

13.8 XÁC ĐỊNH HIỆU QUẢ KHÁNG KHUẨN CỦA CHẤT BẢO QUẢN

Chất bảo quản là những chất được thêm vào các chế phẩm phân liều không vô trùng, nhất là các loại thuốc nước, để ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật có sẵn trong chế phẩm hay nhiễm vào chế phẩm trong quá trình sản xuất. Chất bảo quản cũng được thêm vào các chế phẩm vô trùng đa liều để ức chế sự phát triển của vi sinh vật nhiễm vào chế phẩm sau khi mở ra sử dụng.

Không được dùng chất bảo quản như một biện pháp thay thế cho thực hành tốt sản xuất thuốc, không được dùng chất bảo quản với mục đích duy nhất là làm giảm số lượng vi sinh vật trong chế phẩm không vô trùng hoặc để làm tăng hiệu quả của quá trình tiệt trùng đối với chế phẩm vô trùng đa liều.

Đa số các chất bảo quản là những hợp chất độc. Do đó, để bảo đảm an toàn, nồng độ chất bảo quản trong sản phẩm cuối phải thấp hơn mức có thể gây nguy hiểm cho người sử dụng. Nồng độ chất bảo quản cần dùng có thể giảm đến mức tối thiểu nếu một hay nhiều hoạt chất trong công thức pha chế có khả năng kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm.

Chất bảo quản và nồng độ sử dụng của nó phải ghi rõ trên bao bì của sản phẩm.

Hiệu quả bảo vệ sản phẩm của chất bảo quản phải được xác định ngay từ giai đoạn nghiên cứu và phát triển sản phẩm. Phương pháp xác định hiệu quả kháng khuẩn của chất bảo quản được trình bày dưới đây.

Nguyên tắc của phương pháp là cấy một hỗn dịch vi sinh vật chỉ thị thích hợp vào chế phẩm cần thử, tốt nhất là cấy trực tiếp vào bao bì đóng gói cuối cùng của sản phẩm, nếu có thể. Ủ chế phẩm đã cấy vi sinh vật ở nhiệt độ thích hợp, sau đó lấy mẫu và đếm số lượng vi sinh vật sống còn lại trong sản phẩm sau mỗi khoảng thời gian ủ nhất định. Việc sử dụng chất bảo quản được xem là có hiệu quả nếu số lượng vi sinh vật giảm đáng kể hoặc không tăng theo thời gian.

Tiêu chuẩn để đánh giá hiệu quả kháng khuẩn của chất bảo quản tùy theo loại chế phẩm và đường dùng thuốc (xem Bảng 13.8.1).

Phân loại chế phẩm

Đối tượng của thử nghiệm xác định hiệu quả kháng khuẩn của chất bảo quản là các loại chế phẩm có thành phần chính là nước hay có sử dụng nước làm tá dược. Các chế phẩm này được chia thành 4 nhóm như Bảng 13.8.1.

Bảng 13.8.1

Loại chế phẩm	Mô tả
1	Thuốc tiêm và thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm nhũ dịch, thuốc nhỏ tai, thuốc nhỏ mắt và thuốc nhỏ mũi vô trùng.
2	Thuốc nhỏ mũi không vô trùng, các chế phẩm dùng cho màng nhày, các chế phẩm dùng ngoài da, bao gồm cả các nhũ dịch.
3	Các loại thuốc uống (trừ thuốc kháng acid).
4	Thuốc uống kháng acid.

Vi sinh vật chỉ thị

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 (IP 1431.83, IMI 149 007).

Candida albicans ATCC 10231 (IP 48.72, NCPF 3179).

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (CIP 82.118, NCIMB 8626).

Staphylococcus aureus ATCC 6538 (CIP 4.83, NCTC 10788).

Môi trường nuôi cấy

Tất cả các môi trường sử dụng trong phụ lục này phải được kiểm tra khả năng dinh dưỡng, dùng các vi sinh vật chỉ thị nêu trên để thử trước khi dùng.

Chuẩn bị hỗn dịch vi sinh vật chỉ thị

Cấy riêng rẽ chủng vi sinh vật chỉ thị lên bề mặt môi trường rắn thích hợp, có thể sử dụng môi trường giới thiệu ở Bảng 13.6.1 (xem Phụ lục 13.6) hoặc môi trường khác có sẵn trên thị trường có cùng công dụng và có khả năng dinh dưỡng tương đương, sau đó ủ trong điều kiện như quy định ở Bảng 13.6.1 (xem Phụ lục 13.6) để biết thành phần của các môi trường dinh dưỡng.

