

Các phép thử kiểm tra nguyên liệu và chất phụ gia làm đồ đựng

Các phép thử để kiểm tra nguyên liệu và chất phụ gia được quy định theo từng loại cụ thể trong Phụ lục 17.9.

17.3.3 ĐỒ ĐỰNG BẰNG CHẤT DÈO DÙNG CHO CHẾ PHẨM NHỎ MẮT

Đồ đựng bằng chất dẻo cho các chế phẩm nhỏ mắt có thể được chế tạo từ chất dẻo được cấu thành từ một hỗn hợp các chất đồng đẳng có khối lượng phân tử nằm trong một khoảng nhất định. Các chất dẻo như vậy thường có chứa những chất khác như cản từ quá trình polyme hóa, các chất phụ gia làm dẻo, các chất ổn định, chống oxy hóa, làm trơn và tạo màu.

Để lựa chọn đồ đựng bằng chất dẻo phù hợp với chế phẩm nhỏ mắt, những yếu tố như thành phần của chất dẻo, quy trình sản xuất và làm sạch, môi trường tiếp xúc, độ bám dính, độ hấp thụ và độ thấm của các chất bảo quản, điều kiện bảo quản, v.v... cần phải được đánh giá thêm bằng những phép thử đặc hiệu thích hợp.

Đồ đựng bằng chất dẻo cho chế phẩm thuốc nhỏ mắt phải đáp ứng những thử nghiệm sau:

Thử độ kín, khả năng lấy thuốc ra khỏi đồ đựng, độ trong của dịch chiết, cản không bay hơi

Phải đáp ứng những phép thử quy định cho đồ đựng bằng chất dẻo dùng cho chế phẩm không phải thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt (Phụ lục 17.3.1).

Thử kích ứng mắt

Phép thử này để đánh giá đáp ứng khi nhỏ dịch chiết của mẫu thử vào mắt thỏ.

Dung môi chiết: (a) *Thuốc tiêm natri clorid 0,9 %*. (b) Dầu thực vật.

Chuẩn bị mẫu thử và dịch chiết: Tiến hành giống như chuẩn bị mẫu thử và dịch chiết đối với đồ đựng bằng chất dẻo cho phép thử *tiêm toàn thân* (Phụ lục 17.3.4).

Động vật thí nghiệm: Chọn những thỏ trắng khỏe mạnh, không có dấu hiệu mắt bị kích ứng và trước đó chưa dùng để thử kích ứng mắt. Khu vực nuôi thỏ phải không có mùn cưa, vỏ bào hay những vật liệu khác có thể gây kích ứng mắt thỏ. Kiểm tra cả hai mắt thỏ trước khi thử và chỉ dùng những thỏ có mắt không khuyết tật hoặc không bị kích ứng để thí nghiệm.

Thử nghiệm sự thích hợp của mắt thỏ: Dùng một thỏ, nhỏ vào một mắt 100 µl mẫu trắng và nhỏ vào mắt kia 100 µl nước vô khuẩn để tiêm. Mắt thỏ được coi là thích hợp nếu không nhận thấy sự khác nhau đáng kể giữa hai mắt.

Quy trình thử: Dùng 3 thỏ cho mỗi dịch chiết mẫu thử. Nhốt thỏ ở nơi chắc chắn nhưng thoải mái và yên tĩnh. Kéo nhẹ và hạ mí mắt dưới xa con ngươi để làm thành một hốc lõm và nhỏ khoảng 100 µl *nước vô khuẩn để tiêm*, giữ mí mắt khoảng 30 s. Làm tương tự để nhỏ vào mắt kia 100 µl dịch chiết mẫu thử. Quan sát mắt thỏ vào các thời điểm 24 h, 48 h và 72 h sau khi nhỏ.

Phép thử đạt yêu cầu nếu dịch chiết của mẫu thử chứng tỏ không có kích ứng đáng kể so với mẫu trắng và *thử nghiệm sự thích hợp của mắt thỏ* đạt yêu cầu.

Nếu có hiện tượng kích ứng với mắt nhỏ *nước vô khuẩn để tiêm* hoặc *thử nghiệm sự thích hợp của mắt thỏ* không đạt yêu cầu thì làm lại thí nghiệm với 3 thỏ khác. Trong lần thử lại, tất cả các thỏ phải đạt yêu cầu phép thử.

Phép thử sinh học

Đồ đựng bằng chất dẻo dùng cho chế phẩm nhỏ mắt phải đạt *Phép thử phản ứng sinh học* (Phụ lục 17.3.4). Ưu tiên áp dụng thử nghiệm *in vitro* (thử trên tế bào) khi có đủ điều kiện thí nghiệm. Tuy nhiên, nếu kết quả thử *in vitro* không đáp ứng thì sẽ áp dụng thử nghiệm *in vivo* (thử trên động vật) để đưa ra quyết định cuối cùng.

Đồ đựng không đạt *Phép thử phản ứng sinh học* thì không được sử dụng để đựng các chế phẩm nhỏ mắt.

Các phép thử kiểm tra nguyên liệu làm đồ đựng

Các phép thử để kiểm tra nguyên liệu được quy định theo từng loại cụ thể trong Phụ lục 17.9.

17.3.4 PHÉP THỬ PHẢN ỨNG SINH HỌC

1. THỬ NGHIỆM *IN VITRO*

Thử nghiệm *in vitro* (thử trên tế bào) được thiết kế để xác định phản ứng sinh học của tế bào động vật có vú được nuôi cấy trong môi trường sau khi tiếp xúc với các nguyên liệu là chất dẻo và polymer hoặc dịch chiết từ các nguyên liệu mà người bệnh có thể tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp. Lượng mẫu thử đem chiết được lấy theo diện tích bề mặt. Khi diện tích bề mặt không thể xác định được thì dùng 0,1 g mẫu thử với loại có tính đàn hồi (elastomer) hoặc 0,2 g với các loại chất dẻo (plastic) và các loại khác cho mỗi ml dịch chiết. Cần thận trọng khi chuẩn bị mẫu thử để tránh nhiễm vi sinh vật và các yếu tố ngoại sinh.

Có 3 phương pháp được áp dụng:

Phương pháp A: Khuếch tán trên thạch.

Phương pháp B: Tiếp xúc trực tiếp.

Phương pháp C: Thử với dịch chiết.

Việc lựa chọn phương pháp hoặc số lần thử cần thực hiện để đánh giá phản ứng sinh học của một mẫu nguyên liệu hoặc dịch chiết cụ thể nào đó tùy thuộc vào chất liệu, sản phẩm cuối cùng và mục đích sử dụng. Những yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến tính thích hợp của mẫu thử với mục đích sử dụng là thành phần của chất dẻo, quy trình sản xuất và làm sạch, môi trường tiếp xúc, mực in, keo dán, sự hấp thụ, tính thấm của chất bảo quản và điều kiện bảo quản. Để xác định một sản phẩm làm từ nguyên liệu nào đó thích hợp với mục đích sử dụng, cần đánh giá các yếu tố ảnh hưởng này bằng các phép thử đặc hiệu.

Các nguyên liệu không đạt thử nghiệm *in vitro* thì phải tiến hành thử nghiệm *in vivo*.

