

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

tạo ra được vòng vô khuẩn sắc nét, có đường kính phù hợp tại nồng độ kháng sinh sử dụng. Rót ngay môi trường đã cấy chủng vi sinh vật vào đĩa petri hoặc đĩa vuông với thể tích môi trường phù hợp để thu được lớp môi trường có bề dày đồng nhất từ 2 mm đến 5 mm. Ngoài ra, có thể dùng phương pháp tạo 2 lớp môi trường, trong đó chỉ có lớp môi trường phía trên là được cấy chủng vi sinh vật.

Bảo quản đĩa môi trường trên sao cho vi sinh vật không phát triển hoặc không bị chết trước khi đĩa môi trường được sử dụng và bề mặt của môi trường phải khô khi sử dụng.

Sử dụng dung môi và dung dịch đệm pha loãng theo Bảng 13.9.2 để chuẩn bị các dung dịch kháng sinh chuẩn và dung dịch kháng sinh thử có hoạt lực tương đương. Nhỏ các dung dịch này lên bề mặt của môi trường, ví dụ, vào các ống trụ vô khuẩn được làm bằng sứ, thép không gỉ hay vật liệu phù hợp khác, hoặc nhỏ vào các lỗ đã đục trong môi trường thạch. Phải nhỏ thể tích giống nhau vào các ống trụ hoặc vào các lỗ thạch. Ngoài ra, có thể sử dụng các khoan giấy hấp phụ vô khuẩn có chất lượng phù hợp, đã thấm các dung dịch kháng sinh chuẩn và kháng sinh thử và đặt các khoan giấy đó lên bề mặt của môi trường.

Để đánh giá tính có giá trị của phép thử, sử dụng ít nhất 3 nồng độ kháng sinh chuẩn và 3 nồng độ kháng sinh thử có hoạt lực tương đương nhau. Nên sử dụng các nồng độ kháng sinh theo cấp số nhân. Khi tính tuyến tính của hệ thống được khẳng định trên một số lượng đầy đủ các phép thử 3 nồng độ, thì đối với các phép thử thường ngày, có thể sử dụng phép thử 2 nồng độ. Tuy nhiên, trong trường hợp có tranh chấp, phải áp dụng phép thử 3 nồng độ.

Vị trí các dung dịch trong đĩa petri hoặc đĩa vuông được sắp xếp theo mô hình thông kê phù hợp, trường hợp sử dụng đĩa petri cỡ nhỏ không thể nhỏ quá 6 dung dịch thì phải sắp xếp các dung dịch kháng sinh chuẩn và thử một cách luân phiên để tránh các nồng độ lớn khuếch tán xen phủ nhau.

Ở điều kiện nhiệt độ phù hợp trong 18 h. Thời gian khuếch tán trước khi ủ thường từ 1 h đến 4 h ở nhiệt độ phòng hoặc ở 4 °C để hạn chế tối đa sự ảnh hưởng của việc nhỏ các dung dịch kháng sinh ở các thời điểm khác nhau và cải thiện độ dốc của phương trình hồi qui.

Đo đường kính vòng vô khuẩn với độ chính xác tối thiểu là 0,1 mm hoặc đo diện tích vòng vô khuẩn với độ chính xác tương đương và tính toán hoạt lực bằng phương pháp thống kê thích hợp.

Với mỗi phép thử định lượng, sử dụng đủ số lần lặp lại của mỗi nồng độ để đảm bảo độ chính xác theo quy định. Có thể phải tiến hành lặp lại phép thử nhiều lần, tập hợp kết quả theo phương pháp thống kê để đạt được độ chính xác theo quy định nhằm khẳng định chắc chắn hoạt lực của kháng sinh thử không thấp hơn giới hạn tối thiểu.

Phương pháp đo độ đục (B)

Cấy vào môi trường thích hợp hỗn dịch chủng vi sinh vật nhạy cảm với kháng sinh thử sao cho có thể gây ra sự ức chế đủ lớn tới sự phát triển của vi sinh vật. Cấy vào môi

trường lượng vi sinh vật hợp lý nhằm thu được độ đục phù hợp, có thể đo được sau thời gian ủ là 4 h.

