

STABILITY STUDY AND EXPIRY DATE DETERMINATION OF TRYPTIC SOY AGAR (TSA) MEDIUM PRODUCED AT THE NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINES AND BIOLOGICALS

Trieu Thanh Hai*, Nguyen Thi Van Quynh, Pham Thi Hang, Nguyen Khanh Ly,
 Nguyen Thu Quynh, Nguyen Thi Thu Thuy

National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Received 16 May 2025

Accepted 26 June 2025

Abstract: Currently, laboratories at the National Institute for Control of Vaccines and Biologicals that meet GLP and ISO 17025:2017 standards are controlled for temperature, humidity, air speed rate and microbiological monitoring. Tryptic Soy Agar (TSA) is being used in microbiological testing processes with methods such as: settle plates, volumetric air and surface sampling for microbial colony cultures. To study the stability and determine the shelf life of the TSA medium, the research team from the Department of Experimental Media produced 03 lots of TSA medium at the end of July 2024, then stored them at temperature from 2 to 8°C for period of 4 months (August – November 2024) and evaluated the quality of the criteria: sensory characteristics, pH, sterility and microbial growth at different times (0 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks, 10 weeks, 12 weeks, 13 weeks, and 14 weeks). The results indicated that the TSA media lots still met the quality standards after 12 weeks of storage. For the microbial growth criteria, at week 13 and 14, the recovery value of microbial strains on the lots decreased lower than the standard value ($\geq 70\%$). Therefore, the research team recommends that the shelf life of the TSA media is 3 months from the date of manufacture.

Keyword: *Tryptic Soy Agar, stability, shelf life, culture media*

* Corresponding author:

E-mail address: trieuthanhhai94@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i5.210>

NGHIÊN CỨU TÍNH ỔN ĐỊNH VÀ XÁC ĐỊNH HẠN DỪNG MÔI TRƯỜNG TRYPTIC SOY AGAR (TSA) SẢN XUẤT TẠI VIỆN KIỂM ĐỊNH QUỐC GIA VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ

Triệu Thanh Hải*, Nguyễn Thị Vân Quỳnh, Phạm Thị Hằng, Nguyễn Khánh Ly,
Nguyễn Thu Quỳnh, Nguyễn Thị Thu Thủy

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 16 tháng 05 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 26 tháng 06 năm 2025

Tóm tắt: Hiện nay các phòng thí nghiệm tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế đạt tiêu chuẩn GLP và ISO 17025:2017 đều được kiểm soát về nhiệt độ, độ ẩm, tốc độ trao đổi khí và độ sạch vi sinh. Môi trường thạch dinh dưỡng Tryptic Soy Agar (TSA) đang được sử dụng trong các quy trình kiểm tra vi sinh với các phương pháp như: đặt đĩa thạch, lấy mẫu không khí, lấy mẫu bề mặt để nuôi cấy khuẩn lạc vi sinh vật. Để nghiên cứu tính ổn định và xác định hạn dùng môi trường TSA, nhóm nghiên cứu thuộc khoa Môi trường Thực nghiệm đã sản xuất 03 loạt TSA vào cuối tháng 07/2024, sau đó bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C và đánh giá chất lượng về các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh tại các thời điểm khác nhau (0 tuần, 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần, 10 tuần, 12 tuần, 13 tuần, 14 tuần). Kết quả cho thấy các loạt môi trường TSA vẫn đạt tiêu chuẩn chất lượng sau 12 tuần bảo quản. Đối với tiêu chí tính tăng sinh, ở tuần 13 và 14 giá trị độ phục hồi của các chủng vi sinh vật trên các loạt môi trường giảm thấp hơn giá trị tiêu chuẩn ($\geq 70\%$). Do đó, nhóm nghiên cứu đề xuất hạn dùng của môi trường TSA là 3 tháng kể từ ngày sản xuất.

Từ khoá: *Tryptic Soy Agar, tính ổn định, hạn dùng, môi trường nuôi cấy*

1. Đặt vấn đề

Các phòng thí nghiệm thực hiện các thử nghiệm kiểm định chất lượng vắc xin sinh phẩm tại Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB) đạt tiêu chuẩn GLP, ISO 17025:2017 đều được kiểm soát về nhiệt độ, độ ẩm, tốc độ trao đổi khí và độ sạch vi sinh. Trong đó, hoạt động giám sát độ sạch vi sinh để xác định giới hạn nhiễm khuẩn phải được tiến hành định kỳ để đưa ra các giới hạn cảnh báo và hành động khắc phục [1,2].

Có nhiều phương pháp được sử dụng để giám sát vi sinh phòng sạch như: đặt đĩa thạch, lấy mẫu không khí, lấy mẫu bề mặt. Các phương pháp này dựa trên việc lưu giữ vi sinh vật trên môi trường thạch dinh dưỡng và nuôi cấy khuẩn lạc vi sinh vật. Trong đó, môi trường Tryptic Soy Agar (TSA) là môi trường vi sinh không chọn lọc phổ biến được sử dụng trong giám sát vi sinh để nuôi cấy tăng sinh cho nhiều loại vi sinh vật [1]. Theo khuyến cáo của WHO, để giám sát môi trường phòng sạch cần sử dụng các môi trường dinh dưỡng đã được đánh giá khả năng phục hồi vi sinh vật [2].