Sau khi ủ, nếu cần, có thể tiếp tục cấy chuyển vi sinh vật thu được sang bề mặt môi trường dinh dưỡng mới, cho đến khi thu được vi sinh vật ở trong trạng thái phát triển tốt nhất. Tuy nhiên, số lần cấy chuyển không được quá 5 lần từ chủng gốc ban đầu.

Rửa bề mặt môi trường nuôi cấy các vi khuẩn và *C. albicans* bằng dung dịch natri clorid vô trùng 0,9 %, tập trung dịch rửa vào vật đựng thích hợp và bổ sung dung dịch natri clorid vô trùng 0,9 % để thu được hỗn dịch có khoảng 10⁸ CFU. Để thu hoạch bào tử *A. brasiliensis*, cũng tiến hành như trên nhưng dùng dung dịch natri clorid vô trùng 0,9 % có chứa 0,05 % polysorbat 80, thêm dung dịch natri clorid vô trùng 0,9 % để được hỗn dịch có khoảng 10⁸ CFU/ml.

Ngoài ra, có thể tăng sinh chủng gốc của mỗi vi sinh vật chỉ thị trong môi trường lỏng thích hợp, ví dụ môi trường giới thiệu ở Bảng 13.6.1 (xem Phụ lục 13.6), thu hoạch vi sinh vật chỉ thị bằng cách ly tâm, sau đó rửa và phân tán lại trong dung dịch natri clorid vô trùng 0,9 % để được hỗn dịch có khoảng 10⁸ CFU/ml.

Đếm số lượng tế bào sống của mỗi hỗn dịch thu được bằng phương pháp đĩa thạch (xem Phụ lục 13.6 Thử giới hạn nhiễm khuẩn). Kết quả đếm (CFU/ml) được dùng để xác định lượng vi sinh vật đã cấy vào chế phẩm cần thử tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm.

Bảo quản các hỗn dịch vi sinh vật chỉ thị trong tủ lạnh nếu không dùng ngay trong vòng 2 h. Các hỗn dịch vi khuẩn và *C. albicans* phải dùng trong vòng 24 h sau khi thu hoạch, hỗn dịch *A. brasiliensis* có thể bảo quản trong tủ lạnh trong 7 ngày.

Tiến hành

Cấy riêng rẽ từng hỗn dịch chủng vi sinh vật chỉ thị đã được chuẩn bị như trên trực tiếp vào 4 đơn vị đóng gói cuối cùng của chế phẩm cần thử, lắc kỹ để trộn đều. Thử

tích hỗn dịch vi sinh vật cấy vào các đơn vị đóng gói được tính toán sao cho nồng độ vi sinh vật chỉ thị trong chế phẩm cần thử ngay sau khi cấy khoảng từ 10^5 CFU/ml đến 10^6 CFU/ml đối với chế phẩm loại 1, 2 và 3, khoảng 10^3 CFU/ml đến 10^4 CFU/ml đối với chế phẩm loại 4. Thể tích hỗn dịch đem cấy không được vượt quá 1 % thể tích chế phẩm cần thử, tốt nhất là từ 0,5 % đến 1 %. Nếu không thể cấy vi sinh vật chỉ thị trực tiếp vào đơn vị đóng gói cuối cùng của sản phẩm, chuyển một thể tích đủ lớn của chế phẩm cần thử, ít nhất 20 ml, vào 4 vật chứa vô trùng có thể tích thích hợp, có nắp kín và tiếp tục tiến hành như trên.

Ủ các vật chứa đã cấy vi sinh vật chỉ thị ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C, tránh ánh sáng. Lấy mẫu từ mỗi vật chứa lúc 0 h và sau những khoảng thời gian ủ nhất định như quy định ở Bảng 13.8.3, lượng mẫu cần lấy thường là 1 ml hoặc 1 g. Ghi chép mọi thay đổi về mặt cảm quan của chế phẩm cần thử trong quá trình ủ. Xác định số lượng vi sinh vật tại mỗi thời điểm lấy mẫu bằng phương pháp đĩa thạch, dùng môi trường dinh dưỡng và nhiệt độ ủ như quy định ở Bảng 13.8.2, thời gian ủ từ 3 ngày đến 5 ngày đối các vi khuẩn và *C. albicans*, 3 ngày đến 7 ngày đối với *A. brasiliensis*. Phải bảo đảm loại bỏ hoàn toàn hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc kháng nấm của chế phẩm cần thử bằng phương pháp pha loãng, lọc, hay dùng chất trung hòa. Nếu sử dụng phương pháp pha loãng, điếm cần chú ý là độ chính xác của kết quả đếm sẽ giảm khi số lượng vi sinh vật khá nhỏ (nhỏ hơn 30 CFU/đĩa đối với phương pháp đĩa thạch, dùng đĩa petri có đường kính từ 90 mm đến 100 mm). Nếu sử dụng chất trung hòa, phải có biện pháp kiểm tra thích hợp để bảo đảm nồng độ chất trung hòa đã dùng đủ để loại bỏ hoàn toàn hoạt tính kháng khuẩn của chế phẩm cần thử và để bảo đảm bản thân chất trung hòa không gây bất cứ ảnh hưởng bất lợi nào đến sự phát triển của vi sinh vật chỉ thị. Dùng nồng độ vi sinh vật chỉ thị, tính bằng CFU/ml, tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm (R_0) và nồng độ vi sinh vật sống đếm được tại mỗi thời điểm lấy mẫu "t" (R_t), tính lượng giảm đi của mỗi vi sinh vật chỉ thị tại thời điểm đó (R):

