

STABILITY STUDY AND EXPIRY DATE DETERMINATION OF BAIRD-PARKER AGAR (BPA) MEDIUM PRODUCED AT THE NATIONAL INSTITUTE FOR CONTROL OF VACCINES AND BIOLOGICALS

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

National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Received 11 May 2026

Accepted 18 June 2026

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a common bacterium found in laboratory animals and may interfere with quality control testing results. Baird–Parker Agar (BPA) is widely used for the isolation and identification of this microorganism. This study was conducted to evaluate the stability and establish the shelf life of BPA medium produced by the Department of Experimental Media. Three batches of BPA medium manufactured in May 2025 were evaluated at weeks 0, 4, 8, 12, 14, 16, 17, 18, and 19. Evaluation criteria included appearance, pH, sterility, and growth performance. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 8739 were used to assess recovery and selective inhibitory performance, respectively. The results demonstrated that all BPA batches met the acceptance criteria for appearance, pH, and sterility throughout the 19-week storage period. The selective inhibitory activity against *Escherichia coli* ATCC 8739 was fully maintained. However, the recovery rate of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 gradually declined over time and fell below the acceptance criterion ($\geq 50\%$) at weeks 18 and 19. Based on these findings, the shelf life of BPA medium is proposed to be 4 months from the date of manufacture when stored at 2–8°C.

Keywords: *Baird–Parker Agar; culture medium; stability; shelf life; Staphylococcus aureus.*

* Corresponding author:

E-mail address: trieuthanhhai94@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v6i2.259>

ĐÁNH GIÁ TÍNH ỔN ĐỊNH VÀ XÁC ĐỊNH HẠN DÙNG MÔI TRƯỜNG BAIRD-PARKER AGAR (BPA) 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 Thu Quỳnh, Nguyễn Thị Thu Thủy

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

Nhận ngày 11 tháng 05 năm 2026

Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 06 năm 2026

Tóm tắt: *Staphylococcus aureus* là vi khuẩn thường gặp trên động vật thí nghiệm, có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm kiểm định. Môi trường Baird-Parker Agar (BPA) được sử dụng phổ biến để phân lập và định danh vi khuẩn này. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tính ổn định và xác định hạn sử dụng của môi trường BPA sản xuất tại Khoa Môi trường Thực nghiệm. Ba lô môi trường BPA được sản xuất vào tháng 5/2025 sau đó được đánh giá tại các thời điểm 0, 4, 8, 12, 14, 16, 17, 18 và 19 tuần dựa trên các tiêu chí: cảm quan, pH, độ vô trùng và khả năng tăng sinh vi sinh vật. Đối với khả năng tăng sinh, chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 và chủng *Escherichia coli* ATCC được sử dụng để đánh giá độ phục hồi và khả năng ức chế chọn lọc. Kết quả cho thấy các lô môi trường BPA duy trì đạt yêu cầu về cảm quan, pH và độ vô trùng trong suốt 19 tuần bảo quản. Khả năng ức chế đối với chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 được duy trì hoàn toàn. Tuy nhiên, giá trị độ phục hồi của chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 giảm dần theo thời gian và xuống dưới ngưỡng chấp nhận ($\geq 50\%$) ở tuần 18, 19. Do đó, hạn sử dụng của môi trường BPA được đề xuất là 4 tháng kể từ ngày sản xuất khi bảo quản ở 2–8°C.

Từ khoá: Baird-Parker Agar; tính ổn định, môi trường nuôi cấy, hạn dùng, *Staphylococcus aureus*.

1. Đặt vấn đề

Hiện nay có rất nhiều thử nghiệm *in vivo* thực hiện trên động vật thí nghiệm để kiểm định chất lượng vắc xin – sinh phẩm như: thử nghiệm an toàn đặc hiệu, thử nghiệm công hiệu, chí nhiệt tố... Do đó bất kỳ thử nghiệm nào sử dụng động vật thí nghiệm đều đòi hỏi được xem xét cẩn thận đến nguồn gốc và chất lượng của động vật đưa vào thí nghiệm, trong đó tình trạng sức khỏe vi sinh động vật là một yếu tố rất quan trọng. Liên đoàn các hiệp hội động vật thí nghiệm Châu Âu FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Association)

đã khuyến cáo các cơ sở chăm sóc động vật thí nghiệm cần tiến hành kiểm tra sức khỏe động vật với tần suất 3 hoặc 6 tháng [1].