Theo hướng dẫn của TCVN 8128:2015 và ISO 11133:2014, hạn sử dụng đối với môi trường nuôi cấy được xác định bằng cách kiểm tra môi trường sau khoảng thời gian bảo quản xác định về các đặc tính vật lý, hóa học và vi sinh vật theo tiêu chuẩn đề ra, trong đó hạn sử dụng phải dựa vào thời gian bảo quản mà môi trường vẫn giữ được các tính năng như quy định [3,4]. Ngoài thành phần môi trường, một số các yếu tố khác cũng ảnh hưởng đến hạn sử dụng như phương pháp khử trùng, quy trình bảo quản, đóng gói, nhiệt độ bảo quản và tiếp xúc với ánh sáng. Việc khảo sát và đánh giá các đặc tính hoá sinh của môi trường nuôi cấy theo thời gian để từ đó xác định hiệu lực tối ưu của môi trường trong điều kiện bảo quản thực cũng được áp dụng trong một số nghiên cứu đã được công bố [5].

Tại NICVB, trung bình một năm khoa Môi trường thực nghiệm (MTTN) sản xuất khoảng 3800 đĩa thạch TSA nhằm phục vụ việc giám sát vi sinh phòng sạch và thử nghiệm vô trùng. Các loạt môi trường sau khi sản xuất tại khoa MTTN được sử dụng ngay và chỉ lưu hành nội bộ do chưa nghiên cứu về tính ổn định và xác định hạn dùng. Theo hướng dẫn của văn phòng công nhận chất lượng BoA về yêu cầu đối với các phòng thí nghiệm thuộc lĩnh vực Sinh, các phòng thí nghiệm phải quy định rõ hạn sử dụng đối với các loại môi trường nuôi cấy [6]. Hiện nay có rất nhiều các hãng thương mại trong và ngoài nước như Merck, BD, LaBone, Scharlau, Lofilchem®...phân phối các loại môi trường thạch dinh dưỡng pha sẵn đi kèm CoA đánh giá chất lượng và công bố hạn sử dụng. Do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá tính ổn định và xác định hạn dùng của môi trường TSA sản xuất tại Viện.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Môi trường Tryptic Soy Agar (TSA)

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 03/2024 đến tháng 11/2024

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Môi trường Thực nghiệm – Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

2.3. Nguyên vật liệu, trang thiết bị

2.3.1 Mẫu thử

03 loại môi trường TSA (TSA/0124/NC; TSA/0224/NC; TSA/0324/NC), số lượng (120 đĩa/loại). Ngày sản xuất: 31/7/2024, các loại môi trường được pha độc lập tại các thời điểm khác nhau trong ngày.

2.3.2 Chủng vi sinh vật thử thách

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: mã số NICVB - 0120

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027: mã số NICVB - 0220

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ATCC 6633: mã số F1

2.3.3 Môi trường, hóa chất

- BacterPlate™ Tryptic Soy Agar (TSA) (TraceMedia™ Tryptic Soy Agar) do Công ty TNHH Thiết bị khoa học Labone sản xuất: Loại 060624 (hạn sử dụng: 06/09/2024); Loại 100724 (hạn sử dụng: 10/10/2024); Loại 230924 (hạn sử dụng: 23/12/2024).

- Tryptone Soya Agar, Merck (code: 1054080500)

- Nước muối sinh lý NaCl 0,9%

2.3.4 Vật tư trang thiết bị

- Dụng cụ dùng 1 lần: Ống falcon 15ml, 50 ml (Corning); Pipet nhựa vô trùng 1ml, 25ml (Corning); Đầu côn 100; 200; 1000; 5000 µl (Gilson); Đĩa petri nhựa vô trùng Ø90x15 mm (Biologix); Găng tay dùng 1 lần; Mũ tiệt trùng (Việt Nam); Khẩu trang tiệt trùng (Danameco)

