.2.4, mỗi dung dịch 2 ống nghiệm.

Dung dịch thử dùng cho dung dịch A và B phải không có chứa yếu tố ảnh hưởng. Các điều kiện thử nghiệm như nhiệt độ, thời gian ủ và đánh giá kết quả tương tự như trong phần *Kiểm tra độ nhạy của lysat*.

Bảng 13.2.4

Dung dịch	Nồng độ nội độc tố được thêm vào mỗi dung dịch	Dung môi	Hệ số pha loãng	Nồng độ nội độc tố sau khi pha loãng	Số ống nghiệm
A	0/dung dịch thử	-	1	-	2
			2		2
			4		2
			8		2
B	2 λ/dung dịch thử	Dung dịch thử	1	2 λ	2
C	2 λ/nước BET	Nước BET	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0,5 λ	2
			8	0,25 λ	2
D	0/nước BET	-	-	-	2

Trong đó:

Dung dịch A (dung dịch thử): Dung dịch thử có độ pha loãng không được lớn hơn MVD, không có yếu tố ảnh hưởng. Pha mẫu thử với nước BET theo các hệ số pha loãng 1/2, 1/4, 1/8... Có thể pha loãng tiếp để có kết quả phù hợp nhưng hệ số pha loãng dung dịch thử cuối cùng phải không quá MVD.

Dung dịch B (đối chứng dương tính có mẫu thử): Nội độc tố pha trong dung dịch A, để kiểm tra yếu tố ức chế sự tạo gel.

Dung dịch C (đối chứng dương tính): 2 dãy chuẩn nội độc tố pha trong nước BET.

Dung dịch D (đối chứng âm tính): Dùng nước BET.

Tính toán và đánh giá kết quả:

Phép thử có giá trị khi thoả mãn 3 điều kiện sau:

a) Cả 2 ống của dung dịch D đều âm tính (đối chứng âm tính).

b) Cả 2 ống của dung dịch B đều dương tính (đối chứng dương tính có mẫu thử).

c) Trung bình nhân nồng độ điểm dừng của dung dịch C nằm trong khoảng 0,5 λ đến 2 λ.

Điểm dừng được xác định là ống nghiệm có hệ số pha loãng cao nhất trong dãy của dung dịch A cho phản ứng dương tính, và nồng độ nội độc tố ở điểm dừng của dung dịch A là tích số của độ pha loãng tại điểm đó nhân với hệ số λ.

Nồng độ nội độc tố trong dung dịch mẫu cần kiểm tra được xác định là trung bình nhân nồng độ điểm dừng của các dãy thử, tính trung bình nồng độ nội độc tố của 2 dãy (tương tự như phần *Kiểm tra độ nhạy của lysat*).

Nếu không có nồng độ nào của dung dịch A cho phản ứng dương tính, thì nồng độ nội độc tố của dung dịch A nhỏ hơn λ × hệ số pha loãng thấp nhất của dung dịch A.

Nếu tất cả các độ pha loãng đều cho phản ứng dương tính, nồng độ nội độc tố của dung dịch A là bằng hoặc lớn hơn tích của hệ số pha loãng lớn nhất của dung dịch A nhân với λ . Có thể pha loãng tiếp để tìm được điểm dừng. Tính nồng độ nội độc tố của mẫu thử (EU/ml, EU/mg hoặc mEq hoặc EU/đơn vị), dựa trên nồng độ nội độc tố trung bình của dung dịch A. Mẫu thử đạt yêu cầu phép thử này nếu nồng độ nội độc tố có trong mẫu thử thấp hơn giới hạn nội độc tố quy định trong chuyên luận riêng.

PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG

Phương pháp đo độ đục

Phương pháp đo độ đục xác định lượng nội độc tố có trong dung dịch mẫu thử dựa trên đo mức độ thay đổi độ đục trong quá trình tạo gel của thuốc thử lysat. Hiện nay có 2 kỹ thuật được áp dụng: đo độ đục tại điểm dừng hoặc đo độ đục động học.

Đo độ đục tại điểm dừng dựa trên sự tương quan giữa nồng độ nội độc tố và độ đục của hỗn hợp phản ứng ở thời điểm xác định vào cuối của giai đoạn ủ.