Mẫu đối chứng dương

Phim polyurethan có chứa kẽm diethyldithiocarbamat hoặc kẽm dibutyldithiocarbamat.

Thiết bị

Thiết bị cần thiết cho thử nghiệm bao gồm:

Nồi hấp: Có khả năng duy trì nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, có bộ phận theo dõi nhiệt độ, áp suất, có van xả; giá xếp mẫu thử phải cao trên mức nước trong nồi. Hệ thống làm lạnh có thể làm lạnh mẫu thử đạt đến $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ngay sau chu trình hấp nhưng không được thấp hơn $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tủ sấy: Có thể duy trì nhiệt độ trong khoảng từ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ với sai số cho phép $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tủ ẩm: Có thể duy trì nhiệt độ khoảng $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, không khí có ẩm và có chứa $5\text{ }\%$ CO_2 .

Đồ đựng dịch chiết: Dùng các ống nghiệm hoặc bình bằng thủy tinh loại 1 có nắp đậy thích hợp. Khi sử dụng, các bình hoặc ống nghiệm được đóng kín bằng một nắp xoay có miếng lót bằng chất dẻo có tính đàn hồi (elastomer) thích hợp. Bề mặt tiếp xúc của miếng lót phải được bảo vệ hoàn toàn bằng một miếng đệm hình đĩa bằng chất rắn, trơn có độ dày khoảng $50\text{ }\mu\text{m}$ đến $75\text{ }\mu\text{m}$. Miếng đệm thích hợp có thể bằng polytetrafluoroethylen (PTFE).

Chuẩn bị thiết bị, dụng cụ

Rửa sạch các dụng cụ thủy tinh bằng hỗn hợp acid cromic, hoặc acid nitric (TT) nóng nếu cần, sau đó tráng kỹ bằng nước để pha thuốc tiêm. Các đồ đựng dịch chiết, các phương tiện chuyển và đựng mẫu thử phải được tiệt khuẩn và làm khô bằng quy trình thích hợp.

Chú ý: Nếu dùng ethylen oxyd để tiệt khuẩn, cần phải để khoảng thời gian không ít hơn 48 h để loại khí hoàn toàn.

Chuẩn bị nuôi cấy tế bào

Chuẩn bị các dòng tế bào nguyên bào sợi của động vật có vú L-929 trong môi trường thiết yếu tối thiểu (Minimum Essential Medium - MEM) có thêm $10\text{ }\%$ (tt/tt) huyết thanh bằng cách trypsin hóa (thường dùng dòng tế bào ATCC CCL-1, NCTC dòng vô tính 929 hoặc một dòng tế bào khác thay thế cung cấp bởi một đơn vị lưu trữ tế bào tiêu chuẩn đã được thẩm định). Hút bỏ môi trường nuôi cấy tế bào và tráng qua lớp tế bào bằng dung dịch trypsin $0,25\text{ }\%$ (kl/tt) trong dung dịch EDTA $0,53\text{ mM}$. Thêm $2,0 - 3,0\text{ ml}$ dung dịch trypsin trong EDTA vào bình nuôi cấy và quan sát tế bào dưới kính hiển vi soi ngược cho đến khi lớp tế bào phân tán ra (thường trong vòng $5 - 15\text{ min}$). Thêm $6,0 - 8,0\text{ ml}$ môi trường MEM có thêm $10\text{ }\%$ huyết thanh bào thai bò. Hút nhẹ nhàng các tế bào bằng pipet và thêm một phần thích hợp hỗn dịch tế bào vào bình nuôi cấy mới có mật độ khoảng 10^5 tế bào/ml. Ủ bình nuôi cấy ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong tủ ẩm có không khí ẩm và có $5,0\text{ }\%$ CO_2 trong thời gian không ít hơn 24 h cho tới khi thu được 1 lớp bao phủ lớn hơn $80\text{ }\%$. Kiểm tra lớp tế bào dưới kính hiển vi để đảm bảo đồng nhất và không bị nhiễm vi sinh vật.

Chú ý: Để tránh các tế bào kết tụ khi trypsin hóa, không làm rung động các tế bào (va chạm hoặc lắc bình) trong khi chờ đợi các tế bào tách rời nhau ra. Nên cài đặt ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ để các tế bào dễ phân tán.

Độ chính xác của các thử nghiệm phản ứng sinh học in vitro tùy thuộc vào sự đồng nhất của mật độ tế bào nuôi cấy và sự tạp nhiễm vi sinh vật.

Chuẩn bị mẫu thử

Dùng môi chiết: Dùng thuốc tiêm natri clorid $0,9\text{ }\%$ (kl/tt) hoặc môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú, có hoặc không có huyết thanh.

Chú ý: dùng môi trường nuôi cấy có thêm huyết thanh khi chiết ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h .

Mẫu để chiết: chuẩn bị mẫu như chỉ dẫn trong phần thử nghiệm in vivo. Lượng mẫu được lấy như quy định ở trên.

Chuẩn bị dịch chiết: Chiết mẫu như đã mô tả trong thử nghiệm in vivo, dùng thuốc tiêm natri clorid $0,9\text{ }\%$ hoặc môi trường nuôi cấy không có huyết thanh làm dung môi chiết. Nếu chiết ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h ở tủ ẩm thì dùng môi trường nuôi cấy có thêm huyết thanh. Điều kiện chiết phải không làm thay đổi đặc tính vật lý như làm chảy mẫu (không nhầm với trường hợp mẫu thử bị dính vào nhau).

Phương pháp A: khuếch tán trên thạch

Phép thử được dùng cho các loại nút làm bằng chất dẻo có tính đàn hồi (elastomer) có hình dạng khác nhau. Lớp thạch tác động như một lớp đệm để bảo vệ cho các tế bào không bị tổn thương về mặt cơ học nhưng cho phép các chất hóa học chiết ra được từ các mẫu polymer khuếch tán qua. Dịch chiết của các mẫu thử được thấm (tẩm) lên một miếng giấy lọc.

Mẫu thử: Dùng dịch chiết như đã chỉ dẫn ở trên, hoặc dùng phần mẫu thử có bề mặt phẳng, diện tích không nhỏ hơn 100 mm^2 .

Mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm: Tiến hành như với mẫu thử.

Tiến hành: Dùng 7 ml hỗn dịch tế bào đã chuẩn bị như chỉ dẫn trong phần chuẩn bị nuôi cấy tế bào, nuôi cấy tế bào một lớp (monolayer) trong các đĩa có đường kính 60 mm . Sau khi ủ, hút bỏ môi trường nuôi cấy trong các đĩa và thay thế bằng môi trường nuôi cấy có huyết thanh chứa không quá $2,0\text{ }\%$ thạch.

Chú ý: Chất lượng thạch phải đạt mức để tế bào phát triển.

Lớp thạch phải đủ mỏng để cho phép các chất hóa học có trong dịch chiết khuếch tán được.

