

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.

Mổ 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 lồng 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 gân 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 gân 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. Tinh 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 tổ vi khuẩn dùng để phát hiện hoặc định lượng nội độc tổ 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 tổ; 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 tổ.

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 qui 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 qui 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 qui 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 qui 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 qui 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
C	2 λ/nước BET	Nước BET	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0,5 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, thẩm tách hoặc đun nóng. Để đảm bảo phương pháp

xử lý đã chọn chắc chắn loại dược 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 qui 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 $\leq MVD$.

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 tiên dân 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
			2	1 λ	2
C	2 λ/nước BET	Nước BET	4	0,5 λ	2
			8	0,25 λ	2
			1	2 λ	2
D	0/nước BET	-	-	-	2

Trong đó:

Dung dịch A (dung dịch thử): Dung dịch thử có độ pha loãng $\leq MVD$, 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 thỏa 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/ing 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 qui 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 ù.

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 ± 1) °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 ù.

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 ± 1) °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 qui định cho thuốc thử lysat đang dùng (về tỷ lệ thể tích, thời gian ù, 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 qui định của loại thuốc thử lysat sử dụng (về thể tích, tỷ lệ thể tích dung dịch thử và thuốc thử lysat, thời gian ù).

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 quá 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 qui 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 qui 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 qui 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 qui 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 khoẻ 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 g) 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. Lập 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.

13.4 PHÉP THỬ CHẤT GÂY SỐT

Phép thử được xác định bằng cách đo sự tăng thân nhiệt thô 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 qui 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 qui định trong chuyên luận riêng. Thê 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 qui định.

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng khoẻ 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 qui 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 thủng 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 KHUẨN**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.

Phép thử này không áp dụng được đối với chế phẩm thuốc có thành phần chính là vi sinh vật sống.

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

Qui định chung

Tiến hành phép thử trong điều kiện đảm bảo tránh được sự tạt nhiễm vi sinh vật bên ngoài vào mẫu thử. Các biện pháp phòng tránh tạt 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 lọc, 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, chứng âm tính**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 sản 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. Cây 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. niger*, thêm *polysorbate 80 (T7)* 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. niger* và *B. subtilis*, thay vì chuẩn bị và pha loãng hỗn dịch chủng đang sinh dưỡng thì có thể sử dụng hỗn dịch bảo quản ổn định. Hỗn dịch bảo quản được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C trong khoảng thời gian đã được thẩm định.

Chứng âm tính

Để đánh giá điều kiện thử nghiệm, tiến hành mẫu chứng âm tính bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng thay cho mẫu thử. Mẫu chứng âm tính phải không được có vi sinh vật phát triển. Mẫu chứng âm tính cũng có thể được tiến hành cùng lúc với mẫu thử như mô tả trong phần *Cách tiến hành*. Cần phải xem xét hệ thống kỹ lưỡng khi mẫu chứng âm tính không đạt.

Kiểm tra chất lượng môi trường

Tiến hành kiểm tra chất lượng đối với mỗi lô môi trường pha chế sẵn hoặc mỗi lô môi trường được pha chế từ môi trường khô hay từ các thành phần riêng lẻ.

Cấy riêng rẽ vào môi trường thạch casein đậu tương hay môi trường lòng casein đậu tương một lượng nhỏ vi sinh

vật (không quá 100 CFU) theo chỉ dẫn trong Bảng 13.6.1. Cấy riêng rẽ vào môi trường thạch Sabouraud-dextrose một lượng nhỏ vi sinh vật (không quá 100 CFU) theo chỉ dẫn trong Bảng 13.6.1. Ủ môi trường theo điều kiện ghi trong Bảng 13.6.1.

Bảng 13.6.1- Chuẩn bị và sử dụng chủng vi sinh vật

Vi sinh vật	Chuẩn bị chủng vi sinh vật	Kiểm tra chất lượng môi trường		Sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử	
		Đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí	Đếm tổng số nấm	Đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí	Đếm tổng số nấm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 NCIMB 9518 CIP 4.83 NBRC 13276	Môi trường thạch casein đậu tương hoặc môi trường lòng casein đậu tương 30 °C - 35 °C 18 h - 24 h	Môi trường thạch casein đậu tương và môi trường lòng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-	Môi trường thạch casein đậu tương/ MPN môi trường lòng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 NCIMB 8626 CIP 82.118 NBRC 13275	Môi trường thạch casein đậu tương hoặc môi trường lòng casein đậu tương 30 °C - 35 °C 18 h - 24 h	Môi trường thạch casein đậu tương và môi trường lòng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-	Môi trường thạch casein đậu tương/ MPN môi trường lòng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 NCIMB 8054 CIP 52.62 NBRC 3134	Môi trường thạch casein đậu tương hoặc môi trường lòng casein đậu tương 30 °C - 35 °C 18 h - 24 h	Môi trường thạch casein đậu tương và môi trường lòng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-	Môi trường thạch casein đậu tương/ MPN môi trường lòng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 NCPF 3179 IP 48.72 NBRC 1594	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose hoặc môi trường lòng Sabouraud-dextrose 20 °C - 25 °C 2 - 3 ngày	Môi trường thạch casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 5 ngày	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose ≤ 100 CFU 20 °C - 25 °C ≤ 5 ngày	Môi trường thạch casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 5 ngày MPN: không áp dụng	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose ≤ 100 CFU 20 °C - 25 °C ≤ 5 ngày
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 IMI 149007 IP 1431.83 NBRC 9455	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose hoặc môi trường thạch khoai tây dextrose 20 °C - 25 °C 5 - 7 ngày, hoặc đến khi thu được bào tử	Môi trường thạch casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 5 ngày	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose ≤ 100 CFU 20 °C - 25 °C ≤ 5 ngày	Môi trường thạch casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 5 ngày MPN: không áp dụng	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose ≤ 100 CFU 20 °C - 25 °C ≤ 5 ngày

Đối với môi trường thạch, số lượng vi sinh vật phát triển trên lô môi trường mới không được khác quá 2 lần so với số lượng tính được của hỗn dịch chủng đã được tiêu chuẩn hóa. Đối với chủng được pha chế khi dùng, sự phát triển của vi sinh vật trên lô môi trường mới sẽ được so sánh với sự phát triển của vi sinh vật trên lô môi trường đã đạt yêu cầu chất lượng.

Đối với môi trường lỏng, sự phát triển rõ ràng của vi sinh vật trên lô môi trường mới được so sánh với sự phát triển của vi sinh vật trên lô môi trường đã đạt yêu cầu chất lượng.

Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử: Phương pháp chuẩn bị mẫu thử phụ thuộc vào tính chất vật lý của mẫu thử. Nếu không thể áp dụng cách nào trong các cách dưới đây, có thể sử dụng biện pháp khác để xử lý mẫu.

Mẫu thử tan trong nước: Hòa tan hoặc pha loãng (thường pha loãng 10 lần) mẫu thử trong dung dịch đệm natri clorid-pepton pH 7,0, dung dịch đệm phosphat pH 7,2 hoặc môi trường lỏng casein đậu tương. Điều chỉnh đến pH 6 đến 8, nếu cần. Có thể pha loãng tiếp nếu cần bằng cùng dung dịch pha loãng.

Mẫu thử có bản chất không phải chất béo, không tan trong nước: Pha loãng mẫu thử (thường pha loãng 10 lần) trong dung dịch đệm natri clorid-pepton pH 7,0, dung dịch đệm phosphat pH 7,2 hoặc môi trường lỏng casein đậu tương. Có thể thêm chất điện hoạt như *polysorbat 80 (TT)* với tỷ lệ 1 g/L để tăng khả năng thấm nước của mẫu thử. Điều chỉnh đến pH 6 đến 8, nếu cần. Có thể pha loãng tiếp nếu cần bằng cùng dung dịch pha loãng.

Mẫu thử có bản chất là chất béo: Hòa mẫu thử trong *isopropyl myristat (TT)* đã được tiệt khuẩn trước bằng cách lọc qua màng lọc hoặc trộn mẫu thử với lượng nhỏ nhất có thể *polysorbat 80 (TT)* vô khuẩn hoặc một chất điện hoạt khác không có tính ức chế, làm nóng nếu cần ở nhiệt độ không quá 40 °C, trong một số ít trường hợp có thể sử dụng nhiệt độ không quá 45 °C. Trộn cẩn thận và nếu cần có thể duy trì trong bể ổn nhiệt. Thêm vừa đủ lượng dung dịch pha loãng đã được làm ấm sẵn để thu được độ pha loãng 10 lần. Duy trì nhiệt độ trong thời gian ngắn nhất và trộn cẩn thận để thu được nhũ dịch. Có thể tiếp tục pha loãng theo cấp số 10, trong đó dung dịch pha loãng được bổ sung *polysorbat 80 (TT)* hoặc chất điện hoạt không có tính ức chế khác với nồng độ thích hợp.

Dung dịch hoặc chất rắn dưới dạng aerosol: Chuyển mẫu thử lên màng lọc trong điều kiện vô khuẩn hoặc chuyển sang bình chứa vô khuẩn để tiếp tục lấy mẫu. Có thể sử dụng toàn bộ lượng mẫu hoặc một số liều nhất định từ các đơn vị đóng gói đem thử.

Thuốc dán: Loại bỏ lớp bảo vệ bên ngoài và đặt miếng dán (mặt dính ngửa lên trên) vào bình vô khuẩn. Phủ lên bề mặt miếng dán một loại vật liệu xốp vô khuẩn, ví dụ tấm gạc vô khuẩn, để tránh cho các miếng dán dính vào nhau và cho vào miếng dán một lượng dung dịch pha loãng thích hợp có chứa chất bất hoạt như *polysorbat 80 (TT)* và/hoặc lecithin. Lắc kỹ ít nhất 30 min.

Cấy chủng và pha loãng:

Thêm vào mẫu thử đã được xử lý như mô tả ở phần *Chuẩn bị mẫu thử* của mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* và thêm vào ống chứng (không có mẫu thử) một lượng hỗn dịch vi sinh vật có chứa không quá 100 CFU. Thể tích của hỗn dịch vi sinh vật không được vượt quá 1 % thể tích mẫu thử đã được pha loãng.

Để đánh giá độ phục hồi của vi sinh vật khi có mặt mẫu thử, tiến hành pha loãng mẫu thử ít nhất có thể. Nếu không thể pha loãng ít nhất do bản thân mẫu thử có tác dụng ức chế vi sinh vật hoặc mẫu thử khó tan trong nước, cần áp dụng các biện pháp phù hợp hơn. Nếu không thể loại bỏ được tác dụng ức chế vi sinh vật của mẫu thử, nên thêm hỗn dịch vi sinh vật vào mẫu thử sau khi đã trung hòa, pha loãng hoặc lọc mẫu thử.

Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế:

So sánh số lượng vi sinh vật hồi phục sau khi pha loãng như mô tả trong phần *Cấy chủng và pha loãng* và ủ như qui định trong phần *Hồi phục vi sinh vật khi có mặt mẫu thử* với số lượng vi sinh vật hồi phục của ống chứng.

Nếu có sự ức chế vi sinh vật phát triển (số lượng vi sinh vật giảm quá 2 lần), thì phải thay đổi qui trình đếm số lượng vi sinh vật để khẳng định tính có giá trị của thử nghiệm. Sự thay đổi này có thể là: (1) tăng thể tích dung dịch pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy, (2) phối hợp chất trung hòa đặc hiệu hoặc chất trung hòa phổ biến trong dung dịch pha loãng, (3) áp dụng phương pháp màng lọc, (4) phối hợp các biện pháp nêu trên.

Chất trung hòa:

Một số chất được dùng để trung hòa tác dụng của chất ức chế vi sinh vật (Bảng 13.6.2) được thêm vào dung dịch pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy trước khi hấp tiệt khuẩn. Trước khi sử dụng, phải tiến hành một mẫu trắng có chất trung hòa, không có mẫu thử để khẳng định hoạt tính của chất trung hòa và khẳng định chất trung hòa không có độc tính đối với vi sinh vật.

Bảng 13.6.2 - Một số chất trung hòa thông dụng

Chất ức chế	Chất/phương pháp trung hòa
Glutaraldehyd, dẫn chất thủy ngân	Natri hydrosulfit (Natri bisulfit)
Dẫn chất phenol, alcohol, các aldehyd, sorbat	Pha loãng
Các aldehyd	Glycin
Dẫn chất amoni bậc 4, parahydroxybenzoat (các paraben), bis-biguanid	Lecithin
Dẫn chất amoni bậc 4, iod, các paraben	Polysorbat
Dẫn chất thủy ngân	Thioglycolat
Dẫn chất thủy ngân, các halogen, các aldehyd	Thiosulfat
EDTA (edetat)	ion Mg ²⁺ hoặc ion Cu ²⁺

Nếu không tìm được phương pháp trung hòa phù hợp, có thể thấy việc không phân lập được vi sinh vật đã cấy vào mẫu thử cho thấy bản chất mẫu thử có tác dụng ức chế. Điều này cho thấy mẫu thử sẽ không có khả năng bị tạp nhiễm các vi sinh vật đã thử. Tuy nhiên, rất có thể mẫu thử chỉ ức chế một số vi sinh vật đã thử mà không ức chế vi sinh vật ngoài danh mục các vi sinh vật đã thử. Khi đó, tiến hành thử nghiệm với độ pha loãng cao nhất tương thích với sự phát triển vi sinh vật và phù hợp với giới hạn nhiễm khuẩn cho phép của mẫu thử.

Hỏi phục vi sinh vật khi có mặt mẫu thử: Đối với mỗi vi sinh vật được liệt kê trong Bảng 13.6.1, tiến hành các thí nghiệm riêng rẽ. Chỉ đếm vi sinh vật được cho vào mẫu thử.

• Phương pháp màng lọc:

Sử dụng màng lọc có kích thước lỗ lọc không quá 0,45 µm. Bản chất màng lọc được lựa chọn sao cho khả năng lưu giữ vi sinh vật không bị ảnh hưởng bởi các thành phần của mẫu thử. Đối với mỗi loại vi sinh vật được ghi trong Bảng 13.6.1, sử dụng một màng lọc riêng.

Chuyển một lượng phù hợp mẫu thử (thường là lượng tương đương với 1 g hoặc 1 ml mẫu thử, hoặc lượng mẫu nhỏ hơn nếu dự đoán chứa nhiều vi sinh vật) đã được xử lý theo phần *Chuẩn bị mẫu thử, Cấy chủng và pha loãng, Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế* lên màng lọc, lọc ngay và rửa màng lọc với thể tích thích hợp của dung dịch pha loãng.

Đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí, chuyển màng lọc lên bề mặt đĩa môi trường thạch casein đậu tương. Đếm tổng số nấm, chuyển màng lọc lên bề mặt đĩa môi trường thạch Sabouraud-dextrose. Ủ các đĩa môi trường theo điều kiện ghi ở Bảng 13.6.1. Sau đó đếm số lượng khuẩn lạc.

• Phương pháp đĩa thạch:

Với mỗi loại môi trường, tiến hành trên ít nhất 2 đĩa Petri và tính kết quả trung bình.

Phương pháp cấy trộn: Sử dụng đĩa Petri đường kính 9 cm, thêm vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử đã được xử lý theo phần *Chuẩn bị mẫu thử, Cấy chủng và pha loãng, Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế* và 15 ml đến 20 ml môi trường thạch casein đậu tương hoặc môi trường thạch Sabouraud-dextrose, cả hai môi trường có nhiệt độ không quá 45 °C. Nếu sử dụng đĩa Petri có đường kính lớn hơn, thể tích môi trường phải tăng lên cho phù hợp. Đối với mỗi loại vi sinh vật được ghi trong Bảng 13.6.1, sử dụng ít nhất 2 đĩa Petri. Ủ các đĩa môi trường theo điều kiện ghi ở Bảng 13.6.1. Tính trung bình số lượng khuẩn lạc đếm được đối với mỗi loại môi trường và từ đó tính ra số lượng vi sinh vật trong dịch cấy ban đầu.

Phương pháp cấy trải bề mặt: Sử dụng đĩa Petri đường kính 9 cm, thêm vào mỗi đĩa 15 ml đến 20 ml môi trường thạch casein đậu tương hoặc môi trường thạch Sabouraud-dextrose ở nhiệt độ khoảng 45 °C và để môi trường đông. Nếu sử dụng đĩa Petri có đường kính lớn hơn, thể tích môi trường phải tăng lên cho phù hợp. Làm khô đĩa, ví dụ trong buồng thổi khí sạch (laminar air flow) hoặc tủ ẩm. Đối với mỗi loại vi sinh vật được ghi trong Bảng 13.6.1, sử dụng ít nhất 2 đĩa Petri. Trải lên bề mặt đĩa môi trường

thể tích không dưới 0,1 ml mẫu thử đã được xử lý theo phần *Chuẩn bị mẫu thử, Cấy chủng và pha loãng, Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế*. Ủ và đếm số lượng khuẩn lạc giống mục Phương pháp cấy trộn.

• Phương pháp MPN (Most Probable Number):

Phương pháp MPN có độ chính xác và độ đúng kém hơn so với phương pháp màng lọc hoặc phương pháp đĩa thạch. Kết quả đếm tổng số nấm bằng phương pháp MPN càng cho sai số nhiều hơn. Chính vì vậy, phương pháp MPN chỉ được sử dụng khi không thể áp dụng phương pháp nào khác. Nếu sử dụng phương pháp MPN, cần tuân thủ các bước sau.

Chuẩn bị ít nhất 3 nồng độ pha loãng 10 lần của mẫu thử đã được xử lý như phần *Chuẩn bị mẫu thử, Cấy chủng và pha loãng, Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế*. Đối với mỗi độ pha loãng, cấy 1 g hoặc 1 ml vào 3 ống nghiệm có chứa 9 ml đến 10 ml môi trường lòng casein đậu tương. Nếu cần, có thể thêm chất diện hoạt như *polysorbat 80 (TT)* hoặc các chất bất hoạt phù hợp khác vào môi trường. Như vậy, có tất cả 9 ống nghiệm cho 3 mức nồng độ pha loãng của mẫu thử.

Ủ tất cả các ống nghiệm trên ở 30 °C đến 35 °C trong không quá 3 ngày. Nếu không thể đọc kết quả chính xác do bản chất mẫu thử gây khó khăn cho việc quan sát sự phát triển của vi sinh vật thì cấy chuyển sang môi trường lòng casein đậu tương hoặc môi trường thạch casein đậu tương, ủ tiếp ở nhiệt độ như trên trong 1 ngày đến 2 ngày, sau đó đọc kết quả. Xác định chỉ số MPN trong 1 g hoặc 1 ml mẫu thử theo Bảng 13.6.3.

Kết quả và đánh giá

Khi đánh giá sự phù hợp của phương pháp màng lọc hoặc phương pháp đĩa thạch, giá trị trung bình đếm được của các sinh vật thử phải không được khác quá 2 lần so với kết quả của ống chứng không chứa mẫu thử thu được theo phần *Cấy chủng và pha loãng*. Khi đánh giá sự phù hợp của phương pháp MPN, giá trị MPN phải nằm trong khoảng tin cậy 95 % của kết quả thu được của ống chứng. Nếu các yêu cầu trên không đáp ứng đối với một hoặc nhiều loại vi sinh vật đem thử ở tất cả phương pháp thử thì lựa chọn phương pháp và điều kiện thử nào có đáp ứng gần nhất yêu cầu trên.

Cách tiến hành

Lượng mẫu thử dùng cho thử nghiệm

Trừ khi có chỉ dẫn riêng, lấy 10 g hoặc 10 ml mẫu thử để tiến hành thử nghiệm trong điều kiện đảm bảo như đã đề cập ở trên. Đối với thuốc khí dung chứa dung dịch hoặc chất rắn, tiến hành thử trên 10 đơn vị đóng gói. Đối với thuốc dán, tiến hành thử trên 10 miếng dán.

Lượng mẫu thử nghiệm có thể giảm xuống tùy theo lượng được chất chính được đưa vào chế phẩm trong các trường hợp sau: Khối lượng được chất chính không quá 1 mg trong 1 đơn vị (1 viên nén, 1 nang, 1 ống hoặc lọ thuốc tiêm...) hoặc khối lượng được chất chính trong 1 g hoặc 1 ml mẫu thử (đối với dạng chế phẩm đa liều) nhỏ hơn

1 mg. Trong những trường hợp này, lượng mẫu thử nghiệm phải không được nhỏ hơn lượng mẫu có trong 10 đơn vị đóng gói hoặc 10 g hoặc 10 ml mẫu thử.

Đối với mẫu thử là nguyên liệu nhưng có khối lượng rất hạn chế hoặc cỡ lô quá nhỏ (dưới 1000 ml hoặc 1000 g), lượng mẫu thử nghiệm bằng 1 % cỡ lô, một số trường hợp lượng mẫu thử có thể nhỏ hơn và phải có qui định cụ thể.

Đối với mẫu thử mà tổng số đơn vị trong một lô dưới 200 (ví dụ mẫu thử nghiệm lâm sàng), có thể tiến hành thử nghiệm trên 2 đơn vị, trường hợp cỡ lô nhỏ hơn 100 đơn vị, có thể tiến hành thử nghiệm trên 1 đơn vị.

Lấy mẫu nguyên liệu hoặc mẫu thử một cách ngẫu nhiên. Để thu được đủ lượng mẫu theo yêu cầu, có thể phải trộn đều mẫu thử lấy từ các đơn vị đóng gói khác nhau.

Tiến hành

Phương pháp màng lọc:

Sử dụng dụng cụ lọc được thiết kế phù hợp, cho phép có thể chuyển màng lọc vào môi trường nuôi cấy. Sử dụng phương pháp phù hợp theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường, sự phù hợp của phương pháp đếm, chứng âm tính* để chuẩn bị mẫu thử, và chuyển lượng mẫu thích hợp lên 2 màng lọc và tiến hành lọc ngay. Rửa màng lọc bằng qui trình phù hợp.

Để đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí, chuyển một màng lọc lên bề mặt môi trường thạch casein đậu tương. Để đếm tổng số nấm, chuyển một màng lọc lên bề mặt môi trường thạch Sabouraud-dextrose.

Ủ đĩa chứa môi trường thạch casein đậu tương ở 30 °C đến 35 °C trong 3 ngày đến 5 ngày và ủ đĩa chứa môi trường thạch Sabouraud-dextrose ở 20 °C đến 25 °C trong 5 ngày đến 7 ngày. Tính số CFU (Colony Forming Unit) trong 1 g hoặc 1 ml mẫu thử.

Khi thử nghiệm với thuốc dán, lọc riêng rẽ 10 % thể tích mẫu thử được chuẩn bị theo phần *Chuẩn bị mẫu thử* của mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* trên 2 màng lọc vô khuẩn. Chuyển một màng lọc lên bề mặt môi trường thạch casein đậu tương để đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí và chuyển màng lọc còn lại lên bề mặt môi trường thạch Sabouraud-dextrose để đếm tổng số nấm.

Phương pháp đĩa thạch:

a) Phương pháp cấy trộn:

Sử dụng phương pháp phù hợp theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường, sự phù hợp của phương pháp đếm, chứng âm tính* để chuẩn bị mẫu thử. Tiến hành với ít nhất 2 đĩa Petri cho mỗi loại môi trường ở mỗi nồng độ pha loãng.

Ủ đĩa chứa môi trường thạch casein đậu tương ở 30 °C đến 35 °C trong 3 ngày đến 5 ngày và ủ đĩa chứa môi trường thạch Sabouraud-dextrose ở 20 °C đến 25 °C trong 5 ngày đến 7 ngày. Chọn các đĩa của một nồng độ pha loãng nhất định mà tại nồng độ pha loãng đó, số khuẩn lạc thu được là cao nhất và nhỏ hơn 250 đối với đĩa đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí và nhỏ hơn 50 đối với đĩa đếm tổng số nấm. Từ đó tính giá trị trung bình đối với mỗi loại môi trường và tính số CFU trong 1 g hoặc 1 ml mẫu thử.

Bảng 13.6.3 - Số lượng vi sinh vật lớn nhất có thể có trong chế phẩm

Số ống nghiệm có sự phát triển của vi sinh vật			Số lượng vi sinh vật lớn nhất có thể có trong 1 g hoặc 1 ml	Độ tin cậy 95 %
Số g hoặc ml mẫu thử cho mỗi ống				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	<3	0 - 9,4
0	0	1	3	0,1 - 9,5
0	1	0	3	0,1 - 10
0	1	1	6,1	1,2 - 17
0	2	0	6,2	1,2 - 17
0	3	0	9,4	3,5 - 35
1	0	0	3,6	0,2 - 17
1	0	1	7,2	1,2 - 17
1	0	2	11	4 - 35
1	1	0	7,4	1,3 - 20
1	1	1	11	4 - 35
1	2	0	11	4 - 35
1	2	1	15	5 - 38
1	3	0	16	5 - 38
2	0	0	9,2	1,5 - 35
2	0	1	14	4 - 35
2	0	2	20	5 - 38
2	1	0	15	4 - 38
2	1	1	20	5 - 38
2	1	2	27	9 - 94
2	2	0	21	5 - 40
2	2	1	28	9 - 94
2	2	2	35	9 - 94
2	3	0	29	9 - 94
2	3	1	36	9 - 94
3	0	0	23	5 - 94
3	0	1	38	9 - 104
3	0	2	64	16 - 181
3	1	0	43	9 - 181
3	1	1	75	17 - 199
3	1	2	120	30 - 360
3	1	3	160	30 - 380
3	2	0	93	18 - 360
3	2	1	150	30 - 380
3	2	2	210	30 - 400
3	2	3	290	90 - 990
3	3	0	240	40 - 990
3	3	1	460	90 - 1980
3	3	2	1100	200 - 4000
3	3	3	>1100	

b) Phương pháp cấy trái bề mặt:

Sử dụng phương pháp phù hợp theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường, sự phù hợp của phương pháp đếm, chứng âm tính* để chuẩn bị mẫu thử. Tiến hành với ít nhất 2 đĩa Petri cho mỗi loại môi trường ở mỗi nồng độ pha loãng. Điều kiện ủ và cách tính kết quả giống phương pháp cấy trộn.