Đo độ đục động học dựa trên sự tương quan giữa nồng độ nội độc tố và thời gian cần thiết để đạt tới độ đục định trước của hỗn hợp phản ứng hoặc tốc độ tăng độ đục của hỗn hợp.

Phép thử thường thực hiện ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, độ đục biểu thị bằng độ hấp thụ hay độ truyền qua.

Phương pháp đo màu

Phương pháp đo màu xác định nồng độ nội độc tố của các dung dịch mẫu thử dựa trên đo chất màu được giải phóng ra từ một cơ chất mang màu do phản ứng của nội độc tố với thuốc thử lysat.

Có 2 kỹ thuật đo: đo màu tại điểm dừng hoặc đo màu động học.

Đo màu tại điểm dừng dựa trên tương quan giữa nồng độ nội độc tố và đậm độ chất màu tạo thành của hỗn hợp phản ứng ở điểm cuối của giai đoạn ủ.

Đo màu động học dựa trên mối tương quan định lượng giữa nồng độ nội độc tố và thời gian cần thiết để hỗn hợp phản ứng đạt tới độ hấp thụ (hoặc độ truyền qua) định trước hoặc tốc độ tăng màu của hỗn hợp.

Phép thử thường thực hiện ở $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Chuẩn bị

Để đảm bảo độ đúng và giá trị của phương pháp đo màu hoặc đo độ đục, phải tiến hành phép thử *Kiểm tra đường chuẩn* và *Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng* như sau:

Kiểm tra đường chuẩn: Phép thử được thực hiện với mỗi lô thuốc thử lysat mới. Dùng dung dịch nội độc tố chuẩn, pha ít nhất 3 nồng độ nội độc tố để tạo được đường chuẩn trong khoảng nồng độ nội độc tố ghi trong hướng dẫn của thuốc thử lysat đang sử dụng. Với mỗi nồng độ, phải dùng ít nhất 3 ống tùy theo điều kiện quy định cho thuốc thử lysat đang dùng (về tỷ lệ thể tích, thời gian ủ, nhiệt độ, pH...)*

Giá trị tuyệt đối của hệ số tương quan [r], phải lớn hơn hoặc bằng 0,980 cho khoảng nồng độ nội độc tố đã dùng. Nếu phép thử không có giá trị, kiểm tra các điều kiện thử nghiệm và tiến hành lại như trên.

Phép thử *Kiểm tra đường chuẩn* phải được thực hiện mỗi khi có thay đổi một điều kiện nào đó có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng: Chọn nồng độ nội độc tố vào khoảng giữa của đường chuẩn.

Chuẩn bị dung dịch A, B, C và D theo Bảng 13.2.5. Tiến hành phép thử với các dung dịch này sau khi đã chuẩn hóa các điều kiện theo quy định của loại thuốc thử lysat sử dụng (về thể tích, tỷ lệ thể tích dung dịch thử và thuốc thử lysat, thời gian ủ).

Phép thử *Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng* phải được thực hiện mỗi khi có sự thay đổi có thể ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm.

Bảng 13.2.5

Dung dịch	Nồng độ nội độc tố được thêm vào mỗi dung dịch	Dung dịch được thêm nội độc tố	Số ống nghiệm hoặc lỗ phản ứng
A	0	Dung dịch thử	Không ít hơn 2
B	Nồng độ ở khoảng giữa của đường cong chuẩn	Dung dịch thử	Không ít hơn 2
C	ít nhất 3 nồng độ	Nước BET	Mỗi nồng độ không ít hơn 2
D	0	Nước BET	Không ít hơn 2

Trong đó:

Dung dịch A (dung dịch thử): Dung dịch thử có độ pha loãng không được lớn hơn MVD.

Dung dịch B: Thêm dung dịch chuẩn vào dung dịch thử để có nồng độ nội độc tố vào khoảng đoạn giữa của đường cong chuẩn.

Dung dịch C (đối chứng dương tính): Dung dịch chuẩn nội độc tố có nồng độ dùng trong thẩm định phương pháp như mô tả trong phần *Kiểm tra đường chuẩn*.

Dung dịch D (đối chứng âm tính): Dùng nước BET.

