

STUDY USING THE *CLOSTRIDIUM SPOROGENES* STRAIN TO QUALITY TEST OF THIOGLYCOLLATE MEDIUM (FTM)

Nguyen Khanh Ly, Nguyen Thi Kieu, Nguyen Thi Van Quynh*
Nguyen Thu Quynh, Pham Thi Hang, Nguyen Thi Thu Thuy,
National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

Received 8 September 2023

Accepted 10 November 2023

Abstract

With the goal to evaluating the quality of Fluid Thioglycollate Medium (FTM) used for the sterility tested in laboratory of vaccines and biologicals at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB). We conducted a study to evaluate the suitability of the FTM media quality testing process using the anaerobic *C. sporogenes* strain with specificity criteria performed through 6 independent tests from October 2019 to March 2020 at NICVB.

The results showed that *C. sporogenes* strain was well growth on FTM tubes Media after inoculating 10-100 CFU are meeting the standard requirements for specificity according to WHO guidelines.

From the above research, the results have proven that the quality tested process FTM media using *C. sporogenes* strain at NICVB is appropriate, reliable and meets quality standards according to WHO regulations.

Keywords: FTM media, C. sporogenes strain, growth promotion test

* Corresponding author

E-mail address: vanquynh1074@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i4.117>

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CHỦNG KỶ KHÍ *CLOSTRIDIUM SPOROGENES* KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG MÔI TRƯỜNG THIOGLYCOLAT (FTM)

Nguyễn Khánh Ly, Nguyễn Thị Kiều, Nguyễn Thị Vân Quỳnh*
Nguyễn Thu Quỳnh, Phạm Thị Hằng, Nguyễn Thị Thu Thủy,
*Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 8 tháng 9 năm 2023
Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 11 năm 2023

Tóm tắt

Với mục tiêu đánh giá chất lượng môi trường Fluid Thioglycollate Medium (FTM) dùng cho thử nghiệm kiểm tra vô khuẩn vắc xin và sinh phẩm y tế tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB). Chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá sự phù hợp của quy trình kiểm tra chất lượng môi trường FTM sử dụng chủng kỵ khí *C. sporogenes* với các tiêu chí độ đặc hiệu được thực hiện qua 6 lần thử nghiệm độc lập từ 10/2019 đến 3/2020 tại NICVB.

Kết quả cho thấy có sự phát triển của chủng *C. sporogenes* trên các ống môi trường FTM sau khi cấy 10-100 CFU, đạt yêu cầu tiêu chuẩn về độ đặc hiệu theo hướng dẫn của WHO. Từ nghiên cứu trên kết quả đã chứng minh được quy trình kiểm tra chất lượng môi trường FTM sử dụng chủng *C. sporogenes* tại NICVB là phù hợp, đáng tin cậy và đạt tiêu chuẩn chất lượng theo quy định WHO

Từ khoá: Môi trường FTM, chủng C. sporogenes, kiểm tra chất lượng môi trường.

1. Đặt vấn đề

Thử nghiệm vô trùng 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 trùng. Vi sinh vật có trong các nguyên liệu, chế phẩm sẽ phát triển trên các môi trường dinh dưỡng thích hợp, chúng làm đục môi trường lỏng tạo váng trên bề mặt hoặc lắng cặn ở đáy ống môi trường [5].

Môi trường nuôi cấy chứa những chất dinh dưỡng thích hợp nhằm đảm bảo cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển, môi trường dùng trong thử nghiệm vô trùng vắc xin và sinh phẩm cần kiểm tra về chất lượng. Đánh giá chất lượng môi trường dùng trong thử nghiệm vô trùng dựa trên 2 tính chất: Tính vô khuẩn và khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho sự phát triển của vi khuẩn và nấm (Tính tăng sinh) [3], [4], [6].