Môi trường sau khi đã cấy chủng phải được sử dụng ngay. Sử dụng dung môi và dung dịch đệm theo Bảng 13.9.3 để pha các dung dịch kháng sinh chuẩn và thử có hoạt lực tương đương.

Để đánh giá tính có giá trị của phép thử, sử dụng ít nhất 3 nồng độ kháng sinh chuẩn và 3 nồng độ kháng sinh thử có hoạt lực tương đương nhau. Nên sử dụng các nồng độ kháng sinh theo cấp số nhân. Để thu được sự tuyến tính theo quy định, cần lựa chọn 3 nồng độ liên tiếp từ một số lượng lớn các nồng độ, trong đó các nồng độ của dung dịch kháng sinh chuẩn và thử tương đương nhau.

Nhỏ một thể tích bằng nhau các dung dịch kháng sinh vào ống nghiệm, thêm môi trường đã cấy chủng với thể tích bằng nhau vào mỗi ống nghiệm (ví dụ 1 ml dung dịch kháng sinh và 9 ml môi trường). Với phép thử định lượng tyrothricin thêm 0,1 ml dung dịch kháng sinh vào 9,9 ml môi trường đã cấy chủng).

Song song chuẩn bị 2 ống nghiệm đối chứng không có kháng sinh, cả 2 ống này đều chứa môi trường đã cấy chủng, thêm ngay vào 1 ống 0,5 ml *formaldehyd* (TT). Các ống nghiệm này được dùng để chuẩn hóa thiết bị quang học dùng để đo sự phát triển của vi sinh vật.

Đặt các ống nghiệm theo phân bố ngẫu nhiên hoặc hình vuông Latin hoặc phân bố khối ngẫu nhiên trong bể điều nhiệt hoặc trong thiết bị phù hợp khác sao cho nhiệt độ của các ống nghiệm nhanh chóng đạt được nhiệt độ ủ theo quy định, duy trì các ống nghiệm ở nhiệt độ ủ trong 3 h đến 4 h, đảm bảo nhiệt độ và thời gian ủ đồng nhất giữa các ống nghiệm.

Sau thời gian ủ, làm ngừng sự phát triển của vi sinh vật bằng cách thêm 0,5 ml *formaldehyd* (TT) vào mỗi ống nghiệm hoặc bằng biện pháp xử lý nhiệt và đo độ đục bằng thiết bị quang học phù hợp cho kết quả có 3 chữ số có ý nghĩa. Ngoài ra, có thể đo độ đục của từng ống nghiệm sau các khoảng thời gian ủ hoàn toàn như nhau.

Tính toán hoạt lực dựa theo phương pháp thống kê phù hợp. Sự tuyến tính giữa liều-đáp ứng (số liệu chuyển đổi hoặc không chuyển đổi) thường chỉ đạt được trên một khoảng rất hẹp. Khoảng này phải được dùng để tính toán hoạt lực và phải gồm ít nhất 3 nồng độ liên tiếp để cho phép có thể kiểm tra lại tính tuyến tính. Khi tính tuyến tính của cả hệ thống được khẳng định trên một số lượng đầy đủ các phép thử 3 nồng độ, thì đối với các phép thử thường ngày, có thể sử dụng phép thử 2 nồng độ, và phải được cơ quan có thẩm quyền chấp thuận. Tuy nhiên, trong trường hợp có tranh chấp, phải áp dụng phép thử 3 nồng độ.

Với mỗi phép thử định lượng, sử dụng đủ số lần lặp lại của mỗi nồng độ để đảm bảo độ chính xác theo quy định. Có thể phải tiến hành lặp lại phép thử, tập hợp kết quả theo phương pháp thống kê để đạt được độ chính xác theo quy định nhằm khẳng định chắc chắn hoạt lực của kháng sinh thử không thấp hơn giới hạn tối thiểu.