Phép thử chỉ có giá trị khi hệ số tương quan của đường chuẩn thu được từ dung dịch C lớn hơn hoặc bằng 0,980.

Dung dịch D phải cho kết quả không vượt quá giới hạn giá trị trắng theo quy định của thuốc thử lysat đã dùng, hoặc thấp hơn giới hạn nội độc tố phát hiện của lysat đã dùng.

Khả năng tìm lại được lượng nội độc tố chuẩn thêm vào dung dịch B bằng hiệu số nồng độ đã tìm thấy trong dung dịch B trừ đi nồng độ nội độc tố tìm được trong dung dịch A. Nếu khả năng tìm lại lượng nội độc tố thêm vào nằm trong khoảng 50 % đến 200 %, dung dịch mẫu cần kiểm tra được coi là không có yếu tố ảnh hưởng.

Nếu nồng độ tìm lại được nằm ngoài khoảng quy định, dung dịch mẫu cần kiểm tra có chứa yếu tố ảnh hưởng. Khi đó, cần xử lý để loại yếu tố ảnh hưởng bằng các phương pháp thích hợp (như đã nêu trong phương pháp tạo gel).

Sau đó, phải thực hiện đánh giá lại xem phương pháp xử lý có loại được yếu tố ảnh hưởng không.

Xác định lượng nội độc tố trong mẫu thử

Tiến hành: Chuẩn bị dung dịch A, B, C và D theo như Bảng 13.2.5, và theo quy trình như đã mô tả trong phần Kiểm tra yếu tố ảnh hưởng.

Tính nồng độ nội độc tố:

Tính nồng độ nội độc tố trong mỗi ống của dung dịch A theo đường chuẩn thu được từ dung dịch C. Phép thử không có giá trị trừ khi thoả mãn các yêu cầu sau:

- 1) Giá trị tuyệt đối của hệ số tương quan của đường chuẩn theo dung dịch C lớn hơn hoặc bằng 0,980.
- 2) Lượng nội độc tố tìm lại được, tức là hiệu số nồng độ nội độc tố tìm lại được trong dung dịch B trừ đi nồng độ nội độc tố trong dung dịch A, phải nằm trong khoảng 50 % đến 200 %.
- 3) Kết quả của dung dịch D không vượt quá giới hạn giá trị trắng của thuốc thử lysat đã dùng, hoặc phải thấp hơn giới hạn nội độc tố phát hiện của lysat đã dùng.

Đánh giá kết quả:

Mẫu thử đạt phép thử nội độc tố vi khuẩn nếu nồng độ nội độc tố có trong mẫu thử tính từ nồng độ nội độc tố trung bình của các ống dung dịch A thấp hơn giới hạn nội độc tố quy định trong chuyên luận riêng.

* Nếu tỷ số giá trị logarit đáp ứng giữa nồng độ cao nhất so với nồng độ thấp nhất trong khoảng khảo sát lớn hơn 2, thì nên thêm một số nồng độ để thu được đường chuẩn có khoảng cách giữa các giá trị log phù hợp.

13.3 PHÉP THỬ CÁC CHẤT HẠ ÁP

Thử các chất hạ áp là phương pháp sinh học dựa vào tác dụng hạ huyết áp của thuốc đem thử trên mèo đã được gây mê so với tác dụng hạ áp của thuốc histamin chuẩn.

Chuẩn bị thí nghiệm

Động vật: Mèo khỏe mạnh, trưởng thành, đực hoặc cái (không mang thai), cân nặng từ 1,8 kg trở lên.

Nước muối heparin: Dung dịch chứa 50 đơn vị heparin trong 1 ml dung dịch natri clorid 0,9 % dùng để chống đông máu. Có thể dùng một dung dịch chống đông thích hợp khác để thay thế.

Dung dịch histamin chuẩn: Dùng histamin dihydroclorid hoặc histamin monohydrophosphat bảo quản trong lọ kín, làm khô bằng silica gel 2 h trước khi cân. Hòa tan trong nước cất một lượng histamin đã được cân chính xác thành dung dịch chứa 1 mg/ml histamin base. Ngay trước khi thử, pha loãng dung dịch histamin này (1 mg/ml) bằng dung dịch natri clorid 0,9 % đã tiệt trùng thành dung dịch có nồng độ 0,1 µg/ml tính theo histamin base.