Phương pháp MPN:

Sử dụng phương pháp phù hợp theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường, sự phù hợp của phương pháp đếm, chứng âm tính* để chuẩn bị mẫu thử. Ủ tất cả các ống nghiệm ở 30 °C đến 35 °C trong 3 ngày đến 5 ngày. Có thể cấy chuyên nếu cần theo qui trình phù hợp. Tại mỗi nồng độ pha loãng, ghi lại số lượng ống nghiệm có vi sinh vật phát triển. Xác định số lượng vi sinh vật trong 1 g hoặc 1 ml mẫu thử theo Bảng 13.6.3.

Đánh giá kết quả

Tổng số vi sinh vật hiếu khí được coi là số khuẩn lạc đếm được trên môi trường thạch casein đậu tương. Khuẩn lạc nấm phát hiện được trên môi trường này cũng được coi là một phần của tổng số vi sinh vật hiếu khí. Tổng số nấm được coi là số khuẩn lạc đếm được trên môi trường thạch Sabouraud-dextrose. Khi tổng số nấm vượt quá giới hạn chấp nhận của mẫu thử do vi khuẩn mọc trên môi trường này, có thể thêm kháng sinh vào môi trường thạch Sabouraud-dextrose (ví dụ 50 mg cloramphenicol vào 1 L môi trường trước khi hấp diệt khuẩn). Số lượng vi sinh vật đếm được bằng phương pháp MPN được coi là tổng số vi sinh vật hiếu khí. Nếu không thấy có khuẩn lạc mọc trên đĩa có độ pha loãng 1/10 thì kết luận chế phẩm có ít hơn 10 CFU trong 1 g hoặc 1 ml.

Dựa vào giới hạn nhiễm khuẩn cho phép, có thể đánh giá như sau:

10¹ CFU: Số lượng tối đa được chấp nhận = 20;

10² CFU: Số lượng tối đa được chấp nhận = 200;

10³ CFU: Số lượng tối đa được chấp nhận = 2000 và cứ tiếp tục như vậy.

Các dung dịch và môi trường nuôi cấy được liệt kê trong mục *Dung dịch pha loãng và môi trường*.

2. XÁC ĐỊNH VI SINH VẬT GÂY BỆNH**Giới thiệu**

Phép thử sau đây cho phép xác định sự không hiện diện hoặc hiện diện với số lượng hạn chế của một số vi sinh vật gây bệnh trong mẫu thử dưới những điều kiện đã qui định. Phép thử nhằm đánh giá chế phẩm thử có đáp ứng tiêu chuẩn chất lượng đã công bố về chỉ tiêu vi sinh vật hay không. Khi sử dụng phép thử cho mục đích này, cần tuân thủ theo chỉ dẫn phía dưới về số lượng mẫu đem thử, đánh giá kết quả.

Có thể sử dụng qui trình xác định vi sinh vật khác, bao gồm cả các phương pháp tự động, khi chứng minh được tính tương đương của chúng với phương pháp ghi trong được điện.

Qui định chung

Chuẩn bị mẫu thử theo mô tả ở phần *Chuẩn bị mẫu thử*.

Nếu mẫu thử có chứa chất ức chế vi sinh vật, cần loại bỏ hoặc trung hòa chất ức chế như mô tả trong phần *Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế*.

Khi sử dụng chất điện hoạt trong quá trình chuẩn bị mẫu thử, phải đảm bảo chất điện hoạt đó không chứa độc tố với vi sinh vật và chất điện hoạt phải tương thích với chất bất hoạt khác cùng được sử dụng như mô tả trong phần *Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế*.

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

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 thí nghiệm hoặc có sự thay đổi về sản 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.

Chủng vi sinh vật hiếu khí:

Cấy chủng vi sinh vật thử nghiệm riêng rẽ trên môi trường lỏng casein đậu tương hoặc môi trường thạch casein đậu tương và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h. Cấy chủng *Candida albicans* riêng rẽ trên môi trường thạch Sabouraud-dextrose hoặc môi trường lỏng Sabouraud-dextrose và ủ ở 20 °C đến 25 °C trong 2 ngày đến 3 ngày. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 hoặc NBRC 13276

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 hoặc NBRC 13275

Escherichia coli ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126, hoặc NBRC 3972

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 hoặc có thể thay thế bằng *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony NBRC 100797, NCTC 6017, hoặc CIP 80.39

Candida albicans ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 hoặc NBRC 1594.

Sử dụng dung dịch đệm natri clorid-pepton pH 7,0 hoặc dung dịch đệm phosphat pII 7,2 để pha hỗn dịch chủng vi sinh vật. 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.

Clostridia:

Sử dụng chủng *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) hoặc ATCC 19404 (NCTC 532 hoặc CIP 79.3). Cấy chủng Clostridia trên môi trường tăng sinh cho Clostridia và ủ trong điều kiện kỵ khí ở 30 °C đến 35 °C trong 24 h đến 48 h. Ngoài ra, thay vì chuẩn bị chủng *Cl. sporogenes* dạng sinh dưỡng

như ở trên, có thể sử dụng hỗn dịch bảo tử ổn định. Hỗn dịch bảo tử được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C trong khoảng thời gian đã được thẩm định.

Chứng âm tính

Để đánh giá điều kiện thử nghiệm, tiến hành mẫu chứng âm tính bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng thay cho mẫu thử. Mẫu chứng âm tính phải không được có sự phát triển của vi sinh vật. Mẫu chứng âm tính cũng có thể được tiến hành cùng lúc với mẫu thử như mô tả trong mục *Cách tiến hành*. Cần phải xem xét hệ thống kỹ lưỡng khi mẫu chứng âm tính không đạt.

Kiểm tra chất lượng môi trường

Tiến hành kiểm tra chất lượng đối với mỗi lô môi trường pha chế sẵn hoặc mỗi lô môi trường được pha chế từ môi trường khô hay từ các thành phần riêng lẻ.

Kiểm tra chất lượng môi trường theo chỉ dẫn trong Bảng 13.6.4.

Thử nghiệm kiểm tra khả năng kích thích sự phát triển vi sinh vật của môi trường lỏng:

Cấy vào môi trường lỏng một lượng nhỏ vi sinh vật phù hợp (không quá 100 CFU). Ủ ở nhiệt độ xác định trong thời gian không lâu hơn khoảng thời gian ngắn nhất mà phép thử qui định. Vi sinh vật phát triển tốt, rõ ràng trên lô môi trường mới khi so sánh với sự phát triển của vi sinh vật trên lô môi trường đã đạt yêu cầu chất lượng.

Bảng 13.6.4 - Kiểm tra chất lượng môi trường

	Môi trường	Tính chất	Chủng thử nghiệm
<i>Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật</i>	Môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria-Mossel	Kích thích sự phát triển Ức chế sự phát triển	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>
	Môi trường thạch muối mật tím đỏ	Kích thích sự phát triển và đặc hiệu	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i>	Môi trường lỏng MacConkey	Kích thích sự phát triển Ức chế sự phát triển	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
	Môi trường thạch MacConkey	Kích thích sự phát triển và đặc hiệu	<i>E. coli</i>
<i>Salmonella</i>	Môi trường lỏng tăng sinh <i>Salmonella</i> Rappaport Vassiliadis	Kích thích sự phát triển Ức chế sự phát triển	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> hoặc <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony <i>S. aureus</i>
	Môi trường thạch Xylose Lysin Deoxycholat	Kích thích sự phát triển và đặc hiệu	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> hoặc <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Môi trường thạch Cetrimid	Kích thích sự phát triển Ức chế sự phát triển	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Môi trường thạch muối Mannitol	Kích thích sự phát triển và đặc hiệu Ức chế sự phát triển	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
	Môi trường tăng sinh cho Clostridia	Kích thích sự phát triển	<i>Cl. sporogenes</i>
<i>Candida albicans</i>	Môi trường thạch Columbia	Kích thích sự phát triển	<i>Cl. sporogenes</i>
	Môi trường lỏng Sabouraud-dextrose Môi trường thạch Sabouraud-dextrose	Kích thích sự phát triển Kích thích sự phát triển và đặc hiệu	<i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i>

Thử nghiệm kiểm tra khả năng kích thích sự phát triển vi sinh vật của môi trường đặc:

Dùng kĩ thuật cấy trải bề mặt, cấy vào mỗi đĩa môi trường đặc một lượng nhỏ vi sinh vật phù hợp (không quá 100 CFU). Ủ ở nhiệt độ xác định trong thời gian không lâu hơn khoảng thời gian ngắn nhất mà phép thử qui định. So sánh sự phát triển của vi sinh vật trên lô môi trường mới với sự phát triển của vi sinh vật trên lô môi trường đã đạt yêu cầu chất lượng. *Thử nghiệm kiểm tra khả năng ức chế sự phát triển vi sinh vật của môi trường lỏng và đặc:*

Cấy vào môi trường loại vi sinh vật phù hợp với lượng ít nhất là 100 CFU. Ủ ở nhiệt độ xác định trong thời gian không ít hơn khoảng thời gian dài nhất mà phép thử qui định. Vi sinh vật phải không phát triển trên môi trường.

Thử nghiệm kiểm tra tính đặc hiệu của môi trường:

Dùng kĩ thuật cấy trải bề mặt, cấy vào mỗi đĩa môi trường một lượng nhỏ vi sinh vật phù hợp (không quá 100 CFU). Ủ ở nhiệt độ xác định trong thời gian mà phép thử qui định. So sánh hình thái khuẩn lạc và phản ứng đặc hiệu của vi sinh vật trên lô môi trường mới với hình thái khuẩn lạc và phản ứng đặc hiệu của vi sinh vật trên lô môi trường đã đạt yêu cầu chất lượng.

Sự phù hợp của phương pháp thử

Đối với mỗi mẫu thử, tiến hành chuẩn bị mẫu thử như mô tả trong mục *Cách tiến hành*. Cấy chủng vi sinh vật chúng vào môi trường nuôi cấy tại thời điểm trộn mẫu thử vào môi trường. Cấy các chủng vi sinh vật một cách riêng rẽ. Số lượng vi sinh vật được cấy vào mẫu thử với lượng không quá 100 CFU.

Tiến hành thử nghiệm như mô tả trong mục *Cách tiến hành* và ủ trong thời gian ngắn nhất mà phép thử qui định. Vi sinh vật gây bệnh được phát hiện bằng các phản ứng đặc hiệu được mô tả trong mục *Cách tiến hành*.

Nếu bản chất mẫu thử có tính ức chế vi sinh vật, cần thay đổi qui trình thử cho phù hợp (xem phần *Trung hòa/loại bỏ tác dụng của chất ức chế*).

Với mẫu thử có tính ức chế vi sinh vật nhưng phương pháp đã thử không thể trung hòa hoạt tính ức chế này được thì mẫu thử được coi là không bị nhiễm các vi sinh vật đã được thử nghiệm.

Cách tiến hành

Vi khuẩn Gram âm dung nạp mật

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Lấy không dưới 1 g hoặc 1 ml mẫu thử, pha loãng 10 lần như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* chỉ khác là dùng môi trường lỏng casein đậu tương thay cho dung dịch pha loãng, trộn đều và ủ ở 20 °C đến 25 °C trong một thời gian thích hợp để phục hồi lại vi khuẩn mà không làm tăng số lượng vi khuẩn (thường từ 2 h đến không quá 5 h).

Phát hiện vi khuẩn:

Trừ khi có chỉ dẫn riêng, chuyển một thể tích tương đương

với 1 g hoặc 1 ml mẫu thử được chuẩn bị ở phần *Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ* vào 100 ml môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria-Mossel. Ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 24 h đến 48 h. Cấy chuyển lên môi trường thạch muối mật tím đỏ. Ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h.

Mẫu thử không có *Enterobacteria* nếu không thấy khuẩn lạc mọc trên môi trường.

Đánh giá số lượng:

Phân lập và cấy chuyển: Cấy lượng mẫu thử đã được chuẩn bị theo phần *Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ* tương ứng chứa 0,1 g; 0,01 g và 0,001 g hoặc 0,1 ml; 0,01 ml và 0,001 ml vào thể tích thích hợp môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria-Mossel. Ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 24 h đến 48 h. Cấy chuyển từ mỗi ống môi trường trên sang môi trường thạch muối mật tím đỏ. Ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h.

Đánh giá kết quả: Khuẩn lạc mọc trên môi trường chứng tỏ kết quả dương tính. Ghi lượng nhỏ nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả dương tính và lượng lớn nhất của chế phẩm mà ở đó cho kết quả âm tính. Xác định số lượng vi khuẩn theo Bảng 13.6.5.

Bảng 13.6.5 - Đánh giá kết quả

Kết quả đối với mỗi lượng sản phẩm			Số vi khuẩn có trong 1 gam hoặc 1 ml sản phẩm
0,1 g hoặc 0,1 ml	0,01 g hoặc 0,01 ml	0,001 g hoặc 0,001 ml	
+	+	+	> 10 ¹
+	+	-	< 10 ³ và > 10 ²
+	-	-	< 10 ² và > 10
-	-	-	< 10

Escherichia coli

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Lấy không dưới 1 g hoặc 1 ml, pha loãng 10 lần như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử*. Cấy 10 ml hoặc một lượng tương ứng với 1 g hoặc 1 ml mẫu thử vào một thể tích phù hợp môi trường lỏng casein đậu tương, trộn đều và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h.

Phân lập và cấy chuyển:

Lắc bình môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển 1 ml môi trường lỏng casein đậu tương sang 100 ml môi trường lỏng MacConkey và ủ ở 42 °C đến 44 °C trong 24 h đến 48 h. Tiếp tục cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch MacConkey và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 72 h.

Đánh giá kết quả:

Khuẩn lạc mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *E. coli*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *E. coli* nếu không có khuẩn lạc mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *E. coli* có kết quả âm tính.

Salmonella

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Lấy lượng mẫu thử đã xử lý như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* tương ứng với 10 g hoặc 10 ml mẫu thử và cấy vào một thể tích phù hợp môi trường lòng casein đậu tương, trộn đều và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy chuyển 0,1 ml môi trường lòng casein đậu tương sang 10 ml môi trường tăng sinh *Salmonella* Rappaport Vassiliadis và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h. Tiếp tục cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch xylose, lysin, deoxycholat và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 48 h.

Đánh giá kết quả:

Khuẩn lạc màu đỏ, có hoặc không có trung tâm màu đen mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *Salmonella*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *Salmonella* nếu không có khuẩn lạc có đặc điểm mô tả ở trên mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *Salmonella* có kết quả âm tính.

Pseudomonas aeruginosa

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Lấy không dưới 1 g hoặc 1 ml mẫu thử, pha loãng 10 lần như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử*. Cấy 10 ml hoặc 1 lượng tương ứng với 1 g hoặc 1 ml mẫu thử vào một thể tích phù hợp môi trường lòng casein đậu tương, trộn đều. Đối với thuốc dán, lọc một lượng mẫu thử tương đương với 1 miếng dán như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử của mục Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* qua màng lọc vô khuẩn và cấy vào 100 ml môi trường lòng casein đậu tương. Ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch cetrimid và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 72 h.

Đánh giá kết quả:

Khuẩn lạc mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *P. aeruginosa*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *P. aeruginosa* nếu không có khuẩn lạc mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *P. aeruginosa* có kết quả âm tính.

Staphylococcus aureus

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Lấy không dưới 1 g hoặc 1 ml mẫu thử, pha loãng 10 lần như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử*. Cấy 10 ml hoặc 1 lượng tương ứng với 1 g hoặc 1 ml mẫu thử vào một thể tích phù hợp môi trường lòng casein đậu tương, trộn đều. Đối với thuốc dán, lọc một lượng mẫu

thử tương đương với 1 miếng dán như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* qua màng lọc vô khuẩn và cấy vào 100 ml môi trường lòng casein đậu tương. Ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 24 h.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy chuyển sang đĩa môi trường thạch muối manitol và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 18 h đến 72 h.

Đánh giá kết quả:

Khuẩn lạc màu vàng hoặc trắng có vòng màu vàng bao quanh mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *S. aureus*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *S. aureus* nếu không có khuẩn lạc có đặc điểm mô tả ở trên mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *S. aureus* có kết quả âm tính.

Clostridia

Chuẩn bị mẫu thử và sốc nhiệt:

Chuẩn bị tối thiểu 20 ml mẫu thử được pha loãng 10 lần như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử* tương ứng với không dưới 2 g hoặc 2 ml mẫu thử. Chia mẫu thử thành 2 phần, mỗi phần ít nhất 10 ml. Một phần đun nóng tới 80 °C trong 10 min rồi làm lạnh ngay. Phần còn lại không được đun nóng.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy 10 ml hoặc lượng tương đương với 1 g hoặc 1 ml mẫu thử của cả 2 phần trên vào thể tích phù hợp môi trường tăng sinh cho *Clostridia*. Ủ cả hai mẫu ở điều kiện kỵ khí ở 30 °C đến 35 °C trong 48 h. Sau khi ủ, từ mỗi bình cấy chuyển sang môi trường thạch Columbia và tiếp tục ủ ở điều kiện kỵ khí ở 30 °C đến 35 °C trong 48 h đến 72 h.

Đánh giá kết quả:

Sự phát triển của trực khuẩn trong điều kiện kỵ khí (có hoặc không có bào tử) trên môi trường, phản ứng catalase âm tính cho thấy mẫu thử có thể có *Clostridia*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *Clostridia* nếu không có khuẩn lạc có đặc điểm mô tả ở trên mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *Clostridia* có kết quả âm tính.

Candida albicans

Chuẩn bị mẫu thử và tiền ủ:

Chuẩn bị mẫu thử như mô tả trong phần *Chuẩn bị mẫu thử* mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp đếm khi có mặt mẫu thử*, cấy 10 ml hoặc một lượng tương ứng với 1 g hoặc 1 ml vào 100 ml môi trường lòng Sabouraud-dextrose, trộn đều và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 3 ngày đến 5 ngày.

Phân lập và cấy chuyển:

Cấy chuyển sang môi trường thạch Sabouraud-dextrose và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong 24 h đến 48 h.

Đánh giá kết quả:

Khuẩn lạc màu trắng mọc trên môi trường cho thấy mẫu thử có thể có *C. albicans*. Tiếp tục xác định bằng nhiều phản ứng sinh hóa khác.

Mẫu thử không có *C. albicans* nếu không có khuẩn lạc có đặc điểm mô tả ở trên mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa để xác định *C. albicans* có kết quả âm tính.

3. DUNG DỊCH PHA LOÃNG VÀ MÔI TRƯỜNG

Các dung dịch và môi trường nuôi cấy được chuẩn bị theo cách dưới đây. Có thể sử dụng môi trường khác khi chứng minh được sự phù hợp của chúng.

Dung dịch đệm gốc

Cân 34 g kali dihydrophosphat (TT) và cho vào bình định mức 1000 ml, thêm 500 ml nước tinh khiết, điều chỉnh pH $7,2 \pm 0,2$ bằng natri hydroxyd (TT). Thêm nước tinh khiết tới vạch, trộn đều. Phân chia vào các bình, tiệt khuẩn, bảo quản ở 2 °C đến 8 °C.

Dung dịch đệm phosphat pH 7,2

Pha loãng dung dịch đệm gốc với nước tinh khiết theo tỷ lệ 1 : 800 (tt/tt) và tiệt khuẩn.

Dung dịch đệm natri clorid-pepton pH 7,0

Kali dihydrophosphat	3,6 g
Dinatri hydrophosphat dihydrat	7,2 g tương ứng với 0,067 M phosphat
Natri clorid	4,3 g
Pepton (từ thịt hoặc casein)	1,0 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định

Môi trường lỏng casein đậu tương

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
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,3 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch Sabouraud-dextrose

Dextrose	40,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Pepton từ mô động vật	5,0 g
Thạch	15,0 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $5,6 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch khoai tây dextrose

Dịch chiết từ khoai tây	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Thạch	15,0 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $5,6 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường lỏng Sabouraud-dextrose

Dextrose	20,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Pepton từ mô động vật	5,0 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $5,6 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria-Mossel

Genlatin thủy phân bởi pancreatin	10,0 g
Glucose monohydrat	5,0 g
Mật bò khô	20,0 g
Kali dihydrophosphat	2,0 g
Dinatri hydrophosphat dihydrat	8,0 g
Xanh brilliant	15 mg
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,2 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn bằng nhiệt ở 100 °C trong 30 min và làm lạnh ngay.

Môi trường thạch muối mật tím đỏ

Cao nấm men	3,0 g
Gelatin thủy phân bởi pancreatin	7,0 g
Muối mật	1,5 g
Natri clorid	5,0 g
Glucose monohydrat	10,0 g
Thạch	15,0 g
Đỏ trung tính	30 mg
Tím tinh thể	2 mg
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,4 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn bằng cách đun sôi, không được hấp trong nồi hấp.

Môi trường lỏng MacConkey

Gelatin thủy phân bởi pancreatin	20,0 g
Lactose monohydrat	10,0 g
Mật bò khô	5,0 g
Tía bromocresol	10 mg
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,3 \pm 0,2$ ở 25 °C. Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch MacConkey

Gelatin thủy phân bởi pancreatin	17,0 g
Pepton (thịt hoặc casein)	3,0 g
Lactose monohydrat	10,0 g
Natri clorid	5,0 g
Muối mật	1,5 g
Thạch	13,5 g
Đỏ trung tính	30,0 mg
Tím tinh thể	1,0 mg
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $7,1 \pm 0,2$ ở 25°C . Đun sôi 1 min, sau đó hấp diệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường lỏng tăng sinh *Salmonella Rappaport Vassiliadis*

Pepton đậu tương	4,5 g
Magnesi clorid hexahydrat	29,0 g
Natri clorid	8,0 g
Dikali phosphat	0,4 g
Kali dihydrophosphat	0,6 g
Xanh malachit	0,036 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Hòa tan, đun nóng nhẹ. Hấp diệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định với nhiệt độ không quá 115°C . Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $5,2 \pm 0,2$ ở 25°C .

Môi trường thạch xylose, lysin, desoxycholat

Xylose	3,5 g
L-Lysin	5,0 g
Lactose monohydrat	7,5 g
Sucrose	7,5 g
Natri clorid	5,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Đỏ phenol	80 mg
Thạch	13,5 g
Natri desoxycholat	2,5 g
Natri thiosulfat	6,8 g
Sắt amoni citrat	0,8 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C . Đun sôi, để nguội đến 50°C thì rót môi trường vào đĩa Petri. Không được hấp diệt khuẩn trong nồi hấp.

Môi trường thạch cetrimid

Gelatin thủy phân bởi pancreatin	20,0 g
Magnesi clorid	1,4 g
Dikali sulfat	10,0 g
Cetrimid	0,3 g
Thạch	13,6 g
Nước tinh khiết	1000 ml
Glycerol	10 ml

Đun sôi trong 1 min, khuấy đều. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $7,2 \pm 0,2$ ở 25°C . Tiệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch muối manitol

Casein thủy phân bởi pancreatin	5,0 g
Pepton từ mô động vật	5,0 g
Cao thịt bò	1,0 g
D-Manitol	10,0 g
Natri clorid	75,0 g
Thạch	15,0 g
Đỏ phenol	0,025 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Đun sôi trong 1 min, lắc đều. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C . Hấp diệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường tăng sinh cho *Clostridia*

Cao thịt bò	10,0 g
Pepton	10,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Tinh bột dễ tan	1,0 g
Glucose monohydrat	5,0 g
Cystein hydroclorid	0,5 g
Natri clorid	5,0 g
Natri acetat	3,0 g
Thạch	0,5 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Làm ấm thạch, hòa tan các thành phần bằng cách đun nóng tới sôi, khuấy đều liên tục. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $6,8 \pm 0,2$ ở 25°C . Hấp diệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định.

Môi trường thạch Columbia

Casein thủy phân bởi pancreatin	10,0 g
Pepton từ thịt	5,0 g
Tim thủy phân bởi pancreatin	3,0 g
Cao nấm men	5,0 g
Tinh bột ngô	1,0 g
Natri clorid	5,0 g
Thạch	10,0 g đến 15,0 g
Nước tinh khiết	1000 ml

Làm ấm thạch, hòa tan bằng cách đun nóng tới sôi, khuấy đều liên tục. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp diệt khuẩn, môi trường có pH $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C . Hấp diệt khuẩn trong nồi hấp theo quy trình đã được thẩm định. Để nguội tới 45°C đến 50°C , nếu cần, thêm 20 mg gentamycin base và rót vào đĩa Petri.

4. YÊU CẦU GIỚI HẠN NHIỄM KHIUẨN

Nếu không có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng thì giới hạn nhiễm khuẩn cho các loại thuốc không tiệt khuẩn trong quá trình sản xuất được ghi trong Bảng 13.6.6.