Chủng vi sinh vật

Chuyên luận này giới thiệu một số chủng vi sinh vật và điều kiện sử dụng của chúng. Có thể sử dụng chủng vi sinh vật khác miễn là chủng đó nhạy cảm với kháng sinh thử, được sử dụng trong môi trường phù hợp, trong điều kiện nhiệt độ và pH phù hợp. Nồng độ của dung dịch kháng sinh phải được lựa chọn để đảm bảo có sự liên quan tuyến tính giữa logarit nồng độ với đáp ứng trong điều kiện thử nghiệm.

Chế tạo hỗn dịch cấy truyền

Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus. Hỗn dịch bào tử được chuẩn bị như sau: Cấy chủng vi sinh vật lên bề mặt môi trường số 1 đã có sẵn *mangan sulfat (TT)* với nồng độ 0,001 g/L và ủ ở 35 °C đến 37°C trong 7 ngày. Dùng nước cất vô khuẩn để gặt vi khuẩn (chủ yếu dưới dạng bào tử). Làm nóng hỗn dịch bào tử ở 70 °C trong 30 min và pha loãng tới nồng độ thích hợp, thường là 10⁷ đến 10⁸ bào tử trong 1 ml. Hỗn dịch bào tử có thể sử dụng lâu dài nếu bảo quản ở nhiệt độ không quá 4 °C.

Ngoài ra, có thể chế tạo hỗn dịch bằng cách cấy chủng vi sinh vật vào môi trường số 3 và nuôi cấy ở 26 °C trong 4 ngày đến 6 ngày, sau đó, thêm lượng *mangan sulfat (TT)* phù hợp trong điều kiện vô khuẩn vào môi trường để thu được nồng độ 0,001 g/L, ủ thêm 48 h. Sử dụng kính hiển vi để kiểm tra xem bào tử có được hình thành với tỷ lệ đủ lớn trong hỗn dịch (khoảng 80 %) và li tâm. Hòa cản trở lại trong nước cất vô khuẩn để thu được hỗn dịch có nồng độ 10⁷ đến 10⁸ bào tử trong 1 ml, làm nóng hỗn dịch ở 70 °C trong 30 min và bảo quản ở nhiệt độ không quá 4 °C. *Bordetella bronchiseptica.* Nuôi cấy chủng vi sinh vật trong môi trường số 2 ở 35 °C đến 37 °C trong 16 h đến 18 h. Gặt chủng bằng nước cất vô khuẩn và pha loãng đến độ đục thích hợp.

Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Micrococcus luteus, Staphylococcus epidermidis. Chuẩn bị chủng vi sinh vật giống như mô tả đối với chủng *B. bronchiseptica*, nhưng sử dụng môi trường số 1 và điều chỉnh độ đục hỗn dịch sao cho có sự tuyến tính tốt giữa liều-đáp ứng trong thử nghiệm bằng phương pháp đo độ đục, hoặc tạo ra được vòng vô khuẩn sắc nét, có đường kính phù hợp trong thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán.

Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis. Nuôi cấy chủng vi sinh vật trong môi trường số 6 ở 30 °C đến 37 °C trong 24 h. Gặt chủng bằng *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)* vô khuẩn. Pha loãng đến độ đục thích hợp bằng *dung dịch natri clorid 0,9 % (TT)* vô khuẩn.

Dung dịch đệm

Dung dịch đệm số 1 đến 12 có pH từ 5,8 đến 8,0 được pha chế bằng cách: Lấy 50,0 ml *dung dịch kali dihydrophosphat 0,2 M (TT)*, thêm *dung dịch natri hydroxyd 0,2 M (TT)* với lượng thể tích ghi ở Bảng 13.9.1. Thêm nước vừa đủ 200 ml.

Bảng 13.9.1 - Thành phần dung dịch đệm

Số dung dịch đệm	pH (± 0,1)	Dung dịch natri hydroxyd 0,2 M (ml)
1	5,8	3,72
2	6,0	5,70
3	6,2	8,60
4	6,4	12,60
5	6,6	17,80
6	6,8	23,65
7	7,0	29,63
8	7,2	35,00
9	7,4	39,50
10	7,6	42,80
11	7,8	45,20
12	8,0	46,80

Dung dịch đệm số 13 (pH 6,8 ± 0,1): Hòa tan 6,4 g *kali dihydrophosphat (TT)* và 18,9 g *dinatri hydrophosphat (TT)* trong 1000 ml nước.