Việc kiểm tra chất lượng mỗi loại môi trường được thực hiện trước hoặc song với kiểm tra vô trùng vắc xin sinh phẩm. Tất cả các loại môi trường dùng trong thử nghiệm vô trùng vắc xin/sinh phẩm cần được kiểm tra về tính vô trùng và tính tăng sinh. Tính tăng sinh nhằm đánh giá khả năng phát triển của các chủng thử thách trong môi trường bằng cách cho vào mỗi ống môi trường không quá 100 CFU chủng thử thách. Môi trường đạt yêu cầu về tính tăng sinh nếu các chủng vi khuẩn trong các ống môi trường mọc trong vòng 3 ngày, các chủng nấm trong các ống môi trường mọc trong vòng 5 ngày [4].

Môi trường FTM (Fluid Thioglycollate Medium: FTM) là môi trường đa năng nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí, hiếu khí và được dùng trong thử nghiệm kiểm tra vô trùng để phát hiện các vi sinh vật sống nhiễm vào vắc xin, sinh phẩm. Tại NICVB, kiểm tra chất lượng môi trường FTM sử dụng chủng vi khuẩn kỵ khí *Clostridium sporogenes* là kỹ thuật mới đánh giá chất lượng môi trường dùng trong thử nghiệm vô trùng. Nghiên cứu áp dụng quy trình kiểm tra chất lượng môi trường FTM sử dụng chủng kỵ khí *C. sporogenes* được xác định độ đặc hiệu qua 6 lần thử nghiệm độc lập, kết quả của nghiên cứu là cơ sở để có thể áp dụng quy trình này tại NICVB. Mục tiêu nghiên cứu là đánh giá sự phù hợp của quy trình kiểm tra chất lượng môi trường FTM sử dụng chủng kỵ khí *C. sporogenes* về độ đặc hiệu.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm phòng thí nghiệm.

2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: quy trình kiểm tra chất lượng môi trường FTM.

- Địa điểm: Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Môi trường thực nghiệm, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.

- Thời gian: Từ tháng 10/2019 – tháng 03/2020

2.2. Vật liệu, hóa chất

Môi trường, hóa chất: Môi trường FTM đã được pha tại NICVB, dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn, môi trường thạch TSC.

Chủng vi sinh vật thử thách: Chủng dùng cho kiểm tra chất lượng môi trường: *Clostridium*

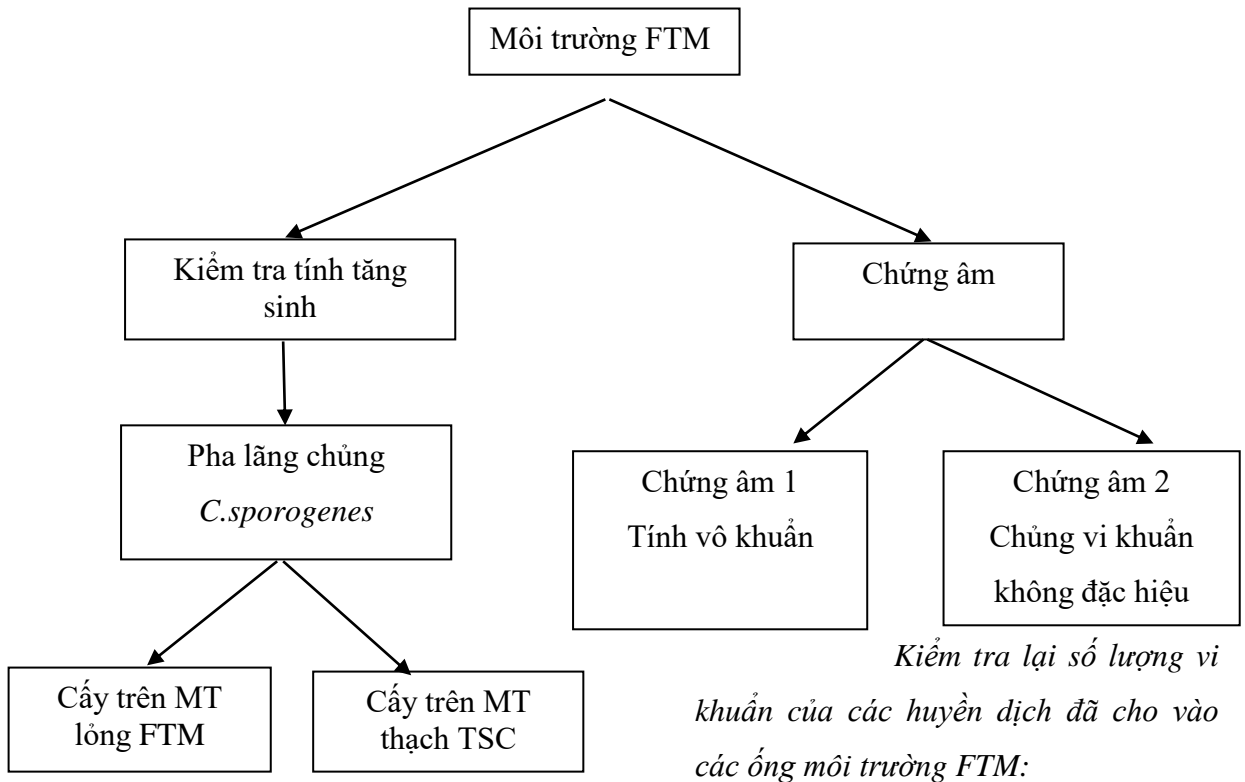
sporogenes ATCC 114367 (Nồng độ chủng làm việc *C. sporogenes* là $4,9 \times 10^4$ - 6×10^4 /1 ống – do Khoa Mẫu chuẩn NICVB cung cấp);