Bảng 13.6.6 - Yêu cầu giới hạn nhiễm khuẩn

Loại chế phẩm	Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/g hoặc CFU/ml)	Tổng số nấm (CFU/g hoặc CFU/ml)	Vi sinh vật gây bệnh
Thuốc dùng điều trị bỏng và các vết loét sâu	Không có vi sinh vật trong 1 g (ml)		
Nguyên liệu hóa dược	10 ³	10 ²	-
Thành phẩm hóa dược dùng để uống (dạng khô: viên nén, nang...)	10 ³	10 ²	Không có <i>Escherichia coli</i> trong 1 g (ml)
Thành phẩm hóa dược dùng để uống (dạng nước: siro, dung dịch...)	10 ²	10 ¹	Không có <i>Escherichia coli</i> trong 1 g (ml)
Thuốc dùng theo đường trực tràng	10 ³	10 ²	-
Thuốc dùng theo đường niêm mạc miệng, lợi, răng, da, mũi, tai	10 ²	10 ¹	Không có <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> trong 1 g (ml)
Thuốc dùng theo đường âm đạo	10 ²	10 ¹	Không có <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> trong 1 g (ml)
Thuốc dán (áp dụng cho 1 miếng dán)	10 ²	10 ¹	Không có <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> trong 1 miếng dán
Thuốc hít (bao gồm cả dạng khí dung)	10 ²	10 ¹	Không có <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g (ml).
Thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên (động, thực vật, khoáng chất); cao thuốc, cồn thuốc dùng để sản xuất thuốc uống từ dược liệu	10 ⁴	10 ²	Không quá 10 ² CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g (ml). Không có <i>Salmonella</i> trong 10 g (ml). Không có <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> trong 1 g (ml).
Thuốc từ dược liệu (thuốc thang...) được xử lý bằng ethanol thấp độ hoặc nước nóng (không sôi) trước khi dùng	10 ⁵	10 ⁴	Không quá 10 ⁴ CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật trong 1 g (ml) Không có <i>Salmonella</i> trong 10 g (ml) Không có <i>Escherichia coli</i> trong 1 g (ml)
Thuốc từ dược liệu (thuốc thang, trà...) được xử lý bằng nước sôi trước khi dùng	10 ⁷ Số lượng tối đa được chấp nhận: 5 × 10 ⁷	10 ⁵ Số lượng tối đa được chấp nhận: 5 × 10 ⁵	Không quá 10 ³ CFU <i>Escherichia coli</i> trong 1 g (ml) Không có <i>Salmonella</i> trong 10 g (ml)

13.7 THỬ VÔ KHUẨN

Qui định chung

Phép thử này được áp dụng nhằm phát hiện sự có mặt của vi khuẩn, nấm trong các nguyên liệu, chế phẩm và dụng cụ mà theo Dược điển cần phải vô khuẩn. Tuy nhiên, kết quả âm tính chỉ có nghĩa là không phát hiện được vi sinh vật tạp nhiễm trong chế phẩm đã thử trong điều kiện của thử nghiệm.

Những biện pháp phòng tạp nhiễm vi sinh vật

Thử vô khuẩn phải được tiến hành trong điều kiện vô khuẩn. Để đạt được điều kiện này, khu vực thử nghiệm

phải phù hợp với qui trình thử vô khuẩn được tiến hành. Các biện pháp phòng tránh tạp nhiễm phải đảm bảo không ảnh hưởng đến vi sinh vật có thể có trong mẫu thử. Khu vực thử vô khuẩn phải được đánh giá thường xuyên bằng phương pháp lấy mẫu tại khu vực làm việc hoặc bằng cách tiến hành mẫu đối chứng thích hợp.

Môi trường và nhiệt độ ủ

Có thể sử dụng môi trường được pha chế theo chỉ dẫn dưới đây hoặc sử dụng các môi trường thương mại có sẵn nếu chúng đáp ứng yêu cầu về khả năng dinh dưỡng theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường*. Môi trường thioglycolat

lông được dùng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí. Môi trường casein đậu tương lỏng được dùng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và nấm.

Môi trường thioglycolat lỏng

L-Cystin	0,5 g
Thạch	0,75 g
Natri clorid	2,5 g
Glucose monohydrat/khan	5,5 g/5,0 g
Cao nấm men (tan được trong nước)	5,0 g
Casein thủy phân bởi pancreatin	15,0 g
Natri thioglycolat	0,5 g
hoặc acid thioglycolic	0,3 ml
Dung dịch natri resazurin 1 g/L mới pha)	1,0 ml
Nước	1000 ml
pH sau khi tiệt khuẩn:	7,1 ± 0,2

Trộn L-Cystin, thạch, natri clorid, glucose, cao nấm men, casein thủy phân bởi pancreatin với nước và đun nóng đến tan hoàn toàn. Hòa tan natri thioglycolat hoặc acid thioglycolic vào dung dịch trên, thêm dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) (nếu cần) để điều chỉnh pH sao cho môi trường sau khi tiệt khuẩn có pH 7,1 ± 0,2. Nếu cần phải lọc thì đun nóng lại dung dịch (tránh đun sôi) và lọc nóng qua giấy lọc đã thấm ướt. Thêm dung dịch resazurin, trộn đều và đóng môi trường vào ống (hoặc bình) thích hợp sao cho sau khi kết thúc quá trình ủ, không quá một nửa thể tích phía trên của môi trường trong ống (hoặc bình) bị chuyển màu chỉ thị do hấp thụ oxy. Hấp tiệt khuẩn theo qui trình đã được thẩm định. Bảo quản môi trường ở nhiệt độ 2 °C đến 25 °C trong bao bì vô khuẩn, kín khí. Nếu 1/3 thể tích phía trên của ống (hoặc bình) môi trường có màu hồng, môi trường không thích hợp để thử nghiệm. Có thể phục hồi lại môi trường bằng cách đun cách thủy cho mất màu rồi làm lạnh nhanh, chú ý tránh tạp nhiễm không khí không vô khuẩn vào môi trường và chỉ sử dụng môi trường đã phục hồi này một lần. Không sử dụng môi trường quá thời hạn sử dụng đã thẩm định.

Ủ môi trường thioglycolat lỏng ở 30 °C đến 35 °C.

Với các chế phẩm có chứa chất bảo quản nhóm thủy phân mà không áp dụng phương pháp màng lọc được, có thể ủ môi trường thioglycolat lỏng ở 20 °C đến 25 °C thay vì sử dụng môi trường lỏng casein đậu tương và trường hợp này môi trường thioglycolat lỏng phải đạt yêu cầu về khả năng dinh dưỡng theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường*.

Khi được qui định hoặc chứng minh rõ ràng, có thể sử dụng môi trường thioglycolat lỏng thay thế. Chuẩn bị hỗn hợp môi trường có thành phần giống như môi trường thioglycolat lỏng ở trên nhưng không có thành phần thạch và dung dịch natri resazurin, tiệt khuẩn giống như ở trên. Môi trường sau khi tiệt khuẩn có pH 7,1 ± 0,2. Đun nóng trong nồi cách thủy trước khi sử dụng và ủ ở 30 °C đến 35 °C trong điều kiện kỵ khí.

Môi trường casein đậu tương lỏng

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/khan	2,5 g/2,3 g
Nước	1000 ml
pH sau khi tiệt khuẩn:	7,3 ± 0,2

Hòa tan tất cả các chất rắn trong nước, đun nóng nhẹ để cho tan hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) (nếu cần) để điều chỉnh pH sao cho môi trường sau khi tiệt khuẩn có pH 7,3 ± 0,2. Lọc (nếu cần) để cho môi trường trong. Phân chia môi trường vào ống (hoặc bình) thích hợp và hấp tiệt khuẩn theo qui trình đã được thẩm định. Bảo quản môi trường ở nhiệt độ 2 °C đến 25 °C trong bao bì vô khuẩn, kín khí, trừ khi môi trường được sử dụng ngay. Không sử dụng môi trường quá thời hạn sử dụng đã thẩm định.

Ủ môi trường casein đậu tương lỏng ở 20 °C đến 25 °C.

Môi trường nuôi cấy phải đạt chất lượng theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường*. Có thể kiểm tra chất lượng môi trường trước hoặc song song với thử vô khuẩn mẫu thử.

Kiểm tra chất lượng môi trường

a) Độ vô khuẩn

Lấy ngẫu nhiên một vài ống (hoặc bình) môi trường mới sản xuất, đem ủ ở nhiệt độ 30 °C đến 35 °C trong 14 ngày đối với môi trường thioglycolat lỏng; ủ ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C trong 14 ngày đối với môi trường casein đậu tương lỏng. Các loại môi trường phải không được có vi khuẩn, nấm mốc.

b) Khả năng dinh dưỡng

Tiến hành kiểm tra khả năng dinh dưỡng đối với mỗi lô môi trường được pha chế sẵn hoặc mỗi lô môi trường được pha chế từ môi trường khô nhiều thành phần hoặc được pha chế từ các thành phần riêng lẻ. Sử dụng các chủng vi sinh vật phù hợp theo qui định trong Bảng 13.7.1.

Bảng 13.7.1 - Chủng vi sinh vật phù hợp để kiểm tra khả năng dinh dưỡng và sự phù hợp của phương pháp

Vi khuẩn hiếu khí	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6358, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
Vi khuẩn kỵ khí	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293
Nấm	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

Cấy vào môi trường thioglycolat lỏng một lượng nhỏ (không quá 100 CFU) các vi sinh vật sau, chú ý cấy riêng rẽ vi sinh vật vào các ống (hoặc bình môi trường): *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Cấy vào môi trường casein đậu tương lỏng một lượng nhỏ (không quá 100 CFU) các vi sinh vật sau, chú ý cấy riêng rẽ vi sinh vật vào các ống (hoặc bình môi trường): *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Ủ trong không quá 3 ngày đối với vi khuẩn và không quá 5 ngày đối với nấm.

Cần đảm bảo chủng vi sinh vật đem cấy vào môi trường không được cấy truyền quá 5 lần từ chủng gốc ban đầu.

Môi trường đạt chất lượng nếu sau thời gian ủ, vi sinh vật đều mọc tốt.

Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp

Tiến hành qui trình tương tự hệt với thử vô khuẩn mẫu thử, chỉ khác:

Phương pháp màng lọc: Sau khi chuyển mẫu thử lên màng lọc, thêm vào phân dung dịch pha loãng cuối cùng một lượng nhỏ (không quá 100 CFU) các vi sinh vật tương ứng. Phương pháp cấy trực tiếp: Sau khi chuyển mẫu thử vào ống (hoặc bình) môi trường, thêm vào một lượng nhỏ (không quá 100 CFU) các vi sinh vật tương ứng.

Trong cả hai trường hợp trên, sử dụng vi sinh vật theo Bảng 13.7.1. Đồng thời tiến hành kiểm tra khả năng dinh dưỡng của môi trường và các ống này được coi như mẫu đối chứng dương. Ủ tất cả các ống (hoặc bình) môi trường trong không quá 5 ngày.

Nếu sau thời gian ủ, sự phát triển của vi sinh vật trong ống môi trường chứa mẫu thử tốt, rõ ràng giống với sự phát triển của vi sinh vật trong ống đối chứng dương không chứa mẫu thử, điều đó có nghĩa mẫu thử không chứa chất ức chế vi sinh vật hoặc khả năng ức chế vi sinh vật của mẫu thử đã bị loại bỏ bởi điều kiện thí nghiệm. Lúc này có thể áp dụng qui trình thử vô khuẩn trên mẫu thử mà không cần bất cứ sự điều chỉnh nào.

Nếu sau thời gian ủ, sự phát triển của vi sinh vật trong ống môi trường chứa mẫu thử không rõ ràng như sự phát triển của vi sinh vật trong ống đối chứng dương không chứa mẫu thử, điều đó có nghĩa mẫu thử chứa chất ức chế vi sinh vật và khả năng ức chế vi sinh vật của mẫu thử không bị loại bỏ bởi điều kiện thí nghiệm. Lúc này cần thay đổi điều kiện thử nghiệm để loại bỏ tác dụng của chất ức chế và tiến hành kiểm tra lại sự phù hợp của phương pháp.

Tiến hành kiểm tra sự phù hợp của phương pháp khi:

- Tiến hành thử vô khuẩn trên một sản phẩm mới.
- Có sự thay đổi về điều kiện thử vô khuẩn.

Sự phù hợp của phương pháp có thể được tiến hành đồng thời với thử vô khuẩn mẫu thử.

Tiến hành thử vô khuẩn

Có thể tiến hành thử vô khuẩn mẫu thử bằng phương pháp màng lọc hoặc phương pháp cấy trực tiếp. Cần tiến hành các ống đối chứng âm tính. Phương pháp màng lọc ưu tiên được sử dụng, được lựa chọn khi bản chất mẫu thử cho phép có thể áp dụng phương pháp màng lọc được, ví dụ

mẫu thử là dung dịch nước, dầu hay cồn, hoặc mẫu thử có thể hòa trộn hoặc hòa tan trong nước hoặc dung môi hữu cơ miễn là dung môi hữu cơ đó không ức chế vi sinh vật trong điều kiện của thử nghiệm.

Phương pháp màng lọc

Sử dụng màng lọc có kính thước lỗ lọc không quá 0,45 μm , kích thước lỗ lọc này đã được chứng minh là phù hợp trong việc lưu giữ vi sinh vật. Màng lọc cellulose nitrat được dùng cho các chế phẩm dạng nước, dạng dầu và các dung dịch cồn thấp độ. Màng lọc cellulose acetat được dùng cho các chế phẩm cồn cao độ. Có thể sử dụng loại màng lọc phù hợp cho các chế phẩm riêng biệt, ví dụ kháng sinh.

Kỹ thuật thử vô khuẩn mô tả dưới đây được áp dụng cho màng lọc có đường kính 50 mm. Nếu sử dụng màng lọc có đường kính lớn hơn, cần thay đổi thể tích dung dịch pha loãng và qui trình rửa cho phù hợp. Bộ dụng cụ lọc và màng lọc phải được tiệt khuẩn theo cách phù hợp. Bộ dụng cụ lọc phải được thiết kế sao cho có thể đưa mẫu thử và lọc mẫu thử trong điều kiện vô khuẩn, cho phép lấy màng lọc ra khỏi bộ lọc và cấy vào môi trường trong điều kiện vô khuẩn, hoặc cho phép có thể mang bộ dụng cụ đem ủ sau khi đã thêm môi trường vào bộ dụng cụ đó.

Mẫu thử là dung dịch nước:

Chuyển một lượng nhỏ dung dịch pha loãng vô khuẩn thích hợp như dung dịch pepton thịt hoặc pepton casein 1 g/L có pH $7,1 \pm 0,2$ lên màng lọc của bộ lọc vô khuẩn và lọc. Dung dịch pha loãng có thể chứa các chất trung hòa và/hoặc các chất bất hoạt phù hợp trong trường hợp mẫu thử có chứa kháng sinh.

Chuyển mẫu thử lên màng lọc, nếu cần có thể pha loãng mẫu giống như đã tiến hành trong mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp* bằng dung dịch pha loãng phù hợp, chú ý lượng mẫu phải tuân thủ theo qui định trong Bảng 13.7.2. Lọc ngay. Nếu mẫu thử có khả năng kháng khuẩn, rửa màng lọc không dưới 3 lần, thể tích dung dịch pha loãng của mỗi lần rửa phải giống như thể tích dung dịch pha loãng đã tiến hành trong mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp*. Chú ý không rửa quá 5 lần, mỗi lần 100 ml dung dịch pha loãng, ngay cả trong trường hợp kết quả kiểm tra sự phù hợp của phương pháp khi áp dụng qui trình rửa này không loại trừ được hoạt tính kháng khuẩn của mẫu thử. Chuyển toàn bộ màng lọc vào môi trường nuôi cấy hoặc cắt màng lọc trong điều kiện vô khuẩn thành 2 phần tương đương và cấy mỗi nửa màng lọc vào một loại môi trường nuôi cấy. Thể tích môi trường nuôi cấy phải giống như thể tích môi trường đã tiến hành trong mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp*. Ngoài ra, có thể thay thế bằng cách cho môi trường nuôi cấy vào bộ dụng cụ chứa màng lọc. Ủ môi trường trong không dưới 14 ngày.

Mẫu thử là chất rắn có thể hòa tan được:

Chú ý lượng mẫu cho vào mỗi loại môi trường phải tuân thủ theo qui định trong Bảng 13.7.2. Hòa tan mẫu thử trong dung môi pha loãng được cung cấp kèm theo mẫu thử, nước cất pha tiêm, nước muối sinh lý hay dung dịch

pepton thịt hoặc pepton casein 1 g/L và tiếp tục tiến hành như mô tả đối với mẫu thử là dung dịch nước ở trên.

Mẫu thử dạng dầu/dung dịch dầu: Chú ý lượng mẫu cho vào mỗi loại môi trường phải tuân thủ theo qui định trong Bảng 13.7.2. Chuyển trực tiếp mẫu thử (không cần pha loãng) lên màng lọc khô nếu mẫu thử là dung dịch dầu có độ nhớt thấp. Nếu mẫu thử là dung dịch dầu rất nhớt, nên pha loãng mẫu thử trong dung dịch pha loãng vô khuẩn thích hợp như isopropyl myristat, dung môi này đã được chứng minh là không có hoạt tính kháng khuẩn. Để cho dung dịch dầu tự chảy qua màng lọc rồi sau đó tiến hành lọc với áp lực lọc đều đặn. Rửa màng lọc không dưới 3 lần, mỗi lần 100 ml dung dịch pha loãng phù hợp như dung dịch pepton thịt hoặc pepton casein 1 g/L có chứa chất điện hoạt phù hợp với nồng độ giống như nồng độ đã tiến hành trong mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp*, ví dụ có thể sử dụng polysorbat 80 ở nồng độ 10 g/L. Chuyển màng lọc vào trong môi trường hoặc ngược lại giống như đã mô tả đối với mẫu thử là dung dịch nước, ở nhiệt độ và thời gian giống như trên.

Mẫu thử dạng mỡ, kem:

Chú ý lượng mẫu cho vào mỗi loại môi trường phải tuân thủ theo qui định trong Bảng 13.7.2. Nên pha loãng thuốc mỡ hoặc thuốc nhũ dịch kiểu N/D trong isopropyl myristat với tỷ lệ 1%, gia nhiệt dưới 40 °C nếu cần. Trong một số trường hợp hạn chế có thể gia nhiệt lên tới 44 °C. Tiến hành lọc nhanh và tiếp tục xử lý giống như mẫu thử dạng dầu/dung dịch dầu.

Phương pháp cấy trực tiếp

Chuyển trực tiếp lượng mẫu thử cho vào mỗi loại môi trường theo qui định trong Bảng 13.7.2. Chú ý thể tích mẫu thử không được vượt quá 10 % thể tích của môi trường, trừ khi có chỉ dẫn khác.

Nếu mẫu thử có hoạt tính kháng khuẩn, cần trung hòa hoạt tính này bằng chất trung hòa trước khi tiến hành thử vô khuẩn hoặc pha loãng mẫu thử trong một thể tích môi trường nuôi cấy đủ lớn. Khi thể tích mẫu thử lớn có thể cần phải sử dụng môi trường đặc hơn (cần phải tính đến mức độ pha loãng của mẫu thử khi xác định độ đặc của môi trường nuôi cấy). Nếu có thể, nên chuyển trực tiếp môi trường đặc vào mẫu thử.

Mẫu thử dạng dung dịch dầu: Sử dụng môi trường có bổ sung chất điện hoạt phù hợp với nồng độ giống như nồng độ đã tiến hành trong mục *Kiểm tra sự phù hợp của phương pháp*, ví dụ có thể sử dụng polysorbat 80 ở nồng độ 10 g/L.

Mẫu thử dạng mỡ, kem: Pha loãng mẫu thử theo tỷ lệ 1:10 bằng cách nhũ hóa mẫu thử trong dung dịch pha loãng như dung dịch pepton thịt hoặc pepton casein 1 g/L có chứa chất điện hoạt. Chuyển mẫu thử đã pha loãng vào môi trường nuôi cấy không chứa chất điện hoạt.

Ủ môi trường đã cấy mẫu thử trong không dưới 14 ngày. Định kỳ quan sát sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình ủ. Hằng ngày, lắc nhẹ nhàng môi trường nuôi cấy

có chứa mẫu thử dạng dầu. Tuy nhiên, nếu sử dụng môi trường thioglycolat lỏng thì hạn chế lắc tối thiểu để duy trì điều kiện kỵ khí của môi trường này.

Mẫu thử là chỉ khâu phẫu thuật và chỉ khâu dùng trong thú y: Sử dụng lượng mẫu thử cho vào mỗi loại môi trường nuôi cấy theo qui định trong Bảng 13.7.2. Mở bao bì đóng gói trong điều kiện vô khuẩn, cắt 3 đoạn của mỗi sợi chỉ khâu cho mỗi loại môi trường nuôi cấy. Tiến hành thử nghiệm trên 3 đoạn, mỗi đoạn 30 cm, cắt từ đoạn đầu, đoạn giữa và đoạn cuối của sợi chỉ khâu. Sử dụng các đoạn được cắt từ các bao gói mới mở. Chuyển từng đoạn vào môi trường nuôi cấy. Chú ý thể tích môi trường nuôi cấy phải đủ ngập mẫu thử (20 ml đến 150 ml).

Quan sát và đánh giá kết quả

Định kỳ trong suốt quá trình ủ và khi kết luận, kiểm tra môi trường bằng mắt thường xem có sự phát triển của vi sinh vật hay không. Nếu bản chất của mẫu thử làm đục môi trường khiến khó quan sát bằng mắt thường sự phát triển của vi sinh vật thì sau 14 ngày ủ, cấy truyền một lượng nhỏ từ môi trường đó (mỗi ống không quá 1 ml) sang loạt môi trường mới cùng loại và tiếp tục ủ cả môi trường cũ và môi trường mới cấy truyền trong không dưới 4 ngày.

Nếu không quan sát thấy sự phát triển của vi sinh vật trong các môi trường, mẫu thử đạt chỉ tiêu vô khuẩn. Nếu quan sát thấy sự phát triển của vi sinh vật trong các môi trường, mẫu thử không đạt chỉ tiêu vô khuẩn, trừ trường hợp chỉ ra rõ ràng rằng thử nghiệm không có giá trị do các nguyên nhân không liên quan gì đến mẫu thử.

Thử nghiệm được coi là không có giá trị khi:

- Các số liệu về kiểm soát vi sinh vật của khu vực thử vô khuẩn không đạt.
- Khi rà soát lại quá trình thử vô khuẩn phát hiện thấy có sai sót.
- Có sự phát triển của vi sinh vật trong ống đối chứng âm tính.
- Sau khi phân lập và định danh vi sinh vật thu được trong ống môi trường, sự phát triển của vi sinh vật này rõ ràng là do sai sót liên quan đến vật liệu hoặc kỹ thuật được áp dụng cho mẫu thử.

Nếu thử nghiệm không có giá trị, tiến hành thử vô khuẩn lại với số lượng mẫu giống như lần đầu.

Nếu không quan sát thấy sự phát triển của vi sinh vật trong các môi trường ở lần thử lặp lại, mẫu thử đạt chỉ tiêu vô khuẩn. Nếu quan sát thấy sự phát triển của vi sinh vật trong các môi trường ở lần thử lặp lại, mẫu thử không đạt chỉ tiêu vô khuẩn.

Bảng 13.7.2 - Số lượng tối thiểu mẫu thử của đơn vị đóng gói cho vào mỗi loại môi trường

Số lượng chế phẩm trong 1 đơn vị đóng gói	Số lượng tối thiểu mẫu thử của đơn vị đóng gói cho vào mỗi loại môi trường (trừ khi có qui định khác)
Chất lỏng: - dưới 1 ml - từ 1 ml đến 40 ml - hơn 40 ml đến không quá 100 ml - hơn 100 ml	Toàn bộ đơn vị đóng gói 1/2 đơn vị đóng gói nhưng không dưới 1 ml 20 ml 10 % đơn vị đóng gói nhưng không dưới 20 ml
Chất lỏng kháng sinh	1 ml
Chế phẩm không tan, chế phẩm dạng kem, mỡ được phân tán hoặc nhũ hóa	Lấy lượng tương ứng với ít nhất 200 mg thuốc
Chất rắn: - dưới 50 mg - từ 50 mg đến dưới 300 mg - từ 300 mg đến 5 g - hơn 5 g - Chi khâu phẫu thuật và chi khâu dùng trong thú y - Băng, bông, gạc phẫu thuật được đóng gói kín - Chi khâu phẫu thuật và các dụng cụ khác được đóng gói dùng một lần - Các dụng cụ y tế khác	Toàn bộ đơn vị đóng gói 1/2 đơn vị đóng gói nhưng không dưới 50 mg 150 mg 500 mg 3 đoạn (mỗi đoạn dài 30 cm) 100 mg mỗi gói Toàn bộ đơn vị đóng gói Toàn bộ dụng cụ, cắt nhỏ dụng cụ hoặc tháo rời dụng cụ ra

Bảng 13.7.3 - Số lượng tối thiểu đơn vị đóng gói của lô đem thử

Số lượng đơn vị đóng gói của lô*	Số lượng tối thiểu đơn vị đóng gói của lô đem thử cho mỗi loại môi trường trừ khi có qui định khác**
Thuốc tiêm: - Không quá 100 đơn vị đóng gói - Trên 100 đến không quá 500 đơn vị đóng gói - Trên 500 đơn vị đóng gói	10 % hoặc 4 đơn vị đóng gói, lấy số lớn hơn 10 đơn vị đóng gói 2 % hoặc 20 đơn vị đóng gói (đối với thuốc tiêm thể tích lớn: 10 đơn vị đóng gói), lấy số bé hơn
Thuốc nhỏ mắt và chế phẩm không tiêm: - Không quá 200 đơn vị đóng gói - Trên 200 đơn vị đóng gói - Nếu chế phẩm được đóng gói dùng một lần, áp dụng qui định giống với thuốc tiêm	5 % hoặc 2 đơn vị đóng gói, lấy số lớn hơn 10 đơn vị đóng gói
Chi khâu phẫu thuật và chi khâu dùng trong thú y	2 % hoặc 5 đơn vị đóng gói, lấy số lớn hơn, tối đa 20 đơn vị đóng gói
Chế phẩm rắn: - Không quá 4 đơn vị đóng gói - Trên 4 đến không quá 50 đơn vị đóng gói - Trên 50 đơn vị đóng gói	Mỗi đơn vị đóng gói 20 % hoặc 4 đơn vị đóng gói, lấy số lớn hơn. 2 % hoặc 10 đơn vị đóng gói, lấy số lớn hơn.
* Nếu không rõ số lượng đơn vị đóng gói của lô, sử dụng số lượng tối đa theo qui định trong bảng.	
** Nếu lượng mẫu trong một đơn vị đóng gói đủ cho 2 loại môi trường, số lượng tối thiểu đơn vị đóng gói đem thử trong cột được hiểu là tính cho cả 2 loại môi trường.	

