

13.6 THỬ GIỚI HẠN NHIỄM VI SINH VẬT

1. XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ VI SINH VẬT

Giới thiệu

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

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

Có thể sử dụng 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 được điển.

Qui định chung

Tiến hành phép thử trong điều kiện đảm bảo tránh được sự tạp nhiễm vi sinh vật bên ngoài vào mẫu thử. Các biện pháp phòng tránh tạp nhiễm phải không ảnh hưởng đến bất cứ loài vi sinh vật nào có thể phát hiện được trong mẫu thử.

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

Phương pháp xác định tổng số vi sinh vật

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

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

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

Yêu cầu chung

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

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

Chuẩn bị chủng vi sinh vật

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

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

Mẫu chứng âm

Để đánh giá điều kiện thử nghiệm, tiến hành mẫu chứng âm bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng thay cho mẫu thử. Mẫu chứng âm phải không được có vi sinh vật phát triển. Mẫu chứng âm 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 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 lỏng 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 lỏng casein đậu tương 30 °C - 35 °C 18 h - 24 h	Môi trường thạch casein đậu tương và môi trường lỏng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-	Môi trường thạch casein đậu tương/MPN môi trường lỏng 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 lỏng casein đậu tương 30 °C - 35 °C 18 h - 24 h	Môi trường thạch casein đậu tương và môi trường lỏng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-	Môi trường thạch casein đậu tương/MPN môi trường lỏng 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 lỏng casein đậu tương 30 °C - 35 °C 18 h - 24 h	Môi trường thạch casein đậu tương và môi trường lỏng casein đậu tương ≤ 100 CFU 30 °C - 35 °C ≤ 3 ngày	-	Môi trường thạch casein đậu tương/MPN môi trường lỏng 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 lỏng 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 brasiliensis</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 diện 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 diện 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 diện 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* (TT). 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 dương (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 dương.

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 Ca^{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 vi sinh vật cho phép của mẫu thử.

Hồi 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.

Để đếm tổng số vi sinh vật hiếu khí, chuyển màng lọc lên bề mặt đĩa môi trường thạch casein đậu tương. Để 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 lỏng casein đậu tương. Nếu cần, có thể thêm chất diện hoạt {ví dụ: *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 lỏng 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 vi sinh vật thử phải không được khác quá 2 lần so với kết quả của ống chứng dương 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 dương. 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 dược chất chính được đưa vào chế phẩm trong các trường hợp sau: Khối lượng dược chất chính không quá 1 mg trong 1 đơn vị (1 viên nén, 1 nang, 1 ống hoặc lọ thuốc tiêm...) hoặc khối lượng dược 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, mẫu chứng âm* 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, mẫu chứng âm* 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 trải bề mặt:

Sử dụng phương pháp phù hợp theo mục *Kiểm tra chất lượng môi trường, sự phù hợp của phương pháp đếm, mẫu chứng âm* 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, mẫu chứng âm* 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 chuyển 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 sử dụng môi trường thạch Sabouraud-dextrose có bổ sung kháng sinh (ví dụ cloramphenicol). 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 vi sinh vật cho phép, có thể đánh giá như sau:

10^1 CFU: Số lượng tối đa được chấp nhận = 20;

10^2 CFU: Số lượng tối đa được chấp nhận = 200;

10^3 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 điển.

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 diện hoạt trong quá trình chuẩn bị mẫu thử, phải đảm bảo chất diện hoạt đó không chứa độc tố với vi sinh vật và chất diện 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, mẫu chứng âm

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 chế phẩm làm ảnh hưởng đến kết quả của phép thử.

Chuẩn bị chủng vi sinh vật

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

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 pH 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 79.03). Cấy chủng *Clostridium sporogenes* 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 *C. sporogenes* dạng sinh dưỡng như ở trên, có thể sử dụng hỗn dịch bào tử ổn định. Hỗn dịch bào tử được bảo quản ở 2 °C đến 8 °C trong khoảng thời gian đã được thẩm định.