Mẫu thử sử dụng trong 1 lần thử nghiệm:
Môi trường FTM là 07 ống, thạch TSC là 02 ống.

Vật tư và trang thiết bị: Pipetman, tủ nuôi cấy vô trùng, tủ ấm, tủ mát, tủ lạnh... dụng cụ vô khuẩn: pipet nhựa, đầu côn các loại, kẹp, pipet aid.....còn hạn sử dụng.

2.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành bằng phương pháp thực nghiệm. Thực hiện 6 lần, dưới đây là sơ đồ 01 lần thực hiện.



2.3.1. Kiểm tra tính tăng sinh

Kiểm tra tính tăng sinh của môi trường sử dụng chủng C.sporogenes:

- Đánh dấu các ống môi trường FTM để kiểm tra theo tên chủng, sử dụng 02 ống.
- Pha loãng chủng bằng nước muối sinh lý để có huyền dịch 10 – 100CFU/ml.
- Cấy chủng *C.sporogenes* vào các ống môi trường FTM: Cấy 1 ml huyền dịch chủng trên vào các ống môi trường FTM tương ứng đã đánh dấu sao cho số lượng chủng cho vào mỗi ống môi trường FTM trong khoảng từ 10 – 100CFU.

- Cấy đếm trên ống môi trường thạch TSC với số lượng 02 ống.
- Cấy 1ml huyền dịch chủng trên vào các ống môi trường thạch TSC giống như đã cho vào các ống môi trường FTM tương ứng.
- Ủ các môi trường ở nhiệt độ 30 – 35°C
- Theo dõi môi trường: FTM trong vòng 72 giờ, TSC trong vòng 24 giờ.

2.3.2. Chứng âm

- Chứng âm: Tính vô khuẩn của lô môi trường FTM sử dụng. Lấy ngẫu nhiên 5 ống môi trường FTM ủ ở nhiệt độ 30-35°C/14 ngày, theo dõi kết quả tại 3 thời điểm.

Tiêu chuẩn về độ đặc hiệu:

3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-
4	-	4	-	4	-	4	-	4	-	4	-
5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-

(-) : Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm.