Áp dụng phép thử vô khuẩn vào thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt và các chế phẩm không tiêm có yêu cầu vô khuẩn

Khi sử dụng phương pháp màng lọc, lượng mẫu trong một đơn vị đóng gói ít nhất phải tuân thủ theo qui định trong Bảng 13.7.2, nếu có thể thì sử dụng toàn bộ lượng mẫu trong một đơn vị đóng gói, pha loãng nếu cần với khoảng 100 ml dung dịch pha loãng phù hợp như dung dịch pepton thịt hoặc pepton casein 1 g/L.

Khi sử dụng phương pháp cấy trực tiếp, lượng mẫu thử cho vào mỗi loại môi trường tuân theo qui định trong Bảng 13.7.2, trừ khi có chỉ dẫn khác. Nếu thể tích hoặc lượng mẫu thử trong một đơn vị đóng gói không đủ để tiến hành thử nghiệm, cần lấy mẫu thử từ 2 hoặc nhiều đơn vị đóng gói để cấy vào các môi trường khác nhau.

Số lượng tối thiểu đơn vị đóng gói đem thử

Số lượng tối thiểu đơn vị đóng gói đem thử được dựa trên cỡ lô của mẫu thử và được qui định tại Bảng 13.7.3.

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 nhầy, 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 niger 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 13.8.2 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 qui định ở Bảng 13.8.2 (xem Phụ lục 13.6). Thử giới hạn nhiễm khuẩn 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 chung 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 10^8 CFU. Để thu hoạch bảo từ *A. niger*, 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 10^8 CFU/ml.

Bảng 13.8.2 - Điều kiện nuôi cấy vi sinh vật

Vi sinh vật chỉ thị	Môi trường nuôi cấy	Nhiệt độ ủ	Thời gian ủ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Môi trường lỏng casein đậu tương	30 °C đến 35 °C	18 h đến 24 h
	Môi trường thạch casein đậu tương		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Môi trường lỏng casein đậu tương	30 °C đến 35 °C	18 h đến 24 h
	Môi trường thạch casein đậu tương		
<i>Candida albicans</i>	Môi trường Sabouraud lỏng	20 °C đến 25 °C	44 h đến 52 h
	Môi trường thạch Sabouraud		
<i>Aspergillus niger</i>	Môi trường Sabouraud lỏng	20 °C đến 25 °C	6 ngày đến 10 ngày
	Môi trường thạch Sabouraud		

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 13.8.2, 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. niger* 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. Thê 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 10⁵ CFU/ml đến 10⁶ CFU/ml đối với chế phẩm loại 1, 2 và 3, khoảng 10³ CFU/ml đến 10⁴ CFU/ml đối với chế phẩm loại 4. Thê 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 qui 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 qui 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. niger*.

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, điểm 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/hộp đối với phương pháp hộp thạch, dùng hộp 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 (R₀) 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 log₁₀ 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 khoanh 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 khoanh 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 qui 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 qui 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 qui 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 ù theo qui định, duy trì các ống nghiệm ở nhiệt độ ù trong 3 h đến 4 h, đảm bảo nhiệt độ và thời gian ù đồng nhất giữa các ống nghiệm.

Sau thời gian ù, 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 ù 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 qui 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 qui 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 ù 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, ù 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 lẫn 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 đậm số 13 (pH $6,8 \pm 0,1$): Hòa tan 6,4 g kali dihydrophosphat (TT) và 18,9 g dinatri hydrophosphat (TT) trong 1000 ml nước.

Dung dịch đậm số 14 (pH $10,5 \pm 0,1$): 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 đậm số 15 (pH $4,5 \pm 0,1$): Hòa tan 13,61 g kali dihydrophosphat (TT) trong 1000 ml nước.

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

Dung dịch đậm số 17 (pH $8,0 \pm 0,1$): 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 đậm số 18 (pH $6,0 \pm 0,1$): 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 đậm số 19 (pH $6,0 \pm 0,1$): Hòa tan 20,0 g dikali hydrophosphat (TT) và 80,0 g kali dihydrophosphat (TT) trong 1000 ml nước.

Dung dịch đậm số 20 (pH $5,6 \pm 0,1$): 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
Dikali hydrophosphat.12H ₂ O	26,9 g
Thạch	10,0 g
Nước	1000 ml

Sau khi tiệt khuẩn môi trường, thêm dikali 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	6,0 g
Glucose	1,0 g
Thạch	15,0 g - 20 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 <i>ethanol</i> (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	<i>Dimethyl sulfoxid</i> (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 <i>acid hydrochloric</i> 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 <i>acid hydrochloric</i> 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
Erythromycin estolat	Erythromycin	<i>Methanol (TT)</i>
Erythromycin ethyl succinat		
Erythromycin stearat		
Framycetin sulfat	Framycetin sulfat	<i>Nước</i>
Gentamycin sulfat	Gentamycin sulfat	<i>Nước</i>
Josamycin	Josamycin	Hòa 30 mg trong 5 ml <i>methanol (TT)</i> , thêm <i>nước</i> vừa đủ 100ml
Josamycin propionat	Josamycin propionat	Hòa 40 mg trong 20 ml <i>methanol (TT)</i> , thêm dung dịch đệm số 20 vừa đủ 100 ml
Kanamycin monosulfat	Kanamycin monosulfat	<i>Nước</i>
Kanamycin acid sulfat		

Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Số 12	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18 <i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 <i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Số 5 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Số 12	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18 <i>Staphylococcus epidermidis</i> NCIB 8853 CIP 68.21 ATCC 12228	Số 1 (pH 7,9)	35 - 39 °C
Số 20	<i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62 ATCC 6633 NCTC 10400	Số 1 (pH 6,6)	35 - 37 °C
Số 20	<i>Bacillus subtilis</i> CIP 52.62 ATCC 6633 NCTC 10400	Số 1 (pH 6,6)	35 - 37 °C
Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C 35 - 39 °C

Tên kháng sinh	Chất chuẩn	Dung môi ban đầu
Kitasamycin	Kitasamycin	<i>Methanol (TT)</i>
Lymecyclin	Lymecyclin	
Neomycin sulfat	Neomycin sulfat	<i>Nước</i>
Netilmicin sulfat	Netilmicin sulfat	<i>Nước</i>
Nystatin	Nystatin	<i>Dimethyl formamid (TT)</i>
Oxytetracyclin dihydrat	Oxytetracyclin dihydrat	<i>Dung dịch acid hydrochloric 0,01 M (TT)</i>
Polymycin B sulfat	Polymycin B	<i>Dung dịch đậm số 18</i>
Rifamycin natri	Rifamycin natri	<i>Methanol (TT)</i>
Spiramycin	Spiramycin	<i>Methanol (TT)</i>

Dung dịch đậm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ u
Số 17	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 11 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Số 1	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 CIP 76.18	Số 1 (pH 6,6)	37 - 39 °C
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
Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P CIP 53.156	Số 1 (pH 7,9)	32 - 35 °C
Số 19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	Số 6 (pH 6,0)	29 - 31 °C
Số 1	<i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241	Số 1 (pH 6,6)	30 - 37 °C
Số 18	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Số 12 (pH 6,5 - 6,6)	32 - 37 °C
Số 7	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	Số 1 (pH 6,6)	35 - 39 °C
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
Streptomycin sulfat	Streptomycin sulfat	Nước
Teicoplanin	Teicoplanin	Dung dịch đệm số 2
Tetracyclin hydroclorid	Tetracyclin hydroclorid	Dung dịch acid hydrocloric 0,01 M (TT)
Tobramycin	Tobramycin	Nước
Vancomycin	Vancomycin	Nước
Vancomycin hydroclorid	Vancomycin hydroclorid	Nước
		Nước

Dung dịch đậm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
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 30 - 37 °C
Số 2	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 11 (pH 7,8 - 8,0)	35 - 37 °C
Số 15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Số 13 (pH 6,0 - 7,0)	35 - 37 °C
Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 1 (pH 7,9)	30 - 37 °C
Số 15	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Số 14 (pH 5,9)	30 - 32 °C
Số 12	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236 CIP 52.62 ATCC 6633	Số 1 (pH 8,0)	37 - 39 °C
Số 15	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	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 đậm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Colistimethat natri	Colistimethat natri	Nước	Số 7	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Dihydrostreptomycin succinat	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				<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	Số 4 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Erythromycin ethyl succinat	Erythromycin	Methanol (TT)	Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Erythromycin stearat				<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 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 CIP 53.156 ATCC 6538 P	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 đậm số 7 polysorbat 80 (TT) với tỷ lệ 0,1 mg/ml	<i>Enterococcus hirae</i> CIP 58.55 ATCC 10541 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	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> 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
Josamycin propionat	Josamycin propionat	Hòa 40 mg trong 20 ml <i>methanol (TT)</i> , thêm dung dịch đệm số 20 vừa đủ 100 ml
Kanamycin monosulfat Kanamycin acid sulfat	Kanamycin monosulfat	<i>Nước</i>
Neomycin sulfat	Neomycin sulfat	<i>Nước</i>
Rifamycin natri	Rifamycin natri	<i>Methanol (TT)</i>
Spiramycin	Spiramycin	<i>Methanol (TT)</i>
Streptomycin sulfat	Streptomycin sulfat	<i>Nước</i>
Tyrothricin	Gramycidin	<i>Ethanol (TT)</i>
Vancomycin hydroclorid	Vancomycin hydroclorid	<i>Nước</i>

Dung dịch đệm	Chủng vi sinh vật	Môi trường và pH ($\pm 0,1$)	Nhiệt độ ủ
Số 20	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 ATCC 6538 P NCTC 7447	Số 3 (pH 8,0)	35 - 37 °C
Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Số 7	<i>Escherichia coli</i> NCIB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Số 7	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Số 12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	Số 3 (pH 7,0)	35 - 37 °C
Ethanol (TT)	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	Số 3 (pH 7,0)	37 °C
Số 12	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.156 ATCC 6538 P	Số 3 (pH 7,0)	37 - 39 °C

13.10 PHÂN TÍCH THỐNG KÊ KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG SINH HỌC

1. Mở đầu

Chuyên luận này hướng dẫn cách thiết kế thí nghiệm sinh học và phương pháp phân tích thống kê các kết quả thử nghiệm sinh học có trong Dược điển Việt Nam.

Có thể dùng kiểu thiết kế thí nghiệm và cách tính toán kết quả khác với phương pháp mô tả trong chuyên luận này, miễn là các phương pháp đó có độ tin cậy không kém phương pháp được mô tả ở đây.

Phương pháp sinh học được dùng để thử nghiệm các chất hay chế phẩm mà hoạt lực của chúng không thể xác định một cách chính xác bằng các phương pháp phân tích hóa - lý. Nguyên tắc của phương pháp là so sánh chế phẩm cần định lượng với một chế phẩm chuẩn để xác định lượng chế phẩm cần định lượng cho cùng tác động sinh học với lượng đã cho, tính bằng đơn vị, của chế phẩm chuẩn. Để đảm bảo độ chính xác của kết quả định lượng, các phép thử được tiến hành với chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng phải thực hiện đồng thời và trong cùng điều kiện thí nghiệm.

Bất kỳ một định giá nào của thử nghiệm sinh học luôn luôn mắc phải sai số ngẫu nhiên do tính biến thiên vốn có của đáp ứng sinh học, do đó nếu có thể, khi tính kết quả của mỗi thử nghiệm phải tính sai số, kể cả khi dùng phương pháp chính thức. Vì vậy, trong chuyên luận này có hướng dẫn các phương pháp thiết kế thử nghiệm và cách tính sai số. Các phương pháp tính toán trình bày ở đây chỉ tính đến sai số ngẫu nhiên gây ra bởi các sinh vật thử và giá định rằng các sai số hệ thống, ví dụ sai số do cân, pha loãng... là rất nhỏ và không ảnh hưởng đáng kể đến kết quả định lượng (do đó phải có biện pháp thích hợp để giảm sai số hệ thống đến mức có thể chấp nhận được). Trong mọi trường hợp, trước khi áp dụng một phương pháp thống kê bất kỳ, phải tiến hành thử sơ bộ một số lần thích hợp để bảo đảm chắc chắn tính khả dụng của phương pháp đó.

Độ chính xác của kết quả thử nghiệm sinh học được xác định bởi các giới hạn tin cậy, hoặc là khoảng tin cậy của hoạt lực. Giới hạn tin cậy ở xác suất 95 % thường được chọn trong các thử nghiệm sinh học, do đó cũng được chọn trong chuyên luận này. Khoảng tin cậy tính bằng các phương pháp toán thống kê giới thiệu ở đây có khả năng chứa hoạt lực thật của chế phẩm cần định lượng với xác suất 95 %. Một số chuyên luận Dược điển qui định giới hạn tin cậy phải không được vượt quá một ngưỡng nhất định, ví dụ phải nằm trong khoảng từ 95 % đến 105 % so với hoạt lực tính được, trong một số trường hợp cần phải lặp lại thử nghiệm hai hay nhiều lần để đạt được giới hạn tin cậy cho phép.

Chú giải các ký hiệu dùng trong chuyên luận này được trình bày trong bảng ở phần cuối của chuyên luận.

2. Ngẫu nhiên hóa

Việc phân bố những xử lý (liều, nồng độ...) khác nhau của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử cho các đơn vị thí nghiệm (ví dụ động vật thí nghiệm, ống nghiệm,...) phải được thực hiện một cách hoàn toàn ngẫu nhiên. Bất kỳ một sự lựa chọn nào khác về những điều kiện thí nghiệm (ví dụ chọn lựa cân nặng, tuổi của động vật thí nghiệm, điều kiện môi trường thí nghiệm,...), cũng không được phép cố ý trong thiết kế thí nghiệm mà đều phải lựa chọn ngẫu nhiên. Chọn vị trí của chuồng nuôi động vật thí nghiệm trong phòng thí nghiệm, trình tự dùng các xử lý cũng phải được thực hiện một cách ngẫu nhiên.

Ngẫu nhiên hóa có thể thực hiện bằng cách ném xúc xắc, xào các lá bài có đánh số, dùng bảng số ngẫu nhiên hay các phần mềm vi tính thích hợp.

3. Các thử nghiệm dựa trên đáp ứng định lượng

3.1 Mô hình thống kê

3.1.1 Nguyên tắc chung

Hai mô hình thống kê thường dùng trong các thử nghiệm sinh học là mô hình đường thẳng song song và mô hình tỷ lệ độ dốc. Trong chuyên luận này chỉ giới thiệu mô hình đường thẳng song song. Để tìm hiểu thêm về mô hình còn lại, xin tham khảo Dược điển châu Âu IX hay các tài liệu thống kê khác.

Chỉ có thể áp dụng mô hình thống kê đường thẳng song song nếu thử nghiệm hội đủ các điều kiện sau:

- 1) Các xử lý khác nhau của chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng đã được phân bố ngẫu nhiên cho từng đơn vị thí nghiệm;
- 2) Các đáp ứng của mỗi xử lý tuân theo phân phối chuẩn;
- 3) Độ lệch chuẩn của các đáp ứng trong mỗi nhóm xử lý của cả chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng không khác nhau có ý nghĩa.

Khi thử nghiệm được triển khai sử dụng, nhà phân tích phải xác định xem các số liệu thu thập được từ nhiều thử nghiệm có thỏa mãn các điều kiện lý thuyết sau không:

Điều kiện 1 có thể thỏa mãn nếu thực hiện đúng theo các hướng dẫn trình bày ở mục 2 (Ngẫu nhiên hóa).

Điều kiện 2 là một giả định mà trong thực tế hầu như đều được thỏa mãn. Những sai lệch nhỏ so với giả định này nói chung không gây ảnh hưởng lớn đến kết quả, nếu mỗi xử lý được tiến hành nhiều thí nghiệm lặp lại.

Điều kiện 3 có thể được kiểm tra bằng phép thử tính đồng nhất của các phương sai, ví dụ bằng phép kiểm Bartlett hoặc phép kiểm Hartley (xem các ví dụ trong mục 3.2.8).

Nếu điều kiện 2 và/hoặc điều kiện 3 không thỏa mãn, chuyển đổi đáp ứng y bằng $\ln(y)$, \sqrt{y} hay y^{-1} có thể cho kết quả tốt. Phép chuyển đổi y thành $\ln(y)$ rất hữu ích trong trường hợp tính đồng nhất của các phương sai không thỏa mãn. Phép chuyển đổi này cũng giúp cải thiện tính chuẩn nếu phân phối bị lệch về bên phải.

Sự chuyển đổi y thành \sqrt{y} thường được dùng khi các quan sát tuân theo phân phối Poisson, ví dụ khi các quan sát thu được bằng phương pháp đếm.

3.1.2 Các thử nghiệm thường nhật

Trong các thử nghiệm thường nhật, rất khó kiểm tra một cách hệ thống các điều kiện lý thuyết mô tả ở mục 3.1.1, bởi vì trong thực tế số quan sát trong một thử nghiệm thường nhỏ do đó ảnh hưởng đến độ nhạy của các phép kiểm thống kê. Tuy nhiên, trong những thử nghiệm cân xứng (là những thử nghiệm có số xử lý của chế phẩm chuẩn bằng với số xử lý của chế phẩm cân định lượng, ví dụ: thử nghiệm $2 + 2, 3 + 3, \dots$) những sai lệch nhỏ so với tính chuẩn hay so với tính đồng nhất của phương sai không ảnh hưởng lớn đến kết quả thử nghiệm. Do đó, chỉ cần kiểm tra lại các điều kiện lý thuyết nói trên khi một loạt các thử nghiệm liên tiếp không thỏa mãn phép kiểm tính có giá trị (xem mục 3.2.4).

Ngoài 3 điều kiện lý thuyết đã nói trên, mô hình đường thẳng song song còn yêu cầu mỗi thử nghiệm phải thỏa mãn thêm 2 điều kiện sau:

- 4) Đường biểu diễn mối quan hệ giữa logarit liều và đáp ứng phải tuyến tính trong khoảng liều đã dùng.
- 5) Đường thẳng $\ln(\text{liều})$ - đáp ứng của chế phẩm cân định lượng phải song song với đường $\ln(\text{liều})$ - đáp ứng của chế phẩm chuẩn.

Chỉ có thể kiểm tra điều kiện 4 và 5 nếu thử nghiệm được tiến hành với ít nhất 3 nồng độ pha loãng của mỗi chế phẩm (định lượng 3 liều hay lớn hơn). Tuy nhiên, nếu tính tuyến tính của đường logarit liều - đáp ứng, trong một khoảng liều nhất định, đã được chứng minh bởi một số lượng đủ lớn các thử nghiệm có 3 liều trở lên, có thể tiến hành thử nghiệm chỉ với 2 liều của mỗi chế phẩm (thử nghiệm 2 liều) trong các thử nghiệm hàng ngày, dùng trong khoảng liều đã cho.

Trước khi tính hoạt lực và các giới hạn tin cậy, cần phải tiến hành phân tích phương sai để kiểm tra xem thử nghiệm có đáp ứng các điều kiện 4 và 5 hay không.

Các thử nghiệm dựa trên mô hình thống kê đường thẳng song song được trình bày trong mục 3.2.

Nếu có bất cứ điều kiện nào trong 5 điều kiện nói trên không thỏa mãn, các phương pháp tính toán giới thiệu ở đây sẽ không có giá trị. Khi đó, phải tiến hành rà soát lại các kỹ thuật thử nghiệm để tìm ra nguyên nhân.

Nếu các phép kiểm thống kê cho thấy bất kỳ một điều kiện nào trong 5 điều kiện nói trên không thỏa mãn, không được chuyển ngay sang một phép chuyển đổi khác, trừ khi có đủ bằng chứng rằng nguyên nhân gây ra hiện tượng đó không phải do ngẫu nhiên mà là kết quả của một sự thay đổi có hệ thống của các điều kiện thí nghiệm. Trước khi áp dụng một phép chuyển đổi mới vào các thử nghiệm thường nhật, phải lặp lại phép kiểm thống kê đã trình bày ở mục 3.1.1.

Để thu được một kết quả thử nghiệm đáng tin cậy, có thể phải tiến hành một vài thử nghiệm độc lập, sau đó phối hợp các kết quả thử nghiệm lại với nhau (xem mục 4 - Phối hợp các kết quả thử nghiệm).

Nhằm mục đích kiểm soát chất lượng của các thử nghiệm hàng ngày, nên ghi các trị định giá về độ dốc hồi qui và sai số dư dưới dạng biểu đồ kiểm tra.

Nếu sai số dư lớn một cách bất thường, nguyên nhân đầu tiên phải nghĩ đến là có sai sót kỹ thuật nào đó. Nếu các khảo sát khẳng định có sai sót trong quá trình thử nghiệm, phải lặp lại thử nghiệm. Sai số dư cũng có thể rất lớn nếu trong dãy số liệu đó có một giá trị bất thường. Chỉ được loại bỏ giá trị nghi ngờ là bất thường nếu giá trị đó khác có ý nghĩa thống kê với các giá trị còn lại.

Một sai số dư nhỏ bất thường có thể xảy ra một lần hoặc một lúc nào đó làm cho các tỷ số F vượt quá giá trị tới hạn. Trong những trường hợp như vậy, có thể thay sai số dư định giá được của từng thử nghiệm riêng bằng một sai số dư trung bình dựa vào các số liệu trước đó trong biểu đồ kiểm tra.

3.1.3 Cách tính toán và những hạn chế

Dưới đây là 3 hạn chế áp đặt cho mỗi thử nghiệm nhằm làm đơn giản hóa việc tính toán và làm tăng độ chính xác của thử nghiệm:

- a) Số nồng độ pha loãng của mỗi chế phẩm trong một thử nghiệm phải bằng nhau;
- b) Tỷ lệ giữa các liều kế tiếp nhau phải là một hằng số đối với tất cả các xử lý trong một thử nghiệm, ví dụ: $S_1/S_2 = S_2/S_3 = \dots = Z_3/Z_2$;
- c) Số các đơn vị thí nghiệm của mỗi xử lý phải bằng nhau.

Các công thức tính toán áp dụng cho một thiết kế thử nghiệm tuân thủ đúng 3 hạn chế nêu trên được giới thiệu ở mục 3.2. Đối với các thiết kế thử nghiệm không tuân theo các hạn chế đã nêu, các công thức tính toán sẽ rất phức tạp và không được giới thiệu trong chuyên luận này.

Trong mục 3.2.8 có trình bày một số ví dụ để minh họa về phương pháp tính thống kê. Có thể dùng các số liệu trong các ví dụ đó để kiểm tra các phần mềm dùng trong phân tích thống kê kết quả thử nghiệm sinh học.

3.2 Mô hình đường thẳng song song

3.2.1 Giới thiệu

Mô hình đường thẳng song song dựa trên quan hệ tuyến tính giữa đáp ứng Y và logarit X của liều D .

$$Y = a + bX$$

Trong đó:

Y là đáp ứng mong đợi;

X là $\ln(\text{liều}) = \ln(D)$;

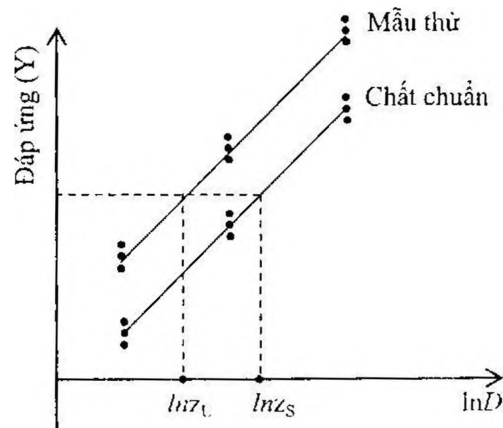
a và b là các hằng số.

Mô hình đường thẳng song song có thể được minh họa bởi đồ thị trong Hình 13.10.1. Trên đồ thị, trục hoành biểu diễn các logarit liều với nồng độ thấp ở bên trái và nồng độ cao ở bên phải, trục tung biểu diễn các đáp ứng đo được. Các đáp ứng riêng của mỗi xử lý được biểu thị bằng các chấm đen. Hai đường trên đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa logarit liều và đáp ứng tính được của chế phẩm chuẩn và chế phẩm cần định lượng.

Từ trục tung kẻ một đường thẳng bất kỳ song song với trục hoành, cắt hai đường $\ln(\text{liều})$ - đáp ứng tại hai điểm có hoành độ là $\ln z_S$ và $\ln z_U$, đây là hai logarit nồng độ hoặc logarit liều của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử cho cùng đáp ứng sinh học.

Để cho thử nghiệm thỏa mãn, hoạt lực giả định của chế phẩm thử phải gần với hoạt lực thực. Dựa vào hoạt lực giả định này và hoạt lực ấn định của chế phẩm chuẩn, pha các độ pha loãng có hoạt lực tương đương sao cho hoạt lực Z_U của chế phẩm thử U bằng hoạt lực Z_S của chế phẩm chuẩn S .

Khoảng cách nằm ngang giữa 2 đường thẳng: $\ln(z_S) - \ln(z_U)$ là hoạt lực thực của chế phẩm thử so với hoạt lực giả định của nó. Nếu đường thẳng của chế phẩm thử ở bên phải của chế phẩm chuẩn, hoạt lực giả định đã được định giá quá cao và việc tính toán sẽ cho hoạt lực định giá được thấp hơn hoạt lực giả định; cũng tương tự nếu đường thẳng của chế phẩm thử ở bên trái của chế phẩm chuẩn, hoạt lực giả định đã được định giá quá thấp và việc tính toán sẽ cho hoạt lực định giá được cao hơn hoạt lực giả định. Trong một thử nghiệm, nếu đoạn thẳng $\ln(z_S) - \ln(z_U)$ càng nhỏ, hoạt lực giả định của chế phẩm cần thử nghiệm càng gần với hoạt lực thật của nó và kết quả thử nghiệm sẽ càng chính xác.



Hình 13.10.1 - Mô hình đường thẳng song song của một thử nghiệm 3 + 3.

Chú ý: Logarit tự nhiên \ln (hay \log_e) được sử dụng xuyên suốt trong chuyên luận này, do đó, antilogarit tương đương với e^x . Tuy vậy, nếu muốn, hoàn toàn có thể dùng logarit cơ số 10 (hay \log_{10}) thay cho \ln , khi đó, antilogarit tương ứng với 10^x .