Đặt bề mặt phẳng của miếng mẫu thử và các mẫu đối chứng hoặc miếng giấy lọc có tẩm dịch chiết tiếp xúc với bề mặt thạch đã đông đặc, mỗi loại 2 miếng. Mỗi đĩa không đặt quá 3 miếng. Ủ tất cả các đĩa nuôi cấy vào tủ ẩm $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h , thích hợp hơn nếu ủ trong tủ ẩm ẩm có chứa $(5 \pm 1)\text{ }\%$ CO_2 . Kiểm tra xung quanh từng miếng mẫu thử, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm đã đặt trong các đĩa nuôi cấy dưới kính hiển vi, dùng thuốc nhuộm thích hợp nếu cần.

Phân tích và đánh giá kết quả: Phản ứng sinh học (thoái hóa, dị dạng tế bào) được mô tả và đánh giá theo các mức từ $0 - 4$ như trong Bảng 17.3.4.1. Đo đáp ứng nuôi cấy tế bào đối với mẫu thử, mẫu đối chứng dương và đối chứng âm. Hệ thống nuôi cấy tế bào là thích hợp nếu đáp ứng quan sát được của mẫu đối chứng âm bằng 0 (không có phản ứng) và đối chứng dương ít nhất phải là 3 (phản ứng

vừa phải). Nếu đáp ứng của mẫu thử không lớn hơn 2 (phản ứng nhẹ), thì mẫu thử đạt yêu cầu phép thử. Làm lại phép thử nếu không khẳng định được sự thích hợp của hệ thống nuôi cấy.

Bảng 17.3.4.1 - Mức độ phản ứng cho phương pháp khuếch tán trên thạch và tiếp xúc trực tiếp

Mức	Phản ứng	Mô tả vùng phản ứng
0	Không	Không phát hiện thấy vùng xung quanh hoặc phía dưới mẫu thử
1	Rất nhẹ	Một số tế bào phía dưới mẫu thử bị thoái hóa, dị dạng
2	Nhẹ	Vùng giới hạn dưới mẫu thử và có thể lan rộng ra phía ngoài mẫu thử nhưng nhỏ hơn 0,45 cm.
3	Vừa phải	Vùng lan rộng ra phía ngoài mẫu thử từ 0,45 cm đến 1,0 cm
4	Nặng	Vùng lan rộng lớn hơn 1,0 cm ra phía ngoài mẫu thử

Phương pháp B: tiếp xúc trực tiếp

Phương pháp này áp dụng cho những mẫu có hình dạng phức tạp. Quy trình cho phép thực hiện đồng thời chiết xuất và thử nghiệm phản ứng của các chất hóa học có thể chiết ra từ mẫu thử với môi trường có thêm huyết thanh. Phương pháp không thích hợp cho những mẫu thử có tỷ trọng rất cao hoặc rất thấp vì có thể gây ra tổn thương cơ học cho các tế bào.

Mẫu thử: Dùng phần mẫu thử có bề mặt phẳng, diện tích không nhỏ hơn 100 mm².

Mẫu đối chứng dương và âm: Tiến hành như với mẫu thử.

Tiến hành: Dùng 2 ml hỗn dịch tế bào đã chuẩn bị như chỉ dẫn trong phần chuẩn bị nuôi cấy tế bào. Nuôi cấy tế bào một lớp trong các đĩa có đường kính 35 mm. Sau khi ủ, hút bỏ môi trường nuôi cấy ở các đĩa và thay thế bằng môi trường nuôi cấy mới pha. Đặt mỗi miếng mẫu thử hoặc các mẫu đối chứng vào một đĩa môi trường, mỗi mẫu thử trên 2 đĩa.

Ủ tất cả các đĩa nuôi cấy vào tủ ấm 37 °C ± 1 °C có không khí ẩm và chứa 5 ± 1 % CO₂ trong 24 h. Kiểm tra xung quanh từng miếng mẫu đã đặt trong các đĩa nuôi cấy dưới kính hiển vi, dùng thuốc nhuộm thích hợp nếu cần.

Phân tích và đánh giá kết quả: Tiến hành như phương pháp A.

Nếu đáp ứng của mẫu thử không lớn hơn 2 (phản ứng nhẹ), thì mẫu thử đạt yêu cầu phép thử. Làm lại phép thử nếu không khẳng định được sự thích hợp của hệ thống nuôi cấy.

Phương pháp C: thử với dịch chiết

Phương pháp này thường áp dụng để đánh giá dịch chiết của các mẫu nguyên liệu polymer. Quy trình thực hiện chiết mẫu thử ở nhiệt độ sinh lý hoặc không sinh lý trong khoảng thời gian thay đổi. Phương pháp thích hợp cho các mẫu có tỷ trọng cao và cách đánh giá đáp ứng liều.

Chuẩn bị mẫu thử: Tiến hành như hướng dẫn chuẩn bị mẫu trong thử nghiệm *in vivo*, dùng *thuốc tiêm natri clorid 0,9 %* hoặc môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú không có huyết thanh làm dung môi chiết. Lượng mẫu được lấy để chiết như quy định ở trên. Có thể dùng môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú có thêm huyết thanh để cho gần giống với điều kiện sinh lý. Chiết bằng cách để 24 h trong tủ ấm chứa (5 ± 1) % CO₂. Duy trì nhiệt độ chính xác ở (37 ± 1) °C, vì nhiệt độ cao có thể làm biến tính các protein huyết thanh.

Mẫu đối chứng dương và âm: Tiến hành như với mẫu thử.

Tiến hành: Dùng 2 ml hỗn dịch tế bào đã chuẩn bị như chỉ dẫn trong phần chuẩn bị nuôi cấy tế bào, nuôi cấy tế bào một lớp trong các đĩa có đường kính 35 mm. Sau khi ủ, hút bỏ môi trường nuôi cấy ở các đĩa và thay thế bằng dịch chiết của các mẫu thử hoặc mẫu đối chứng. Mỗi mẫu thử trên 2 đĩa. Không pha loãng nếu dịch chiết là môi trường nuôi cấy có huyết thanh hoặc không có huyết thanh (nồng độ 100 %), với dịch chiết dùng dung môi là *thuốc tiêm natri clorid 0,9 %* thì pha loãng với môi trường nuôi cấy có huyết thanh và thử ở nồng độ dịch chiết 25 %. Ủ tất cả các đĩa nuôi cấy ở (37 ± 1) °C trong 48 h ở tủ ấm ẩm có không khí chứa (5 ± 1) % CO₂. Kiểm tra từng đĩa nuôi cấy dưới kính hiển vi ở thời điểm 48 h, dùng thuốc nhuộm thích hợp, nếu cần.

Phân tích và đánh giá kết quả: Tiến hành như phương pháp A, nhưng dùng Bảng 17.3.4.2.

Phản ứng sinh học (thoái hóa, dị dạng tế bào) được mô tả và đánh giá theo các mức từ 0 - 4 như trong Bảng 17.3.4.2. Nếu đáp ứng của mẫu thử không lớn hơn 2 (phản ứng nhẹ), thì mẫu thử đạt yêu cầu phép thử. Làm lại nếu không khẳng định được sự thích hợp của hệ thống nuôi cấy. Nếu phép thử dùng để đánh giá đáp ứng liều, lặp lại phép thử với các độ pha loãng thích hợp của dịch chiết mẫu.