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là tác nhân vi sinh thường gặp trên các mẫu bệnh phẩm ở động vật thí nghiệm tại các vị trí: Phân trong manh tràng, dịch mũi, rỉ mắt, lông, da... Để phân lập tác nhân vi sinh trên, hiện nay Khoa Động vật Thực nghiệm (TN) đang sử dụng môi trường thạch dinh dưỡng Baird –Parker Agar (BPA) do Khoa Môi trường Thực nghiệm (MTTN) sản xuất.

Môi trường BPA được tạo ra vào

năm 1962 là môi trường chọn lọc để phát hiện vi khuẩn *Staphylococci* dương tính *coagulase* (*Staphylococcus aureus* và các loài khác). Khuẩn lạc *Staphylococcus aureus* điển hình có màu đen (khử Tellurite thành Telluride trong môi trường), bóng, lồi và được bao quanh bởi quang sáng (phản ứng lòng đỏ trứng) là kết quả của phản ứng phân giải protein. Môi trường BPA có chứa casein thủy phân tụy, chiết xuất thịt và chiết xuất nấm men là nguồn dinh dưỡng, vitamin và khoáng chất cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật nói chung, trong khi pyruvate và glycine là những hợp chất có lợi cho sự tăng trưởng cụ thể của *Staphylococcus aureus* và ức chế chọn lọc sự phát triển của hầu hết các loại vi khuẩn khác [2]

Hiện nay, môi trường BPA sau khi sản xuất tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB) chủ yếu được sử dụng ngay và chưa có dữ liệu đánh giá tính ổn định để xác định hạn sử dụng. Theo yêu cầu của các tiêu chuẩn hiện hành, các phòng thí nghiệm cần xác định và công bố hạn dùng đối với môi trường nuôi cấy [3]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tính ổn định và đề xuất hạn sử dụng của môi trường BPA trong điều kiện bảo quản thực tế.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Môi trường Baird-Parker Agar (BPA)

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 04/2025 đến tháng 11/2025

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

2.3. Nguyên vật liệu và thiết bị phục vụ nghiên cứu

2.3.1. Mẫu thử

Môi trường BPA (03 loạt) bao gồm: Loạt BPA/0225, BPA/0325, BPA/0425

2.3.2. Chủng vi sinh vật thử thách

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: mã số NICVB – 0120, nồng độ 2×10^8 (CFU/ml)

Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 8739: mã code 048E7, lô 483-1419-5

2.3.3. Môi trường, hóa chất

Môi trường AgarCult™ Tryptic Soy Agar (Alphachem), lô 2281105205, Hạn dùng: 27/11/2025

Môi trường Tryptic Soy Agar (NICVB), loạt TSA/12/25 (Hạn dùng 27/08/2025), loạt TSA/16/25 (Hạn dùng 15/10/2025), loạt TSA/23/25 (Hạn dùng 23/12/2025)

Môi trường BPA tổng hợp, hãng Difco
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 μ l (Gilson); Đĩa petri nhựa vô trùng $\varnothing 90 \times 15$ mm (Biologix).



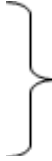
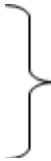
- Dụng cụ thủy tinh: Cốc 2000ml (Schott, Đức); Chai, ống đong 1000ml (Schott, Đức).

- 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 (Mettler Toledo), pH 19-MT; Máy lắc tuýp, lắc phiến (IKA), VT 28-MT; Tủ âm Memmert, IC25 - PS2; Tủ bảo quản

mẫu CI09 – PS2, Sanyo; Tủ âm IC20 – PS2, Sanyo; Cân phân tích Ohaus EB20-MT; Bề ổn nhiệt WB 14-MT (Beckman, Đức).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm:

	<i>Thử nghiệm</i>
Sản xuất 03 loạt môi trường BPA	
 Đánh giá chất lượng 03 loạt môi trường BPA (<i>tuần 0</i>) 	 Cảm quan pH Vô trùng Tính tăng sinh
Nghiên cứu tính ổn định trong điều kiện bảo quản thực 2-8°C tại các thời điểm khác nhau (<i>4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 14 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 tuần</i>)	 Cảm quan pH Vô trùng Tính tăng sinh

Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4.1. Sản xuất 03 loạt môi trường BPA

- Ba (03) loạt môi trường BPA độc lập được sản xuất trên cùng một chai môi trường bột tổng hợp BPA tại 3 thời điểm trong 3 ngày khác nhau, trong cùng điều kiện con người, phòng thí nghiệm. Môi trường BPA sau khi sản xuất được đóng gói với số lượng 08 đĩa BPA/ 1 túi, bọc bằng túi polyetylen đã được hấp tiệt trùng, buộc kín, dán nhãn. Bảo quản trong tủ bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C.