Mẫu thử: Pha theo từng chuyên luận tương ứng trong dung dịch natri clorid 0,9 % đã tiệt khuẩn hoặc trong dung môi thích hợp, đến nồng độ cần thiết.

Tiến hành

Mèo được gây mê bằng cloralose hoặc một loại barbiturat thích hợp như phenobarbital v.v... để duy trì được huyết áp đồng đều trong suốt thời gian thí nghiệm. Cố định động vật trên bàn mổ, cần làm nhẹ nhàng sao cho mèo không bị kích thích. Có biện pháp giữ để thân nhiệt mèo không giảm quá giới hạn sinh lý bằng đèn hoặc lò sưởi. Thông khí quản bằng một canuyn thủy tinh. Bộc lộ động mạch cảnh, lồng canun có chứa đầy nước muối heparin (hoặc dung dịch chống đông khác) vào động mạch cảnh. Nối canuyn với huyết áp kế thủy ngân hoặc một thiết bị ghi huyết áp khác đạt yêu cầu về độ nhạy. Bộc lộ tĩnh mạch đùi, luồn vào đó một kim tiêm đầu tù có chứa nước muối heparin, buộc cố định lại để tiêm mẫu thử hoặc histamin chuẩn.

Xác định độ nhạy của động vật với histamin bằng cách tiêm tĩnh mạch các liều 1 ml (0,1 µg) và 1,5 ml (0,15 µg) dung dịch histamin chuẩn cho mỗi kg thể trọng. Khoảng cách thời gian giữa các lần tiêm ít nhất là 1 min sau khi huyết áp đã trở lại mức bình thường. Bình thường một liều histamin 0,1 µg/kg thể trọng mèo làm huyết áp hạ khoảng 20 mmHg. Lặp lại liều thấp histamin chuẩn (1 ml/kg) ít nhất 2 lần. Động vật được dùng vào thí nghiệm khi sự giảm huyết áp là hằng định ở các liều 1 ml/kg và với liều 1,5 ml/kg phải có độ hạ áp lớn hơn.

Sau khi đã đạt yêu cầu thử độ nhạy với histamin, tiêm tĩnh mạch cho mỗi kg mèo 1 ml dung dịch histamin chuẩn. Tiếp theo tiêm 2 liều liên tục của mẫu thử theo chỉ dẫn của từng chuyên luận và cuối cùng lại tiêm dung dịch histamin chuẩn với liều 1 ml/kg. Thời gian giữa các lần tiêm là hằng định như đã nêu ở trên. Nhắc lại chuỗi tiêm như trên một lần nữa và kết thúc bằng 1,5 ml dung dịch histamin chuẩn cho 1 kg mèo.

Đánh giá kết quả

- a) Nếu độ hạ áp của dung dịch histamin chuẩn liều 1,5 ml/kg không lớn hơn liều 1 ml/kg thì thí nghiệm không có giá trị.
- b) Chế phẩm đạt yêu cầu về thử các chất hạ áp nếu đạt cả 2 điều kiện sau:

Giá trị trung bình của các độ hạ áp khi tiêm mẫu thử không lớn hơn giá trị trung bình của các độ hạ áp khi tiêm dung dịch histamin chuẩn liều 1 ml/kg thể trọng mèo.

Mức hạ áp của mỗi lần tiêm mẫu thử đều không cao hơn mức hạ áp của dung dịch histamin chuẩn liều kết thúc 1,5 ml/kg.

- c) Chế phẩm không đạt yêu cầu nếu một trong 2 điều kiện trên không đạt.

Chú ý: Động vật không được dùng để thử tác dụng hạ áp nữa nếu trong quá trình thử, đã có lần mẫu thử gây hạ áp lớn hơn mức hạ áp do liều kết thúc 1,5 ml dung dịch histamin chuẩn cho 1 kg mèo, hoặc giá trị hạ áp của dung dịch histamin chuẩn ở liều kết thúc 1,5 ml/kg nhỏ hơn giá trị trung bình của các liều 1 ml/kg đã tiêm trước đó.