

XÂY DỰNG QUY TRÌNH SẢN XUẤT BỘ MẪU NGOẠI KIỂM NẤM

Nguyễn Xuân Đạt[✉], Vũ Thị Bích Hồng, Phan Văn Hiếu

Nguyễn Thúy Hà, Lê Văn Hưng, Đặng Thị Ngọc Dung

Trường Đại học Y Hà Nội

Làm chủ quy trình công nghệ sản xuất mẫu ngoại kiểm tra chất lượng là một trong những yêu cầu hàng đầu đối với tổ chức ngoại kiểm. Quy trình sản xuất mẫu ngoại kiểm nhuộm soi, định danh và kháng sinh đồ nấm được nghiên cứu trên 4 cặp chủng phân lập từ bệnh nhân và chủng chuẩn gồm: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis* và *Candida auris*. Bộ mẫu đông khô được sản xuất với giai đoạn làm đông -40°C , nhiệt độ sấy sơ cấp -33°C , nhiệt độ sấy thứ cấp 25°C , áp suất 200mtor, chất nền lactose 10% sử dụng thiết bị Virtis Advantage Pro SP Scientific. Sản phẩm đông khô có độ sống $> 103 \text{ CFU/ml}$, độ ẩm tồn dư $< 4\%$, kết quả độ đồng nhất đạt 100%, độ ổn định duy trì tối thiểu trong 8 tháng. Bộ mẫu dạng dung dịch cho kết quả hình thái của *Cryptococcus neoformans* duy trì độ ổn định trong 32 ngày, hình thái của *Candida albicans*, *Candida tropicalis* và *Candida auris* duy trì được độ ổn định trong tối thiểu 40 ngày.

Từ khóa: nấm gây bệnh, ngoại kiểm.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất lượng xét nghiệm là yếu tố quan trọng góp phần quyết định sự thành công trong công tác chăm sóc sức khỏe người bệnh. Kiểm soát chất lượng là việc làm vô cùng quan trọng trong hệ thống quản lý chất lượng xét nghiệm, giúp phòng xét nghiệm đảm bảo độ tin cậy và độ chính xác của xét nghiệm. Trong đó, ngoại kiểm tra cung cấp bằng chứng khách quan về năng lực thực hiện xét nghiệm, là công cụ dùng để cải tiến chất lượng của phòng xét nghiệm.^{1,2}

Hàng năm, trên thế giới có 300 triệu ca nhiễm bệnh nấm, số người tử vong lên tới 1,6 triệu người.³ Mặc dù các xét nghiệm chẩn đoán nấm gây bệnh ngày càng trở nên phổ biến, tuy nhiên, chất lượng xét nghiệm nấm gây bệnh phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như kỹ thuật, con người, hóa chất, thiết bị... Do vậy, sử dụng bộ mẫu ngoại kiểm tra chất lượng nấm bệnh là

cần thiết và được các cơ quan quản lý yêu cầu thực hiện.⁴ Hiện nay, việc thực hiện ngoại kiểm xét nghiệm nấm tại các phòng xét nghiệm còn khó khăn do vấn đề về nguồn cung cấp mẫu, thời gian lưu trữ mẫu, kiến thức và thói quen thực hành. Nguồn mẫu ngoại kiểm nấm hiện đang được cung cấp bởi một vài tổ chức nước ngoài. Việc này dẫn tới vấn đề như chưa kiểm soát hết các yếu tố ảnh hưởng bởi điều kiện vận chuyển, khó khăn khi làm thủ tục mua bán, thủ tục báo cáo, tiếp nhận kết quả, giải đáp thắc mắc và giá thành sản phẩm cao. Bên cạnh đó, giá trị ấn định của các bộ mẫu ngoại kiểm này chưa phù hợp với đặc điểm dịch tễ ở nước ta. Mặt khác, với mục tiêu nâng cao năng lực kiểm soát chất lượng của xét nghiệm, Thủ tướng chính phủ phê duyệt đề án 316/QĐ-TTg ngày 27/02/2016 với mục tiêu Việt Nam có thể tự sản xuất được các loại mẫu kiểm soát chất lượng xét nghiệm.⁴ Cho tới nay, các bộ mẫu ngoại kiểm vi sinh, định nhóm máu, HBV-DNA, đông máu... đã được các Trung tâm Kiểm chuẩn chất lượng xét nghiệm y học sản xuất và cung cấp tới các phòng xét nghiệm. Tuy nhiên, nước ta