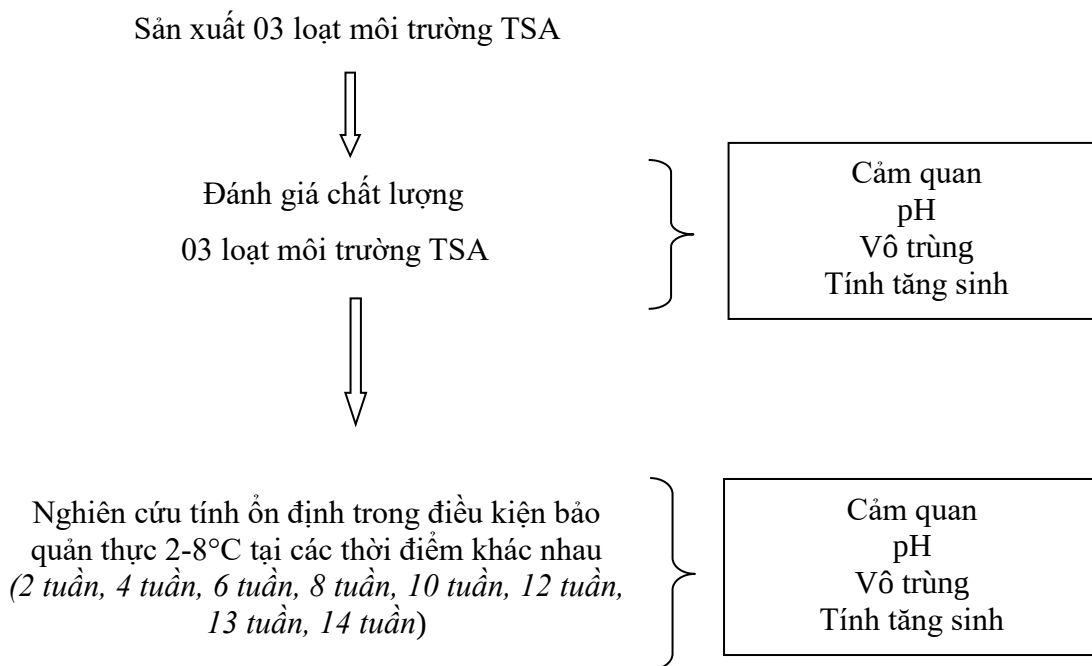
- Dụng cụ thủy tinh: Cốc 2000ml (Schott, Đức); Chai, ống đong 1000ml (Schott, Đức)

- Trang thiết bị: Tủ an toàn sinh học cấp 2, LH17-PS2; Tủ nuôi cấy vô trùng 2 cửa, LH28-MT, Suzhou; Pipet aid (Integra); Máy đo pH (Hana), pH 17-MT; Máy đo pH (Orion Star), pH 18-MT; Máy lắc tuýp, lắc phiên (IKA), VT 28-MT; Tủ ấm Memmert, IC25 - PS2; Tủ bảo quản mẫu CI09 – PS2, Sanyo; Tủ ấm IC20 – PS2, Sanyo; Cân phân tích Ohaus EB20-MT; Bể ổn nhiệt WB 14-MT (Beckman, Đức)

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả trong phòng thí nghiệm

Thử nghiệm



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4.1 Sản xuất 03 loại môi trường TSA

Môi trường TSA được sản xuất tại khoa Môi trường thực nghiệm theo quy trình chuẩn và đóng gói với số lượng 10 đĩa TSA/ 1 túi, bọc bằng túi polyetylen đã được hấp tiệt trùng, buộc kín, dán nhãn. Bảo quản trong tủ bảo quản mẫu ở nhiệt độ 2-8°C.

2.4.2 Đánh giá chất lượng 03 loại môi trường TSA sau khi sản xuất

Các loại môi trường TSA sau khi sản xuất được đánh giá chất lượng về các tiêu chí:

- Tiêu chí cảm quan:

+ Phương pháp: Quan sát, mô tả bằng mắt thường

+ Tiêu chuẩn chấp thuận: Môi trường TSA có màu vàng đậm, độ dày lớp thạch từ 0,3-0,5cm, mặt thạch trong không có bọt khí. [7,8]

- Tiêu chí pH:

+ Phương pháp: Đo bằng máy

+ Tiêu chuẩn chấp thuận: pH= 7,3±0,2 ở 25°C [7,8]

- Tiêu chí vô trùng

+ Phương pháp: Nuôi cấy

+ Tiêu chuẩn chấp thuận: Không có sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa thạch sau ít nhất 3 ngày theo dõi khi ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 30-35°C. [3,4]

- Tiêu chí: Tính tăng sinh

+ Phương pháp định lượng

+ Tiêu chuẩn chấp thuận: Hệ số độ phục hồi: $P_R \geq 70\%$ [2-4,9-11]

$P_R = N_S / N_O$.

Trong đó:

N_S : số đếm khuẩn lạc của hỗn dịch chủng ở môi trường mẫu thử

N_O : số đếm khuẩn lạc tính của hỗn dịch chủng ở môi trường chuẩn

Đối với tiêu chí về tính tăng sinh, các chủng vi sinh vật được lựa chọn dựa trên tham chiếu của TCVN 8128:2015, ISO 11133:2014 (mục 5, bảng E.1) [3,4] ; Merck, Microbiology manual 12th edition (trang 474) [6], Manual of Microbiological Culture Media, DifcoTM & BBLTM Manual, 2th Edition (trang 568) [7].

Cấy ≤ 100 CFU chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 trên các đĩa thạch chuẩn TSA thương mại (2 đĩa thạch/ chủng vi sinh) và trên 6 đĩa thạch TSA/ 1 loạt x 3 loạt (2 đĩa thạch/ chủng vi sinh). Ủ và theo dõi ở nhiệt độ 30-35°C trong vòng 3 ngày. Cộng và tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc CFU của mỗi chủng trên 1 loạt môi trường x 3 loạt.