Dung dịch đệm số 14 (pH 10,5 ± 0,1): Hòa tan 35,0 g *dikali hydrophosphat (TT)* trong 900 ml nước, thêm 20 ml *dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT)*, thêm nước vừa đủ 1000 ml.

Dung dịch đệm số 15 (pH 4,5 ± 0,1): Hòa tan 13,61 g *kali dihydrophosphat (TT)* trong 1000 ml nước.

Dung dịch đệm số 16 (pH 7,8 ± 0,1): Hòa tan 5,59 g *dikali hydrophosphat (TT)* và 0,41 g *kali dihydrophosphat (TT)* trong 1000 ml nước.

Dung dịch đệm số 17 (pH 8,0 ± 0,1): Hòa tan 16,73 g *dikali hydrophosphat (TT)* và 0,523 g *kali dihydrophosphat (TT)* trong 750 ml nước, điều chỉnh pH 8,0 bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 M (TT)* hoặc *dung dịch acid phosphoric 0,1 M (TT)* nếu cần, thêm nước vừa đủ 1000 ml.

Dung dịch đệm số 18 (pH 6,0 ± 0,1): Hòa tan 8,63 g *kali dihydrophosphat (TT)* và 1,37 g *dinatri hydrophosphat khan (TT)* trong 750 ml nước, điều chỉnh pH 6,0 bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 M (TT)* hoặc *dung dịch acid phosphoric 0,1 M (TT)* nếu cần, thêm nước vừa đủ 1000 ml.

Dung dịch đệm số 19 (pH 6,0 ± 0,1): Hòa tan 20,0 g *dikali hydrophosphat (TT)* và 80,0 g *kali dihydrophosphat (TT)* trong 1000 ml nước.

Dung dịch đệm số 20 (pH 5,6 ± 0,1): Hòa tan 0,908 g *kali dihydrophosphat (TT)* trong vừa đủ 100 ml nước (dung dịch A). Hòa tan 1,161 g *dikali hydrophosphat (TT)* trong vừa đủ 100 ml nước (dung dịch B). Trộn 94,4 ml dung dịch A và 5,6 ml dung dịch B. Điều chỉnh pH 5,6 bằng dung dịch A hoặc B, nếu cần.

Môi trường

Có thể dùng các loại môi trường sau hoặc thay thế bằng môi trường khác tương đương.

Môi trường số 1

Pepton	6,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	4,0 g
Cao thịt bò	1,5 g
Cao nấm men	3,0 g
Glucose monohydrat	1,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 2

Casein thủy phân bởi pancreatin	17,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	3,0 g
Natri clorid	5,0 g
Dikali hydrophosphat	2,5 g
Glucose monohydrat	2,5 g
Thạch	15,0 g
Polysorbat 80	10,0 g
Nước	1000 ml

Hòa tan các thành phần (trừ polysorbat 80) trong nước, đun sôi, thêm polysorbat 80 ngay trước khi thêm nước vừa đủ.

Môi trường số 3

Pepton	6,0 g
Cao thịt bò	1,5 g
Cao nấm men	3,0 g
Natri clorid	3,5 g
Glucose monohydrat	1,0 g
Dikali hydrophosphat	3,68 g
Kali dihydrophosphat	1,32 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 4

Cao tim	1,5 g
Cao nấm men	1,5 g
Pepton - casein	5,0 g
Glucose monohydrat	1,0 g
Natri clorid	3,5 g
Dikali hydrophosphat	3,68 g
Kali dihydrophosphat	1,32 g
Kali nitrat	2,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 5

Pepton	5,0 g
Cao thịt	3,0 g
Dinatri hydrophosphat. 12H ₂ O	26,9 g
Thạch	10,0 g
Nước	1000 ml

Sau khi tiệt khuẩn môi trường, thêm Dinatri hydrophosphat (TT) dưới dạng dung dịch vô khuẩn vào môi trường.