3.2.2 Thiết kế thử nghiệm

Các thử nghiệm sinh học có thể được thiết kế theo một số cách khác nhau như trình bày dưới đây.

3.2.2.1 Thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn

Nếu toàn bộ các đơn vị thí nghiệm (động vật, ống nghiệm,...) tương đối đồng nhất, việc phân chia các đơn vị thí nghiệm cho các xử lý khác nhau phải được tiến hành một cách ngẫu nhiên, ví dụ dùng bảng hoán vị ngẫu nhiên.

Nếu chia các đơn vị thí nghiệm thành các phân nhóm, ví dụ theo vị trí vật lý hay theo ngày thí nghiệm, nên chia theo cách tính đồng nhất hơn là chỉ xét đến số lượng các đơn vị thí nghiệm, ta có thể tăng độ chính xác của thử nghiệm bằng cách áp dụng một hoặc nhiều hạn chế trong cách thiết kế thí nghiệm. Sự phân chia các đơn vị thí nghiệm theo các hạn chế đó cho phép loại bỏ những nguồn gây sai số không liên quan.

3.2.2.2 *Thiết kế ngẫu nhiên theo khối*

Trong kiểu thiết kế thí nghiệm này, có thể tách các nguồn biến thiên ra khỏi sai số toàn phần, ví dụ biến thiên do sự nhạy cảm giữa các lứa động vật thí nghiệm hoặc biến thiên giữa các hộp Petri trong định lượng vi sinh vật bằng phương pháp khuếch tán. Thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối đòi hỏi mỗi khối (lứa động vật hoặc hộp Petri) phải có số xử lý bằng nhau và chỉ thích hợp nếu khối đủ lớn để có thể chứa tất cả các xử lý của thử nghiệm.

Bảng 13.10.6 trình bày công thức tính toán áp dụng cho các thử nghiệm thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối, trong đó mỗi xử lý chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi khối (thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối không lặp). Ví dụ minh họa cho kiểu thiết kế thí nghiệm này được trình bày trong ví dụ 3.2.8.2.

3.2.2.3 *Thiết kế hình vuông Latin*

Kiểu thiết kế thí nghiệm này thích hợp với những thử nghiệm mà đáp ứng chịu ảnh hưởng của 2 nguồn biến thiên khác nhau, trong đó mỗi nguồn biến thiên có k mức hay k vị trí khác nhau. Ví dụ, trong định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán, các xử lý có thể được sắp xếp thành $k \times k$ dãy trên một khay lớn, mỗi xử lý chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi hàng và mỗi cột. Chỉ có thể áp dụng kiểu thiết kế thí nghiệm hình vuông Latin khi số hàng, số cột và số xử lý của mỗi chế phẩm đều phải bằng nhau.

Các đáp ứng được ghi vào một bảng hình vuông gọi là hình vuông Latin. Biến thiên do sự khác nhau về đáp ứng giữa k hàng và giữa k cột sẽ được tách khỏi biến thiên toàn phần, do đó làm giảm sai số của định lượng.

Bảng 13.10.6 trình bày công thức tính toán áp dụng cho các thử nghiệm hình vuông Latin, trong đó mỗi xử lý chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi hàng và mỗi cột. Ví dụ minh họa cho kiểu thiết kế thí nghiệm này được trình bày trong ví dụ 3.2.8.3.

3.2.2.4 *Thiết kế chéo*

Kiểu thiết kế thí nghiệm này được áp dụng trong trường hợp thí nghiệm có thể chia thành các khối, nhưng mỗi khối chỉ có thể nhận hai xử lý, ví dụ một khối là một đơn vị thí nghiệm được thử hai lần vào hai thời điểm khác nhau. Mục đích của kiểu thiết kế chéo là làm tăng độ chính xác của thử nghiệm bằng cách loại trừ ảnh hưởng do sự khác nhau giữa các đơn vị thí nghiệm. Nếu thử nghiệm tiến hành với 2 liều của chế phẩm chuẩn và 2 liều của chế phẩm cần định lượng, ta có kiểu thí nghiệm chéo đôi.

Bảng 13.10.1 - Cách sắp xếp các liều trong thiết kế thí nghiệm chéo

Nhóm các đơn vị thí nghiệm	Giai đoạn I	Giai đoạn II
1	s_1	u_2
2	s_2	u_1
3	u_1	s_2
4	u_2	s_1

Trong thiết kế chéo đôi, thử nghiệm được chia thành hai giai đoạn, mỗi giai đoạn tiến hành vào những thời điểm khác nhau. Các đơn vị thí nghiệm được chia thành bốn nhóm, mỗi nhóm nhận một trong bốn xử lý ở giai đoạn đầu của thí nghiệm. Đơn vị nhận một chế phẩm trong giai đoạn đầu sẽ nhận chế phẩm khác trong giai đoạn sau, và các đơn vị nhận liều thấp trong giai đoạn đầu sẽ nhận liều cao trong giai đoạn sau. Cách sắp xếp các liều cho ở Bảng 13.10.1. Ví dụ minh họa cho kiểu thiết kế thí nghiệm này được trình bày trong Ví dụ 3.2.8.4.

3.2.3 *Phân tích phương sai*

Mục này trình bày các công thức cần thiết để phân tích phương sai. Người đọc sẽ dễ hiểu hơn khi tham khảo thêm các ví dụ ở mục 3.2.8 và Bảng ghi chú các ký hiệu ở mục 6.

Các công thức trình bày ở đây có thể áp dụng cho các định lượng đối xứng trong đó một hay nhiều chế phẩm cần thử (U, \dots, Z) được so sánh với cùng một chế phẩm chuẩn S , với điều kiện thử nghiệm phải đáp ứng được các điều kiện sau:

- 1) tỷ lệ giữa các liều kế tiếp nhau của tất cả các chế phẩm phải là một hằng số;
- 2) số xử lý của mỗi chế phẩm và 3) số đơn vị thí nghiệm (số thử nghiệm lặp lại) trong mỗi xử lý phải bằng nhau (xem mục 3.1.3).

Ngoại trừ một vài khác biệt nhỏ trong cách tính sai số dư, phương pháp phân tích các số liệu của mỗi thử nghiệm sinh học về cơ bản là giống nhau đối với các kiểu thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên hoàn toàn, ngẫu nhiên theo khối và hình vuông Latin. Thiết kế thí nghiệm chéo có công thức tính hoàn toàn khác và do đó được trình bày trực tiếp trong Ví dụ 3.2.8.4.

Để chuẩn bị số liệu cho phân tích phương sai, đầu tiên phải tính tổng đáp ứng của mỗi liều, tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (*linear contrast*) của mỗi chế phẩm; đối với các định lượng có nhiều hơn hai liều của mỗi chế phẩm, cần tính thêm tương phản bậc hai (*quadratic contrast*). Các Bảng 13.10.2, 13.10.3 và 13.10.4 trình bày các công thức tính đó.

Bảng 13.10.2 - Công thức tính toán cho các thử nghiệm hai liều đa chế phẩm

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử thứ nhất U	Chế phẩm thử thứ (h - 1) Z
Tổng đáp ứng của liều thấp	S_1	U_1	Z_1
Tổng đáp ứng của liều cao	S_2	U_2	Z_2
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S_1 + S_2 = S$	$U_1 + U_2 = U$	$Z_1 + Z_2 = Z$
Tương phản tuyến tính	$S_2 - S_1 = L_S$	$U_2 - U_1 = L_U$	$Z_2 - Z_1 = L_Z$

Bảng 13.10.3 - Công thức tính toán cho các thử nghiệm ba liều đa chế phẩm

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử thứ nhất U	Chế phẩm thử thứ (h - 1) Z
Tổng đáp ứng của liều thấp	S_1	U_1	Z_1
Tổng đáp ứng của liều trung gian	S_2	U_2	Z_2
Tổng đáp ứng của liều cao	S_3	U_3	Z_3
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S_1 + S_2 + S_3 = S$	$U_1 + U_2 + U_3 = U$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 = Z$
Tương phản tuyến tính	$S_3 - S_1 = L_S$	$U_3 - U_1 = L_U$	$Z_3 - Z_1 = L_Z$
Tương phản bậc hai	$S_1 - 2S_2 + S_3 = Q_S$	$U_1 - 2U_2 + U_3 = Q_U$	$Z_1 - 2Z_2 + Z_3 = Q_Z$

Bảng 13.10.4 - Công thức tính toán cho các thử nghiệm bốn liều đa chế phẩm

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử thứ nhất U	Chế phẩm thử thứ (h - 1) Z
Tổng đáp ứng của liều thấp nhất	S_1	U_1	Z_1
Tổng đáp ứng của liều thứ hai	S_2	U_2	Z_2
Tổng đáp ứng của liều thứ ba	S_3	U_3	Z_3
Tổng đáp ứng của liều cao nhất	S_4	U_4	Z_4
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S_1 + S_2 + S_3 + S_4 = S$	$U_1 + U_2 + U_3 + U_4 = U$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 = Z$
Tương phản tuyến tính	$3S_4 + S_3 - S_2 - 3S_1 = L_S$	$3U_4 + U_3 - U_2 - 3U_1 = L_U$	$3Z_4 + Z_3 - Z_2 - 3Z_1 = L_Z$
Tương phản bậc hai	$S_1 - S_2 - S_3 + S_4 = Q_S$	$U_1 - U_2 - U_3 + U_4 = Q_U$	$Z_1 - Z_2 - Z_3 + Z_4 = Q_Z$
Tương phản bậc ba	$3S_2 - S_1 + S_4 - 3S_3 = J_S$	$3U_2 - U_1 + U_4 - 3U_3 = J_U$	$3Z_2 - Z_1 + Z_4 - 3Z_3 = J_Z$

Trong bước kế tiếp, biến thiên toàn phần của thử nghiệm, còn gọi là sai số chung, được phân tích thành các biến thiên riêng phần như trình bày ở Bảng 13.10.5, các tổng các bình phương được tính từ các giá trị thu được ở các Bảng 13.10.2, 13.10.3 và 13.10.4.

Bảng 13.10.5 - Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Nguồn biến thiên	Bậc tự do (f)	Tổng các bình phương		
		2 liều/chế phẩm	3 liều/chế phẩm	4 liều/chế phẩm
Chế phẩm	h - 1	$\frac{S^2 + U^2 + \dots + Z^2}{2n} - K$	$\frac{S^2 + U^2 + \dots + Z^2}{3n} - K$	$\frac{S^2 + U^2 + \dots + Z^2}{4n} - K$
Hồi qui tuyến tính	1	$\frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{2nh} = F$	$\frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{2nh} = F$	$\frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{20nh} = E$
Tính không song song	h - 1	$\frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{2n} - E$	$\frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{2n} - E$	$\frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{20n} - E$
Tính không tuyến tính (Độ cong)	h (3 liều) 2h (4 liều)		$\frac{Q_S^2 + Q_U^2 + \dots + Q_Z^2}{6n}$	$\frac{Q_S^2 + Q_U^2 + \dots + Q_Z^2}{4n} + \frac{J_S^2 + J_U^2 + \dots + J_Z^2}{20n}$

Tính sai số dư (*residual error*) bằng cách lấy sai số toàn phần của thử nghiệm trừ đi các sai số riêng của các nguồn biến thiên khác nhau (Bảng 13.10.6), nguồn biến thiên có thể nhận dạng được tùy theo kiểu thiết kế thí nghiệm trong Bảng 13.10.6, $\sum y^2$ là tổng bình phương của tất cả các đáp ứng đo được trong thử nghiệm, K là đại lượng để hiệu chỉnh:

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N}$$

Kết thúc phân tích phương sai bằng cách chia các tổng các bình phương tính được từ Bảng 13.10.5 cho bậc tự do tương ứng để được các bình phương trung bình.

Bình phương trung bình của sai số dư cũng được tính theo cách tương tự, dùng số liệu tương ứng ở Bảng 13.10.6. Bình phương trung bình của mỗi biến số cần kiểm tra sẽ được biểu diễn dưới dạng một tỷ số với sai số dư s^2 , gọi là tỷ số F . Đánh giá mức ý nghĩa của các tỷ số F bằng cách so sánh F tính được (viết tắt là F_{cal}) với giá trị F tới hạn (viết tắt là F_{crit}) tra từ Bảng 13.10.7 hay bằng cách dùng các phần mềm vi tính thích hợp. Nếu dùng bảng tra cứu, đọc F_{crit} từ Bảng 13.10.7 tại giao điểm giữa cột tương ứng với bậc tự do của bình phương trung bình của biến số cần kiểm tra (f_1) và hàng tương ứng với bậc tự do của s^2 (f_2). Biến số cần kiểm tra được coi là có ý nghĩa nếu $F_{cal} > F_{crit}$ ở xác suất $P = 0.05$ hay rất có ý nghĩa nếu $F_{cal} > F_{crit}$ ở xác suất $P = 0.01$.

Bảng 13.10.6 - Định giá của sai số dư

Nguồn biến thiên	Bậc tự do (f)	Tổng các bình phương		
		Ngẫu nhiên hoàn toàn	Ngẫu nhiên theo khối	Hình vuông Latin
Giữa các xử lý	$k - 1$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$
Giữa các khối (hàng)	$n - 1$	-	$\frac{R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2}{k} - K$	$\frac{R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2}{k} - K$
Giữa các khối (cột)	$n - 1$	-	-	$\frac{C_1^2 + C_2^2 + \dots + C_r^2}{k} - K$
Sai số dư	Hiệu số	*	*	*
Sai số toàn phần	$N - 1$	$\sum y^2 - K$	$\sum y^2 - K$	$\sum y^2 - K$

* Lấy sai số toàn phần trừ đi các tổng các bình phương tương ứng của mỗi phương pháp thiết kế thí nghiệm.

Bảng 13.10.7 - Giá trị tới hạn của tỷ số F

f_2		f_1									
		1	2	3	4	5	6	7	8	20	∞
12	12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,54	2,30
	15	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	3,86	3,36
	20	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,33	2,07
	25	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,37	2,87
	30	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,12	1,84
	40	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	2,94	2,42
	50	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,01	1,71
	60	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	2,70	2,17
	70	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	1,93	1,62
	80	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	2,55	2,01
15	15	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	1,84	1,51
	20	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,37	1,80
	25	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	1,75	1,39
	30	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,20	1,60
20	20	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,57	1,00
	25	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,20	1,60

* Nếu F tính được $> F$ tới hạn, biến số cần kiểm tra được coi là có ý nghĩa (dòng trên, $p = 0,05$) hay rất có ý nghĩa (dòng dưới, $p = 0,01$), f_1 là bậc tự do của tử số, f_2 là bậc tự do của mẫu số.

3.2.4. *Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm*

Kết quả thử nghiệm được coi là có giá trị thống kê (*statistically valid*) nếu:

- 1) Đại lượng hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa, $F_{cal} > F_{crit}$ ở xác suất $P = 0,01$ ($P < 0,01$), chứng tỏ độ dốc của đường ln(liều) - đáp ứng rất khác 0.
- 2) Đại lượng không tuyến tính (*non-linearity*) phải không có ý nghĩa, $F_{cal} < F_{crit}$ ở xác suất 0,05 ($P > 0,05$), chứng tỏ thoả mãn điều kiện 4, tức là các đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn \underline{S} và các chế phẩm thử ($\underline{U}, \dots, \underline{Z}$) thẳng.
- 3) Đại lượng không song song (*non-parallelism*) phải không có ý nghĩa, $F_{cal} < F_{crit}$ ở xác suất 0,05 ($P > 0,05$), chứng tỏ thử nghiệm đáp ứng điều kiện 5, hay nói cách khác các đường ln(liều) - đáp ứng của các chế phẩm thử ($\underline{U}, \dots, \underline{Z}$) song song với đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn \underline{S} .

Nếu đại lượng không song song có ý nghĩa trong một thử nghiệm có h chế phẩm, kể cả chế phẩm chuẩn, một trong số các chế phẩm cần thử có thể có độ dốc của đường ln(liều) - đáp ứng khác với các chế phẩm còn lại. Tính t' (phép kiểm Dunnett) của mỗi chế phẩm cần định lượng ($\underline{U}, \dots, \underline{Z}$) theo công thức:

$$t' = \frac{L_S - L_U}{2\sqrt{ns^2}} \quad (3.2.4.-1)$$

Đối với các thử nghiệm có bốn liều đơn chế phẩm, tính t' theo công thức:

$$t' = \frac{L_S - L_U}{2\sqrt{10}ns^2}$$

So sánh mỗi t' tính được với giá trị tới hạn đọc từ Bảng 13.10.8, với $f_1 = h - 1$, f_2 là bậc tự do của s^2 . Nếu t' có ý nghĩa thống kê với một chế phẩm bất kỳ, loại bỏ tất cả các số liệu liên quan đến chế phẩm đó và lặp lại từ đầu phép kiểm tính có giá trị với các chế phẩm còn lại.

Bảng 13.10.8 - Giá trị tới hạn của t'

		$f_1 = (h - 1) = \text{số chế phẩm cần định lượng}$								
f_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97	
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71	
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53	
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41	
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32	
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24	
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19	
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14	
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10	
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07	
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04	
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02	
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00	
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98	
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96	
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95	
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90	
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86	
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81	
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77	
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73	
∞	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69	

Biến thiên do chế phẩm không được dùng trong phép thử tính có giá trị của thử nghiệm, tuy nhiên, trong những thử nghiệm mà sai số dư lớn một cách bất thường và tỷ số F của nguồn biến thiên do chế phẩm cao rất có ý nghĩa, hoạt lực giả định của chế phẩm cần định lượng rất khác với hoạt lực thật của nó, cần phải lập lại thử nghiệm dùng hoạt lực tính được làm hoạt lực giả định.

Nếu thử nghiệm thỏa mãn phép thử tính có giá trị, hay nói cách khác, thử nghiệm có giá trị thống kê, hoạt lực và các giới hạn tin cậy có thể được định giá bằng các phương pháp mô tả trong mục kê tiếp.

3.2.5 Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

Đề định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy, trước hết phải tính đáp ứng trung bình của mỗi chế phẩm ($\bar{y}_S, \bar{y}_L, \dots, \bar{y}_Z$):

$$\bar{y}_S = \frac{S}{N_S} \tag{3.2.5.-1}$$

Tiến hành tương tự như vậy với các chế phẩm khác.

Gọi I là khoảng cách giữa \ln các liều kế tiếp nhau của một chế phẩm bất kỳ (I là hằng số trong một thử nghiệm), ví dụ $I = \ln(S_2) - \ln(S_1)$, độ dốc chung (b) của một thử nghiệm bao gồm h chế phẩm, mỗi chế phẩm có d liều khác nhau được tính theo công thức:

$$b = \frac{L_S + L_L + \dots + L_Z}{(d-1)Ibh} \tag{3.2.5.-2}$$

Đối với các thử nghiệm bốn liều đơn chế phẩm, tính b theo công thức:

$$b = \frac{L_S + L_L + \dots + L_Z}{10Ibh}$$

\ln (tỷ lệ hoạt lực) của chế phẩm cần định lượng U được tính theo công thức:

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} \tag{3.2.5.-3}$$

Gọi A_U là hoạt lực giả định của chế phẩm U , logarit hoạt lực của U (M_U) sẽ bằng:

$$M_U = M'_U + \ln(A_U) \tag{3.2.5.-4}$$

Hoạt lực tính được là ước lượng của hoạt lực thật của mỗi chế phẩm cần định lượng. Các giới hạn tin cậy của hoạt lực tính được là khoảng chứa hoạt lực thật của chế phẩm cần định lượng với xác suất 95%. Logarit của các giới hạn tin cậy được tính theo công thức sau:

$$\ln(A_U) + CM'_U \pm \frac{M\sqrt{C}}{b} \sqrt{\frac{1}{N_S} + \frac{1}{N_U} + \frac{(\bar{y}_S - \bar{y}_U)^2}{E - s^2t^2}} \tag{3.2.5.-5}$$

với: $C = \frac{E}{E - s^2t^2}$ (3.2.5.-6)

E là giá trị tính được từ Bảng 13.10.5, tính s^2 bằng cách chia tổng các bình phương của biến số sai số dư trong Bảng 13.10.6 cho bậc tự do tương ứng của nó, t là giá trị đọc được từ Bảng 13.10.28 với xác suất $P = 0,95$ và f là bậc tự do của s^2 .

Trong những thử nghiệm đối xứng, công thức tính các giới hạn tin cậy có thể đơn giản hóa thành:

$$\ln(A_U) + CM'_U \pm \sqrt{(C-1)(CM_U^2 + 2H)} \tag{3.2.5.-7}$$

với: $H = \frac{E}{b^2dn}$

Trong đó:

C là tiêu chí đánh giá ý nghĩa của đường hồi qui. Trong một thử nghiệm có độ dốc đạt yêu cầu, giá trị của C rất gần với 1. Nếu $C < 0$ hồi qui tuyến tính không có ý nghĩa.

Tính định giá hoạt lực của chế phẩm U (R_U) và các giới hạn tin cậy của nó bằng cách lấy antilogarit các giá trị tính được từ các công thức 3.2.5.-4 và 3.2.5.-7.

$$R_U = \text{anti ln}(M_U) \quad (3.2.5-8)$$

$$FL_U = \text{anti ln} \left(\ln(A_U) + CM'_U + \sqrt{(C-1)(CM_U^2 + 2H)} \right) \quad (3.2.5-9)$$

$$FL_L = \text{anti ln} \left(\ln(A_L) + CM'_L - \sqrt{(C-1)(CM_L^2 + 2H)} \right) \quad (3.2.5-10)$$

FL_U là giới hạn tin cậy trên và FL_L là giới hạn tin cậy dưới của hoạt lực tính được R_U .

Nếu nồng độ dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử không hoàn toàn bằng nhau, phải hiệu chỉnh hoạt lực tính được và các giới hạn tin cậy với một hệ số, gọi là hệ số hiệu chỉnh (xem Ví dụ 3.2.8.3). Hệ số hiệu chỉnh là tỷ số giữa nồng độ dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn và nồng độ dung dịch gốc của mỗi chế phẩm cần định lượng.

3.2.6 Các giá trị bị mất

Trong một thử nghiệm đối xứng, một sự cố ngẫu nhiên có thể dẫn đến việc mất một hay nhiều giá trị đo, ví dụ động vật thí nghiệm chết, vòng vô khuẩn bị méo không đo được trong một thử nghiệm kháng sinh... Nếu sự cố xảy ra không liên quan đến thành phần của chế phẩm đã sử dụng, vẫn có thể tính được kết quả định lượng một cách chính xác, tuy nhiên khi đó các công thức tính toán sẽ trở nên rất phức tạp. Để có thể tiếp tục dùng các công thức tính toán đơn giản của thiết kế thí nghiệm đối xứng, có thể áp dụng một trong hai cách sau:

1) Nếu số đáp ứng của mỗi xử lý đủ lớn, giảm số đáp ứng trong các xử lý có số đáp ứng lớn hơn cho đến khi số đáp ứng của tất cả các xử lý bằng nhau. Nếu động vật thí nghiệm đã được phân bố một cách ngẫu nhiên cho mỗi xử lý, bỏ một hay vài đáp ứng, được chọn ngẫu nhiên, từ các xử lý có số đáp ứng lớn sẽ thu được thử nghiệm đối xứng. Đối với các thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối, cách đơn giản nhất là bỏ tất cả các đáp ứng của khối có giá trị bị mất. Ví dụ, chỉ giữ lại kết quả đo của các hộp Petri có đủ 6 vòng vô khuẩn trong thử nghiệm kháng sinh 3 + 3 bằng phương pháp khuếch tán, dùng hộp Petri.

2) Thay các giá trị bị mất bằng các giá trị tính được từ những giá trị còn lại. Công thức tính các giá trị mất được trình bày ở bên dưới. Số bậc tự do của sai số toàn phần và sai số dư sẽ phải giảm đi một đơn vị cho mỗi giá trị bị mất. Cần nhớ rằng đây chỉ là phương pháp gần đúng, phương pháp chính xác luôn luôn cho kết quả đáng tin cậy hơn.

Nếu có nhiều quan sát bị mất, thay tất cả các giá trị bị mất, trừ một quan sát, bằng các giá trị ước lượng thô và dùng công thức thích hợp để tính giá trị của quan sát đó dựa trên các giá trị còn lại, kể cả các giá trị ước lượng thô. Thay quan sát bị mất bằng giá trị vừa tính được. Tiếp tục tính theo cách trên với giá trị ước đoán thô thứ nhất... Sau khi đã thay thế lần lượt tất cả các quan sát bị mất, lặp lại từ đầu chu trình tính toán, mỗi lần tính dùng một giá trị ước đoán hoặc giá trị tính được cho đến khi hai chu trình kế tiếp nhau cho cùng kết quả.

Kết quả thử nghiệm chỉ được chấp nhận nếu số các giá trị thay thế tương đối nhỏ (nhỏ hơn 5%) so với tổng số đáp ứng của toàn bộ thử nghiệm. Cần đặc biệt thận trọng trong trường hợp các giá trị bị mất có khuynh hướng tập trung trong một xử lý hay một khối.

Thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn

Trong kiểu thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn, thay giá trị bị mất bằng trung bình số học của các đáp ứng khác trong cùng xử lý.

Thiết kế ngẫu nhiên theo khối

Giá trị bị mất (y') được tính bằng công thức:

$$y' = \frac{nB' - kT' - G'}{(n-1)(k-1)} \quad (3.2.6-1)$$

Trong đó:

B' là tổng đáp ứng của khối chứa giá trị bị mất, T' là tổng đáp ứng của xử lý chứa giá trị bị mất, G' là tổng tất cả các đáp ứng còn lại trong thử nghiệm, n và k theo thứ tự là số khối và số xử lý.

Để minh họa, giả sử giá trị của u_j trong khối thứ nhất (trong trường hợp này là hàng hay hộp Petri) ở ví dụ 3.2.8.2, Bảng 13.10.14 bị mất ($u_j = 174$). Với:

$$B' = 1.050$$

$$T' = 869$$

$$G' = 7.189$$

$$k = 6$$

$$n = 6$$

$y' = 173$. Dùng giá trị tính được 173 thay cho đáp ứng của u_j trong hộp số 1 của Bảng 13.10.14 và tiếp tục tính toán như trình bày trong ví dụ 3.2.8.2 nhưng với bậc tự do của sai số toàn phần là 34, và bậc tự do của sai số dư là 24.