2.4.3 Nghiên cứu tính ổn định 03 loạt TSA trong điều kiện bảo quản thực ở các thời điểm khác nhau

Trong 03 loạt môi trường TSA được nghiên cứu tính ổn định trong điều kiện bảo quản thực 2-8°C tại các thời điểm khác nhau (2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần , 10 tuần, 12 tuần, 13 tuần, 14 tuần). Đối với mỗi thời điểm, tiến hành đánh giá chất lượng theo các tiêu chí (cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh), thời điểm mà ở đó môi trường dinh dưỡng vẫn đảm bảo được chất lượng về các tiêu chí trên sẽ là căn cứ để xác định hạn dùng.

2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Các chỉ số: cảm quan, vô trùng là các chỉ số định tính. Kết quả đánh giá gồm hai giá trị: Đạt hoặc không đạt. Các chỉ số: pH, tính tăng sinh là các chỉ số định lượng. Kết quả được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

2.6. Đạo đức nghiên cứu

Đề tài được thực hiện trong phòng thí nghiệm, không thực hiện trên người.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả sản xuất 03 loạt môi trường TSA

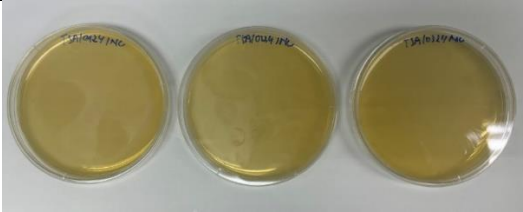
Nhóm nghiên cứu đã sản xuất 03 loạt môi trường TSA độc lập (TSA/0124/NC; TSA/0224/NC; TSA/0324/NC) theo quy trình chuẩn đã được phê duyệt tại SOP 02-03: Sản xuất môi trường Tryptic Soy Agar (TSA), ngày sản xuất 31/7/2024. Các loạt môi trường sau khi sản xuất được đóng gói thành từng gói với số lượng 10 đĩa/ túi, bọc bằng túi polyetylen chịu nhiệt được hấp tiệt trùng ở 121°C/30 phút, dán nhãn, ghi thông tin về loạt môi trường, ngày pha, người pha, bảo quản trong điều kiện thực ở nhiệt độ 2-8°C.

3.2. Kết quả đánh giá chất lượng 03 loạt TSA sau khi sản xuất

Các loạt môi trường TSA sau khi sản xuất được đánh giá chất lượng (ngày thực hiện 1/8/2024) theo các tiêu chí (cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh). Kết quả thu được như sau:

3.2.1 Về tiêu chí cảm quan

Bảng 1. Kết quả đánh giá tiêu chí cảm quan

	TSA/0124/NC	TSA/0224/NC	TSA/0324/NC
			
	Hình 2. Hình ảnh cảm quan 03 loạt môi trường TSA		
Kết quả	Môi trường màu vàng đậm, độ dày 0,3-0,5cm, mặt thạch trong không bọt khí.		
Tiêu chuẩn chấp thuận	Môi trường có màu sắc vàng đặc trưng, độ dày thạch nằm trong khoảng 0,3-0,5cm, mặt thạch đồng nhất, không có bọt khí		
Đánh giá	Đạt yêu cầu		

3.2.2 Về tiêu chí pH

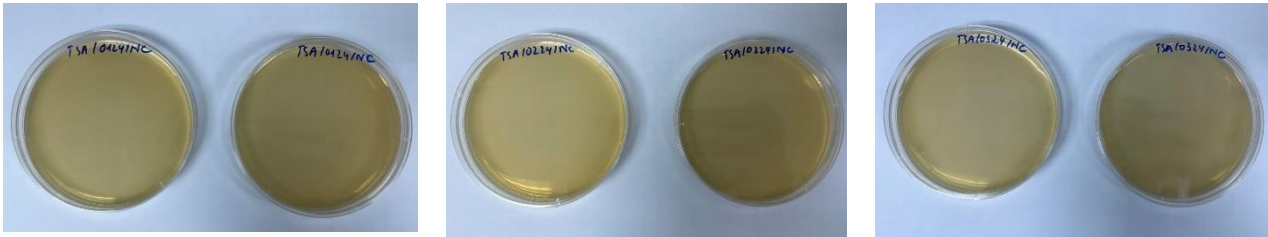
Bảng 2. Kết quả đánh giá tiêu chí pH

STT	Môi trường	Loạt số	Kết quả	Tiêu chuẩn chấp thuận	Đánh giá
1	TSA	TSA/0124/NC	pH = 7,15	7,3 ± 0,2	Đạt yêu cầu
2		TSA/0224/NC	pH = 7,14		
3		TSA/0324/NC	pH = 7,11		

3.2.3 Về tiêu chí vô trùng

Bảng 3. Kết quả đánh giá tiêu chí vô trùng

STT	Môi trường	Loạt số	Kết quả	Tiêu chuẩn chấp thuận	Đánh giá
1	TSA	TSA/0124/NC	Không có sự phát triển của vi sinh vật trong các đĩa thạch sau 03 ngày theo dõi ở nhiệt độ 30-35°C	Không có sự phát triển của vi sinh vật sau thời gian theo dõi	Đạt yêu cầu
2		TSA/0224/NC			
3		TSA/0324/NC			



Hình 3. Hình ảnh 03 loạt môi trường TSA sau khi ủ vô trùng

3.2.4 Về tiêu chí tính tăng sinh

Các ống chủng vi sinh vật được pha loãng trong dung dịch NaCl 0,9% sau đó cấy 100µl dung dịch các chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ở độ pha $10^{-4,5}$; chủng *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ở độ pha $10^{-3,5}$; chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ở độ pha $10^{-4,5}$ vào các đĩa môi trường mẫu thử và mẫu chuẩn (2 đĩa/ loạt).