Bảng 17.3.4.2 - Mức độ phản ứng cho phương pháp thử với dịch chiết

Mức	Phản ứng	Mô tả vùng phản ứng
0	Không	Các hạt trong bào tương rời rạc, không có sự dung giải (tiêu) tế bào
1	Rất nhẹ	Không quá 20 % các tế bào hình tròn, gần kết lỏng lẻo, không thấy các hạt trong bào tương, có một số tế bào bị dung giải.
2	Nhẹ	Có trên 20 % đến không quá 50 % (≤ 50 %) tế bào hình tròn, không có các hạt trong bào tương, không có dung giải tế bào mở rộng và các vùng trống giữa các tế bào.
3	Vừa phải	Có trên 50 % đến không quá 70 % (≤ 70 %) lớp tế bào có chứa các tế bào hình tròn hoặc bị dung giải.
4	Nặng	Gần như phá hủy hoàn toàn các lớp tế bào

2. THỬ NGHIỆM *IN VIVO*

Những phép thử sau đây được xây dựng để đánh giá đáp ứng sinh học của động vật đối với những vật liệu là chất dẻo hay polymer khác khi tiêm dịch chiết từ mẫu thử hoặc cấy các mẫu thử vào cơ thể động vật.

Lượng mẫu thử đem chiết được lấy theo diện tích bề mặt. Khi diện tích bề mặt không thể xác định được thì dùng 0,1 g mẫu thử với loại chất dẻo có tính đàn hồi (elastomer) hoặc 0,2 g với các loại chất dẻo (plastic) và các loại khác cho mỗi ml dịch chiết. Cần thận trọng khi chuẩn bị mẫu thử để tránh nhiễm vi sinh vật và các yếu tố ngoại sinh. Phép thử *tiêm toàn thân* và *tiêm trong da* áp dụng để thử các loại chất dẻo có tính đàn hồi, đặc biệt là để làm các loại nút và các loại chất dẻo khác.

Phép thử *cấy trong cơ hoặc dưới da* để thử các nguyên liệu chất dẻo dùng để sản xuất các loại đồ đựng hoặc phụ kiện dùng cho các chế phẩm thuốc tiêm, dụng cụ để cấy vào cơ thể hoặc dụng cụ y tế khác.

Mẫu thử là mẫu đồ đựng cần thử hoặc dịch chiết từ mẫu cần thử.

Mẫu trắng dùng gồm cùng loại và cùng lượng dung môi đã dùng để chiết mẫu thử, được xử lý trong cùng điều kiện và quy trình như mẫu thử.

Mẫu đối chứng âm là mẫu không cho phản ứng trong cùng điều kiện thử nghiệm.

Phân loại chất dẻo

Chất dẻo được phân làm 6 loại (Bảng 17.3.4.3). Sự phân loại dựa trên đáp ứng đối với các phép thử *in vivo* của đồ đựng hoặc dịch chiết từ đồ đựng và theo đường dùng.

Chất dẻo được phân thành 6 loại từ I – VI dựa trên cơ sở các tiêu chí đáp ứng ghi trong Bảng 17.3.4.3. Bảng phân loại này không áp dụng cho các chất dẻo dùng chế tạo đồ đựng thuốc uống hoặc dùng ngoài, hoặc loại có thể được dùng như một phần của công thức thuốc. Bảng này cũng không áp dụng cho các loại cao su tự nhiên là loại thường chỉ thử với dịch chiết bằng thuốc tiêm natri clorid và dầu thực vật.

Những phép thử quy định thường có liên quan trực tiếp tới mục đích sử dụng của đồ đựng. Dung môi chiết lựa chọn là đại diện các chất lỏng trong chế phẩm mà đồ đựng có thể tiếp xúc. Theo bảng phân loại này, nhà sản xuất đồ đựng, nhà sản xuất chất dẻo và người sử dụng dễ dàng trao đổi, thống nhất với nhau các phép thử cần thực hiện đối với đồ đựng thuốc tiêm hoặc các dụng cụ y tế.

Trừ phép thử *cấy ghép*, quy trình chế dịch chiết (chuẩn bị mẫu thử) phụ thuộc vào sự chịu nhiệt của mẫu thử, có 3 mức nhiệt độ tiêu chuẩn là 50 °C, 70 °C và 121 °C. Do vậy, khi phân loại chất dẻo phải ghi chú thêm nhiệt độ để chiết (ví dụ IV-121° là chất dẻo loại 4, chiết ở 121 °C; hoặc I-50° là chất dẻo loại 1 chiết ở 50 °C).

Phép thử *tiêm toàn thân* và *tiêm trong da* được xây dựng để đánh giá đáp ứng sinh học toàn thân và tại chỗ của động vật thí nghiệm với chất dẻo bằng cách tiêm liều đơn dịch chiết của mẫu cần kiểm tra.

Phép thử *cấy trong cơ hoặc dưới da* được xây dựng để đánh giá phản ứng của mô sống với chất dẻo bằng cách cấy mẫu cần thử vào mô hoặc dưới da của động vật. Chuẩn bị các mẫu cấy trong điều kiện vô khuẩn là rất quan trọng khi thực hiện phép thử này.

Phép thử áp dụng cho các loại chất dẻo và các polymer khác đúng với trạng thái và điều kiện sử dụng.

Nếu các đồ đựng phải rửa hoặc tiệt khuẩn trước khi dùng thì phép thử cũng phải tiến hành trên mẫu đồ đựng đã được xử lý với cùng quy trình rửa và tiệt khuẩn.

Các yếu tố như thành phần của mẫu thử, quy trình xử lý và làm sạch, môi trường tiếp xúc, mực in, các chất dính, sự hấp phụ và hấp thụ, khả năng thấm của chất bảo quản, điều kiện bảo quản có thể ảnh hưởng tới sự tương thích của đồ đựng với mục đích sử dụng. Các yếu tố này phải được đánh giá bằng các phép thử khác để đảm bảo đồ đựng phù hợp với mục đích sử dụng.

Chuẩn bị dịch chiết

Nồi hấp:

Dùng một nồi hấp có khả năng duy trì nhiệt độ ở 121 °C ± 2 °C, có đồng hồ theo dõi nhiệt độ, áp suất, van xả; Có giá đủ để xếp các mẫu đồ đựng ở trên mức nước trong nồi và có hệ thống nước làm lạnh để làm nguội bình đựng mẫu thử đến khoảng 20 °C (nhưng không thấp hơn) ngay sau khi hấp.

Tủ sấy:

Dùng tủ sấy tốt hơn nếu dùng loại tuần hoàn cưỡng bức, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 50 °C ± 2 °C hoặc 70 °C ± 2 °C.

Đồ đựng chiết:

Dùng các loại đồ đựng như ống nghiệm hoặc ống đựng môi trường nuôi cấy là thủy tinh trung tính (thủy tinh loại I) có nắp xoáy. Nếu dùng các ống đựng môi trường có nắp xoáy phải có miếng lót đàn hồi thích hợp. Bề mặt tiếp xúc của miếng lót phải được bảo vệ hoàn toàn bằng một miếng đệm hình tròn bằng chất liệu rắn, trơn có độ dày 0,05 - 0,075 mm, thường dùng loại nhựa polytetrafluoroethylen (PTFE).