Thiết kế hình vuông Latin

Giá trị bị mất (y') được tính bằng công thức:

$$y' = \frac{k(B'+C'+T')-2G'}{(k-1)(k-2)} \quad (3.2.6.-2)$$

Trong đó:

B' và C' là tổng các đáp ứng trong hàng và cột chứa giá trị bị mất. G' là tổng các đáp ứng còn lại trong thử nghiệm (Bảng 13.10.18), còn T' là tổng các đáp ứng của xử lý chứa giá trị bị mất (Bảng 13.10.19). Trong thiết kế hình vuông Latin $k = n$. Giả sử giá trị 161 của đáp ứng ở cột thứ 1 và hàng thứ 1 trong Bảng 13.10.18 và Bảng 13.10.19 (Ví dụ 3.2.8.3) bị mất, nó sẽ được thay thế bởi giá trị 150 tính được bằng công thức 3.2.6.-2 với:

- $B' = 890$
- $C' = 876$
- $T' = 791$
- $G' = 6.175$
- $k = 6$

Các bậc tự do sẽ bị giảm xuống còn 19 đối với sai số dư và 34 đối với sai số toàn phần.

Thiết kế chéo

Nếu có giá trị bị mất trong kiểu thiết kế thí nghiệm chéo phải tham khảo các tài liệu thống kê vì công thức tính sẽ rất khác nhau tùy theo cách phối hợp các xử lý.

3.2.7 Các thử nghiệm đối xứng một phần

Nếu hoạt lực giả định của chế phẩm cần định lượng, là hoạt lực được dùng để tính lượng chế phẩm thử cần lấy khi pha các dung dịch của chế phẩm thử, khác xa với hoạt lực thật, nồng độ cao nhất hoặc nồng độ thấp nhất của chế phẩm thử có thể nằm lọt ra ngoài vùng tuyến tính của đường ln(liều) - đáp ứng, do đó thử nghiệm sẽ không có giá trị thống kê đo không thỏa mãn tính tuyến tính và/hoặc tính song song.

Có thể tính hoạt lực từ các số liệu còn lại, sau khi loại bỏ các đáp ứng của nồng độ cao nhất hoặc nồng độ thấp nhất của chế phẩm thử và dùng hoạt lực tính được làm hoạt lực giả định cho những lần thử nghiệm lặp lại.

Logarit tỷ lệ hoạt lực được tính bằng công thức:

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} \pm \frac{I}{2} \quad (3.2.7.-1)$$

Công thức trên rất giống với phương trình 3.2.5.-3, tuy nhiên, ln(tỷ lệ hoạt lực) sẽ bị trừ đi một đại lượng bằng $I/2$ nếu bỏ nồng độ thấp nhất, và cộng thêm $I/2$ nếu bỏ nồng độ cao nhất.

Tính các đáp ứng trung bình \bar{y}_S và \bar{y}_U theo cách tương tự như thử nghiệm cân xứng hoàn toàn (phương trình 3.2.5.-1), nhưng công thức tính độ dốc (b) có một số biến đổi tùy theo thiết kế thí nghiệm.

Trong thử nghiệm hai liều đa chế phẩm, tính độ dốc bằng công thức:

$$b = \frac{L_S + \dots + L_Z}{\ln(h-1)} \quad (3.2.7.-2)$$

Chú ý: Trong công thức trên, từ số không bao gồm L_U vì chế phẩm U chỉ còn một nồng độ.

Đối với thử nghiệm đơn chế phẩm:

$$b = \frac{L_S}{\ln} \quad (3.2.7.-3)$$

Trong thử nghiệm ba liều đa chế phẩm, tính các tương phản tuyến tính (L_S, \dots, L_Z) theo công thức cho ở Bảng 13.10.3, riêng L_U tính bằng công thức ở Bảng 13.10.2. Công thức tính độ dốc sẽ là:

$$b = \frac{2(L_S + \dots + L_Z) + L_U}{\ln(4h-3)} \quad (3.2.7.-4)$$

Đối với thử nghiệm đơn chế phẩm, công thức trên trở thành:

$$b = \frac{2L_S + L_U}{5\ln} \quad (3.2.7.-5)$$

3.2.8 Các ví dụ

Mục này trình bày một số ví dụ minh họa cách sử dụng các công thức tính toán liên quan đến mô hình đường thẳng song song.

Các ví dụ giới thiệu ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa cho các phương pháp tính toán thống kê và không phải là phương pháp bắt buộc phải áp dụng nếu chuyên luận riêng cho phép dùng phương pháp khác.

Để có thể sử dụng các ví dụ trong chuyên luận này như nguồn số liệu tham khảo phục vụ cho việc kiểm tra các chương trình vi tính, thương mại hay tự biên soạn, dùng trong phân tích thống kê kết quả định lượng sinh học, các kết quả tính toán có thể chứa nhiều số thập phân hơn mức cần thiết. Có thể dùng phương pháp tính toán khác với phương pháp giới thiệu trong chuyên luận này, nhưng kết quả cuối cùng phải giống như các kết quả trong các ví dụ trình bày ở đây.

Ví dụ 3.2.8.1 Thử nghiệm hai liều đa chế phẩm với thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn

Thử nghiệm định lượng corticotrophin bằng phương pháp tiêm dưới da chuột cống trắng

Liều dùng của chế phẩm chuẩn là 0,25 và 1,0 đơn vị cho mỗi 100 g thể trọng chuột thí nghiệm. Hai chế phẩm thử đều có hoạt lực giả định là 1 đơn vị/mg và có liều dùng giống như chế phẩm chuẩn. Các đáp ứng riêng và đáp ứng trung bình của mỗi nhóm xử lý cho ở Bảng 13.10.9.

Bảng 13.10.9 - Đáp ứng metameter y - khối lượng acid ascorbic (mg) trên 100 g tuyến thượng thận

	Chế phẩm chuẩn		Chế phẩm thử		Chế phẩm thử		Tổng số
	S	U	Z				
	s_1	s_2	u_1	u_2	z_1	z_2	
	300	289	310	230	250	236	
	310	221	290	210	268	213	
	330	267	360	280	273	283	
	290	236	341	261	240	269	
	364	250	321	241	307	251	
	328	231	370	290	270	294	
	390	229	303	223	317	223	
	360	269	334	254	312	250	
	342	233	295	216	320	216	
	306	259	315	235	265	265	
Trung bình	332,0	248,4	323,9	244,0	282,2	250,0	
Phương sai (var.)	1.026,7	483,8	725,0	718,7	854,6	784,7	$\Sigma \text{var.} = 4.593,4$
ln (var.)	6,9341	6,1817	6,5862	6,5774	6,7507	6,6653	$\Sigma \ln(\text{var.}) = 39,6953$

Bảng 13.10.10- Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (xem công thức tính ở Bảng 13.10.2)

	Chế phẩm chuẩn		Chế phẩm thử		Chế phẩm thử		Tổng số
	S	U	Z				
Liều thấp	$S_1 = 3.320$	$U_1 = 3.239$	$Z_1 = 2.822$				
Liều cao	$S_2 = 2.484$	$U_2 = 2.440$	$Z_2 = 2.500$				
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S = 5.804$	$U = 5.679$	$Z = 5.322$				$\Sigma y = 16.805$
Tương phản tuyến tính	$L_S = -836$	$L_U = -799$	$L_Z = -322$				$\Sigma L = 1.957$

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{16.805^2}{60} = 4.706.800,42$$

$$\Sigma y^2 = 4.826.447$$

Tính các tổng các bình phương theo công thức trong các Bảng 13.10.5 và 13.10.6 dùng các số liệu tính được ở Bảng 13.10.10:

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2 + Z^2}{2n} - K = \frac{5.804^2 + 5.679^2 + 5.322^2}{20} - 4.706.800,42 = 6.256,63$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U + \dots + L_Z)^2}{2nh} = \frac{(-836 - 799 - 322)^2}{60} = 63.830,817 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2 + \dots + L_Z^2}{2n} - E = \frac{(-836)^2 + (-799)^2 + (-322)^2}{20} - 63.830,817 = 8.218,233$$

Giữa các xử lý = $\frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K = \frac{3.320^2 + 2.484^2 + \dots + 2.500^2}{10} - K = 78.305,68$

Toàn phần = $\sum y^2 - K = 4.826.447 - 4.706.800,42 = 119.646,58$

Sai số dư = Toàn phần - Giữa các xử lý = $119.646,58 - 78.305,68 = 41.340,90$

Bảng 13.10.11- Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	2	6.256,6	3128,3		
Hồi qui tuyến tính	1	63.830,8	63.830,8	83,4	< 0,01
Không song song	2	8.218,2	4109,1	5,4	< 0,05
Giữa các xử lý	5	78.305,7			
Sai số dư	54	41.340,9	765,572		
Sai số toàn phần	59	119.646,6			

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Kết quả phân tích phương sai cho thấy, tỷ số F của biến số hồi qui $F_{cal} = 83,4$ rất lớn so với F tới hạn ở xác suất $P = 0,01, f_1 = 1$ và $f_2 = 54: F_{(P=0,01; f_1=1; f_2=54)} = 7,13^{(1)}$, do đó biến số hồi qui rất có ý nghĩa.

Biến số không song song cũng có ý nghĩa, $F_{cal} = 5,4 > F_{(P=0,05; f_1=2; f_2=54)} = 3,17$. Khảo sát Bảng 13.10.10 cho thấy chế phẩm Z có tương phản tuyến tính L_2 rất khác với L_5 và L_{12} . Do đó, có khả năng độ dốc của đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm Z không phù hợp với các chế phẩm còn lại và là nguyên nhân làm cho tính có giá trị của thử nghiệm không thỏa mãn. Kiểm tra giả thuyết trên bằng phép kiểm Dunnett (t' được tính theo công thức 3.2.4 - 1 ở mục 3.2.4) :

Đối với chế phẩm U:

$$t' = \frac{L_5 - L_U}{2\sqrt{ns^2}} = \frac{-836 - (-799)}{2\sqrt{10 \times 765,572}} = -0,21$$

Đối với chế phẩm Z:

$$t' = \frac{L_5 - L_Z}{2\sqrt{ns^2}} = \frac{-836 - (-322)}{2\sqrt{10 \times 765,572}} = -2,94$$

Đối với chế phẩm Z, $|t'_{cal}| = 2,94 > t'_{crit} = 2,27$ đọc từ Bảng 13.10.8 với $P = 0,05, f_1 = 2$ và $f_2 = 54$, do đó đường ln(liều) - đáp ứng của nó không song song với đường ln(liều) - đáp ứng của chế phẩm chuẩn. Loại các số liệu liên quan đến chế phẩm Z và lập lại phân tích chỉ với các số liệu của chế phẩm U và chế phẩm chuẩn, với $\sum y = 11.483$ và $\sum L = -1.635$ (Bảng 13.10.10).

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{11.483^2}{40} = 3.296.482,225$$

$$\sum y^2 = 3.390.325$$

Bảng 13.10.12 - Phân tích phương sai không có chế phẩm Z

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	1	390,6	390,6		
Hồi qui tuyến tính	1	66.830,6	66.830,6	90,5	< 0,01
Không song song	1	34,2	34,2	0,05	> 0,05
Giữa các xử lý	3	67.255,5			
Sai số dư	36	26.587,3	738,54		
Sai số toàn phần	39	93.842,8			

⁽¹⁾ Trong bảng 13.10.7 không có $f_2 = 54$. Tuy nhiên $F_{(P=0,01; f_1=1; f_2=40)} = 7,31$ nên ở đây $F_{crit} = F_{(P=0,01; f_1=1; f_2=54)}$ phải < 7,31, còn $F_{cal} = 83,4$, do đó $F_{cal} > F_{crit}$ nên biến số hồi qui rất có ý nghĩa. Nếu có bảng tra cứu chi tiết hơn, có $f_2 = 54$ thì $F_{crit} = 7,13$. Tỷ số này có thể tìm được bằng phép nội suy của bảng 13.10.7 hoặc cũng có thể tính được bằng hàm FINV(p, f₁, f₂) của chương trình bảng tính Excel.

Sau khi loại chế phẩm Z , kết quả phân tích phương sai cho thấy thử nghiệm thỏa mãn các yêu cầu về cả hồi qui và cả tính không song song.

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

$$\bar{y}_S = \frac{S}{N_S} = \frac{5.804}{20} = 290,2$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{N_U} = \frac{5.679}{20} = 283,95$$

Tỷ lệ giữa các liều kế tiếp nhau bằng $1,0/0,25 = 4$, do đó $t = \ln(4) = 1,3863$, $t = 2,03$ với $P = 0,95$ và $f = 36$ (Bảng 13.10.28).

$$b = \frac{L_S + L_U}{Inh} = \frac{-1.635}{20t} = -58,970$$

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = \frac{283,95 - 290,2}{-58,970} = 0,1060$$

Hoạt lực giả định A_U của chế phẩm U là 1 đơn vị/mg, do đó:

$$M_U = M'_U + \ln(A_U) = 0,1060 + 0 = 0,1060$$

Hoạt lực của chế phẩm U bằng $\text{antiln}(M_U) = \text{antiln}(0,1060) = 1,11$ đơn vị/mg.

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{66.830,6}{66.830,6 - 738,5 \times 2,03^2} = 1,0477$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{66.830,6}{(-58,970)^2 \times 2 \times 10} = 0,969091$$

$$(C-1)(CM'_U)^2 + 2H = (1,0477-1)(1,0477 \times 0,1060^2 + 2 \times 0,969091) = 0,09223$$

Logarit các giới hạn tin cậy bằng:

$$\ln(A_U) + CM'_U \pm \sqrt{0,09223} = 0 + 0,1110 \pm 0,3037$$

Các giới hạn tin cậy là 0,82 và 1,51 đơn vị/mg.

Ví dụ 3.2.8.2 Thử nghiệm 3 liều đơn chế phẩm, với thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối không lặp

Thử nghiệm định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán dùng hộp Petri

Các dung dịch thử của chế phẩm chuẩn s_1, s_2 và s_3 có nồng độ lần lượt là 2, 4 và 8 IU/ml. Chế phẩm thử có hoạt lực giả định là 1.500 IU/ml và cũng được pha thành 3 dung dịch thử u_1, u_2 và u_3 có nồng độ tương đương với nồng độ các dung dịch của chế phẩm chuẩn. Mỗi hộp Petri đều có 3 dung dịch của chế phẩm chuẩn và 3 dung dịch của chế phẩm thử, trong đó mỗi dung dịch thử chỉ xuất hiện một lần duy nhất trong mỗi hộp Petri (không lặp). Trật tự sắp xếp các dung dịch thử trong mỗi hộp được phân bố như trong Bảng 13.10.13.

Các đáp ứng riêng và đáp ứng trung bình của mỗi dung dịch thử cho ở Bảng 13.10.14.

Bảng 13.10.13 - Cách bố trí các dung dịch thử trong các hộp

Hộp số	Số vị trí trong hộp					
	1	2	3	4	5	6
1	u_2	u_3	s_3	s_1	u_1	s_2
2	s_3	u_1	s_2	u_3	s_1	u_2
3	u_3	u_2	s_1	s_3	s_2	u_1
4	s_1	s_2	u_3	u_1	u_2	s_3
5	u_1	s_1	u_2	s_2	s_3	u_3
6	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	s_1

Các đáp ứng riêng và trị trung bình đáp ứng của mỗi nồng độ được cho ở Bảng 13.10.14.

Bảng 13.10.14 - Đáp ứng y - đường kính vòng vô khuẩn (mm × 10)

Hộp số	Chế phẩm chuẩn S			Chế phẩm thử U			Tổng khối
	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	
1	176	205	235	174	202	232	$R_1 = 1224$
2	178	208	238	175	206	234	$R_2 = 1239$
3	178	207	237	177	203	236	$R_3 = 1238$
4	175	205	235	173	201	232	$R_4 = 1221$
5	176	206	235	174	204	231	$R_5 = 1226$
6	174	204	236	170	202	229	$R_6 = 1215$
Tổng cột	1057	1235	1416	1043	1218	1394	7363
Trung bình	176,2	205,8	236,0	173,8	203,0	232,3	
Phương sai	2,6	2,2	1,6	5,4	3,2	5,9	

Kiểm tra số liệu thu được bằng các phép thử tương tự như ở ví dụ 3.2.8.1 cho thấy thử nghiệm đáp ứng các điều kiện ở mục 3.1.1.

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{7.363^2}{36} = 1.505.938,03$$

$$\sum y^2 = 1.527.127$$

Bảng 13.10.15- Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (xem công thức tính ở Bảng 13.10.3)

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử U	Tổng số
Liều thấp	$S_1 = 1.057$	$U_1 = 1.043$	
Liều trung gian	$S_2 = 1.235$	$U_2 = 1.218$	
Liều cao	$S_3 = 1.416$	$U_3 = 1.394$	
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S = 3.708$	$U = 3.655$	$\sum y = 7.363$
Tương phản tuyến tính	$L_S = 359$	$L_U = 351$	$\sum L = 710$
Tương phản bậc hai	$Q_S = 3$	$Q_U = 1$	$\sum Q = 4$

Các tổng các bình phương được tính bằng các công thức trong Bảng 13.10.5 và 13.10.6 với các số liệu ở Bảng 13.10.15.

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2}{18} - K = 78,026$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U)^2}{24} = 21.004,167 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{12} - E = 2,666$$

$$\text{Độ cong} = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} = \frac{3^2 + 1^2}{36} = 0,278$$

$$\text{Giữa các xử lý} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{6} - K = 21.085,137$$

$$\text{Giữa các khối} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{6} - K = 75,805$$

$$\text{Toàn phần} = \sum y^2 - K = 21.188,97$$

$$\text{Sai số dư} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các xử lý} - \text{Giữa các khối} = 28,03$$

Bảng 13.10.16 - Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	1	78,03	78,03		
Hồi qui tuyến tính	1	21.004,17	21.004,17	18.737	< 0,01
Không song song	1	2,67	2,67	2,4	> 0,05
Độ cong	2	0,28	0,16	0,1	> 0,05
Giữa các xử lý	5	21.085,14			
Giữa các khối (hộp Petri)	5	75,80	15,16	13,5	< 0,01
Sai số dư	25	28,03	1,121		
Sai số toàn phần	35	21.188,97			

Kết quả phân tích phương sai cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa cao ($P < 0,01$) của kích thước đường kính vòng vô khuẩn giữa các hộp Petri. Nếu thí nghiệm thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, biến thiên giữa các khối sẽ không được tách ra khỏi sai số toàn phần, do đó bình phương trung bình của sai số dư sẽ lớn hơn, dẫn đến khoảng tin cậy sẽ rộng hơn. Đây là ưu điểm của thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên theo khối so với thiết kế thí nghiệm kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn.

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa ($P < 0,01$), các đại lượng không song song và độ cong không có ý nghĩa ($P > 0,05$), do đó thử nghiệm thỏa mãn cách tính hiệu lực.

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

$$\bar{y}_U - \bar{y}_S = \frac{U - S}{3n} = \frac{3655 - 3708}{18} = \frac{-53}{18}$$

Tỷ lệ giữa các nồng độ kế tiếp bằng 2,0, do đó:

$$I = \ln(2) = 0,69315$$

$$b = \frac{L_S + L_U}{2Inh} = \frac{359 + 351}{2 \times I \times 6 \times 2} = \frac{710}{24I} = 42,6797$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = -0,0690$$

$$M = M' + \ln(A_U) = -0,0690 + \ln(1.500) = 7,2442$$

Hoạt lực của chế phẩm U là $R = \text{anti} \ln(M) = 1.400$ IU/ml.

Với $P = 0,95$ và $f = 25$, $t = 2,06$ (Bảng 13.10.28), ta có:

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{21.004,17}{21.004,17 - 1,121 \times 2,06^2} = 1,0002$$

$$H = \frac{E}{b^2 dn} = \frac{21.004,17}{(42,6797)^2 \times 3 \times 6} = 0,640605$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = (1,0002 - 1)(1,0002 \times (-0,0690)^2 + 2 \times 0,640605) = 0,00026$$

Các ln(giới hạn tin cậy) bằng:

$$\ln(A_U) + CM' \pm \sqrt{0,00026} = \ln(1.500) + 1,0002 \times (-0,0690) \pm \sqrt{0,00026} = 7,2442 \pm 0,0160$$

Các giới hạn tin cậy bằng 1.378 và 1.423 IU/ml.

Nếu phân tích bằng máy tính, các kết quả sẽ là:

$$C = 1,000227$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = 0,00029128$$

Khoảng tin cậy: 1.376,3 - 1.424,1 IU/ml.

Ví dụ 3.2.8.3 Thử nghiệm 3 liều đơn chế phẩm thiết kế hình vuông Latin không lặp
 Thử nghiệm định lượng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán, dùng khay vuông
 Chế phẩm chuẩn có hoạt lực biết trước 4.855 IU/mg. Chế phẩm thử có hoạt lực giả định là 5.600 IU/mg. Pha các dung dịch gốc bằng cách hòa tan 25,2 mg chế phẩm chuẩn và 21,4 mg chế phẩm thử trong lượng vừa đủ dung môi pha loãng để được 25 ml. Sau đó, pha loãng các dung dịch gốc đến nồng độ pha loãng 1/20 và tiếp tục pha loãng xa hơn với tỷ lệ pha loãng 1:1,5 để được các dung dịch thử cuối cùng của chuẩn và mẫu.
 Các dung dịch thử của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử được thiết kế trên khay theo bố trí thí nghiệm hình vuông Latin như trong Bảng 13.10.17. Các đường kính vòng vô khuẩn của thử nghiệm được trình bày trong Bảng 13.10.18. Trung bình đường kính vòng vô khuẩn, phương sai (var_i) và $\ln(var_i)$ của mỗi nhóm dung dịch thử trình bày trong Bảng 13.10.19.

Bảng 13.10.17 - Cách bố trí các dung dịch thử trên khay

	1	2	3	4	5	6
1	s_1	u_1	u_2	s_3	s_2	u_3
2	u_1	u_3	s_1	s_2	u_2	s_3
3	u_2	s_3	s_2	s_1	u_3	u_1
4	s_3	s_2	u_3	u_1	s_1	u_2
5	s_2	u_2	s_3	u_3	u_1	s_1
6	u_3	s_1	u_1	u_2	s_3	s_2

Phép thử tính đồng nhất của các phương sai

Đối với một nhóm gồm k phương sai, trong đó mỗi phương sai có $f = (n - 1)$ bậc tự do, công thức tính sẽ như sau:

$$\chi^2 = \frac{3kf^2 \left[k \ln \left(\frac{\sum var_i}{k} \right) - \sum \ln var_i \right]}{3kf + k + 1}$$

Với $k = 6$, bậc tự do $f = 5$, công thức trên sẽ rút gọn thành:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{450}{97} \times \left[6 \ln \left(\frac{\sum var_i}{6} \right) - \sum \ln var_i \right] \\ &= \frac{450}{97} \times \left(6 \ln \frac{209,20}{6} - 20,494 \right) = 3,78 \end{aligned}$$

Giá trị tính được nhỏ hơn giá trị tới hạn 11,07 đọc từ Bảng 13.10.29 với $P = 0,95$ và $f = (k - 1) = 5$. Do đó, sự khác biệt giữa các phương sai của mỗi nhóm dung dịch thử không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 13.10.18 - Đáp ứng y - đường kính vòng vô khuẩn (mm × 10)

	1	2	3	4	5	6	Tổng hàng
1	161	160	178	187	171	194	$R_1 = 1.051$
2	151	192	150	172	170	192	$R_2 = 1.027$
3	162	195	174	161	193	151	$R_3 = 1.036$
4	194	184	199	160	163	171	$R_4 = 1.071$
5	176	181	201	202	154	151	$R_5 = 1.065$
6	193	166	161	186	198	182	$R_6 = 1.086$
Tổng cột	$C_1 = 1.037$	$C_2 = 1.078$	$C_3 = 1.063$	$C_4 = 1.068$	$C_5 = 1.049$	$C_6 = 1.041$	

Bảng 13.10.19 - Trung bình đường kính vòng vô khuẩn và phương sai của mỗi nhóm dung dịch thử

STT (hộp petri)	Chế phẩm chuẩn S			Chế phẩm thử U			Tổng số
	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	
1	161	171	187	160	178	194	
2	150	172	192	151	170	192	
3	161	174	195	151	162	193	
4	163	184	194	160	171	199	
5	151	176	201	154	181	202	
6	166	182	198	161	186	193	
Tổng cột	952	1059	1167	937	1048	1173	
Trung bình	158,67	176,50	194,50	156,17	174,67	195,50	
Phương sai (var_i)	43,47	28,70	23,50	22,17	75,07	16,30	$\Sigma var_i = 209,20$
ln (var_i)	3,772	3,357	3,157	3,099	4,318	2,791	$\Sigma \ln(var_i) = 20,494$

Bảng 13.10.20 - Các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính (xem công thức tính ở Bảng 13.10.3)

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử U	Tổng số
Liều thấp	$S_1 = 952$	$U_1 = 937$	
Liều trung gian	$S_2 = 1.059$	$U_2 = 1.048$	
Liều cao	$S_3 = 1.167$	$U_3 = 1.173$	
Tổng đáp ứng của chế phẩm	$S = 3.178$	$U = 3.158$	$\Sigma y = 6.336$
Tương phản tuyến tính	$L_S = 215$	$L_U = 236$	$\Sigma L = 451$
Tương phản bậc hai	$Q_S = 1$	$Q_U = 14$	$\Sigma Q = 15$

$$K = \frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{6.336^2}{36} = 1.115.136$$

$$\Sigma y^2 = 1.124.692$$

Các tổng các bình phương được tính bằng các công thức trong Bảng 13.10.5 và 13.10.6 với các số liệu ở Bảng 13.10.18 và Bảng 13.10.20.