Cộng và tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc CFU ở các đĩa thạch của mỗi chủng trên 1 loạt môi trường x 3 loạt. Ủ và theo dõi ở nhiệt độ 30-35°C trong vòng 3 ngày.

Bảng 4. Kết quả đánh giá tiêu chí tính tăng sinh

TT	Chủng vi sinh vật	Mẫu thử	Đĩa 1 (CFU)	Đĩa 2 (CFU)	Trung bình (CFU)	Độ phục hồi
1	Chủng <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSA/0124/NC	48	54	51	92,7%
		TSA/0224/NC	56	46	51	92,7%
		TSA/0324/NC	45	52	48,5	88,2%
		TSA đối chứng	57	53	55	
2	Chủng <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA/0124/NC	53	56	54,5	89,3%
		TSA/0224/NC	46	67	56,5	92,6%
		TSA/0324/NC	54	57	55,5	90,9%
		TSA đối chứng	58	64	61	
3	Chủng <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSA/0124/NC	60	58	59	84,8%
		TSA/0224/NC	52	54	53	76,2%
		TSA/0324/NC	64	53	58,5	84,1%
		TSA đối chứng	67	72	69,5	

Kết quả cho thấy giá trị độ phục hồi của 03 loạt môi trường TSA (TSA/0124/NC; TSA/0224/NC; TSA/0324/NC) lần lượt trên chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 là 92,7%, 92,7%, 88,2%; trên chủng *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 là 89,3%, 92,6%, 90,9%; trên chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 là 84,8%, 76,2%, 84,1% đều đáp ứng tiêu chuẩn chấp thuận ($\geq 70\%$).

3.3. Kết quả nghiên cứu tính ổn định 03 loại TSA trong điều kiện bảo quản thực ở các thời điểm khác nhau

Để nghiên cứu tính ổn định và xác định hạn dùng của môi trường TSA, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá chất lượng 03 loại môi trường TSA về các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh tại các thời điểm: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14 tuần trong điều kiện bảo quản thực 2-8°C. Kết quả thu được cụ thể như sau:

3.3.1 Về tiêu chí cảm quan

Bảng 5. Kết quả đánh giá tiêu chí cảm quan qua các thời điểm

Thời điểm	Loại			Tiêu chuẩn chấp thuận	Đánh giá
	TSA/0124/NC	TSA/0224/NC	TSA/0324/NC		
2 tuần	Môi trường màu	Môi trường màu	Môi trường màu	Môi trường	Đạt yêu cầu
4 tuần	vàng đậm, độ	vàng đậm, độ	vàng đậm, độ	màu vàng	
6 tuần	dày lớp thạch từ	dày lớp thạch từ	dày lớp thạch từ	đậm, độ dày	
8 tuần	0,3-0,5cm, mặt	0,3-0,5cm, mặt	0,3-0,5cm, mặt	lớp thạch từ	
10 tuần	thạch trong	thạch trong	thạch trong	0,3-0,5cm,	
12 tuần	không có bọt	không có bọt	không có bọt	mặt thạch	
13 tuần	khí	khí	khí	trong không	
14 tuần				có bọt khí	

Kết quả cho thấy sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, 03 loại môi trường TSA đều đạt yêu cầu về cảm quan tại các thời điểm nghiên cứu.

3.3.2 Về tiêu chí pH

Bảng 6. Kết quả đánh giá tiêu chí pH qua các thời điểm

Loại mẫu thử	pH								
	0 tuần	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	10 tuần	12 tuần	13 tuần	14 tuần
TSA/0124/NC	7,15	7,15	7,18	7,21	7,22	7,24	7,28	7,30	7,32
TSA/0224/NC	7,14	7,15	7,17	7,19	7,24	7,25	7,27	7,31	7,34
TSA/0324/NC	7,11	7,14	7,17	7,20	7,25	7,27	7,29	7,32	7,35

Kết quả cho thấy giá trị pH của 03 loại môi trường TSA qua các thời điểm nghiên cứu đều trong giới hạn tiêu chuẩn pH= 7,3 ± 0,2 ở 25°C.

3.3.3 Về tiêu chí vô trùng

Bảng 7. Kết quả đánh giá tiêu chí vô trùng qua các thời điểm

Thời điểm	Loại			Tiêu chuẩn chấp thuận	Đánh giá
	TSA/0124/NC	TSA/0224/NC	TSA/0324/NC		
2 tuần	Không có sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa môi trường sau khi ủ nhiệt độ 30-35°C ít nhất 3 ngày	Không có sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa môi trường sau khi ủ nhiệt độ 30-35°C ít nhất 3 ngày	Không có sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa môi trường sau khi ủ nhiệt độ 30-35°C ít nhất 3 ngày	Không có sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa môi trường sau thời gian theo dõi	Đạt yêu cầu
4 tuần					
6 tuần					
8 tuần					
10 tuần					
12 tuần					
13 tuần					
14 tuần					

Kết quả cho thấy 03 loại môi trường TSA đều đạt yêu cầu về vô trùng tại các thời điểm nghiên cứu.