Mẫu chứng âm

Để đánh giá điều kiện thử nghiệm, tiến hành mẫu chứng âm bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng thay cho mẫu thử. Mẫu chứng âm phải không được có sự phát triển của vi sinh vật. Mẫu chứng âm 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 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	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
		Ức chế sự phát triển	<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	<i>E. coli</i>
		Ức chế sự phát triển	<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 Salmonella Rappaport Vassiliadis	Kích thích 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
		Ức chế sự phát triển	<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	<i>P. aeruginosa</i>
		Ức chế sự phát triển	<i>E. coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Môi trường thạch muối Mannitol	Kích thích sự phát triển và đặc hiệu	<i>S. aureus</i>
		Ức chế sự phát triển	<i>E. coli</i>
<i>Clostridia</i>	Môi trường tăng sinh cho Clostridia	Kích thích sự phát triển	<i>C. sporogenes</i>
	Môi trường thạch Columbia	Kích thích sự phát triển	<i>C. sporogenes</i>
<i>Candida albicans</i>	Môi trường lỏng Sabouraud-dextrose	Kích thích sự phát triển	<i>C. albicans</i>
	Môi trường thạch Sabouraud-dextrose	Kích thích sự phát triển và đặc hiệu	<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 chứng 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 tiên 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 tiên 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 vi khuẩn Gram âm dung nạp mật 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 tiên 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 chế phẩm			Số vi khuẩn có thể có trong 1 gam hoặc 1 ml chế phẩm
0,1 g hoặc 0,1 ml	0,01 g hoặc 0,01 ml	0,001 g hoặc 0,001 ml	
+	+	+	$> 10^3$
+	+	-	$< 10^3$ và $> 10^2$
+	-	-	$< 10^2$ và > 10
-	-	-	< 10

Escherichia coli

Phát hiện vi khuẩn:

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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh khác.

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

Đánh giá số lượng:

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 lượng mẫu thử 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 casein đậu tương, lắc 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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh khác.

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.

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 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:

Cấy chuyển 0,1 ml môi trường lỏng 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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh 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, phương pháp định danh 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 lỏng 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 lỏng 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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh khác.

Mẫu thử không có *P. aeruginosa* nếu không có khuẩn lạc mọc trên môi trường hoặc các phản ứng sinh hóa, phương pháp định danh 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 lỏng 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 lỏng 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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh 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, phương pháp định danh 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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh 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, phương pháp định danh 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 lỏng 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 bằng nhiều phản ứng sinh hóa hoặc phương pháp định danh 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, phương pháp định danh 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*, điều chỉnh pH $7,2 \pm 0,2$ bằng *natri hydroxyd (TT)*. Thêm *nước* 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* 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 casein đậu tương

Casein thủy phân bởi pancreatin	15,0 g
Bột đậu tương thủy phân bởi papain	5,0 g
Natri clorid	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 $7,3 \pm 0,2$ 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 và 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 tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,1 \pm 0,2$ ở 25 °C. Đun sôi 1 min, sau đó hấp tiệt 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 tiệt 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 tiệt 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 tiệt 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 tiệt 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 tiệt 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 tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,4 \pm 0,2$ ở 25 °C. Hấp tiệt 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 ẩm thạch, hòa tan các thành phần bằng cách đun nóng tới sôi, khuấy đều liên tục. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $6,8 \pm 0,2$ ở 25 °C. Hấp tiệt 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 ẩm thạch, hòa tan bằng cách đun nóng tới sôi, khuấy đều liên tục. Điều chỉnh pH sao cho sau khi hấp tiệt khuẩn, môi trường có pH $7,3 \pm 0,2$ ở 25 °C. Hấp tiệt 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 VI SINH VẬT

Nếu không có chỉ dẫn trong chuyên luận riêng thì giới hạn nhiễm vi sinh vật 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 vi sinh vật

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... hoặc dạng dung dịch dầu)	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 dược liệu dùng để sản xuất thuốc uống	10^4 *	10^2 *	Không quá 10^2 CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật <i>trong</i> 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 thang, thuốc bột, ... để ngâm rượu hoặc xử lý bằng nước nóng (không sôi) trước khi dùng. Cao dược liệu dùng để sản xuất thuốc uống mà quá trình chiết (Ví dụ ngâm hoặc ngâm nhỏ giọt trong nước...) không làm giảm số lượng vi sinh vật đạt được mức * ở trên	10^5 Số lượng tối đa được chấp nhận: 5×10^5	10^4 Số lượng tối đa được chấp nhận: 5×10^4	Không quá 10^4 CFU vi khuẩn Gram âm dung nạp mật <i>trong</i> 1 g (ml) Không có <i>Salmonella</i> trong 25 g (ml) Không có <i>Escherichia coli</i> trong 1 g (ml)
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> <i>trong</i> 1 g (ml) Không có <i>Salmonella</i> trong 25 g (ml)