- Quy trình sản xuất môi trường BPA cụ thể như sau:

+ Pha theo tỷ lệ 63g môi trường Baird-Parker Agar Base bột thương mại/ 950ml nước cất 2 lần

+ Hấp tan thạch hoàn toàn ở 105°C/10 phút sau đó hấp tiệt trùng ở 121°C/15 phút.

Đề nguội thạch trong bề ổn nhiệt 55-60°C/30 phút. Thêm 50ml EY Tellurite Enrichment vô trùng. Trộn đều, nhẹ nhàng, tránh sủi bọt.

+ Đổ thạch ra đĩa petri (thực hiện trong tủ cấy vô trùng), đổ thạch từ từ dàn đều, độ dày của lớp thạch khoảng 0,3cm - 0,5cm, mặt thạch phẳng không có bọt khí.

+ Để thạch khô tự nhiên. Đóng gói với số lượng 08 đĩa BPA/ 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 loạt môi trường BPA sau khi sản xuất

❖ Tiêu chí cảm quan

Phương pháp: Quan sát, mô tả bằng mắt thường

Quy trình thực hiện: Các đĩa thạch sau khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C, trước khi sử dụng được quan sát cảm quan bằng mắt thường và so sánh với tiêu chuẩn chấp thuận.

Tiêu chuẩn chấp thuận: Môi trường BPA có màu vàng, trắng sữa, độ dày lớp thạch từ 0,3-0,5cm, mặt thạch trong không có bọt khí. [4]

❖ Tiêu chí pH

Phương pháp: Đo bằng máy đo pH có sử dụng điện cực bề mặt

Quy trình thực hiện:

Chuẩn bị máy đo pH, chuẩn độ máy đo pH với dung dịch pH chuẩn theo hướng dẫn sử dụng máy

Chuẩn bị các đĩa môi trường: Chuyển các đĩa thạch được bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C ra khỏi tủ bảo quản, để ở nhiệt độ phòng 25°.

Mở nắp đĩa thạch, đo pH và ghi lại kết quả.

Tiêu chuẩn chấp thuận: pH= 6,9±0,1 [4]

❖ Độ vô trùng

Phương pháp: Phương pháp nuôi cấy (Ủ và theo dõi ở nhiệt độ thích hợp)

Quy trình thực hiện:

Chuẩn bị tủ nuôi cấy mẫu, cài đặt nhiệt độ ở 35-37°C.

Chuẩn bị các đĩa môi trường: Các đĩa môi trường được bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C, được chuyển sang ủ trong tủ nuôi cấy mẫu. Theo dõi trong vòng 7 ngày.

Quan sát các đĩa môi trường và ghi nhận kết quả.

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. [5,6]

❖ Tính tăng sinh

Phương pháp: Phương pháp định lượng

Quy trình thực hiện:

Chuẩn bị chủng vi sinh vật: Chủng vi sinh vật được lựa chọn dựa trên tham chiếu của TCVN 8128:2015, ISO 11133:2014 (phụ lục E, F) [5],[6]; Hướng dẫn của Hiệp hội vi sinh vật Úc [7] Hướng dẫn sử dụng của một số hãng thương mại. Trong đó, chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 được sử dụng để xác định giá trị độ phục hồi; chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 được sử dụng để xác định khả năng ức chế chọn lọc trên các loại môi trường BPA.

Chuẩn bị các đĩa môi trường: Các đĩa môi trường sau khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C, được ủ trong tủ ấm 30-35°C trong khoảng từ 24-48h trước khi thực hiện thử nghiệm.

Pha loãng chủng vi sinh vật: Các chủng vi sinh vật được pha loãng bằng dung dịch nước muối sinh lý 0,9% để đạt nồng độ thích hợp. Cụ thể, chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (nồng độ) được pha loãng ở độ pha 10^{-4.5} để đạt nồng độ trong khoảng 10-100CFU/100µl,

* Lưu ý để đảm bảo độ tin cậy, nồng độ chủng trên môi trường đối chứng hoặc môi trường nghiên cứu cần cao hơn giá trị nồng độ dưới (ít nhất từ 30CFU trở lên)

Cấy chủng vi sinh vật vào các đĩa môi trường:

- Đối với tiêu chí xác định độ phục hồi: Cấy 10-100CFU/100µl chủng *Staphylo coccus aureus* ATCC 25923 trên 3 đĩa thạch BPA/ 1 loạt x 3 loạt và 2 đĩa thạch TSA đối chứng;

- Đối với tiêu chí đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật: Cấy 10³-10⁴ CFU/100µl chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 trên 2 đĩa thạch BPA/ 1 loạt x 3 loạt.