3.3.4 Về tiêu chí tính tăng sinh

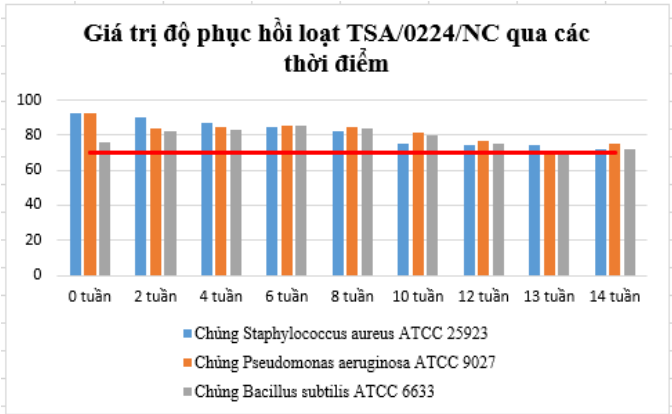
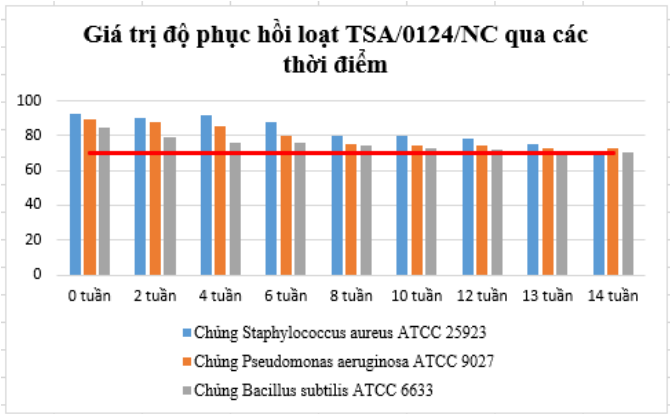
Tại các thời điểm 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần, 10 tuần, 12 tuần, 13 tuần, 14 tuần, cấy ≤ 100 CFU chủng vi sinh vật *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 vào các đĩa môi trường TSA do khoa Môi trường thực nghiệm pha và sử dụng các đĩa môi trường TSA thương mại làm chuẩn đối chứng. Kết quả thu được như sau:

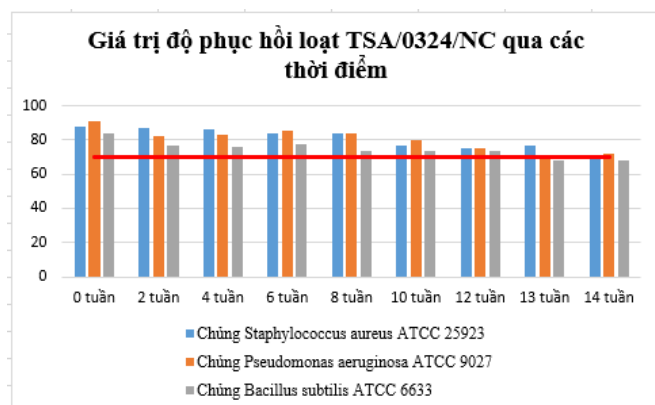
Bảng 8. Kết quả giá trị độ phục hồi môi trường TSA qua các thời điểm

Chủng	Đơn vị (CFU)	Thời gian								
		0 tuần	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	10 tuần	12 tuần	13 tuần	14 tuần
Chủng <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSA chuẩn									
	TB	55	56,5	50,5	46	52,5	59	54	58	54,5
	TSA/0124/NC									
	TB	51	51	46,5	40,5	42	47	42,5	43,5	38
	Pr (%)	92,7	90,3	92,1	88	80	79,7	78,7	75	69,7
	TSA/0224/NC									
	TB	51	51	44	39	43	44,5	40	43	39
	Pr (%)	92,7	90,3	87,1	84,8	81,9	75,4	74,1	74,1	71,6
	TSA/0324/NC									
	TB	48,5	49	43,5	38,5	44	45,5	40,5	44,5	37,5