Tác giả liên hệ: Nguyễn Xuân Đạt

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: nguyenuxandat@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 25/08/2022

Ngày được chấp nhận: 10/09/2022

chưa có nghiên cứu nào được tiến hành để sản xuất bộ mẫu ngoại kiểm nấm. Từ những thực tế trên, nghiên cứu này được thực hiện với hai mục tiêu: 1) Xây dựng quy trình sản xuất mẫu ngoại kiểm đông khô phù hợp với xét nghiệm nhuộm soi, định danh và kháng sinh đồ nấm. 2) Xây dựng quy trình sản xuất mẫu ngoại kiểm dạng dung dịch phù hợp với xét nghiệm nhuộm soi nấm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Chủng chuẩn nấm có nguồn gốc từ ngân hàng chủng chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC): *Candida albicans* ATCC® 14053™* (*C. albicans*®), *Cryptococcus neoformans* ATCC® 204092™* (*C. neoformans*®), *Candida tropicalis* ATCC® 1369™* (*C. tropicalis*®). Chủng chuẩn nấm *Candida auris* CDC® B11903 (*C. auris*®) từ ngân hàng chủng trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ.

Chủng phân lập từ bệnh phẩm được cung cấp bởi phòng xét nghiệm: *C. albicans*^{BN}, *C. neoformans*^{BN}, *C. tropicalis*^{BN}, *C. auris*^{BN}.

Tiêu chuẩn chấp nhận

Chủng chuẩn nấm thế hệ F0 tới F3 có lý lịch chủng rõ ràng.

Chủng được phân lập từ bệnh phẩm có nguồn gốc rõ ràng.

Kết quả xác nhận bằng cách định danh lại chủng nấm của trung tâm phù hợp với kết quả từ đơn vị cung cấp chủng.

Tiêu chuẩn loại trừ

Các chủng có dấu hiệu bị tạp nhiễm, kết quả xác nhận không đạt.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu thực nghiệm trong phòng xét nghiệm.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 11/2021 tới tháng 08/2022.

Địa điểm nghiên cứu

+ Nghiên cứu sản xuất mẫu tại Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng xét nghiệm Y học thuộc Trường Đại học Y Hà Nội.

+ Kiểm tra độ ẩm tồn dư được thực hiện tại Viện Công nghiệp thực phẩm.

Chỉ số nghiên cứu

+ Quy trình sản xuất mẫu đông khô: khối lượng nước thăng hoa, độ ẩm tồn dư, nhiệt độ sấy sơ cấp, độ tơi xốp, hình thái, mật độ sống, độ thuần nhất, độ đồng nhất và độ ổn định.

+ Quy trình sản xuất mẫu dung dịch: hình thái, độ thuần nhất, độ đồng nhất và độ ổn định.

Các bước tiến hành xây dựng quy trình sản xuất mẫu đông khô

Bước 1: Xác nhận chủng đưa vào nghiên cứu. Chủng chuẩn được hoàn nguyên và nuôi cấy theo đúng khuyến cáo của nhà cung cấp (các chủng chuẩn đều có thế hệ F3). Chủng phân lập được cấy chuyển tiếp hai lần trên thạch Sabouraud Dextrose Agar (SDA) nuôi cấy ở điều kiện 35 - 37°C trong 24 - 48 giờ. Thực hiện định danh và kháng sinh đồ trên 2 cặp chủng *C. albicans* và *C. tropicalis*, định danh với 2 cặp chủng còn lại sử dụng hệ thống Vitek 2 compact - hãng bioMérieux. Kết quả có sự phù hợp với đơn vị cung cấp chủng được sử dụng cho bước tiếp theo. Loại bỏ và chọn lại chủng khi không có sự phù hợp giữa hai kết quả trên.

