

13.4 PHÉP THỬ CHẤT GÂY SỐT

Phép thử được xác định bằng cách đo sự tăng thân nhiệt thỏ sau khi tiêm tĩnh mạch dung dịch vô khuẩn của chất cần kiểm tra.

Lựa chọn động vật thí nghiệm

Dùng thỏ trưởng thành, khỏe mạnh, cả 2 giống, cân nặng không dưới 1,5 kg, nuôi dưỡng bằng thức ăn không có chứa kháng sinh và thỏ không có dấu hiệu giảm cân trong quá trình thử nghiệm. Không dùng để thử nghiệm nếu:

- a) Thỏ mới được dùng thử chất gây sốt có kết quả âm tính trong vòng 3 ngày trước đó, hoặc
- b) Thỏ đã được dùng thử chất gây sốt có kết quả dương tính trong vòng 3 tuần.

Khu vực lưu giữ động vật

Thỏ được nuôi giữ riêng từng con trong khu vực yên tĩnh, có nhiệt độ ổn định. Cho thỏ nhịn ăn từ đêm trước khi thử cho đến khi thử xong, không cho uống nước trong quá trình thử. Tiến hành phép thử trong phòng yên tĩnh, không có tiếng ồn, nhiệt độ phòng chênh lệch không quá 3 °C so với khu vực nuôi giữ, hoặc thỏ phải được lưu giữ ở điều kiện phòng thí nghiệm trong khoảng ít nhất 18 h trước khi thử nghiệm.

Dụng cụ, bơm và kim tiêm

Tất cả các dụng cụ, bơm và kim tiêm phải được rửa sạch và tráng nước cất, sấy ở nhiệt độ 250 °C trong 30 min hoặc 200 °C trong 1 h.

Hộp, giá giữ thỏ

Các hộp, giá giữ thỏ cho trường hợp đo nhiệt độ bằng thiết bị điện được thiết kế để giữ ở cổ con vật nhưng không được chật quá, phần cơ thể còn lại được thoải mái để thỏ có thể ngồi ở tư thế bình thường. Không giữ thỏ bằng các loại kẹp hoặc giá có thể gây đau hoặc khó chịu cho con vật. Thỏ phải được cho vào hộp hoặc giá ít nhất 1 h trước khi thử và giữ ở đó trong suốt quá trình thử nghiệm.

Nhiệt kế

Nhiệt kế hoặc thiết bị điện dùng để ghi nhiệt độ có độ chính xác 0,1 °C và được đưa vào trực tràng của thỏ với độ sâu 5 cm. Độ sâu của nhiệt kế trong trực tràng phải giống nhau giữa các thỏ. Nếu dùng thiết bị điện, đầu đo nhiệt độ phải được đặt trong trực tràng trong suốt quá trình thử.

Thử nghiệm sơ bộ

Chỉ nên tiến hành thử sơ bộ với những thỏ lần đầu tiên được dùng để thử chất gây sốt.

Trong vòng 1 đến 3 ngày trước khi kiểm tra mẫu thử, tiêm tĩnh mạch tại 10 ml/kg thỏ dung dịch natri clorid 0,9 % không có chất gây sốt, đã làm ấm đến khoảng 38,5 °C trước khi tiêm. Ghi nhiệt độ thỏ, bắt đầu ít nhất 90 min trước khi tiêm và tiếp tục trong 3 h sau khi tiêm. Không dùng những thỏ có nhiệt độ thay đổi quá 0,6 °C vào thử nghiệm chính thức.

Thử nghiệm chính thức

Mỗi mẫu được thử trên một nhóm 3 thỏ.

Chuẩn bị và tiêm mẫu thử: Mẫu thử có thể được hòa tan trong một dung môi không có chất gây sốt, dung dịch natri clorid 0,9 % hoặc một chất lỏng được quy định trong chuyên luận riêng. Làm ấm dung dịch thử lên khoảng 38,5 °C trước khi tiêm. Tiêm chậm dung dịch thử vào tĩnh mạch tai thỏ trong khoảng thời gian không quá 4 min, trừ khi có chỉ dẫn gì khác trong chuyên luận riêng. Lượng mẫu thử được tiêm sẽ thay đổi tùy theo chế phẩm cần kiểm tra và được quy định trong chuyên luận riêng. Thể tích tiêm trong khoảng 0,5 ml/kg cân nặng đến 10 ml/kg cân nặng thỏ.