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K = \frac{3.178^2 + 3.158^2}{18} - 1.115.136 = 11.1111$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U)^2}{2nh} = \frac{451^2}{24} = 8.475,0416 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{215^2 + 236^2}{12} - 8.475,0416 = 18,3750$$

$$\text{Độ cong (không tuyến tính)} = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} = \frac{1^2 + 14^2}{36} = 5,4722$$

$$\text{Giữa các xử lý} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{n} - K = \frac{952^2 + 1.059^2 + \dots + 1.173^2}{6} - 1.115.136 = 8.510$$

$$\text{Giữa các hàng} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2 + R_5^2 + R_6^2}{k} - K = \frac{1.051^2 + 1.027^2 + \dots + 1.086^2}{6} - 1.115.136 = 412$$

$$\text{Giữa các cột} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2 + C_4^2 + C_5^2 + C_6^2}{k} - K = \frac{1.037^2 + 1.078^2 + \dots + 1.041^2}{6} - 1.115.136 = 218,6667$$

$$\text{Toàn phần} = \Sigma y^2 - K = 1.124.692 - 1.115.136 = 9.556$$

$$\text{Sai số dư} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các xử lý} - \text{Giữa các hàng} - \text{Giữa các cột} = 415,3333$$

Bảng 13.10.21 - Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Chế phẩm	1	11,1111	11,1111		
Hồi qui tuyến tính	1	8.475,0416	8.475,0416	408,1	< 0,01
Không song song	1	18,3750	18,3750	0,885	> 0,05
Độ cong	2	5,4722	2,7361	0,132	> 0,05
Giữa các xử lý	5	8510			
Giữa các hàng	5	412	82,40	3,968	< 0,05
Giữa các cột	5	218,6667	43,73	2,106	> 0,05
Sai số dư	20	415,3333	20,7667		
Sai số toàn phần	35	9.556			

Phân tích phương sai cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa các hàng chứng tỏ thiết kế thí nghiệm hình vuông Latin cho độ chính xác cao hơn thiết kế thí nghiệm ngẫu nhiên hoàn toàn.

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa ($P < 0,01$), tính không tuyến tính và tính không song song của các đường ln(liều) - đáp ứng không có ý nghĩa ($P > 0,05$), do đó thử nghiệm thỏa mãn các phép thử tính có giá trị.

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

Tỷ lệ giữa các nồng độ kế tiếp nhau bằng 1,5, do đó $I = \ln(1,5) = 0,405465$. Với $P = 0,95$ và $f = 20$, $t = 2,09$ (Bảng 13.10.28).

$$\bar{y}_s = \frac{S}{N_s} = \frac{3.178}{18} = 176,556$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{N_U} = \frac{3.158}{18} = 175,444$$

$$b = \frac{I_s + L_U}{2Inh} = \frac{451}{24I} = 46,346$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_s}{b} = \frac{175,444 - 176,556}{46,346} = -0,023974$$

$$M = M' + \ln(A_c) = -0,023974 + \ln(5.600) = 8,606548$$

Hoạt lực của chế phẩm U là $R = \text{antiln}(M) = 5.467,3$ IU/mg.

$$C = \frac{E}{E - s^2t^2} = \frac{8.475,0416}{8.475,0416 - 20,7667 \times 2,09^2} = 1,0108$$

$$H = \frac{E}{b^2dn} = \frac{8.475,0416}{46,346^2 \times 3 \times 6} = 0,2192$$

Các ln(giới hạn tin cậy) được tính theo công thức:

$$\begin{aligned} \ln(A_{ci}) + CM' \pm \sqrt{(C-1)(CM'^2 + 2H)} = \\ = \ln(5.600) + 1,0108 \times (-0,023974) \pm \sqrt{0,0108 \times [1,0108 \times (-0,023974)^2 + 2 \times 0,2192]} \\ = 8,60629 \pm 0,06878 \end{aligned}$$

Các giới hạn tin cậy bằng 5.102,6 và 5.855,1 IU/mg ở $P = 0,05$

Vì các dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử có hoạt lực không hoàn toàn bằng nhau dựa trên hoạt lực giả định, cần hiệu chỉnh hoạt lực tính được và các giới hạn tin cậy bằng cách nhân với một hệ số hiệu chỉnh:

$$\frac{4.855 \times 25,2 / 25}{5.600 \times 21,4 / 25} = 1,02091$$

Sau khi hiệu chỉnh, hoạt lực tính được sẽ bằng 5.582 IU/mg với giới hạn tin cậy từ 5.209 IU/mg đến 5.977 IU/mg σ xác suất 95 %.

Ví dụ 3.2.8.4 Thiết kế chéo đôi

Thử nghiệm định lượng insulin bằng phương pháp tiêm dưới da thỏ

Các dung dịch của chế phẩm chuẩn có nồng độ 1 và 2 IU/ml. Hoạt lực giả định của chế phẩm thử là 40 IU/ml và được pha loãng thành các dung dịch có nồng độ tương đương với các dung dịch của chế phẩm chuẩn. Tiêm dưới da các thỏ thí nghiệm với liều 0,5 ml mỗi dung dịch thử theo thiết kế ở Bảng 13.10.22. Các kết quả thí nghiệm trình bày trong Bảng 13.10.23. Phương sai lớn cho thấy biến thiên lớn giữa các thỏ thí nghiệm và cần thiết phải dùng thiết kế thí nghiệm chéo.

Bảng 13.10.22 - Cách sắp xếp các xử lý

Ngày thí nghiệm	Nhóm thỏ			
	1	2	3	4
Ngày I	s_1	s_2	u_1	u_2
Ngày II	u_2	u_1	s_2	s_1

Phép thử tính đồng nhất của các phương sai bằng phép kiểm Hartley

Tính tỷ số F theo công thức:

$$F = \frac{\text{var}_{\max.}}{\text{var}_{\min.}} = \frac{1.215,1}{230,6} = 5,3$$

Trong đó $\text{var}_{\max.}$ là phương sai lớn nhất và $\text{var}_{\min.}$ là phương sai nhỏ nhất trong k phương sai cần kiểm tra. F tính được ($F_{\text{cal}} = 5,3$) nhỏ hơn F tới hạn ($F_{\text{crit}} = 12,7$) đọc từ Bảng 13.10.30 với $P = 0,95$, $k = 8$ và bậc tự do $f = 7$. Do đó, sự khác nhau giữa các phương sai của mỗi nhóm dung dịch thử không có ý nghĩa thống kê. Nếu dùng phép kiểm Bartlett với cùng số liệu, giá trị tính được sẽ là 6,4 so với giá trị tới hạn bằng 14,1.

Trong các thử nghiệm dùng thiết kế chéo, các tổng đáp ứng và tương phản tuyến tính được tính riêng rẽ cho mỗi giai đoạn thí nghiệm. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 13.10.24.

Bảng 13.10.23 - Đáp ứng y : glucose huyết (mg/100 ml) ở 1 và 2½ h

	Nhóm 1			Nhóm 2			Nhóm 3			Nhóm 4		
	s_1	u_2	Tổng số	s_2	u_1	Tổng số	u_1	s_2	Tổng số	u_2	s_1	Tổng số
	112	104	216	65	72	137	105	91	196	118	144	262
	126	112	238	116	160	276	83	67	150	119	149	268
	62	58	120	73	72	145	125	67	192	42	51	93
	86	63	149	47	93	140	56	45	101	64	107	171
	52	53	105	88	113	201	92	84	176	93	117	210
	110	113	223	63	71	134	101	56	157	73	128	201
	116	91	207	50	65	115	66	55	121	39	87	126
	101	68	169	55	100	155	91	68	159	31	71	102
Tổng cột	765	662		557	746		719	533		579	854	5415
Trung bình	95,6	82,8		69,6	93,3		89,9	66,6		72,4	106,8	
Phương sai	709,7	627,9		525,1	1.012,5		479,6	230,6		1.214,3	1.215,1	

Bảng 13.10.24 - Các tổng đáp ứng và tương phân tuyến tính

	Chế phẩm chuẩn S	Chế phẩm thử U	Tổng số
Ngày I			
Nồng độ thấp	$S_{11} = 765$	$U_{11} = 719$	
Nồng độ cao	$S_{21} = 557$	$U_{21} = 579$	
Tổng số	$S_{1.} = 1.322$	$U_{1.} = 1.298$	$D_{1.} = 2.620$
Ngày II			
Nồng độ thấp	$S_{12} = 854$	$U_{12} = 746$	
Nồng độ cao	$S_{22} = 533$	$U_{22} = 662$	
Tổng số	$S_{2.} = 1.387$	$U_{2.} = 1.408$	$D_{2.} = 2.795$
Tổng chế phẩm	$S = 2.709$	$U = 2.706$	$\sum y = 5.415$
Tương phân tuyến tính			
Ngày I	$L_{S1} = -208$	$L_{U1} = -140$	$L_{1.} = -348$
Ngày II	$L_{S2} = -321$	$L_{U2} = -84$	$L_{2.} = -405$
Tổng số	$L_S = -529$	$L_U = -224$	$\sum L = -753$

Phân tích phương sai trong các thử nghiệm thiết kế chéo phức tạp hơn các kiểu thiết kế thí nghiệm khác vì biến thiên do cấu phần tổng các bình phương, gây bởi tính song song không độc lập với biến thiên do cấu phần gây bởi sự khác nhau của thỏ. Tính song song của các đường hồi qui sẽ được kiểm tra bằng đại lượng bình phương trung bình của sai số dư thứ hai, được tính bằng cách lấy tổng các bình phương của cấu phần do sự khác nhau về thỏ (khối) trừ đi cấu phần không song song và hai cấu phần trong tác.

Ba cấu phần tương tác được đưa thêm vào phân tích phương sai là do sự lặp lại trong mỗi nhóm thỏ thí nghiệm, gồm:

Giữa các ngày \times chế phẩm; Giữa các ngày \times hồi qui; Giữa các ngày \times tính song song.

Ba đại lượng này biểu thị khuynh hướng của 3 cấu phần (chế phẩm, hồi qui và song song) thay đổi từ ngày thí nghiệm này sang ngày thí nghiệm khác. Tính có giá trị của thử nghiệm phụ thuộc vào các tỷ số F tương ứng của ba đại lượng nói trên. Nếu F tính được rất có ý nghĩa, $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$ ở $P = 0,01$, cần phải rất thận trọng khi suy diễn các kết quả của thử nghiệm, và nếu có thể, phải lập lại thử nghiệm.

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{5.415^2}{64} = 458.159,77$$

$$\sum y^2 = 511.583$$

Tính giá trị của tổng các bình phương của chế phẩm, hồi qui và không song song theo công thức trong Bảng 13.10.5 với số liệu trong Bảng 13.10.24.

Chú ý trong thử nghiệm này $n = 16$, là tổng số đáp ứng của mỗi xử lý qua hai ngày thí nghiệm.

$$\text{Chế phẩm} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{2.709^2 + 2.706^2}{32} - 458.159,77 = 0,14$$

$$\text{Hồi qui tuyến tính} = \frac{(L_S + L_U)^2}{2nh} - \frac{(-753)^2}{64} = 8.859,52 = E$$

$$\text{Không song song} = \frac{L_S^2 - L_U^2}{2n} - E = \frac{(-529)^2 + (-224)^2}{32} - 8.859,52 = 1.453,51$$

$$\text{Giữa các khối (thỏ)} = \frac{\sum B_i^2}{2} - K = \frac{216^2 + 238^2 + \dots + 102^2}{2} - 458.159,77 = 39.794,73$$

Trong đó B_i là các tổng đáp ứng của mỗi thỏ thí nghiệm trong Bảng 13.10.23.

$$\text{Giữa các ngày} = \frac{D_I^2 + D_{II}^2}{2n} - K = \frac{2.620^2 + 2.795^2}{32} - 458.159,77 = 478,51$$

Trong đó D_I và D_{II} là tổng đáp ứng của mỗi thí nghiệm.

$$\text{Giữa các ngày} \times \text{Chế phẩm} = \frac{(S_I - S_{II} - U_I + U_{II})^2}{N} = \frac{[1.322 - 1.387 - 1.298 + 1.408]^2}{64} = 31,64$$

Trong đó S_I, S_{II}, U_I và U_{II} là tổng đáp ứng của từng chế phẩm trong mỗi ngày.

$$\text{Giữa các ngày} \times \text{hồi qui} = \frac{(L_{SI} - L_{SII} + L_{UI} - L_{UII})^2}{N} = \frac{[(-321) - (-208) + (-84) - (-140)]^2}{64} = 50,77$$

$$\text{Giữa các ngày} \times \text{Không song song} = \frac{(L_{SI} - L_{SII} - L_{UII} + L_{UI})^2}{N} = \frac{[(-321) - (-208) - (-84) + (-140)]^2}{64} = 446,27$$

Trong đó L_{SI}, L_{SII}, L_{UI} và L_{UII} là tương phản tuyến tính của mỗi ngày thí nghiệm.

$$\text{Toàn phần} = \sum y^2 - K = 511.583 - 458.159,77 = 53.423,23$$

$$\text{Sai số dư giữa các thò} = \text{Giữa các khối} - \text{Không song song} - (\text{Giữa các ngày} \times \text{chế phẩm}) - (\text{Giữa các ngày} \times \text{hồi qui}) = 39.794,73 - 1.453,51 - 31,64 - 50,76 = 38.258,81$$

$$\text{Sai số dư trong mỗi thò} = \text{Toàn phần} - \text{Giữa các khối} - \text{Giữa các ngày} - \text{Chế phẩm} - \text{Hồi qui} - (\text{Giữa các ngày} \times \text{không song song}) = 53.423,23 - 39.794,73 - 478,51 - 0,14 - 8.859,52 - 446,27 = 3.844,06$$

Phép thử tính có giá trị của thử nghiệm

Phân tích phương sai cho thấy thử nghiệm thỏa mãn phép thử tính có giá trị:

1) Hồi qui tuyến tính rất có ý nghĩa: tỷ số F của đại lượng hồi qui được tính dựa trên bình phương trung bình của sai số dư trong mỗi thò, $F_{cal} = 64,5 > F_{crit} = 7,63$ với $P = 0,01, f_1 = 1$ và $f_2 = 28$.

2) Tính không song song của đường hồi qui: phép thử tính không song song trong thiết kế chéo dựa trên bình phương trung bình của sai số dư giữa các thò, $F_{cal} = 1,06 < F_{(P=0,05, f_1=1, f_2=28)} = 4,19$, chứng tỏ các đường ln(liều) – đáp ứng của chuẩn và mẫu song song với nhau.

3) Ba cấu phần trong tác đều không có ý nghĩa, các tỷ số F tính được lần lượt là 0,02, 0,04 và 3,25 và đều nhỏ hơn $F_{crit.} = 4,19$.

Bảng 13.10.25 - Phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Xác suất
Không song song	1	1.453,5	1.453,5	1,06	> 0,05
Giữa các ngày × chế phẩm	1	31,6	31,6	0,02	> 0,05
Giữa các ngày × hồi qui	1	50,8	50,8	0,04	> 0,05
Sai số dư giữa các thò	28	38.258,8	1.366,4		
Giữa các khối (thò)	31	39.794,7	1.283,7		
Chế phẩm	1	0,1	0,1	0,00	> 0,05
Hồi qui	1	8.859,5	8.859,5	64,5	< 0,01
Giữa các ngày	1	478,5	478,5	3,48	> 0,05
Giữa các ngày × không song song	1	446,3	446,3	3,25	> 0,05
Sai số dư trong mỗi thò	28	3.844,1	137,3		
Toàn phần	63	53.423,2	847,9878472		

Định giá hoạt lực và các giới hạn tin cậy

Tỷ lệ pha loãng bằng 2, do đó $t = \ln(2) = 0,69315$. Với $P = 0,95$ và $f = 28, t = 2,05$ (Bảng 13.10.28).

$$\bar{y}_U - \bar{y}_S = \frac{U - S}{2n} = \frac{2.706 - 2.709}{32} = \frac{-3}{32}$$

$$b = \frac{L_S + L_U}{2nl} = \frac{-753}{32l} = -33,948$$

$$M' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = \frac{-3}{32 \times (-33,948)} = 0,00276$$

$$M = M' + \ln(A_t) = 0,00276 + \ln(40) = 3,6916$$

Hoạt lực $R = \text{antiln}(M) = \text{antiln}(0,00276) = 40,1 \text{ IU/ml}$.

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} = \frac{8.859,5}{8.859,5 - 137,3 \times 2,05^2} = 1,0697$$

$$H = \frac{E}{h^2 dn} = \frac{8.859,5}{(-33,948)^2 \times 2 \times 16} = 0,24023$$

$$(C - 1)(CM'^2 + 2H) = 0,0697(1,0697 \times 0,00276^2 + 2 \times 0,24023) = 0,033488$$

Logarit các giới hạn tin cậy bằng:

$$\ln(A_t) + CM' \pm \sqrt{0,033488} = 3,6918 \pm 0,1830$$

Khoảng tin cậy của hoạt lực từ 33,4 đến 48,2 IU/ml.

4. Phối hợp các kết quả thử nghiệm

4.1 Mở đầu

Để đáp ứng các yêu cầu của Dược điển, ví dụ yêu cầu về độ chính xác, có thể phải lặp lại hai hay nhiều thử nghiệm độc lập và phối hợp các kết quả thử nghiệm để được kết quả cuối cùng chính xác và đáng tin cậy hơn.

Hai thử nghiệm được coi là độc lập với nhau nếu quá trình thực hiện của mỗi thử nghiệm không gây bất cứ ảnh hưởng nào đến kết quả của thử nghiệm khác. Điều đó có nghĩa là các sai số ngẫu nhiên của các yếu tố chủ yếu ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm (ví dụ: sự pha loãng chế phẩm chuẩn và chế phẩm thử, độ nhạy của chi thị sinh học) của một thử nghiệm phải độc lập với các sai số ngẫu nhiên tương ứng của thử nghiệm kia. Các thử nghiệm thực hiện vào những ngày kế tiếp nhau dùng cùng dung dịch gốc của chế phẩm chuẩn không phải là những thử nghiệm độc lập.

Có nhiều phương pháp phối hợp kết quả của các thử nghiệm độc lập, tuy nhiên, dưới đây chỉ trình bày ba phương pháp gần đúng do tính đơn giản và dễ áp dụng của chúng.

Trước khi phối hợp, các hoạt lực phải được hiệu chỉnh với hoạt lực giả định của mỗi chế phẩm thử (xem Ví dụ 3.2.8.3) và phải được biểu diễn dưới dạng logarit.

4.2 Phối hợp cân chỉnh (weighted combination) các kết quả thử nghiệm

Phương pháp này có thể áp dụng nếu thỏa mãn các điều kiện sau:

- 1) Các thử nghiệm phải độc lập với nhau;
- 2) Đại lượng C của mỗi thử nghiệm phải nhỏ hơn 1,1 (xem công thức 3.2.5-6 để biết công thức tính và ý nghĩa của C);
- 3) Bậc tự do của sai số dư của mỗi thử nghiệm không được nhỏ hơn 6, tốt nhất là lớn hơn 15;
- 4) Sự khác nhau giữa các định giá hoạt lực riêng phải không có ý nghĩa thống kê (xem mục 4.2.2).

Nếu các điều kiện trên không thỏa mãn, phương pháp này không được áp dụng. Khi đó dùng phương pháp giới thiệu ở mục 4.3 để tính hoạt lực trung bình và lấy kết quả tính được làm hoạt lực giả định cho lần thử nghiệm kế tiếp.

4.2.1 Tính các hệ số cân chỉnh W

Giả sử các kết quả đo của mỗi n' thử nghiệm đã được phân tích để được n' giá trị logarit hoạt lực M và các giới hạn tin cậy tương ứng. Đối với mỗi thử nghiệm, tính theo logarit khoảng tin cậy L bằng cách lấy giới hạn tin cậy trên trừ đi giới hạn tin cậy dưới. Tính hệ số cân chỉnh W cho mỗi giá trị của M theo phương trình 4.2.1.-1, với t có cùng giá trị như khi tính các giới hạn tin cậy.

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \tag{4.2.1.-1}$$

4.2.2 Tính đồng nhất của các hoạt lực

Để kiểm tra tính đồng nhất của một dãy các logarit hoạt lực, thành lập biểu thức có phân phối xấp xỉ phân phối χ^2 như sau:

$$\chi^2 = \sum_n W(M - \bar{M})^2 = \sum_n (WM^2) - \frac{\left[\sum_n (WM) \right]^2}{\sum_n W} \tag{4.2.2.-1}$$

với:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

Nếu χ^2 tính được nhỏ hơn giá trị tương ứng với bậc tự do $f = (n' - 1)$ tra từ Bảng 13.10.29, sự khác nhau giữa các hoạt lực không có ý nghĩa thống kê và, do đó, có thể tiếp tục tính hoạt lực trung bình và các giới hạn tin cậy theo các công thức ở mục 4.2.3.

Nếu χ^2 tính được lớn hơn giá trị tới hạn tương ứng đọc từ Bảng 13.10.29, các hoạt lực tính được không đồng nhất và không thể sử dụng các công thức ở mục 4.2.3, thay vào đó, có thể dùng các công thức ở mục 4.2.4.

4.2.3 Tính hoạt lực trung bình có cân chỉnh (weighted mean) và các giới hạn tin cậy

Logarit hoạt lực trung bình có cân chỉnh được tính theo công thức:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \quad (4.2.3.-1)$$

Độ lệch chuẩn của logarit hoạt lực trung bình là căn bậc hai của nghịch đảo của tổng các hệ số cân chỉnh W :

$$s_M = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \quad (4.2.3.-2)$$

và các logarit giới hạn tin cậy của hoạt lực trung bình được tính theo phương trình sau:

$$\bar{M} \pm ts_M \quad (4.2.3.-3)$$

Trong đó t là giá trị tới hạn đọc được từ Bảng 13.10.29 với bậc tự do bằng tổng số bậc tự do của các sai số dư của mỗi thử nghiệm riêng.

4.2.4 Hoạt lực trung bình có cân chỉnh và các giới hạn tin cậy dựa trên biến thiên trong mỗi thử nghiệm và giữa các thử nghiệm

Khi phối hợp các kết quả của một số thử nghiệm lặp lại, giá trị χ^2 có thể có ý nghĩa. Biến thiên của các hoạt lực có thể phân tích thành hai cấu phần, gồm:

1) Biến thiên trong mỗi thử nghiệm $s_M^2 = 1/W$

2) Biến thiên giữa các thử nghiệm $s_W^2 = \frac{\sum (M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)}$

với \bar{M} là trung bình chưa cân chỉnh (trung bình số học) của các M . Biến thiên đầu thay đổi từ thử nghiệm này đến thử nghiệm khác, trong khi biến thiên sau là chung cho tất cả các M .

Đối với mỗi M , tính hệ số cân chỉnh theo công thức:

$$W' = \frac{1}{s_M^2 + s_W^2}$$

Dùng W' thay thế cho W trong các công thức ở mục 4.2.3, với $t = 2$.

4.3 Phối hợp phi cân chỉnh (unweighted combination) các kết quả thử nghiệm

Cách phối hợp các kết quả thử nghiệm đơn giản nhất là tính trung bình số học của n' logarit hoạt lực M và sau đó tính độ lệch chuẩn của nó theo công thức:

$$s_M^2 = \frac{\sum (M - \bar{M})^2}{n'(n' - 1)} \quad (4.3.-1)$$

Các logarit giới hạn tin cậy bằng:

$$M \pm ts_M \quad (4.3.-2)$$

Trong đó t có $(n' - 1)$ bậc tự do. Vì số các thử nghiệm cần phối hợp thường nhỏ nên giá trị của t khá lớn.

4.4 Ví dụ

Bảng 13.10.26 liệt kê các hoạt lực cùng các giới hạn tin cậy của 6 thử nghiệm độc lập của cùng một chế phẩm và bậc tự do của sai số dư tương ứng. Tất cả các thử nghiệm đều đáp ứng điều kiện 1, 2 và 3 trong mục 4.2. Các hệ số cân chỉnh W được tính theo công thức 4.2.1.-1 ở mục 4.2.

Phép thử tính đồng nhất của các hoạt lực

$$\chi^2 = \sum_n W(M - \bar{M})^2 = \sum_n (WM^2) - \frac{[\sum_n (WM)]^2}{\sum_n W} = 2.123.323,8792 - \frac{216.478,4988^2}{22.070,6028} = 4,42$$

χ^2 tính được 4.42 nhỏ hơn giá trị tới hạn 11,07 đọc từ Bảng 13.10.29 với bậc tự do $f = 5$. Do đó, sự khác nhau giữa các hoạt lực không có ý nghĩa thống kê, và do đó đạt tất cả các điều kiện.

Bảng 13.10.26 - Hoạt lực và các giới hạn tin cậy của sáu thử nghiệm độc lập

Lần thử nghiệm	Hoạt lực R (IU/l _o)	Các giới hạn tin cậy (IU/l _o)		Bậc tự do DF
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
1	18.367	17.755	19.002	20
2	18.003	17.415	18.610	20
3	18.064	17.319	18.838	20
4	17.832	17.253	18.429	20
5	18.635	17.959	19.339	20
6	18.269	17.722	18.834	20
Tổng số				120

Bảng 13.10.27

Với $f = 20, P = 0,05$. Bảng 13.10.28 cho $t = 2,09$. Tính $W = 4t^2/L^2$ theo công thức 4.2.1.-1

	$M = \ln(R)$	L^*	W	WM	WM^2
	9,8183	0,0679	3.777,8301	37.091,9101	364.179,9033
	9,7983	0,0664	3.951,6825	38.719,7456	379.387,4392
	9,8017	0,0841	2.462,5579	24.137,1950	236.584,9721
	9,7887	0,0659	4.003,1116	39.185,4586	383.576,6531
	9,8328	0,0740	3.175,7400	31.226,4061	307.042,9060
	9,8130	0,0609	4.699,6807	46.117,7833	452.552,0054
Tổng số	58,8528		22.070,6028	216.478,4988	2.123.323,8792

* $L = \ln(\text{giới hạn tin cậy trên}) - \ln(\text{giới hạn tin cậy dưới})$

Hoạt lực trung bình và các giới hạn tin cậy:

Hoạt lực trung bình và các giới hạn tin cậy của nó được tính bằng các công thức ở mục 4.2.3 và các số liệu trong Bảng 13.10.26 và 13.10.27.