Môi trường số 6

Pepton	9,4 g
Cao nấm men	4,7 g
Cao thịt bò	2,4 g
Natri clorid	10,0 g
Glucose monohydrat	10,0 g
Thạch	23,5 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 7

Glycerol	10,0 g
Pepton	10,0 g
Cao thịt	10,0 g
Natri clorid	3,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 8

D-glucose	10,0 g
Tryptone	6,0 g
Cao nấm men	2,0 g
Nước vừa đủ	1000 ml

Môi trường số 9

Pepton	6,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	4,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Glucose monohydrat	1,0 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 10

Pepton	6,0 g
Cao thịt bò	1,5 g
Cao nấm men	3,0 g
Glucose monohydrat	1,0 g
Thạch	15,0 g - 20,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 11

Pepton	5,0 g
Thạch	15,0 g
Cao thịt bò	3,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 12

Pepton	10,0 g
Cao thịt	3,0 g
Natri clorid	30,0 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 13

Pepton	6,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Cao thịt bò	1,5 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml

Môi trường số 14

Pepton	6,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Cao thịt bò	1,5 g
Thạch	15,0 g
Nước	1000 ml

Bảng 13.9.2 - Điều kiện định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu	Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Acetyl spiramycin	Acetyl spiramycin	Hòa tan acetyl spiramycin trong ethanol (TT) với tỷ lệ 5 mg trong 2 ml, sau đó thêm nước cất vừa đủ	Số 16	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 10 (pH 8,1)	35 - 37 °C
Amphotericin B	Amphotericin B	Dimethyl sulfoxid (TT)	Số 14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 IP 1432-83	Số 6 (pH 6,1)	35 - 37 °C
Bacitracin kẽm	Bacitracin kẽm	Dung dịch acid hydrochloric 0,01 M (TT)	Số 7	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 7743 CIP 53.160 ATCC 10240	Số 1 (pH 7,0)	35 - 39 °C
Bleomycin sulfat	Bleomycin sulfat	Nước	Số 13	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	Số 7 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Colistimethat natri	Colistimethat natri	Nước	Số 2	<i>Bordetella bronchiseptica</i> NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 <i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	Số 2 (pH 7,3)	35 - 39 °C
Dihydrostreptomycin sulfat	Dihydrostreptomycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 1.83 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Doxycyclin hydroclorid	Doxycyclin hydroclorid	Dung dịch acid hydrochloric 0,01 M (TT)	Số 15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Số 9 (pH 6,0 - 7,0)	35 - 37 °C

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu	Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Erythromycin estolat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Erythromycin ethyl succinat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Erythromycin stearat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	ATCC 6633 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Framycetin sulfat	Framycetin sulfat	Nước	Số 12	ATCC 6633 <i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Số 5 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Gentamycin sulfat	Gentamycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18 <i>Staphylococcus epidermidis</i> NCIB 8853 CIP 68.21	Số 1 (pH 7,9)	35 - 39 °C
Josamycin	Josamycin	Hòa 30 mg trong 5 ml methanol (TT), thêm nước vừa đủ 100 ml	Số 20	ATCC 12228 <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	Số 1 (pH 6,6)	35 - 37 °C
Josamycin propionat	Josamycin propionat	Hòa 40 mg trong 20 ml methanol (TT), thêm dung dịch đệm số 20 vừa đủ 100 ml	Số 20	ATCC 6633 NCTC 10400 <i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62	Số 1 (pH 6,6)	35 - 37 °C
Kanamycin monosulfat	Kanamycin monosulfat	Nước	Số 12	ATCC 6633 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Kanamycin acid sulfat	Kanamycin acid sulfat	Nước	Số 12	ATCC 6633 <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 1 (pH 7,9)	35 - 39 °C