Ủ và theo dõi các đĩa môi trường ở nhiệt độ 35-37°C từ 24-48 giờ, nhận dạng hình thái khuẩn lạc sau đó cộng và tính giá trị trung bình số lượng khuẩn lạc CFU trên các đĩa thạch,

Tổng hợp kết quả và xử lý số liệu:

Đối với giá trị độ phục hồi (P_R) được tính toán theo công thức:

$$P_R = N_S/N_O$$

Trong đó:

N_S : số đếm khuẩn lạc của hỗn dịch chủng ở môi trường nuôi cấy nghiên cứu

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

Tiêu chuẩn chấp thuận:

Độ phục hồi: $P_R = N_S/N_O \geq 50\%$ [5-7]

Khả năng ức chế chọn lọc: Không có sự phát triển của chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 trên các môi trường nghiên cứu.

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

03 loạt môi trường BPA được nghiên cứu tính ổn định trong điều kiện bảo quản thực 2-8°C tại các thời điểm khác nhau (0 tuần, 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 14 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 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 BPA

Nhóm nghiên cứu đã sản xuất 03 loạt môi trường BPA theo quy trình như sau:

Các loạt môi trường BPA sau khi sản xuất bao gồm:

- Loạt 0225 pha ngày 27/5/2025, số lượng 90 đĩa/ loạt;
- Loạt 0325 pha ngày 28/5/2025, số lượng 90 đĩa/ loạt;
- Loạt 0425 pha ngày 29/5/2025, số lượng 90 đĩa/ loạt.

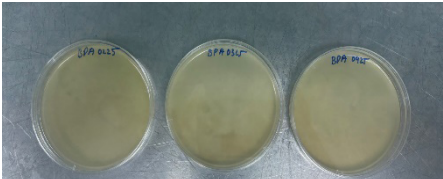


Hình 1. Ba loạt môi trường BPA sau khi sản xuất

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

3.2.1. Tiêu chí cảm quan

Bảng 1. Kết quả đánh giá tiêu chí cảm quan

	BPA/0225	BPA/0325	BPA/0425
			
	Hình 2. Hình ảnh cảm quan 03 loạt môi trường BPA		
Kết quả	Môi trường màu vàng, trắng sữa, độ dày từ 0,3-0,5cm, mặt thạch trong không bọt khí.		
Tiêu chuẩn chấp thuận	Môi trường có màu vàng, trắng sữa, độ dày thạch nằm trong khoảng 0,3-0,5 cm, mặt thạch đồng nhất, không có bọt khí		
Đánh giá	Đạt yêu cầu		

3.2.2. Tiêu chí pH

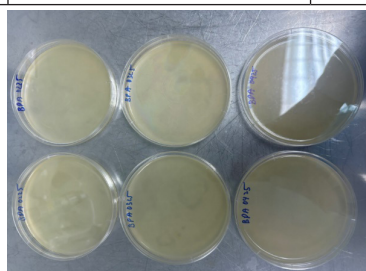
Bảng 2. Kết quả đánh giá tiêu chí pH

STT	Môi trường	Loạt số	Kết quả	Tiêu chuẩn chấp thuận	Đánh giá
1	BPA	BPA/0225	pH = 6,95	6,9 ± 0,1	Đạt yêu cầu
2		BPA/0325	pH = 6,92		
3		BPA/0425	pH = 6,90		

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	BPA	BPA/0225	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		BPA/0325			
3		BPA/0425			