	PR (%)	88,2	86,7	86,1	83,7	83,8	77,1	75	76,7	68,8
Chủng <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA chuẩn									
	TB	61	60	52	70,5	76,5	57	78	71	97,5
	TSA/0124/NC									
	TB	54,5	52,5	44,5	56,5	57,5	42,5	58	51,5	71
	PR (%)	89,3	87,5	85,6	80,1	75,2	74,6	74,4	72,5	72,8
	TSA/0224/NC									
	TB	56,5	50,5	44	60	64,5	46,5	60	50,5	73,5
	PR (%)	92,6	84,2	84,6	85,1	84,3	81,6	76,9	71,1	75,4
	TSA/0324/NC									
	TB	55,5	49,5	43	60	64	45,5	58,5	50,5	70
	PR (%)	90,9	82,5	82,7	85,1	83,7	79,8	75	71,1	71,8
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSA chuẩn									
	TB	69,5	87	75	67,5	84	49	64,5	59,5	90,5
	TSA/0124/NC									
	TB	59	69	57	51	62,5	35,5	46,5	42	64
	PR (%)	84,8	79,3	76,0	75,6	74,4	72,4	72,1	70,6	70,7
	TSA/0224/NC									
	TB	53	70	59	52,5	63	35,5	47	42,5	63
	PR (%)	76,2	80,5	78,7	77,8	75	72,4	72,9	71,4	69,6
	TSA/0324/NC									
	TB	58,5	66,5	57	52,5	61,5	36	47,5	40,5	61,5
	PR (%)	84,1	76,4	76,0	77,8	73,2	73,5	73,6	68,1	68

Dưới đây là các biểu đồ giá trị độ phục hồi của 03 loại môi trường TSA qua các thời điểm nghiên cứu tính ổn định.





Hình 4. Các biểu đồ giá trị độ phục hồi 03 loạt TSA qua các thời điểm

Từ bảng 8 và biểu đồ ta thấy giá trị độ phục hồi qua các thời điểm của 03 loạt môi trường TSA ở thời điểm từ 0 tuần đến 12 tuần nằm trong tiêu chuẩn chấp thuận ($\geq 70\%$) và giảm dần đối với cả 3 chủng vi sinh vật.

Ở tuần thứ 13 giá trị độ phục hồi đối với chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 trên loạt TSA/0324/NC là 68,1%, thấp hơn giá trị tiêu chuẩn ($\geq 70\%$).

Ở tuần thứ 14 giá trị độ phục hồi đối với chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 trên loạt TSA/0224/NC là 69,6%; TSA/0324/NC là 68,0% và chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 trên loạt TSA/0124/NC là 69,7% và TSA/0324/NC là 68,8%, thấp hơn giá trị tiêu chuẩn ($\geq 70\%$).

Kết luận: Từ các kết quả đánh giá tính ổn định 03 loạt môi trường TSA tại các thời điểm nghiên cứu cho thấy môi trường TSA vẫn đạt tiêu chuẩn chấp thuận về các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng trong khoảng thời gian từ 0 đến 14 tuần. Đối với tiêu chí tính tăng sinh ở tuần thứ 13, giá trị độ phục hồi đối với chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 trên loạt TSA/0324/NC thấp hơn giá trị tiêu chuẩn ($\geq 70\%$); tuần thứ 14, giá trị độ phục hồi đối với chủng *Bacillus subtilis* ATCC 6633 trên loạt TSA/0224/NC và TSA/0324/NC; chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 trên loạt TSA/0124/NC và TSA/0324/NC, thấp hơn giá trị tiêu chuẩn ($\geq 70\%$).

4. Bàn luận

Môi trường TSA là môi trường nuôi cấy không chọn lọc phổ biến được sử dụng để nuôi cấy tăng sinh cho nhiều loại vi sinh vật bao gồm cả vi khuẩn và nấm (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*), thành phần môi trường cung cấp nguồn dinh dưỡng phong phú (bao gồm trypton, pepton đậu nành, glucose, natri clorua và agar) rất lý tưởng cho việc nuôi cấy, quan sát hình thái khuẩn

lạc. Chính vì thế, TSA là công cụ không thể thiếu trong nghiên cứu vi sinh nói chung và giám sát vi sinh phòng sạch theo tiêu chuẩn GLP, ISO tại NICVB nói riêng.

Trung bình mỗi năm khoa Môi trường thực nghiệm sản xuất khoảng 3800 đĩa thạch TSA với tần suất 2-3 loạt/ tháng nhằm phục vụ việc giám sát vi sinh phòng sạch và thử nghiệm vô trùng tại các khoa Môi trường Thực nghiệm, Khoa Kiểm định vắc xin Vi rút, Khoa Kiểm định vắc xin Vi khuẩn, Khoa Động vật thực nghiệm.

Căn cứ trên các tài liệu ISO 11133:2014, Tiêu chuẩn Việt Nam 8128:2015, Hướng dẫn của hiệp hội Vi sinh vật Úc và tham khảo Cẩm nang hướng dẫn của các nhà sản xuất môi trường vi sinh thương mại lớn, nhóm nghiên cứu đã xác định tiêu chuẩn chất lượng của môi trường TSA bao gồm 4 tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng và tính tăng sinh; các tiêu chí này cũng tương đồng với các môi trường pha sẵn đang được lưu hành, phân phối trên thị trường [2-4,9].