Chuẩn bị dụng cụ: Tất cả dụng cụ thủy tinh cần làm sạch bằng hỗn hợp acid cromic hoặc acid nitric (TT) nóng, súc rửa kỹ với nước, tráng lại bằng nước cất. Rửa các dụng cụ để cất bằng cách thích hợp (ví dụ rửa lần lượt bằng acetone (TT) và dicloromethan (TT) trước khi dùng để cất mẫu. Tất cả các dụng cụ khác phải được rửa với chất tẩy rửa thích hợp rồi tráng kỹ bằng nước và nước cất. Làm khô và tiệt khuẩn các dụng cụ bằng phương pháp thích hợp.

Chú ý: Nếu dùng ethylen oxyd để tiệt khuẩn, cần phải để khoảng thời gian đủ để loại khí hoàn toàn.

Bảng 17.3.4.3 - Phân loại chất dẻo

Phân loại chất dẻo ⁽¹⁾						Các phép thử cần thực hiện			
I	II	III	IV	V	VI	Nguyên liệu thử	Động vật thí nghiệm	Liều	Quy trình ⁽²⁾
x	x	x	x	x	x	Dịch chiết mẫu trong thuốc tiêm natri clorid 0,9 %	Chuột nhắt	50 ml/kg	(A)-IV
x	x	x	x	x	x	Dịch chiết mẫu trong thuốc tiêm natri clorid 0,9 %	Thỏ hoặc chuột lang	0,2 ml cho mỗi vị trí, 10 hoặc 6 vị trí/con	(B)-IC
	x	x	x	x	x	Dịch chiết mẫu trong dung dịch ethanol 1/20 trong thuốc tiêm natri clorid 0,9 %	Chuột nhắt	50 ml/kg	(A)-IP
	x	x	x	x	x	Dịch chiết mẫu trong dung dịch ethanol 1/20 trong thuốc tiêm natri clorid 0,9 %	Thỏ hoặc chuột lang	0,2 ml cho mỗi vị trí, 10 hoặc 6 vị trí/con	(B)-IC
		x		x	x	Dịch chiết mẫu trong polyethylen glycol 400	Chuột nhắt	10 g/kg	(A)-IP
				x	x	Dịch chiết mẫu trong polyethylen glycol 400	Thỏ hoặc chuột lang	0,2 ml cho mỗi vị trí, 10 hoặc 6 vị trí/con	(B)-IC
	x	x	x	x	x	Dịch chiết mẫu trong dầu thực vật	Chuột nhắt	50 ml/kg	(A)-IP
				x	x	Dịch chiết mẫu trong dầu thực vật	Thỏ hoặc chuột lang	0,2 ml cho mỗi vị trí, 10 hoặc 6 vị trí/con	(B)-IC
			x		x	Các miếng mẫu thử để cấy	Thỏ	4 miếng/thỏ (2 thỏ)	C
			x		x	Mẫu thử để cấy	Chuột cống	2 mẫu/chuột (5 chuột)	C

Ghi chú:

(1) Phép thử yêu cầu cho mỗi loại được chỉ ra trên cột thích hợp

(2) Chú thích: (A)-IV: Tiêm toàn thân (tiêm tĩnh mạch); (A)-IP: Tiêm toàn thân (tiêm trong màng bụng); (B)-IC: Tiêm trong da; C: Cấy ghép vào cơ thể sống (trong cơ hoặc dưới da)

Dung môi chiết: Lựa chọn dung môi chiết dưới đây, ưu tiên chọn loại dung môi có hoặc gần giống loại có trong chế phẩm sẽ tiếp xúc trực tiếp với đồ đựng chất dẻo cần thử nghiệm.

(a) Thuốc tiêm natri clorid 0,9 % (vô khuẩn và không có chất gây sốt).

(b) Dung dịch ethanol 5 % (tt/tt) trong thuốc tiêm natri clorid 0,9 %.

(c) Polyethylen glycol 400 (TT).

(d) Dầu thực vật: Dùng dầu vừng, dầu hạt bông hoặc một loại dầu thích hợp mới tinh chế và phải đạt thêm yêu cầu sau: Dùng 3 thỏ thí nghiệm theo quy định của phép thử tiêm trong da. Tiêm trong da 0,2 ml vào mỗi vị trí, tiêm 10 vị trí trên mỗi thỏ. Quan sát các vị trí tiêm 24 h, 48 h và 72 h sau khi tiêm. Đánh giá mức độ phản ứng quan sát được ở mỗi thời điểm theo Bảng 17.3.4.4. Trên 3 thỏ hoặc chuột lang (30 hoặc 18 vị trí tiêm), ở bất kỳ thời điểm quan sát nào, đáp ứng ban đỏ không được lớn hơn 0,5 và phù nề không được lớn hơn 1,0 và không được có vị trí nào có phản ứng trên mô có đường kính lớn hơn 10 mm. Không nhầm lẫn vết phù nề với vết dầu còn đọng lại ở chỗ tiêm. Phân biệt bằng cách ấn nhẹ ngón tay lên vết, nếu là phù nề thì vết sẽ hơi lõm xuống và bị nhạt màu đi.

(e) Dung môi để pha thuốc (nếu sử dụng)

(f) Nước để pha thuốc tiêm.

Bảng 17.3.4.4 - Đánh giá phản ứng trên da

Ban đỏ và tạo thành vảy	Mức độ	Tạo thành phù nề *	Mức độ
Không có ban đỏ	0	Không có phù nề	0
Ban đỏ rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1	Phù nề rất nhẹ (vừa đủ nhận thấy)	1
Ban đỏ nhận thấy rõ	2	Phù nề nhẹ (viên phù nề nổi rõ)	2
Ban đỏ vừa đến nặng	3	Phù nề vừa (phù nề cao khoảng 1 mm)	3
Ban đỏ đậm (đỏ thẫm) tới tạo thành vảy nhẹ (tổn thương sâu)	4	Phù nề nặng (phù nề cao trên 1 mm và lan rộng hơn vùng tiếp xúc)	4

* Không kể những vết nề (cơ học) do mẫu trắng hoặc dịch chiết mà không phải viêm.

Chuẩn bị mẫu thử:

Phép thử tiêm toàn thân và tiêm trong da được thực hiện với cùng mẫu dịch chiết, nếu cần thiết có thể chuẩn bị dịch chiết riêng cho mỗi thử nghiệm. Lấy mẫu thử và cắt thành những mảnh nhỏ theo kích thước hướng dẫn trong Bảng 17.3.4.5. Loại bỏ những vật lạ như xơ vãi và những mảnh vụn quá nhỏ bằng cách cho mẫu đã cắt vào ống đựng thủy tinh loại I, dung tích 100 ml, có nút mài, thêm 70 ml nước để pha thuốc tiêm. Lắc trong khoảng 30 s, gạn bỏ hết nước,

làm lại một lần nữa. Với phần mẫu dùng chiết bằng dung môi là dầu thực vật, cần sấy khô mẫu thử ở nhiệt độ không quá 50 °C. Xử lý tương tự với mẫu đối chứng âm.

Ghi chú: Không lau mẫu bằng khăn khô/ấm hoặc rửa bằng dung môi hữu cơ hoặc chất điện hoạt.