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

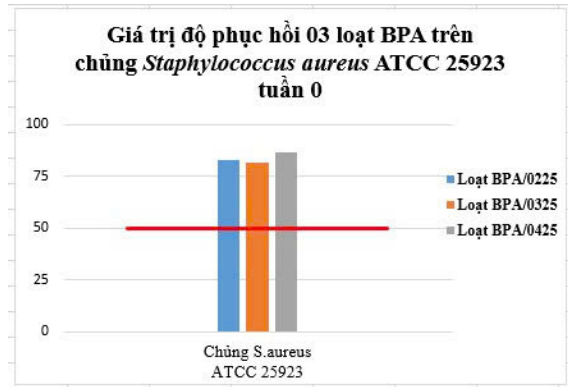
3.2.4 Tính tăng sinh

Bảng 4. Kết quả đánh giá tính tăng sinh trên 03 loạt BPA

Chủng VSV	Môi trường	Loạt	Đĩa 1 (CFU)	Đĩa 2 (CFU)	Đĩa 3 (CFU)	TB (CFU)	Kết quả	Tiêu chuẩn	Đánh giá
Chủng <i>S.aureus</i> ATCC 25923	BPA	0225	42	31	39	37,3	$P_R=82,8\%$	$P_R \geq 50\%$	Đạt yêu cầu
		0325	34	39	37	36,7	$P_R=81,5\%$		
		0425	35	43	39	38,7	$P_R=86,7\%$		
	TSA	46	44		45				
Chủng <i>E.coli</i> ATCC 8739	BPA	0225	(-)	(-)		(-)	Ức chế toàn phần	Ức chế toàn phần VSV	Đạt yêu cầu
		0325	(-)	(-)		(-)	Ức chế toàn phần		
		0425	(-)	(-)		(-)	Ức chế toàn phần		

Kết quả cho thấy chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 phát triển tốt trên môi trường BPA (khuẩn lạc tròn, nhẵn bóng, màu đen) và môi trường TSA (khuẩn lạc tròn, màu trắng sữa) giá trị độ phục hồi của 03 loạt môi trường (BPA/0225; BPA/0325; BPA/0425) lần lượt trên chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 là 82,8%, 81,5%, 86,7% đáp ứng tiêu chuẩn chấp thuận ($\geq 50\%$). Khả năng ức chế trên chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 của 03 loạt môi trường BPA, MSA, PS-A là ức chế toàn phần, trong khi trên môi trường TSA chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 phát triển tốt, khuẩn lạc màu trắng sữa nhẹ.

Dưới đây là biểu đồ giá trị độ phục hồi 03 loạt môi trường BPA, trong đó trục tung là giá trị độ phục hồi, đơn vị là %, vạch đỏ là giá trị tiêu chuẩn (50%):



Hình 4. Biểu đồ giá trị độ phục hồi 03 loạt BPA sau khi sản xuất

3.3. Kết quả nghiên cứu tính ổn định 03 loạt BPA 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 BPA, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá chất lượng 03 loạt môi trường BPA về các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh tại các thời điểm: 0, 4, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19 tuần trong điều kiện bảo quản thực 2-8°C. Kết quả thu được cụ thể như sau:

3.3.1 Tiêu chí cảm quan

Sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, các đĩa thạch của 03 loại môi trường (BPA/0225; BPA/0325; BPA/0425) tại các thời điểm 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 14 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 tuần đều đạt yêu cầu về cảm quan (môi trường màu vàng, trắng sữa, độ dày lớp thạch từ 0,3-0,5cm, mặt thạch trong không có bọt khí).

3.3.2 Tiêu chí pH

Giá trị pH của 03 loại môi trường BPA tại các thời điểm nghiên cứu (4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 14 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 tuần) đều trong giới hạn tiêu chuẩn pH=6,9 ± 0,1 ở 25°C.

Bảng 5. Kết quả giá trị pH môi trường BPA qua các thời điểm

Loại	pH								
	0 tuần	4 tuần	8 tuần	12 tuần	14 tuần	16 tuần	17 tuần	18 tuần	19 tuần
0225	6,95	6,94	6,94	6,96	6,97	6,96	6,96	6,97	6,97
0325	6,92	6,92	6,93	6,94	6,95	6,94	6,96	6,95	6,96
0425	6,90	6,91	6,91	6,93	6,95	6,94	6,97	6,97	6,96
Tiêu chuẩn	pH=6,9 ± 0,1								

3.3.3. Tiêu chí vô trùng

Các loại môi trường BPA/0225; BPA/0325; BPA/0425 sau khi được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, tại các thời điểm 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 14 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 tuần tiến hành đem ủ 2 đĩa/

loại ở nhiệt độ 30-35°C trong 7 ngày. Sau thời gian theo dõi đều không quan sát thấy sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa môi trường đã ủ. Kết quả cho thấy 03 loại môi trường BPA đều đạt yêu cầu về vô trùng.