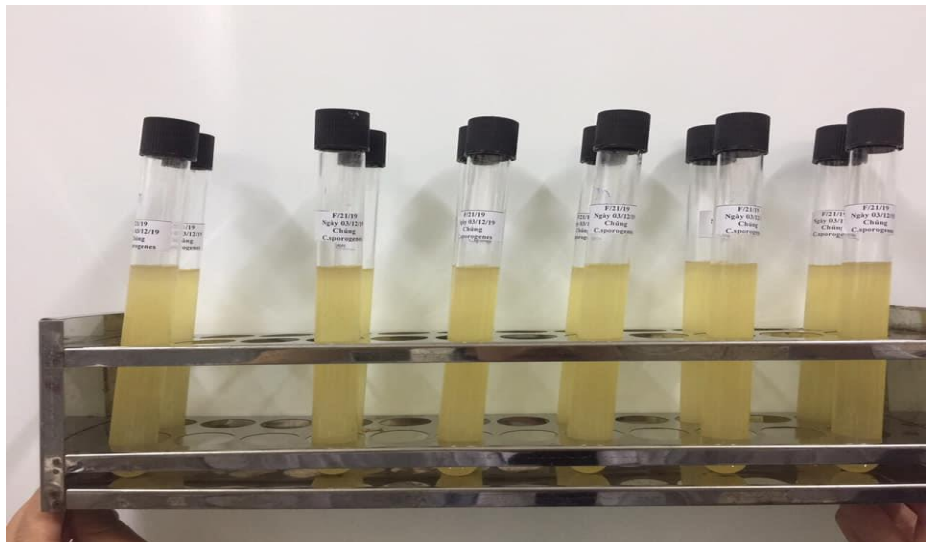
Các ống môi trường FTM lô F/21/19 của 6 lần thử nghiệm đều trong, không mất chỉ thị màu, không có cặn ở đáy ống sau 14 ngày theo dõi. Môi trường FTM đạt yêu cầu về vô khuẩn.

3.2. Kết quả kiểm tra sự phát triển chủng kỵ khí *C. sporogenes* cấy trên các ống môi trường FTM (Tính tăng sinh)

Bảng 5: Kết quả kiểm tra sự phát triển chủng kỵ khí *C. sporogenes* cấy trên các ống môi trường FTM của 6 lần thử nghiệm

Lần thử nghiệm 1		Lần thử nghiệm 2		Lần thử nghiệm 3		Lần thử nghiệm 4		Lần thử nghiệm 5		Lần thử nghiệm 6	
FTM	Kết quả	FTM	Kết quả	FTM	Kết quả	FTM	Kết quả	FTM	Kết quả	FTM	Kết quả
Ống 1	+	Ống 1	+	Ống 1	+	Ống 1	+	Ống 1	+	Ống 1	+
Ống 2	+	Ống 2	+	Ống 2	+	Ống 2	+	Ống 2	+	Ống 2	+

(+): ống FTM đục, mất màu chỉ thị



Hình 1: Hình ảnh phát triển của chủng *C.sporogenes* trong môi trường FTM

Kết quả ở bảng 5 và hình 1 cho thấy, ở 6 lần thử nghiệm tất cả các ống môi trường sau khi cấy chủng *C.sporogenes* đều đục, mất màu chỉ thị trong vòng 3 ngày sau khi cấy.

Sự phát triển của chủng *C.sporogenes* trên môi trường FTM là rõ ràng trong 6 lần thử nghiệm.

3.3. Kết quả kiểm tra chủng kỵ khí *C. sporogenes* trên thạch TSC

Bảng 6: Kết quả kiểm tra sự phát triển chủng kỵ khí *C. sporogenes* cấy trên các ống thạch TSC

Lần thử nghiệm	1		2		3		4		5		6		Trung bình
Số ống FTM	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	22
Chủng <i>C. sporogenes</i>	18	21	25	27	19	22	24	26	20	22	21	19	

Số lượng chủng *C. sporogenes* trong các ống môi trường thạch TSC sau khi cấy đều nằm trong khoảng cho phép là từ 10 – 100CFU/ống.



Ảnh 2: Ảnh kiểm tra chủng kỵ khí *C.sporogenes* trên thạch TSC

(Khuẩn lạc màu đen, đếm được số lượng khuẩn lạc)

4. Bàn luận

Kiểm tra chất lượng môi trường FTM là thử nghiệm được thực hiện để đánh giá chất lượng môi trường dùng trong thử nghiệm vô trùng vắc xin và sinh phẩm. Tính đặc hiệu

của quy trình kiểm tra chất lượng môi trường FTM đối với chủng *Clostridium sporogenes* được thể hiện qua việc kiểm tra tính tăng sinh với chủng này. Chủng *Clostridium sporogenes* trong nghiên cứu