Bảng 17.3.4.5 - Diện tích bề mặt của các mẫu cần lấy để thử

Dạng chất dẻo	Bề dày	Lượng mẫu cho mỗi 20 ml dung môi chiết	Chia nhỏ thành
Màng mỏng hay phiến	< 0,5 mm	Tương đương 120 cm ² diện tích bề mặt (cả hai mặt)	Những miếng kích thước khoảng 5 cm × 0,3 cm
	Từ 0,5 mm đến 1 mm	Tương đương 60 cm ² diện tích bề mặt (cả hai mặt)	
Ống	< 0,5 mm (thành ống)	Chiều dài (cm) = $120 \text{ (cm}^2\text{)} / [\text{đường kính trong} + \text{đường kính ngoài của ống}] \text{ (cm)}$	Những phần kích thước khoảng 5 cm × 0,3 cm
	Từ 0,5 mm đến 1 mm (thành ống)	Chiều dài (cm) = $60 \text{ (cm}^2\text{)} / [\text{đường kính trong} + \text{đường kính ngoài của ống}] \text{ (cm)}$	
Phiến mỏng, ống hoặc đã tạo khuôn	> 1 mm	Tương đương với 60 cm ² tổng diện tích bề mặt (toàn bộ bề mặt tiếp xúc)	Những miếng kích thước khoảng 5 cm × 0,3 cm
Chất dẻo đàn hồi	> 1 mm	Tương đương với tổng diện tích bề mặt 25 cm ² (toàn bộ bề mặt tiếp xúc)	Không phân chia

Chiết mẫu thử: Cho lượng mẫu thử đã xử lý đúng yêu cầu vào dụng cụ chiết, thêm 20 ml dung môi chiết. Chuẩn bị như vậy với từng loại dung môi chiết theo yêu cầu phép thử. Song song chuẩn bị một mẫu trắng dùng 20 ml mỗi loại dung môi và xử lý trong cùng điều kiện. Chiết bằng cách hấp trong nồi hấp ở 121 °C trong 60 min hoặc trong tủ ẩm ở 70 °C trong 24 h hoặc ở 50 °C trong 72 h, tùy thuộc vào loại chất dẻo đem thử. Thời gian được tính từ khi chất lỏng trong bình chiết đạt đến nhiệt độ quy định.

Khi hết thời gian, làm nguội ngay đến nhiệt độ phòng nhưng không dưới 20 °C, lắc mạnh trong vài phút và gạn ngay mỗi dịch chiết vào một bình khô, vô khuẩn đã chuẩn bị trước. Bảo quản các dịch chiết ở nhiệt độ từ 20 °C đến 30 °C nhưng không dùng để thử nếu để quá 24 h. Chú ý đảm bảo sự tiếp xúc của dung môi với bề mặt của mẫu thử, nhiệt độ và thời gian chiết; các thao tác làm nguội, lắc, gạn phải chuẩn xác và đảm bảo vô khuẩn khi xử lý mẫu cũng như bảo quản dịch chiết.

Ghi chú: Điều kiện chiết không được làm thay đổi trạng thái vật lý của mẫu thử, như làm chảy hoặc làm nóng chảy mẫu thử, dẫn tới làm giảm diện tích bề mặt mẫu thử.

Có thể cho phép các mảnh dính nhẹ vào nhau. Nên cho từng mảnh nhỏ đã rửa sạch vào dung môi chiết. Nếu dùng các ống nuôi cấy để chiết với dầu thực vật trong nồi hấp thì phải dán kín mép quanh nút bằng băng dính tốt để ngăn hơi nước không lọt vào trong dịch chiết.

Phép thử tiêm toàn thân

Phép thử dùng để đánh giá đáp ứng toàn thân của chuột nhất sau khi tiêm dịch chiết mẫu cần thử.

Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng khỏe mạnh, cùng nguồn gốc, cân nặng 18 g đến 22 g, chưa dùng vào thí nghiệm nào trước đó. Chuột được cho ăn và uống nước bình thường.

Tiến hành: Chú ý lắc kỹ dịch chiết trước khi lấy liều tiêm để đảm bảo chất chiết được trộn đều. Không lấy các tiểu phần nhìn thấy được để tiêm tĩnh mạch.

Dùng 5 chuột cho một nhóm, mỗi nhóm thử với một dịch chiết của mẫu thử hoặc mẫu trắng. Liều tiêm và đường tiêm theo hướng dẫn ở Bảng 17.3.4.6. Riêng dịch chiết với dung môi polyethylen glycol và mẫu trắng tương ứng cần pha loãng với 4,1 thể tích thuốc tiêm natri clorid 0,9 % để được dung dịch có nồng độ khoảng 200 mg polyethylen glycol trong 1 ml.

Bảng 17.3.4.6 - Hướng dẫn phép thử tiêm toàn thân

Dịch chiết hay mẫu trắng	Liều/1 kg cân nặng	Đường tiêm
Thuốc tiêm natri clorid 0,9 %	50 ml	Tĩnh mạch
Dung dịch 5 % (tt/tt) ethanol trong thuốc tiêm natri clorid 0,9 %	50 ml	Tĩnh mạch
Polyethylen glycol 400	10 g	Trong màng bụng
Dung môi pha thuốc (nếu sử dụng)	50 ml	Tĩnh mạch
	50 ml	Trong màng bụng
Dầu thực vật	50 ml	Trong màng bụng

Quan sát tất cả các chuột ngay sau khi tiêm, sau 4 h và ít nhất vào các thời điểm 24 h, 48 h và 72 h sau khi tiêm. Nếu trong thời gian theo dõi không có chuột nào của nhóm tiêm mẫu thử có phản ứng sinh học lớn hơn có ý nghĩa so với nhóm tiêm mẫu trắng thì mẫu thử đạt yêu cầu. Nếu có ≥ 2 chuột bị chết hoặc có ≥ 2 chuột có biểu hiện bất thường như co giật, suy kiệt (nằm bẹp) hoặc có ≥ 3 chuột bị giảm cân (> 2 g) thì mẫu thử không đạt yêu cầu.

Nếu chuột ở nhóm tiêm mẫu thử chỉ có các phản ứng sinh học nhẹ hoặc chỉ có một chuột bị chết hoặc có dấu hiệu phản ứng sinh học đáng kể thì thử lại trên 10 chuột khác. Với lần thử lại, mẫu thử đạt yêu cầu nếu tất cả 10 chuột đều sống và không có biểu hiện sinh học khác đáng kể so với nhóm chứng trong thời gian theo dõi.

Phép thử tiêm trong da

Thử nghiệm này được xây dựng để đánh giá phản ứng tại chỗ sau khi tiêm dịch chiết mẫu thử vào trong da thỏ hoặc chuột lang.

Động vật thí nghiệm: Dùng thỏ hoặc chuột lang khỏe mạnh, có lông dễ cạo sạch (lông đã cắt ngắn) và da không bị tổn thương hoặc bị kích ứng do cạo xát. Trong thời gian theo dõi, tránh tiếp xúc vào những chỗ tiêm trừ khi cần phân biệt giữa nốt phù nề với vết cặn dầu động.

Những thỏ trước đó đã dùng cho các phép thử không liên quan như thử chất gây sốt hoặc thỏ đã nghỉ một thời gian sau lần thử trước, có thể dùng vào phép thử này nếu da sạch và không bị tổn thương.