3.3.4. Tiêu chí tính tăng sinh

Bảng 6. Kết quả tính tăng sinh trên môi trường BPA qua các thời điểm

Chủng	Tiêu chí	Thời gian								
		0 tuần	4 tuần	8 tuần	12 tuần	14 tuần	16 tuần	17 tuần	18 tuần	19 tuần
Chủng S. aureus ATCC 25923		TSA đối chứng								
	TB	45,3	57	54,5	45	39	46,5	50,5	41	48
		BPA/0225								
	TB	37,6	41,7	38	32	24,3	26	28	19,7	22,3
	P _r (%)	83,7	73,1	69,7	71,1	62,4	55,9	55,4	48,0	46,5
		BPA/0325								
	TB	36,7	40,7	36,3	30	23,7	26,7	27	19,3	22
	P _r (%)	81,5	71,3	66,7	66,7	60,7	57,3	53,5	47,2	45,8
		BPA/0425								
	TB	39	44,3	37,7	31,7	23,3	25,7	26,3	20	22
P _r (%)	86,7	77,8	69,1	70,4	59,8	55,2	52,1	48,8	46,5	

Chủng <i>E. coli</i> ATCC 8739	Khả năng ức chế	BPA/0225									
		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		BPA/0325									
		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		BPA/0425									
		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(-): Âm tính (Không có sự phát triển của vi sinh vật trên các đĩa môi trường)											
Tiêu chuẩn chấp thuận	+ Giá trị độ phục hồi $P_R \geq 50\%$ + Khả năng ức chế chọn lọc: Ức chế sự phát triển của chủng <i>E.coli</i> trên các đĩa môi trường										

Kết quả tính tăng sinh của các loạt môi trường BPA qua các thời điểm cho thấy:

- Về khả năng ức chế: tại các thời điểm nghiên cứu tính ổn định từ tuần 0 đến tuần 19, cả các loạt môi trường BPA (0225, 0325, 0425) đều ức chế toàn phần đối với chủng *Escherichia coli* ATCC 8739

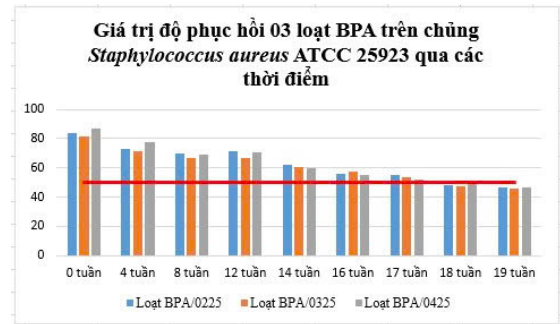
- Giá trị độ phục hồi: Từ biểu đồ cho thấy giá trị độ phục hồi trên chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 của 03 loạt môi trường BPA giảm dần qua các thời điểm từ 0 tuần đến 17 tuần. Số lượng khuẩn lạc của chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 có xu hướng giảm dần theo thời gian trên cả môi trường nghiên cứu BPA và môi trường đối chứng TSA.

+ Từ tuần 0 đến tuần 17, giá trị độ phục hồi của 03 loạt môi trường BPA (0225, 0325, 0425) đều đạt tiêu chuẩn chấp thuận ($\geq 50\%$).

+ Tuần thứ 18 giá trị độ phục hồi đối với chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 trên 03 loạt BPA (0225, 0325, 0425) lần lượt giảm xuống còn 48,0%; 47,2%; 48,8%, thấp hơn giá trị tiêu chuẩn (50%).

+ Tuần thứ 19 giá trị độ phục hồi đối với chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 trên 03 loạt BPA (0225, 0325, 0425) tiếp tục giảm xuống còn 46,5%; 45,8%; 46,5%, thấp hơn giá trị tiêu chuẩn (50%).

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



Hình 5. Biểu đồ giá trị độ phục hồi 03 loạt BPA qua các thời điểm

Từ các kết quả đánh giá các tiêu chí dựa trên tiêu chuẩn đã xây dựng cho thấy môi trường BPA vẫn đạt các tiêu chuẩn chấp thuận về các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng và khả năng ức chế chủng vi sinh chọn lọc *Escherichia coli* ATCC 8739 trong khoảng thời gian từ 0 đến 19 tuần. Tuy nhiên, về tiêu chí tính tăng sinh, ở tuần thứ 18 và 19, giá trị độ phục hồi đối với chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 của cả 03 loạt môi trường BPA (0225, 0325, 0425) nằm dưới mức tiêu chuẩn. Do đó, nhóm nghiên cứu đề xuất hạn dùng của môi trường BPA là 4 tháng kể từ ngày sản xuất.