Theo dõi nhiệt độ và xác định đáp ứng:

Ghi nhiệt độ thỏ 30 min một lần, ít nhất 90 min trước khi tiêm và tiếp tục 3 h sau khi tiêm. Theo dõi nhiệt độ trước khi tiêm, không dùng vào thử nghiệm nếu:

Thỏ có chênh lệch nhiệt độ > 0,2 °C giữa 2 lần ghi liên tiếp, hoặc

Thỏ có nhiệt độ ban đầu cao hơn 39,8 °C hoặc thấp hơn 38 °C, hoặc

Nhiệt độ ban đầu của 3 thỏ trong cùng nhóm khác nhau quá 1 °C.

“Nhiệt độ ban đầu” của mỗi thỏ là trung bình của 2 giá trị nhiệt độ ghi được cách nhau 30 min, xác định trong khoảng 40 min ngay trước khi tiêm dung dịch thử. “Nhiệt độ tối đa” của mỗi thỏ là nhiệt độ cao nhất ghi được cho thỏ đó trong vòng 3 h sau khi tiêm. Chênh lệch giữa “nhiệt độ ban đầu” và “nhiệt độ tối đa” được gọi là đáp ứng. Khi chênh lệch là âm, kết quả được coi là đáp ứng bằng 0.

Đánh giá kết quả:

Đầu tiên thử trên một nhóm 3 thỏ, tùy thuộc vào kết quả thu được, thử thêm lần lượt từng nhóm 3 thỏ khác cho đến khi tổng cộng 4 nhóm, nếu cần. Nếu tổng đáp ứng của nhóm đầu tiên không vượt quá số ghi trong cột 2 của Bảng 13.4, thì mẫu thử đạt yêu cầu. Nếu tổng đáp ứng vượt quá số ghi trong cột 2 nhưng không vượt quá số ghi trong cột 3 thì lặp lại phép thử trên nhóm khác như đã nêu ở trên. Nếu tổng các đáp ứng lớn hơn số ghi trong cột 3 thì mẫu thử không đạt yêu cầu.

Bảng 13.4

Số thỏ	Mẫu thử đạt nếu tổng đáp ứng không vượt quá	Mẫu thử không đạt nếu tổng đáp ứng vượt quá
(1)	(2)	(3)
3	1,15 °C	2,65 °C
6	2,80 °C	4,30 °C
9	4,45 °C	5,95 °C
12	6,60 °C	6,60 °C

Những thỏ có nhiệt độ tăng cao quá 1,2 °C thì loại và không bao giờ dùng lại cho phép thử chất gây sốt.

13.5 THỬ ĐỘC TÍNH BẤT THƯỜNG

Độc tính bất thường của thuốc được xác định bằng cách theo dõi số chuột chết trong thời gian 48 h sau khi cho chuột một liều thuốc qua đường dùng theo quy định.

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng khỏe mạnh, cân nặng 18 g đến 22 g, chưa dùng vào thí nghiệm, nếu là chuột cái phải không có thai hoặc đang cho con bú, được chăn nuôi trong điều kiện bình thường.

Chuẩn bị dung dịch thử

Nếu không có hướng dẫn gì khác, chuẩn bị dung dịch thử bằng cách hòa tan mẫu thử trong dung dịch natri clorid 0,9 % hoặc nước cất tiêm (nếu thử theo đường tiêm) hoặc phân tán đều mẫu thử trong nước cất (nếu thử theo đường uống) để thu được dung dịch hoặc hỗn dịch có chứa lượng chất cần thử phù hợp với mức liều quy định trong chuyên luận riêng.

Tiến hành thử

Dùng 5 chuột, cho mỗi con 0,5 ml dung dịch thử bằng một trong những đường dùng sau:

Tiêm tĩnh mạch: Tiêm vào tĩnh mạch đuôi của mỗi chuột với tốc độ hằng định trong 15 s đến 30 s.

Tiêm trong màng bụng: Tiêm qua lớp da bụng vào thẳng hốc bụng chuột.

Tiêm dưới da: Tiêm dưới da vào một chỗ ở lưng hoặc bụng.

Uống: Cho uống bằng một kim cong đầu tù hoặc một dụng cụ khác thích hợp, phải đảm bảo đưa thuốc vào trong thực quản hoặc dạ dày.

Đánh giá kết quả

Nếu không có hướng dẫn gì khác thì quan sát chuột 48 h sau khi dùng thuốc.

Nếu không có chuột nào chết thì mẫu thử đạt yêu cầu.

Nếu có chuột chết, làm lại thử nghiệm với 10 chuột khác, dùng chuột có cân nặng (19 ± 1) g. Sau 48 h, nếu không có chuột nào chết thì mẫu thử đạt yêu cầu.