Tiến hành: Vào ngày thí nghiệm, cạo sạch lông ở cả hai bên sống lưng của động vật với diện tích đủ cho thử nghiệm. Tránh gây kích ứng và làm tổn thương cơ học cho da. Dùng máy hút để loại hết lông trên da, nếu cần có thể lau nhẹ da bằng *ethanol loãng* (thường dùng ethanol 70 %) và để khô trước khi tiêm. Mỗi loại dịch chiết cần thử trên 2 con vật, trên mỗi con tiêm dịch chiết một bên và một bên còn lại tiêm mẫu trắng theo hướng dẫn trong Bảng 17.3.4.7. Để tránh lãng phí, trên cùng một động vật có thể tiêm vài loại dịch chiết hoặc dịch chiết của vài mẫu khác nếu kết quả không ảnh hưởng lẫn nhau. Lắc kỹ dịch chiết trước khi lấy để tiêm. Đối với mẫu dịch chiết với *polyethylen glycol 400 (TT)* và mẫu trắng tương ứng, cần pha loãng với 7,4 thể tích *thuốc tiêm natri clorid 0,9 %* để có nồng độ polyethylen glycol khoảng 120 mg trong 1 ml.

Bảng 17.3.4.7 - Hướng dẫn phép thử tiêm trong da

Loại mẫu	Số vị trí (cho mỗi con vật)	Liều cho mỗi vị trí (µl)
Mẫu thử	5	200
Mẫu trắng	5	200

Quan sát các chỗ tiêm để phát hiện phản ứng của mô như ban đỏ, phù nề hoặc hoại tử. Có thể lau nhẹ bằng *ethanol loãng* (thường dùng ethanol 70 %) để dễ quan sát và đánh giá kết quả. Quan sát tất cả các thỏ hoặc chuột thí nghiệm tại các thời điểm 24 h, 48 h và 72 h sau khi tiêm. Đánh giá tất cả các vị trí tiêm của mẫu trắng và mẫu thử theo các mức độ trong Bảng 17.3.4.4.

Trong thời gian theo dõi, nếu cần có thể cạo lại lông để dễ quan sát. Tính điểm ban đỏ và phù nề trung bình cho mẫu trắng và mẫu thử ở mỗi lần chấm điểm (24 h, 48 h và 72 h) cho mỗi con thỏ hoặc chuột lang. Sau 72 h, cộng tất cả các điểm ban đỏ và phù nề cho riêng từng mẫu thử và mẫu trắng.

Chia tổng số điểm của từng mẫu cho 12 (2 con × 3 lần ghi điểm × 2 loại điểm) để xác định điểm trung bình với mỗi mẫu thử và mẫu trắng tương ứng. Phép thử đạt yêu cầu nếu hiệu số giữa điểm trung bình của mẫu thử và mẫu trắng tương ứng nhỏ hơn hoặc bằng 1,0. Nếu ở bất kỳ lần ghi điểm nào đó, điểm phản ứng trung bình của mẫu thử nghi ngờ cao hơn mẫu trắng, làm lại thêm trên 3 con vật khác. Phép thử đạt yêu cầu nếu điểm trung bình giữa mẫu thử và mẫu trắng khác nhau nhỏ hơn hoặc bằng 1,0.

Phép thử cấy trong cơ hoặc dưới da

Phép thử này được xây dựng để đánh giá chất dẻo và các nguyên liệu là polymer khác khi cho tiếp xúc trực tiếp với mô sống. Vấn đề quan trọng là phải chuẩn bị đúng cách các mẫu cấy và tiến hành cấy ghép trong điều kiện vô khuẩn. Thông thường, phép thử cấy trong cơ được thực hiện trên thỏ trắng trưởng thành. Mẫu thử được đặt vào trong một cái kim sau đó cấy vào cơ. Mặc dù hầu hết các nguyên liệu đều thích hợp với phương pháp này, nhưng vẫn có một số mẫu nguyên liệu đồ đựng không thích hợp để cấy trong cơ. Những nguyên liệu có đặc tính vật lý không thích hợp để cấy trong cơ, có thể dùng mô hình cấy dưới da trên chuột cống để thay thế.

Cấy trong cơ thỏ

Chuẩn bị 8 miếng cấy của mẫu thử và 4 miếng của mẫu đối chứng âm là polyethylen tỷ trọng cao chuẩn. Mỗi miếng có kích thước không nhỏ hơn 10 × 1 mm. Các cạnh của miếng cấy phải càng nhẵn càng tốt để tránh gây tổn thương cơ học khi cấy. Dùng kim tiêm dưới da (15 - 19 gauge) có đầu nhọn và một ống thông (canula) thích hợp để cấy các miếng mẫu thử có kích thước tối thiểu. Trong điều kiện vô khuẩn, khéo léo lồng mỗi miếng cấy vào trong đầu một kim. Tất cả mẫu thử và các dụng cụ đều phải được xử lý thích hợp để đảm bảo vô khuẩn. Chỉ cấy lên bó cơ hai bên cột sống mà không cấy lên bất kỳ mô cơ nào khác.

Chú ý: Nếu mẫu thử hoặc dụng cụ được tiệt khuẩn bằng phương pháp dùng ethylen oxyd thì phải để một khoảng thời gian đủ cho bay hết khí bảm xung quanh.

Động vật thí nghiệm: Dùng thỏ trắng trưởng thành, cân nặng không dưới 2,5 kg, có cơ cạnh cột sống đủ rộng để cấy mẫu thử. Gây mê thỏ bằng một thuốc mê thích hợp đến mức độ mê đủ sâu để tránh các cơ chuyển động, như co giật cơ. Nên tham khảo hướng dẫn thí nghiệm trên động vật để thực hiện phép thử này.

Tiến hành: Thực hiện phép thử trong một khu vực sạch. Vào ngày thí nghiệm hoặc khoảng 20 h trước khi thử nghiệm, cạo sạch lông ở 2 bên sườn cạnh cột sống. Hút sạch lông bằng máy hút bụi. Nếu cần, lau nhẹ vùng da bằng *ethanol loãng* (thường dùng ethanol 70 %), và để khô trước khi cấy. Cấy 4 miếng mẫu thử vào một bên cơ cạnh cột sống của mỗi thỏ, các điểm cấy cách khoảng từ 2,5 - 5 cm từ cột sống và song song với cột sống, và mỗi điểm cấy cách nhau khoảng 2,5 cm. Tương tự, cấy 2 miếng mẫu đối chứng âm là polyethylen tỷ trọng cao chuẩn vào bên cơ đối diện qua cột sống của thỏ.

Khi cấy, chọc đầu kim đã có lồng miếng cấy vào giữa bó cơ đến một độ sâu thích hợp, chú ý đưa kim nhẹ nhàng phải dứt khoát. Luồn đầu canula qua đốc kim để giữ miếng cấy lại trong cơ và nhẹ nhàng rút kim ra trước, sau đó rút canula. Nếu thấy một vị trí cấy nào bị chảy máu quá nhiều, cấy thêm một miếng khác để thay thế.