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu	Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Kitasamycin	Kitasamycin	Methanol (TT)	Số 17	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 11 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Lymecyclin	Lymecyclin		Số 1	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Số 1 (pH 6,6)	37 - 39 °C
Neomycin sulfat	Neomycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	Số 5 (pH 7,9)	30 - 37 °C
			Số 17	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Số 1 (pH 8,0 - 8,1)	35 - 39 °C
			Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 5 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Netilmicin sulfat	Netilmicin sulfat	Nước	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P CIP 53.156	Số 1 (pH 7,9)	32 - 35 °C
Nystatin	Nystatin	Dimethyl formamid (TT)	Số 19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	Số 6 (pH 6,0)	29 - 31 °C
Oxytetracyclin dihydrat	Oxytetracyclin dihydrat	Dung dịch acid hydrochloric 0,01 M (TT)	Số 1	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	Số 1 (pH 6,6)	30 - 37 °C
Polymycin B sulfat	Polymycin B sulfat	Dung dịch đệm số 18	Số 18	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Số 12 (pH 6,5 - 6,6)	32 - 37 °C
Rifamycin natri	Rifamycin natri	Methanol (TT)	Số 7	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	Số 1 (pH 6,6)	35 - 39 °C
Spiramycin	Spiramycin	Methanol (TT)	Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 1 (pH 7,9)	30 - 32 °C

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu	Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Streptomycin sulfat	Streptomycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 1.83 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Teicoplanin	Teicoplanin	Dung dịch đệm số 2	Số 2	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 11 (pH 7,8 - 8,0)	35 - 37 °C
Tetracyclin hydroclorid	Tetracyclin hydroclorid	Dung dịch acid hydrocloric 0,01 M (TT)	Số 15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Số 13 (pH 6,0 - 7,0)	35 - 37 °C
Tobramycin	Tobramycin	Nước	Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Vancomycin	Vancomycin	Nước	Số 15	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 14 (pH 5,9)	30 - 32 °C
Vancomycin hydroclorid	Vancomycin hydroclorid	Nước	Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 52.62 ATCC 6633 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 1 (pH 8,0)	37 - 39 °C
		Nước	Số 15		Số 14 (pH 5,9)	30 - 32 °C

Bảng 13.9.3- Điều kiện định lượng kháng sinh bằng phương pháp đo độ đục

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu	Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật <i>Escherichia coli</i>	Môi trường và pH (±0,1)	Nhiệt độ ủ
Colistimethat natri	Colistimethat natri	Nước	Số 7	NCIB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Dihydrostreptomycin sulfat	Dihydrostreptomycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Erythromycin estolat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	Số 4 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Erythromycin ethyl sucinat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Erythromycin stearat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Framycetin sulfat	Framycetin sulfat	Nước	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Gentamycin sulfat	Gentamycin sulfat	Nước	Số 7	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Gramicidin	Gramicidin	Methanol (TT)	Thêm vào dung dịch đệm số 7 polysorbat 80 (TT) với tỷ lệ 0,1 mg/ml	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 58.55 ATCC 10541	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Josamycin	Josamycin	Hòa 30 mg trong 5 ml methanol (TT), thêm nước vừa đủ 100 ml	Số 20	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Josamycin propionat	Josamycin propionat	Hòa 40 mg trong 20 ml methanol (TT), thêm dung dịch đệm số 20 vừa đủ 100 ml	Số 20	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 ATCC 6538 P NCTC 7447	Số 3 (pH 8,0)	35 - 37 °C
Josamycin propionat	Josamycin propionat	Hòa 40 mg trong 20 ml methanol (TT), thêm dung dịch đệm số 20 vừa đủ 100 ml	Số 20	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 ATCC 6538 P NCTC 7447	Số 3 (pH 8,0)	35 - 37 °C

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu	Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Kanamycin monosulfat Kanamycin acid sulfat	Kanamycin monosulfat	Nước	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Neomycin sulfat	Neomycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Rifamycin natri	Rifamycin natri	Methanol (TT)	Số 7	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Spiramycin	Spiramycin	Methanol (TT)	Số 7	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Streptomycin sulfat	Streptomycin sulfat	Nước	Số 12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Tyrothricin	Gramycidin	Ethanol (TT)	Ethanol (TT)	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	Số 3 (pH 7,0)	37 °C
Vancomycin hydrochlorid	Vancomycin hydrochlorid	Nước	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	37 - 39 °C