này được NICVB mua từ ngân hàng chủng chuẩn Mỹ -ATCC, việc nhân chủng và đông khô chế phẩm này được thực hiện với sự hợp tác nghiên cứu của Khoa Mẫu chuẩn NICVB với Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế IVAC. Loạt chủng chuẩn *C. sporogenes* đạt yêu cầu về chất lượng và được NICVB phê chuẩn cho phép sử dụng theo quyết định số 86/QĐ-KĐQG. Vi sinh vật dùng trong thử nghiệm kiểm tra chất lượng môi trường bao gồm các vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí với số lượng cấy vào môi trường <100 CFU [6], [7]. Tại NICVB trước năm 2019, thực hiện kiểm tra chất lượng môi trường sử dụng 3 chủng *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Candida albicans* ATCC 10231. Do đó chúng tôi, tiến hành nghiên cứu này để bổ sung thêm chủng kỵ khí trong thực hiện kiểm tra chất lượng môi trường theo khuyến cáo [4], [7].

Đối chiếu với tiêu chuẩn về độ đặc hiệu, các ống môi trường FTM lô F/21/19 của 6 lần thử nghiệm khi không cấy chủng *C. sporogenes* đạt yêu cầu về vô khuẩn và có sự phát triển của chủng *C. sporogenes* khi chủ động cấy vào môi trường.

Từ các kết quả cho thấy qua 6 lần thử nghiệm độc lập, thực hiện thử nghiệm cùng

một phương pháp, trong cùng một phòng thí nghiệm, sử dụng cùng 1 thiết bị cho kết quả có sự phát triển của chủng kỵ khí trong vòng 3 ngày nuôi cấy trên môi trường FTM Chủng môi trường FTM: không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi (khi không cấy chủng *C. sporogenes*), không có sự phát triển của chủng *M. orale* trong các ống môi trường FTM sau khi cấy chủng *M. orale*.

Có sự phát triển của chủng *C. sporogenes* trên các ống môi trường FTM sau khi cấy chủng. Số lượng chủng *C. sporogenes* đều nằm trong khoảng cho phép từ 10 – 100CFU.

Kết quả cho thấy các ống môi trường FTM của 6 lần thử nghiệm khi không cấy chủng *C. sporogenes* đạt yêu cầu về vô khuẩn và có sự phát triển của chủng *C. sporogenes* khi chủ động cấy vào các ống môi trường.

Các thử nghiệm này đều đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

5. Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu đã chứng minh được quy trình KTCLMT FTM sử dụng chủng *C. sporogenes* là phù hợp và đáng tin cậy, cụ thể quy trình thử nghiệm được thẩm định qua 6 lần thử nghiệm độc lập bằng chủng chuẩn quốc tế ATCC đã được biết trước số lượng và thực hiện song song với các mẫu

chúng âm. Kết quả của 6 lần thử nghiệm được cho thấy độ đặc hiệu của quy trình đạt yêu cầu.

Kiến nghị áp dụng quy trình thử nghiệm để kiểm tra chất lượng MT FTM với chủng kỵ khí *C. sporogenes* tại NICVB.

Tài liệu tham khảo

[1] Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế, MT02-43: Quy trình chuẩn kiểm tra chất lượng môi trường Thioglycolat và môi trường canh thang Tryptic Soy Broth.

[2] Viện Kiểm định Quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế, KĐQG-34: Quy trình chuẩn thẩm định quy trình.

[3] Hội đồng Dược điển -Dược thư Việt Nam (2017), “Phụ lục 15.7. Kiểm tra vô trùng vắc xin/sinh phẩm”, Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản y học, tr PL368 – PL 370.

[4] Hội đồng Dược điển- Dược thư Việt Nam (2017), “Phụ lục 15.8. Môi trường dùng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí và nấm”, Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản y học, tr PL 370.

[5] Bộ Y tế, Vụ khoa học và đào tạo (2005), “Thử vô trùng”, Kiểm nghiệm dược phẩm, Nhà xuất bản y học, tr. 124-125.

[6] World Health Organization, General requirements for the sterility of biological substance, WHO TRS 530 annex 4, pp. 40-57, 1973.

[7] Council of Europe European, European Direction for the quality of medicine (COE-EDQM) (2020), "Sterility", *European pharmacopoeia 10.0*, pp. 191-194.