Nuôi giữ thỏ ở điều kiện bình thường trong thời gian ít nhất 120 h. Sau đó gây chết thỏ bằng một lượng thuốc mê

quá liều hoặc bằng cách thích hợp. Cắt bộc lộ mô gần các vị trí cây, để một khoảng thời gian cho mô cắt chảy hết máu. Quan sát cẩn thận mô xung quanh vị trí miếng cấy. Có thể dùng một kính lúp phóng đại và ánh sáng trợ giúp để quan sát cho rõ hơn. Quan sát vị trí cây mẫu thử, mẫu đối chứng xem có bị chảy máu, hoại tử, biến màu và nhiễm vi sinh vật không, ghi kết quả.

Nếu có sự tạo thành khoang hình “nang” hay “kén” bao quanh miếng cấy, đo kích thước của nang, bằng cách xác định độ rộng của nang (khoảng cách từ cạnh mặt ngoài của miếng cấy tới đường viền của nang) dùng thước đo chính xác tới 0,1 mm. Chấm điểm theo Bảng 17.3.4.8.

Bảng 17.3.4.8 - Đánh giá đáp ứng tạo nang trong phép thử cấy ghép

Chiều rộng của nang	Điểm
Không tạo nang	0
Đến 0,5 mm	1
0,6 - 1,0 mm	2
1,1 - 2,0 mm	3
Lớn hơn 2,0 mm	4

Tính điểm trung bình cho mẫu thử và mẫu đối chứng. Mẫu thử nghiệm đạt yêu cầu phép thử nếu hiệu số điểm trung bình của mẫu thử và mẫu đối chứng không lớn hơn 1,0 hoặc nếu hiệu số điểm trung bình của mẫu thử và mẫu đối chứng của hơn 1 vị trí trong 4 vị trí cấy ở mỗi con vật không quá 1,0.

Cấy dưới da chuột cống

Chuẩn bị 10 miếng cấy mẫu thử và 10 miếng mẫu đối chứng âm, kích thước tương tự nhau, ví dụ miếng hình tròn có đường kính khoảng 10 - 12 mm, dày khoảng 0,3 - 1,0 mm. Các cạnh của miếng cấy phải càng nhẵn càng tốt để tránh gây tổn thương thêm khi cấy.

Động vật thí nghiệm: Chuột cống trắng khỏe mạnh, vào thời điểm thí nghiệm cân nặng khoảng 225 - 350 g.

Tiến hành: Vào ngày thí nghiệm hoặc khoảng 20 h trước khi tiến hành, cạo sạch lông ở 2 bên sườn cạnh cột sống.

Hút sạch lông bằng máy hút bụi.

Thực hiện phép thử trong một khu vực sạch. Gây mê 5 con chuột bằng một thuốc mê thích hợp đến mức độ mê đủ sâu để có thể thực hành thí nghiệm. Lau sạch vùng da bằng dung dịch povidon iod. Rạch 2 đường (dài khoảng 1 cm) qua da trên lưng ở khoảng giữa đầu và đuôi chuột bằng dụng cụ vô khuẩn. Dùng que phẫu tích (spatule) nhẹ nhàng tách lớp mô liên kết nối giữa da và cơ để tạo thành một hốc (hay túi) ở dưới da (đáy của hốc xấp xỉ khoảng 20 mm tính từ đường cấy). Cho mỗi miếng cấy vô khuẩn đã chuẩn bị vào mỗi hốc và khâu kín. Cấy 2 miếng mẫu thử và 2 miếng mẫu đối chứng vào mỗi chuột.

Nuôi giữ chuột trong điều kiện tiêu chuẩn trong thời gian ít nhất 7 ngày. Sau đó giết chuột bằng cách dùng CO₂ để giảm oxy hít vào hoặc bằng một lượng thuốc mê quá liều

hoặc bằng cách thích hợp. Để một khoảng thời gian đủ cho mô bị cắt không chảy máu. Cắt lớp da trên lưng quanh vị trí cấy. Quan sát cẩn thận vùng mô xung quanh vị trí miếng cấy. Cắt đôi miếng cấy để có thể quan sát mô tiếp xúc trực tiếp với mẫu thử. Có thể dùng kính lúp phóng đại và thêm nguồn sáng để quan sát cho rõ hơn.

Quan sát vùng mô xung quanh vị trí miếng cấy mẫu thử và mẫu đối chứng xem có bị chảy máu, hoại tử, biến màu hoặc nhiễm vi sinh vật không, ghi kết quả. Nếu có sự tạo thành khoang hình “nang” hoặc “kén” bao quanh miếng cấy, đo chiều rộng của nang từ miếng cấy đến mép ngoài của nang chính xác đến 0,1 mm. Chấm điểm theo Bảng 17.3.4.8.

Tính điểm chiều rộng trung bình của mẫu thử và mẫu đối chứng. Mẫu thử nghiệm đạt yêu cầu của phép thử nếu hiệu số điểm trung bình của mẫu thử và mẫu đối chứng không quá 1,0.

Độc tính bất thường

Mẫu thử phải đạt phép thử độc tính bất thường, tiến hành như quy định chung tại Phụ lục 13.5, thử bằng cách tiêm dịch chiết cho chuột nhắt, quan sát chuột trong 48 h.

17.4 DỤNG CỤ TIÊM TRUYỀN ĐÃ TIỆT KHUẨN (BỘ DÂY TRUYỀN DỊCH)

Dụng cụ tiêm truyền (bộ dây truyền dịch) dùng để dẫn các chế phẩm như thuốc tiêm thể tích lớn, máu và các chế phẩm từ máu vào cơ thể qua đường tĩnh mạch hoặc đường khác thích hợp trong điều trị và dinh dưỡng.

Cấu tạo

Bộ dây truyền dịch có phần chính là một ống dẫn hình trụ bằng chất dẻo gắn chặt với các bộ phận khác gồm: Kim chọc nút chai, bầu đếm giọt, màng lọc máu, khóa (bộ phận điều chỉnh lưu lượng chảy), kim tiêm, màng lọc không khí. Bộ dụng cụ này được sản xuất với các kích cỡ khác nhau theo yêu cầu của trị liệu.

Nguyên liệu và thiết kế sản xuất

Nguyên liệu dùng để chế tạo ra bộ dây truyền dịch thường gồm nhựa dẻo như polyvinyl clorid (PVC), ethylenvinyl acetat (EVA) và kim loại không gỉ. Những nguyên liệu này phải là loại dùng cho y tế. Nguyên liệu dùng làm ống dẫn, bầu đếm giọt phải là loại trong suốt. Việc chọn nguyên liệu cho sản phẩm phải không ảnh hưởng tới chất lượng của dịch được dẫn truyền, đặc biệt không tác động đến các thành phần của máu, cũng như đảm bảo an toàn trong khi dùng. Bộ dây truyền dịch được sản xuất theo các quy định thực hành tốt sản xuất dụng cụ y tế và các quy định riêng của từng quốc gia.

Tất cả các phần của bộ dây truyền dịch đều có thể tiếp xúc với máu, chế phẩm máu hay thuốc tiêm truyền nên phải vô khuẩn và không có chất gây sốt. Mỗi bộ được đóng gói trong đồ đựng riêng để duy trì độ vô khuẩn và chỉ dùng một lần, không được tiệt trùng để dùng lại.