$$\text{Log}_{10}\text{Reduction} = \text{Log}_{10}R_0 - \text{Log}_{10}R_t$$

Nguyên tắc đánh giá hiệu quả kháng vi sinh vật của chất bảo quản

Hiệu quả kháng khuẩn của chất bảo quản hay hệ chất bảo quản được xem là đạt yêu cầu nếu kết quả thử nghiệm thỏa mãn các nguyên tắc đánh giá ở các Bảng 13.8.3 (.A/B/C/D). Số lượng vi sinh vật chỉ thị tại một thời điểm tăng không nhiều hơn 0,5 \log_{10} CFU/ml so với kết quả đếm ở thời điểm gần kề trước đó thì được xem là "không tăng".

Bảng 13.8.3.A - Chế phẩm loại 1

	Log ₁₀ Reduction		
	7 ngày	14 ngày	28 ngày
Vi khuẩn	≥ 1,0	≥ 3,0	Không tăng
Nấm men, nấm mốc	Không tăng	Không tăng	Không tăng

Bảng 13.8.3.B - Chế phẩm loại 2

	Log ₁₀ Reduction		
	7 ngày	14 ngày	28 ngày
Vi khuẩn	-	≥ 2,0	Không tăng
Nấm men, nấm mốc	-	Không tăng	Không tăng

Bảng 13.8.3.C - Chế phẩm loại 3

	Log ₁₀ Reduction		
	7 ngày	14 ngày	28 ngày
Vi khuẩn	-	≥ 1,0	Không tăng
Nấm men, nấm mốc	-	Không tăng	Không tăng

Bảng 13.8.3.D - Chế phẩm loại 4

	Log ₁₀ Reduction		
	7 ngày	14 ngày	28 ngày
Vi khuẩn	-	Không tăng	Không tăng
Nấm men, nấm mốc	-	Không tăng	Không tăng

13.9 XÁC ĐỊNH HOẠT LỰC THUỐC KHÁNG SINH BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH VẬT

Hoạt lực kháng sinh được xác định bằng so sánh khả năng ức chế sự phát triển vi sinh vật nhạy cảm của kháng sinh thử và kháng sinh chuẩn.

Kháng sinh chuẩn được sử dụng trong thử nghiệm phải được xác định hoạt tính một cách chính xác dựa trên chất chuẩn quốc tế.

Phép thử xác định hoạt lực phải được thiết kế sao cho có thể tính toán được tính có giá trị của mô hình toán học được dùng làm cơ sở cho phương trình hoạt lực. Nếu áp dụng mô hình đường thẳng song song, hai đường logarit liều-đáp ứng của chất chuẩn và chế phẩm thử phải song song với nhau và phải tuyến tính trong khoảng liều được dùng trong tính toán. Các điều kiện đó phải được kiểm định bởi các thử nghiệm tính có giá trị của phương pháp (validity test) ở xác suất đã cho, thường là 0,05. Có thể sử dụng các mô hình toán học khác, ví dụ mô hình tỷ số độ dốc nếu chứng minh được tính có giá trị của phương pháp. Trừ trường hợp được chỉ dẫn trong chuyên luận riêng, giới hạn tin cậy (P = 0,95) của phép thử xác định hoạt lực phải không được dưới 95 % và không lớn hơn 105 % so với hoạt lực ước đoán.

Tiến hành định lượng theo phương pháp A hoặc B.

Phương pháp khuếch tán (A)

Làm lỏng môi trường phù hợp với điều kiện thử nghiệm và cấy một lượng chủng vi sinh vật nhạy cảm với kháng sinh thử vào môi trường ở nhiệt độ thích hợp, ví dụ 48 °C đến 50 °C đối với vi sinh vật dạng sinh dưỡng, sao cho có thể