4. Bàn luận

Môi trường BPA là môi trường chọn lọc trong thành phần có chứa casein thủy phân tụy, chiết xuất thịt và chiết xuất nấm men là nguồn dinh dưỡng, vitamin và khoáng chất cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật nói chung, trong khi pyruvate và glycine là những hợp chất có lợi cho sự tăng trưởng cụ thể của *Staphylococcus aureus* và ức chế chọn lọc sự phát triển của hầu hết các loại vi khuẩn khác. Trong nghiên cứu này, các loại môi trường BPA cũng được đánh giá khả năng ức chế chọn lọc trên chủng *Escherichia coli* ATCC 8739, cho thấy sự ức chế toàn phần tại tất cả các thời điểm nghiên cứu. Việc lựa chọn chủng *Escherichia coli* ATCC 8739 được tham chiếu dựa trên hướng dẫn TCVN 8128:2015 và ISO 11133:2014 cũng như Hướng dẫn và tham chiếu CoA của các hãng thương mại [4-6]

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là cầu khuẩn Gram dương, có khả năng gây nhiều bệnh nhiễm trùng trên cả người và động vật và tại nhiều vị trí khác nhau. Chính vì vậy, việc giám sát vi sinh các cơ sở chăm sóc động vật thí nghiệm đồng thời đánh giá tình trạng sức khỏe động vật thí nghiệm định kỳ là một trong những yêu cầu quan trọng được Liên đoàn các hiệp hội động vật thí nghiệm Châu Âu FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Association) khuyến cáo [1]. Hiện nay do chưa nghiên cứu tính ổn định nên môi trường BPA sau khi sản xuất chỉ được lưu hành nội bộ và sử dụng ngay sau khi sản xuất, gây tốn kém chi phí, thời gian và nhân lực. Do đó, việc xác định và công bố hạn dùng môi trường BPA rất có ý nghĩa đối với hoạt động chuyên môn của Viện.

Để nghiên cứu tính ổn định và đánh giá hạn dùng môi trường BPA, nhóm nghiên cứu đã sản xuất 03 loại môi trường BPA theo các quy trình chuẩn được phê duyệt, trong điều kiện phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GLP, trang thiết bị được hiệu chuẩn thẩm định định kỳ do nhân sự đã được đào tạo đánh giá tay nghề thực hiện. Các loại môi trường sau khi sản xuất được đánh giá và đạt yêu cầu chất lượng về các tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh theo tiêu chuẩn dựa trên các tài liệu tham chiếu: TCVN 8128:2015, ISO 11133:2014, cẩm nang vi sinh và Giấy chứng nhận phân tích (CoA) tham chiếu của các hãng thương mại [4-6]

Các loại môi trường sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C tại các thời điểm: 4 tuần, 8 tuần, 12 tuần, 14 tuần, 16 tuần, 17 tuần, 18 tuần, 19 tuần được đánh giá chất lượng về các tiêu chí về cảm quan, pH, vô trùng, tính tăng sinh. Các phương pháp nghiên cứu dùng để đánh giá các chỉ tiêu trên đều là những phương pháp có độ tin cậy cao và được hướng dẫn trong các tài liệu tham chiếu và nghiên cứu công bố trên tạp chí khoa học. Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 4 tháng bảo quản, các loại môi trường BPA vẫn đảm bảo chất lượng về tiêu chí: cảm quan, pH, vô trùng và khả năng ức chế chọn lọc vi sinh vật; riêng đối với tiêu chí tính tăng sinh, tại các thời điểm 18, 19 tuần giá trị độ phục hồi trên các chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 của cả 03 loại môi trường BPA (0225, 0325, 0425) nằm dưới mức tiêu chuẩn ($\geq 50\%$). Căn cứ lựa chọn giá trị tiêu chuẩn $\geq 50\%$ đã được tham chiếu dựa trên tài liệu: TCVN 8128:2015, ISO 11133:2014; Hướng dẫn hiệp hội vi sinh vật Úc; Cẩm nang vi sinh của các hãng.

Hiện nay các hãng vi sinh thương mại như Labone, Hardy Diagnostics, Himedia, BD cũng đang áp dụng tiêu chuẩn này cho môi trường BPA. Dựa trên CoA của nhà sản xuất, hạn dùng công bố của môi trường BPA dao động từ 3-6 tháng tùy hãng trong điều kiện bảo quản 2-8°C, môi trường BPA sau khi phân phối vào đĩa thạch, được đóng gói bằng 3 lớp trong túi nhựa PE/PET không thấm nước, kèm túi hút ẩm silica gel và đựng trong hộp carton để giảm sự bay hơi và oxy hoá, sau đó được chiếu xạ toàn bộ bằng tia gamma để đảm bảo vô trùng.