Đối với tiêu chí tính tăng sinh, tiêu chuẩn cho giá trị độ phục hồi là $\geq 70\%$. Trong tài liệu của WHO về giám sát môi trường phòng sạch, tiêu chuẩn cho việc đánh giá khả năng phục hồi vi sinh vật trên môi trường là $\geq 50\%$, tuy nhiên đây là tiêu chuẩn chung cho các môi trường bao gồm cả môi trường chọn lọc, TSA là môi trường không chọn lọc. Trong điều kiện sản xuất và bảo quản tại NICVB, các đĩa thạch sau khi sản xuất được bọc trong giấy nến hoặc túi polyetylen đã hấp tiệt trùng sau quá trình bảo quản dài trong điều kiện tủ lạnh ở nhiệt độ $2-8^{\circ}\text{C}$ có thể gây ra tình trạng đọng nước ở túi và nắp đĩa thạch, ngoài ra tham chiếu trên các tài liệu về đánh giá chất lượng môi trường vi sinh cho thấy tiêu chuẩn độ phục hồi $\geq 70\%$ là phù hợp. Hiện nay các hãng vi sinh thương mại như Labone, Merck, BD, Schalaur cũng đang áp dụng tiêu chuẩn này cho môi trường TSA.

Các loạt môi trường TSA sau khi sản xuất và đạt yêu cầu chất lượng được bảo quản ở nhiệt độ $2-8^{\circ}\text{C}$ và đánh giá tính ổn định tại các thời điểm 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần, 10 tuần, 12 tuần, 13 tuần, 14 tuần. Kết quả cho thấy tại các thời điểm từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 14, môi trường TSA vẫn đạt các tiêu chí về cảm quan, pH, vô trùng; riêng đối với tiêu chí tính tăng sinh, tại các thời điểm tuần 13, 14 giá trị độ phục hồi trên các chủng vi sinh vật ở các loạt môi trường có xu hướng giảm dần và thấp hơn giá trị tiêu chuẩn. Điều này có thể xảy ra khi bảo quản đĩa thạch trong thời gian dài yếu tố độ ẩm, pH, ánh sáng và một số thành phần dinh dưỡng có thể bị giảm độ ổn định theo thời gian như peptone và vitamin từ đó ảnh hưởng đến sự phát triển tối ưu của vi sinh vật.

Hạn sử dụng của môi trường là thời gian bảo quản mà môi trường vẫn giữ được các tính năng như quy định đồng thời phù hợp với điều kiện thực tế sử dụng, do đó đối với môi trường TSA pha tại NICVB khoảng thời gian 3 tháng là phù hợp. Hiện nay các môi trường vi sinh pha sẵn đang lưu hành trên thị trường như Millipore, Scharlau..., hạn sử dụng này cũng là tương đương trong cùng nhiệt độ bảo quản 2-8°C. Việc đánh giá hạn dùng môi trường TSA góp phần giảm thiểu chi phí, thời gian, nhân lực trong việc sản xuất môi trường vi sinh phục vụ kiểm định chất lượng vắc xin và sinh phẩm; chủ động trong công việc chuyên môn, đào tạo, nghiên cứu khoa học. Môi trường TSA sau khi được công bố hạn dùng hoàn toàn có thể thương mại, cung cấp cho các đơn vị bệnh viện, phòng thí nghiệm có nhu cầu.

5. Kết luận

Sau khi bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 3 tháng, kết quả đánh giá tính ổn định tại các thời điểm khác nhau cho thấy các loại môi trường TSA đảm bảo yêu cầu chất lượng theo các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng và tính tăng sinh. Do đó hạn sử dụng của môi trường TSA là 3 tháng kể từ ngày sản xuất.

Tài liệu tham khảo

- [1] WHO Health Organization (2011). “WHO Good practices for pharmaceutical microbiology laboratories” WHO TRS 961, Annex 6
- [2] WHO Health Organization (2012). “Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities” page 23-28
- [3] Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8128: 2015 (ISO 11133:2014) về Vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn, chăn nuôi và nước – Chuẩn bị, sản xuất, bảo quản và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy.
- [4] ISO 1113:2014&A1:2018 (2018) Microbiology of food, animal feeding stuffs and water – preparation, production, storage and performance testing of culture media (ISO/DIS 11133:2012).
- [5] S.Ulisse, A. Peccio, G.Orsini & Di Emidio (2006) A study of the shelf-life of critical culture media, Veterinaria Italiana 42(3), 237-247
- [6] Văn phòng công nhận chất lượng BoA (02/01/2020) Yêu cầu bổ sung để công nhận các phòng thử nghiệm lĩnh vực Sinh, ARL 04, lần ban hành 03, trang 11-12
- [7] Merck Microbiology manual, 12th edition, Tryptic soy agar, page 474
- [8] Manual of Microbiological Culture Media (2009) Difco™ & BBL™ Manual, Second Edition, page 491

- [9] Guidelines for Assuring Quality of Medical Microbiological Culture Media (2012), 2nd edition. Culture Media Special Interest group, *The Australia Society for Microbiology*.
- [10] Millipore (2021), Technical Data Sheet ReadyPlate™ TSA (Tryptic Soy Agar) acc ISO, FDA-BAM, EP + USP,
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/273/403/146431dat-mk.pdf>, ngày truy cập 25/11/2024
- [11] Scharlau (2023), Technical Data Tryptone Soy Agar (TSA) (Eur.Ph.),
https://www.scharlab.com/lab/in/files/2024/01/064-PA0031_TDS_EN.pdf , ngày truy cập 25/11/2024