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} = \frac{216.478,4988}{22.070,6028} = 9,8085$$

$$s_{\bar{M}} = \frac{1}{\sqrt{\sum W}} = \frac{1}{\sqrt{22.070,6028}} = 0,00673$$

Với số bậc tự do $f = 120, P = 0,95, t = 1,98$.

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}} = 9,8085 \pm 1,98 \times 0,00673 = 9,7951 \text{ và } 9,8218$$

Bằng cách lấy antilogarit các giá trị tính được, hoạt lực trung bình bằng 18.187 IU/l_o với khoảng tin cậy ở xác suất 95 % từ 17.946 đến 18.431 IU/l_o.

5. Các Bảng tra cứu

Bảng 13.10.28 - Bảng giá trị tới hạn của phân phối t

f	P		f	P	
	0,05	0,01		0,05	0,01
1	12,71	63,66	18	2,10	2,88
2	4,30	9,92	19	2,09	2,86
3	3,18	5,84	20	2,09	2,85
4	2,78	4,60	21	2,08	2,83
5	2,57	4,03	22	2,07	2,82
6	2,45	3,71	23	2,07	2,81
7	2,36	3,50	24	2,06	2,80
8	2,31	3,36	25	2,06	2,79
9	2,26	3,25	26	2,06	2,78
10	2,23	3,17	27	2,05	2,77
11	2,20	3,11	28-29	2,05	2,76
12	2,18	3,05	30	2,04	2,75
13	2,16	3,01	40-43	2,02	2,7
14	2,14	2,98	57-63	2,00	2,66
15	2,13	2,95	102-126	1,98	2,26
16	2,12	2,92	600-∞	1,96	2,58
17	2,11	2,90			

Nếu giá trị quan sát lớn hơn giá trị trong bảng, nó được coi là có ý nghĩa ($P = 0,05$) hay rất có ý nghĩa ($P = 0,01$).

Bảng 13.10.29 - Bảng giá trị tới hạn của χ^2

f	P		f	P	
	0,05	0,01		0,05	0,01
1	3,84	6,63	11	19,68	24,73
2	5,99	9,21	12	21,03	26,22
3	7,81	11,34	13	22,36	27,69
4	9,49	13,28	14	23,68	29,14
5	11,07	15,09	15	25,00	30,58
6	12,59	16,81	16	26,30	32,00
7	14,07	18,48	20	31,41	37,57
8	15,51	20,09	25	37,65	44,31
9	16,92	21,67	30	43,77	50,89
10	18,31	23,21	40	55,76	63,69

Nếu giá trị quan sát lớn hơn giá trị trong bảng, nó được coi là có ý nghĩa ($P = 0,05$) hay rất có ý nghĩa ($P = 0,01$).

Bảng 13.10.30 - Giá trị tới hạn của tỷ số $F = \text{var}_{\text{max}}/\text{var}_{\text{min}}$

k là số phương sai trong nhóm xử lý, mỗi phương sai có f bậc tự do (Hartley's test).

$f \backslash k$	4	6	8	9	10	12
4	20,6 49	29,5 69	37,5 89	41,1 97	44,6 106	51,4 120
5	13,7 28	18,7 38	22,9 46	24,7 50	26,5 54	29,9 60
6	10,4 19,1	13,7 25	16,3 30	17,5 32	18,6 34	20,7 37
7	8,44 14,5	10,8 18,4	12,7 22	13,5 23	14,3 24	15,8 27
8	7,18 11,7	9,03 14,5	10,5 16,9	11,1 17,9	11,7 18,9	12,7 21
9	6,31 9,9	7,80 12,1	8,95 13,9	9,45 14,7	9,91 15,3	10,7 16,6
10	5,67 8,6	6,92 10,4	7,87 11,8	8,28 12,4	8,66 12,9	9,34 13,9

Nếu F tính được lớn hơn giá trị trong bảng, biến số cần kiểm tra được coi là có ý nghĩa (dòng trên, $P = 0,05$), hay rất có ý nghĩa (dòng dưới, $P = 0,01$).

6. Bảng chú giải các ký hiệu

Ký hiệu	Định nghĩa
b	Độ dốc hồi qui tuyến tính của đường thẳng liều - đáp ứng hay ln(liều) - đáp ứng của tất cả các chế phẩm trong một thử nghiệm
d	Số mức liều của mỗi chế phẩm trong một thử nghiệm đối xứng
e	Cơ số của logarit tự nhiên. $e = 2,718281828\dots$
f	Số bậc tự do
h	Số chế phẩm trong một thử nghiệm, kể cả chế phẩm chuẩn
k	Số xử lý trong một thử nghiệm, $k = dh$
n	Số thí nghiệm lặp lại hoặc số đơn vị thí nghiệm của mỗi xử lý
n'	Số các định giá hoạt lực riêng
s^2	Trị định giá của phương sai được tính từ bình phương trung bình của sai số đư. s^2_0 là phương sai của logarit hoạt lực M
s	Trị định giá của Độ lệch chuẩn, $(= \sqrt{s^2})$
s_1, s_2, s_3	Nồng độ liều thấp, trung gian và cao của chế phẩm chuẩn S . Trong một thử nghiệm chỉ có 2 nồng độ của mỗi chế phẩm s_2 đại diện cho nồng độ cao
t	Thống kê t của Student (Bảng 13.10.28)
t'	Thống kê t' của Dunnett (Bảng 13.10.8)
u_1, \dots, u_3	Nồng độ (liều) của các chế phẩm thử $U \dots Z$
y	Đáp ứng riêng hay đáp ứng riêng đã được chuyển đổi
y'	Đáp ứng tính được dùng để thay thế cho giá trị bị mất
$\bar{y}_S, \dots, \bar{y}_Z$	Đáp ứng trung bình của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử
A_1, \dots, A_Z	Hoạt lực giả định của các chế phẩm thử $U \dots Z$, là hoạt lực được dùng để tính lượng chế phẩm cần lấy khi pha các dung dịch thử

$B_1...B_n$	Tổng đáp ứng của mỗi đơn vị thí nghiệm (1 đến $2n$) trong thiết kế chéo đôi
B'	Tổng đáp ứng của khối hay hàng có chứa giá trị bị mất
C	Đại lượng biểu thị ý nghĩa của hồi qui, dùng trong tính toán các giới hạn tin cậy (phương trình 3.2.5-5). Trong một số tài liệu thống kê kết quả thử nghiệm sinh học, ý nghĩa của hồi qui được biểu thị theo g:

$$C = \frac{1}{1-g}$$

$C_1...C_n$	Tổng đáp ứng của mỗi cột (1 đến n) trong thiết kế hình vuông Latin
C'	Tổng đáp ứng của cột không kể một giá trị bị mất trong thiết kế hình vuông Latin
D	Liều
D_1, D_2	Tổng đáp ứng của giai đoạn I và giai đoạn II trong thiết kế chéo đôi
E	Tổng các bình phương của đại lượng hồi qui (Bảng 13.10.5)
F'	Tỷ số của hai trị định giá độc lập của phương sai theo phân phối F (Bảng 13.10.7)
G'	Tổng đáp ứng trong một thử nghiệm không kể giá trị bị mất
I	Khoảng cách giữa các ln(liều) kế tiếp nhau, $I = \ln(s_2/s_1) = \ln(s_2) - \ln(s_1)$
K	Đại lượng được dùng để tính tổng các bình phương trong phân tích phương sai

$$K = \frac{(\sum y)^2}{N}$$

L	Độ rộng của logarit giới hạn tin cậy, $L = \ln(\text{giới hạn tin cậy trên}) - \ln(\text{giới hạn tin cậy dưới})$
$L_S...L_Z$	Tương phản tuyến tính của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử (Bảng 13.10.2, 13.10.3 và 13.10.4)
M	Trị định giá của logarit hoạt lực, trong thử nghiệm đa chế phẩm, M được dùng kèm với một ký tự ($U...Z$) ghi ở dưới, ví dụ M_U , để chỉ rõ một chế phẩm riêng ($M = \ln R$).
\bar{M}	Trung bình của một vài trị định giá độc lập của M
M'	Logarit tỷ lệ hoạt lực hay trị định giá của logarit hoạt lực trước khi hiệu chỉnh với hoạt lực giả định ($M' = \ln R'$)
N	Tổng số đáp ứng trong một thử nghiệm
N_S, N_U	Tổng số đáp ứng của chế phẩm S và U
P	Xác suất
$Q_S...Q_Z$	Tương phản bậc 2 của chế phẩm chuẩn và các chế phẩm thử
R	Hoạt lực định giá được dùng với một ký tự ($U...Z$) ghi ở dưới, ví dụ R_U để chỉ rõ một chế phẩm thử riêng trong một thử nghiệm đa chế phẩm ($R = \text{antiln}M$)
R'	Định giá hoạt lực hoặc tỷ số hoạt lực trước khi hiệu chỉnh bởi hoạt lực giả định ($R' = \text{antiln}M'$).
$R_1...R_n$	Tổng đáp ứng của mỗi hàng (1 đến n) trong thiết kế hình vuông Latin, hay mỗi khối trong thiết kế ngẫu nhiên theo khối.
\bar{S}	Chế phẩm chuẩn
S	Tổng đáp ứng của chế phẩm chuẩn
S_1, S_2, S_3	Tổng đáp ứng của liều (nồng độ) thấp, trung gian và cao của chế phẩm chuẩn \bar{S} . Trong một thử nghiệm chỉ có 2 mức liều, S_2 là tổng đáp ứng của liều cao
T'	Tổng đáp ứng trong một xử lý không kể giá trị bị mất
$U...Z$	Tổng đáp ứng của các chế phẩm thử $U...Z$
$\bar{U}...Z$	Các chế phẩm cân thử
U_1, U_2, U_3	Tổng đáp ứng của liều thấp, trung gian và cao của chế phẩm \bar{U} , trong một định lượng chỉ có 2 nồng độ của mỗi chế phẩm, U_2 đại diện cho nồng độ cao
W	Hệ số cân chỉnh dùng trong phối hợp một số định giá độc lập (phương trình 4.2.1.-1)
X	$\ln(\text{liều})$

13.11 ĐỊNH LƯỢNG HOẠT TÍNH VITAMIN B₁₂ BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH VẬT

Dung dịch đệm

Hòa tan 1,29 g *đinatri hydrophosphat (TT)*, 1,10 g *acid citric khan (TT)*, 1,00 g *natri metabisulfít (TT)* trong 100 ml *nước để pha tiêm*.

Môi trường định lượng

Thành phần

L-Cystin	0,1 g
L-Tryptophan	0,05 g
Acid hydrochloric 1N	10 ml
Dung dịch adenin - guanin - uracil	5 ml
Dung dịch Xanthin	5 ml
Dung dịch vitamin I	10 ml
Dung dịch vitamin II	10 ml
Dung dịch muối A	5 ml
Dung dịch muối B	5 ml
Dung dịch asparagin	5 ml
Dung dịch thủy phân casein bằng acid	25 ml
Dextrose khan	10 g
Natri acetat khan	5 g
Acid ascorbic	1 g
Dung dịch polysorbat 80	5 ml

Chuẩn bị các dung dịch

Dung dịch thủy phân casein bằng acid: Cho 100 g *casein* không chứa vitamin vào 500 ml *dung dịch acid hydrochloric 6 N*, đun hồi lưu từ 8 h đến 12 h. Loại bỏ acid hydrochloric trong hỗn hợp bằng cất chân không đến khi thu được khối bột nhão. Hòa tan cẩn thận được bằng *nước để pha tiêm*, điều chỉnh pH dung dịch về $3,5 \pm 0,1$ bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)*. Thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 1000 ml. Thêm 20 g *than hoạt*, khuấy để hấp phụ trong 1 h. Lọc lấy dịch trong. Tiếp tục lặp lại bước thêm than hoạt trên đến khi thu được dung dịch trong suốt. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh ở nhiệt độ không dưới 10 °C.

Dung dịch Asparagin: Hòa tan 2,0 g *L-asparagin* trong vừa đủ 200 ml *nước để pha tiêm*. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh.

Dung dịch adenin - guanin - uracil: Hòa tan 200 mg mỗi loại *adenin sulfat*, *guanin hydrochlorid* và *uracil* trong 10 ml *dung dịch acid hydrochloric 4 N*, làm nóng nếu cần đến khi tan hết, làm lạnh, thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 200 ml. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh.

Dung dịch xanthin: Hòa 0,2 g *xanthin* vào khoảng 30 ml đến 40 ml *nước để pha tiêm*, đun nóng đến khoảng 70 °C, thêm 6 ml *dung dịch amoni hydroxyd 6 N*, khuấy đều đến khi tan hoàn toàn. Làm lạnh đến nhiệt độ phòng, thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 200 ml. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh.

Dung dịch muối A: Hòa tan 10 g *kali dihydrophosphat (TT)* và 10 g *đikali hydrophosphat (TT)* trong vừa đủ 200 ml

nước để pha tiêm. Thêm 2 giọt *acid hydrochloric (TT)*, bảo quản trong toluen.

Dung dịch muối B: Hòa tan 4,0 g *magnesi sulfat (TT)*, 0,20 g *natri clorid (TT)*, 0,20 g *sắt (II) sulfat (TT)* và 0,20 g *mangan sulfat (TT)* trong vừa đủ 200 ml *nước để pha tiêm*. Thêm 2 giọt *acid hydrochloric (TT)*, bảo quản trong toluen.

Dung dịch polysorbat 80: Hòa tan 20 g *polysorbat 80* vào 200 ml *alcol*. Bảo quản trong tủ lạnh.

Dung dịch vitamin I: Hòa tan 10 mg *riboflavin*, 10 mg *thiamin hydrochlorid*, 100 µg *biotin* và 20 mg *niacin* trong vừa đủ 400 ml *dung dịch acid acetic 0,02 N*. Bảo quản trong toluen, tránh ánh sáng, trong tủ lạnh.

Dung dịch vitamin II: Hòa tan 20 mg *acid para-aminobenzoic*, 10 mg *calci pantothenat*, 40 mg *pyridoxal hydrochlorid*, 40 mg *pyridoxin hydrochlorid*, 8 mg *pyridoxamin dihydrochlorid* và 2 mg *acid folic* trong vừa đủ 400 ml *dung dịch ethanol trung tính loãng (1 trong 4)*. Bảo quản tránh ánh sáng, trong tủ lạnh.

Pha chế môi trường

Hòa tan hoàn toàn cystin và tryptophan vào 10 ml *dung dịch acid hydrochloric 1 N (TT)*, thêm 8 dung dịch đã chuẩn bị ở trên (trừ dung dịch polysorbat 80) trộn đều, tiếp tục thêm 100 ml *nước để pha tiêm*, hòa tan dextrose, natri acetat, acid ascorbic vào dung dịch này. Lọc nếu cần. Thêm dung dịch polysorbat 80, khuấy đều, điều chỉnh pH môi trường từ 5,5 đến 6,0 bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)*, thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 250 ml.

Có thể sử dụng môi trường ở dạng bột khô có thành phần như trên. Chế tạo môi trường theo hướng dẫn ghi trên nhãn.

Môi trường pha loãng

Pha loãng Môi trường định lượng bằng một lượng *nước để pha tiêm* tương đương sẽ thu được Môi trường pha loãng. Đong vào mỗi ống thủy tinh 10 ml môi trường vừa pha, hấp tiệt khuẩn. Làm lạnh ngay sau khi hấp.

Nước ép cà chua

Ly tâm nước ép cà chua để loại bỏ hết phần thịt quả, lấy phần dung dịch. Hòa 5 g chất tợ lọc vào 1 L dung dịch trên thu được hỗn dịch. Lọc dưới áp suất giảm đến khi thu được dung dịch có màu nâu tây trong suốt. Bảo quản trong toluen, trong tủ lạnh.

Môi trường nuôi cấy chủng

Thành phần:

Cao men bia tan trong <i>nước để pha tiêm</i>	0,75 g
Pepton khô	0,75 g
Dextrose khan	1,0 g
Kali dihydrophosphat	0,2 g
Nước ép cà chua	10 ml
Polysorbat 80	1 ml

Cách tiến hành: Hòa tan cao men bia, pepton, dextrose khan, kali dihydrophosphat trong 60 ml đến 70 ml *nước để pha tiêm*, tiếp tục thêm 10 ml nước ép cà chua và 1 ml polysorbat 80, điều chỉnh pH dung dịch về 6,8 bằng *dung*

dịch natri hydroxyd 1 N (TT). Thêm nước để pha tiêm vừa đủ 100 ml. Đong vào ống nghiệm mỗi ống 10 ml môi trường. Hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 min. Làm lạnh ngay sau khi hấp.

Có thể sử dụng môi trường có thành phần như trên ở dạng bột đông khô. Chế tạo môi trường theo hướng dẫn ghi trên nhãn.

Chủng gốc

Thêm 1,0 g đến 1,5 g thạch vào 100 ml môi trường nuôi cấy chủng, trộn đều, đun trong cách thủy đến khi thạch tan hoàn toàn, đong vào mỗi ống nghiệm thủy tinh 10 ml môi trường. Hấp ở 121 °C trong 15 min. Để nguội. Lấy ít nhất 3 ống môi trường, cấy vào mỗi ống một quai cấy hỗn dịch *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 gốc thuần chủng. Ủ ở một nhiệt độ xác định trong khoảng từ 30 °C đến 40 °C, trong 16 h đến 24 h, duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng nhiệt độ lựa chọn ± 0,5 °C. Bảo quản trong tủ lạnh. Chủng sử dụng trong phép thử định lượng phải được cấy truyền không dưới 10 lần trong vòng 2 tuần.

Cấy truyền chủng ít nhất 3 lần một tuần, không sử dụng chủng đã quá 4 ngày tuổi. Hoạt tính của chủng sẽ được tăng lên khi cấy truyền hàng ngày hoặc 2 ngày 1 lần đến khi có thể quan sát sự phát triển của chủng làm đục môi trường sau 2 h đến 4 h nuôi cấy. Chủng vi sinh vật chậm phát triển khó có thể tạo ra một đường chuẩn đáp ứng thích hợp và do đó có thể dẫn đến kết quả bất thường.

Hỗn dịch chủng làm việc

Chuẩn bị 2 ống chứa 10 ml môi trường nuôi cấy chủng đã chuẩn bị ở trên, cấy một quai cấy hỗn dịch chủng *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 gốc vào mỗi ống. Ủ ở một nhiệt độ xác định trong khoảng từ 30 °C đến 40 °C, trong 16 h đến 24 h, duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng nhiệt độ lựa chọn ± 0,5 °C. Trong điều kiện vô trùng, ly tâm, lấy cặn vi khuẩn, loại bỏ dịch nổi. Hòa cặn vào 5 ml môi trường pha loãng, gộp hỗn dịch từ 2 ống thu được hỗn dịch chủng gốc, pha loãng hỗn dịch chủng gốc bằng môi trường pha loãng sao cho khi pha loãng hỗn dịch này với tỷ lệ 1 : 20 bằng nước muối sinh lý vô khuẩn để thu được hỗn dịch có độ truyền qua 70 % khi đo quang ở 530 nm, cuvet 10 mm, mẫu trắng là nước muối sinh lý vô khuẩn. Pha loãng hỗn dịch chủng gốc bằng môi trường định lượng tỷ lệ 1 : 400 thu được hỗn dịch chủng làm việc. *Chú ý:* Độ đục của hỗn dịch chủng làm việc có thể thay đổi nhằm tạo được sự đáp ứng mong muốn.

Hỗn dịch chủng đông lạnh *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 có thể thay thế cho chủng gốc *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830.

Cách tiến hành

Dụng cụ thử nghiệm được rửa sạch bằng các chất tẩy rửa và phương pháp thích hợp. Sấy ở 250 °C trong 2 h để phân hủy dư lượng vitamin B₁₂.

Dụng dịch thử: Lấy một lượng thích hợp số đơn vị đóng gói, làm đồng nhất mẫu với mỗi g hoặc ml. Cân chính xác một lượng chế phẩm thích hợp vào bình nón, thêm 25 ml

dung dịch đệm, lắc đều. Hấp hỗn dịch trên trong nồi hấp ở 121 °C trong 10 min. Lấy ra, để nguội, chuyển toàn bộ dịch hấp sang bình định mức dung tích 200 ml, thêm nước để pha tiêm vừa đủ đến vạch. Ly tâm hoặc lọc, thu được dịch lọc trong. Tiếp tục pha loãng dịch lọc với nước để pha tiêm để được dung dịch thử làm việc có nồng độ tương tự dung dịch chuẩn.

Dung dịch chuẩn cyanocobalamin gốc: Hòa tan cyanocobalamin chuẩn trong alcol 25 % để được dung dịch có nồng độ 1 µg/ml. Bảo quản trong tủ lạnh.

Dung dịch chuẩn cyanocobalamin làm việc: Lấy chính xác một lượng thích hợp dung dịch chuẩn cyanocobalamin gốc, pha loãng bằng nước để pha tiêm để thu được dung dịch chuẩn cyanocobalamin làm việc có nồng độ 0,01 ng đến 0,04 ng/ml.

Cách tiến hành:

Cho vào mỗi ống nghiệm 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml dung dịch chuẩn cyanocobalamin làm việc. Thêm nước để pha tiêm vừa đủ 5,0 ml. Thêm vào mỗi ống nghiệm 5,0 ml môi trường định lượng. Mỗi nồng độ làm lặp lại 2 ống.

Cho vào mỗi ống nghiệm khác 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dung dịch thử làm việc. Thêm nước để pha tiêm vừa đủ 5,0 ml. Thêm vào mỗi ống nghiệm 5,0 ml môi trường định lượng. Mỗi nồng độ làm lặp lại hai ống.

Cho vào 4 ống trắng, mỗi ống 5,0 ml nước để pha tiêm và 5,0 ml môi trường định lượng.

Đậy nắp ống nghiệm để tránh nhiễm khuẩn. Hấp tiệt trùng các ống nghiệm trên ở 121 °C trong 5 min, có thể hấp thời gian dài hơn tuy nhiên không được quá 10 min, sau khi hấp xong làm lạnh ngay.

Trong điều kiện vô trùng, cấy vào mỗi ống 500 µl hỗn dịch chủng làm việc trừ hai ống trắng “không cấy chủng”. Ủ ở một nhiệt độ xác định trong khoảng từ 30 °C đến 40 °C, trong 16 h đến 24 h, duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng nhiệt độ lựa chọn ± 0,5 °C. Sau thời gian nuôi cấy, làm ngừng sự phát triển của vi khuẩn bằng cách nhúng các ống nghiệm trong nước để pha tiêm nóng không dưới 80 °C trong 5 min. Để nguội đến nhiệt độ phòng.

Lắc đều ống thử nghiệm. Để yên hỗn dịch thử nghiệm trong một khoảng thời gian nhất định đến khi giá trị độ truyền qua dao động ít nhất. Đo độ truyền qua của ống trắng “cây chủng” với mẫu trắng là ống trắng “không cấy chủng” ở bước sóng 530 nm, cuvet 10 mm. Nếu độ truyền qua của hai ống trắng này khác nhau quá 5 % hoặc có dấu hiệu chủng bị nhiễm thì phải loại bỏ phép thử. Tiếp tục đo độ truyền qua của các ống nghiệm chứa dung dịch chuẩn và dung dịch thử với mẫu trắng là ống trắng “không cấy chủng”. Chú ý thời gian đo độ truyền qua của các hỗn dịch thử nghiệm phải như nhau.

Tính kết quả

Xây dựng đường đáp ứng của dung dịch chuẩn theo quy trình dưới đây:

Kiểm tra các giá trị độ truyền qua và loại bỏ những giá trị sai số thô.

Đối với mỗi mức liều của chuẩn, tính tổng các giá trị độ truyền qua của hai ống lặp lại (Σ), giá trị y được tính như sau: $y = 2,00 - \Sigma$.

Thiết lập đồ thị với trục tung là giá trị y , trục hoành là logarit số ml của dung dịch cyanocobalamin chuẩn. Có thể sử dụng trục hoành theo thang số học hay logarit để thu được đường đáp ứng phù hợp. Vẽ đường chuẩn tương đối phù hợp nhất với các điểm trên đồ thị.

Tính $y = 2,00 - \Sigma$ đối với mẫu thử tương tự như cách tính y đối với mẫu chuẩn. Từ đồ thị đọc giá trị logarit của thể tích dung dịch chuẩn tương ứng với mỗi giá trị y , loại bỏ các giá trị y nằm ngoài khoảng xác định của giá trị chuẩn (khoảng từ giá trị nhỏ nhất đến giá trị lớn nhất của chuẩn). Đối với mỗi mức liều, giá trị x là hiệu của giá trị logarit vừa đọc được và giá trị logarit số ml của dung dịch chuẩn tương ứng. Tính trung bình ít nhất ba giá trị x trở lên thu được $x_{tb} = M'$.

Xác định giá trị M bằng công thức:

$$M = M' + \lg R$$

Tính hoạt lực cyanocobalamin của mẫu thử bằng công thức:

$$\text{antilog } M = \text{antilog } (M' + \lg R)$$

Trong đó:

R là hoạt lực giả định của cyanocobalamin trong mẫu thử ban đầu.

Tiến hành lặp lại phép thử ít nhất một lần, sử dụng dung dịch thử độc lập. Nếu giá trị M giữa hai lần thử sai khác nhau không quá 0,08 thì giá trị trung bình M_{tb} chính là hàm lượng của cyanocobalamin trong mẫu thử. Nếu giá trị M giữa hai lần thử sai khác nhau quá 0,08, tiến hành thêm một hoặc nhiều phép thử nữa. Tính giá trị trung bình M_{tb} từ các giá trị M khác nhau không quá 0,15 là hoạt lực của cyanocobalamin trong mẫu thử.