13.6 THỬ GIỚI HẠN NHIỄM VI SINH VẬT

1. XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ VI SINH VẬT

Giới thiệu

Phép thử sau đây cho phép xác định số lượng khuẩn ưa nhiệt trung bình và nấm có thể phát triển được trong điều kiện hiếu khí.

Phép thử nhằm đánh giá chế phẩm thử có đáp ứng tiêu chuẩn chất lượng đã công bố về chỉ tiêu vi sinh hay không. Khi sử dụng phép thử cho mục đích này, cần tuân thủ theo chỉ dẫn dưới đây về số lượng mẫu đem thử, đánh giá kết quả.

Có thể sử dụng quy trình kiểm tra vi sinh khác, bao gồm các phương pháp tự động nếu chứng minh được tính tương đương của các phương pháp này với phương pháp ghi trong được điển.

Quy định chung

Tiến hành phép thử trong điều kiện đảm bảo tránh được sự tạp nhiễm vi sinh vật bên ngoài vào mẫu thử. Các biện

pháp phòng tránh tạp nhiễm phải không ảnh hưởng đến bất cứ loài vi sinh vật nào có thể phát hiện được trong mẫu thử.

Nếu mẫu thử có chứa chất ức chế vi sinh vật thì cần phải loại bỏ hoặc trung hòa trước khi thử nghiệm. Khi sử dụng chất bất hoạt, cần chứng minh khả năng bất hoạt của chúng và đảm bảo chất bất hoạt đó không chứa độc tố với vi sinh vật. Khi sử dụng chất diệt hoạt trong quá trình chuẩn bị mẫu thử, phải đảm bảo chất diệt hoạt đó không chứa độc tố với vi sinh vật và chất diệt hoạt phải tương thích với chất bất hoạt khác cùng được sử dụng.

Phương pháp xác định tổng số vi sinh vật

Sử dụng phương pháp màng lọc hoặc phương pháp đĩa thạch. Phương pháp MPN (Most Probable Number) nói chung có độ chính xác thấp nhất trong số các phương pháp đếm vi sinh vật, tuy nhiên, với mẫu thử có số lượng vi sinh vật rất thấp thì đây lại là phương pháp phù hợp nhất.

Lựa chọn phương pháp thử dựa trên nhiều yếu tố như bản chất của mẫu thử và giới hạn vi sinh vật cho phép. Phương pháp được lựa chọn phải đảm bảo tiến hành trên lượng mẫu đủ để đánh giá được mẫu thử đáp ứng theo tiêu chuẩn. Cần phải xác định sự phù hợp của phương pháp đã lựa chọn.

Kiểm tra chất lượng môi trường, sự phù hợp của phương pháp đếm, mẫu chứng âm

Yêu cầu chung

Phải chứng minh phương pháp thử có khả năng phát hiện vi sinh vật khi có mặt mẫu thử.

Phải chứng minh sự phù hợp của phương pháp khi có sự thay đổi trong quá trình tiến hành thử nghiệm hoặc có sự thay đổi về chế phẩm làm ảnh hưởng đến kết quả của phép thử.

Chuẩn bị chủng vi sinh vật

Có thể sử dụng hỗn dịch chủng vi sinh vật ổn định đã được tiêu chuẩn hóa hoặc chuẩn bị như trình bày dưới đây. Kỹ thuật lưu giữ chủng gốc phải đảm bảo vi sinh vật được cấy truyền không quá 5 lần từ giống gốc ban đầu. Các chủng vi sinh vật và nấm riêng rẽ theo Bảng 13.6.1.

Sử dụng dung dịch đệm natri clorid-pepton pH 7,0 hoặc dung dịch đệm phosphat pH 7,2 để pha hỗn dịch chủng vi sinh vật. Để pha hỗn dịch *A. brasiliensis*, thêm *polysorbat 80 (TT)* với tỷ lệ 0,05 % vào dung dịch đệm. Hỗn dịch được sử dụng trong vòng 2 h, nếu bảo quản ở 2 °C đến 8 °C thì có thể sử dụng trong vòng 24 h. Ngoài ra, đối với *A. brasiliensis* và *B. subtilis*, thay vì chuẩn bị và pha loãng hỗn dịch chủng dạng sinh dưỡng thì có thể sử dụng hỗn dịch bào tử ổn định. Hỗn dịch bào tử được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C trong khoảng thời gian đã được thẩm định.

Mẫu chứng âm

Để đánh giá điều kiện thử nghiệm, tiến hành mẫu chứng âm bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng thay cho mẫu thử.