Giá trị độ phục hồi của các chủng vi sinh vật trên môi trường BPA nghiên cứu có sự giảm dần theo thời gian so với môi trường đối chứng TSA do bản chất thành phần môi trường, ngoài ra, 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. Môi trường TSA được sử dụng làm môi trường đối chứng dựa trên tham chiếu của TCVN 8128:2015, ISO 11133:2014 (phụ lục E, F). 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 [8]. Sự suy giảm khả năng tăng sinh của môi trường theo thời gian có thể liên quan đến sự biến đổi hoặc giảm hoạt tính của một số thành phần nhạy cảm trong môi trường như Potassium Tellurite hoặc các thành phần giàu dinh dưỡng như lòng đỏ trứng. Ngoài ra, các yếu tố như điều kiện bảo quản, ánh sáng và quá trình đóng gói cũng có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của môi trường.

Tham chiếu trên hạn dùng công bố của môi trường BPA đang lưu hành trên thị trường, dựa trên dữ liệu nghiên cứu, kết quả hạn dùng 4 tháng của môi trường BPA là phù hợp với điều kiện sản xuất, bảo quản tại NICVB. Thời hạn sử dụng 4 tháng được đề xuất nhằm đảm bảo tuân thủ các tiêu chuẩn chất lượng và đáp ứng tần suất sử dụng thực tế của môi trường trong các thử nghiệm kiểm định. Việc đánh giá hạn dùng môi trường BPA góp phần giảm thiểu chi phí, thời gian, nhân lực trong việc sản xuất môi trường vi sinh phục vụ đánh giá chất lượng động vật thí nghiệm và giám sát vi sinh các cơ sở chăm sóc động vật thí nghiệm; chủ động trong công việc chuyên môn, đào tạo, nghiên cứu khoa học. Môi trường BPA sau khi được công bố hạn dùng hoàn toàn có thể thương mại, cung cấp cho các đơn vị bệnh viện thú ý, cơ sở chăm sóc động vật thí nghiệm có nhu cầu.

5. Kết luận

Môi trường Baird-Parker Agar (BPA) sản xuất tại NICVB duy trì đạt yêu cầu về cảm quan, pH, độ vô trùng và khả năng ức chế vi sinh vật trong thời gian bảo quản đến 19 tuần ở 2–8°C. Tuy nhiên, khả năng tăng sinh đối với chủng *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 giảm xuống dưới ngưỡng chấp nhận từ tuần thứ 18. Trên cơ sở đó, hạn sử dụng của môi trường BPA được đề xuất là 4 tháng kể từ ngày sản xuất nhằm đảm bảo chất lượng và độ tin cậy trong quá trình sử dụng.

Tài liệu tham khảo

- [1] Javier. FELASA Guidelines and Recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012; 51(3)

- [2] Idzika ES, Mossel DAA. Enumeration of Vital and Thermally Stressed *Staphylococcus aureus* in Food using Baird-Parker Pig Plasma Agar (BPP). *J Appl Bacteriol.* 1980;49:101-13.
- [3] Văn phòng Công nhận Chất lượng (BoA). *Yêu cầu bổ sung để công nhận các phòng thử nghiệm lĩnh vực Sinh.* ARL 04. Hà Nội: Văn phòng Công nhận Chất lượng; 2020. tr. 11-2.
- [4] Difco™ & BBL™ Manual. 2nd ed. Manual of Microbiological Culture Media. Sparks (MD): Becton, Dickinson and Company; 2009.
- [5] Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8128:2015 (ISO 11133:2014). *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.* Hà Nội: Bộ Khoa học và Công nghệ; 2015.
- [6] ISO 11133:2014/A1:2018. *Microbiology of food, animal feeding stuffs and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.* Geneva: International Organization for Standardization; 2018.
- [7] Culture Media Special Interest Group, The Australian Society for Microbiology, *Guidelines for Assuring Quality of Medical Microbiological Culture Media*, 2nd edition. Australia: The Australian Society for Microbiology; 2012.
- [8] Ulisse S, Peccio A, Orsini G, Di Emidio E. A study of the shelf-life of critical culture media. *Veterinaria Italiana.* 2006;42(3):237-47.