Bước 2: Thực nghiệm xác định quy trình đông khô. Pha huyền dịch nấm với độ đục thử nghiệm 0,5 McF, 1 McF, 2 McF và 3 McF bằng thiết bị đo độ đục Densicheck plus - hãng bioMérieux, chất nền lactose 10% (cần thực hiện đưa tín hiệu máy về 0 trên từng ống chứa chất nền trước khi tiến hành đo). Cấy đếm trên mỗi độ đục để kiểm tra mật độ sống trước đông khô. Phân phối 1ml huyền dịch của từng chủng vào các lọ vô trùng riêng biệt đã dán nhãn tương ứng. Xác định khối lượng lọ trước

và sau khi phân phối huyền dịch để xác nhận khối lượng huyền dịch được chia vào mỗi lọ là tương đương.

Chuyển lọ mẫu lên thiết bị đông khô Virtis Advantage Pro SP Scientific cài đặt giai đoạn làm đông ở -40°C cho tất cả các mẫu, giai đoạn sấy sơ cấp được thử nghiệm ở dải nhiệt độ từ -34°C đến -31°C ở áp suất 200mtor, giai đoạn sấy thứ cấp ở 25°C trong 5 giờ duy trì áp suất không thay đổi. Đánh giá cảm quan sản phẩm sau đông khô xác định lượng nước thăng hoa (m^{TH}). Hoàn nguyên mẫu theo khối lượng nước thăng hoa, cấy kiểm tra mật độ sống sau đông khô, thực hiện định danh và kháng sinh đồ nấm. Tiến hành so sánh kết quả trước và sau đông khô ở từng thử nghiệm để lựa chọn quy trình đông khô phù hợp.

Bước 3: Đánh giá chất lượng sản phẩm đông khô. Sản xuất 60 lọ mẫu/chủng theo quy trình đông khô đã lựa chọn. Kiểm tra các chỉ số nghiên cứu theo tiêu chuẩn ISO/IEC 13528:2015.

Tính chất vật lý: đánh giá độ đóng bánh, độ mịn và màu sắc của sản phẩm.

Độ ẩm tồn dư: được gửi kiểm định tại Viện Công nghệ thực phẩm với số lượng 16 mẫu (02 mẫu/chủng x 8 chủng).

Độ đồng nhất: Đánh giá bởi kết quả tương đồng về lượng nước thăng hoa, mật độ sống, hình thái, độ thuần nhất, kết quả định danh, kết quả kháng sinh đồ trên 80 mẫu (10 mẫu/chủng x 8 chủng).

Độ ổn định: Đánh giá các kết quả tương đương với kiểm tra độ đồng nhất, hàng tháng phân tích các chỉ số trên 02 mẫu/chủng x 8 chủng kéo dài trong 8 tháng.

Độ thuần nhất: Xem xét kết quả cấy trên thạch SDA của mẫu cùng thời điểm đảm bảo cho sự đồng nhất giữa các khuẩn lạc trên đĩa nuôi cấy. Để tránh sự tạp nhiễm từ một số vi khuẩn, thực hiện cấy phân vùng trên thạch Chromogenic UTI Agar quan sát sự khác biệt về hình thái và màu sắc khuẩn lạc để đánh giá.

Các bước tiến hành xây dựng quy trình sản xuất mẫu dung dịch

Bước 1: Xác nhận lại chủng đưa vào nghiên cứu. Thực hiện tương tự quy trình sản xuất mẫu đông khô.

Bước 2: Sản xuất mẫu dạng dung dịch. Pha huyền dịch nấm với độ đục 0,5 McF bằng thiết bị đo độ đục Densicheck plus - hãng bioMérieux, chất nền NaCl 0,9%. Tiến hành nhuộm soi (soi tươi, nhuộm mực tàu, nhuộm Gram) để xác định hình thái ban đầu. Phân phối 1ml huyền dịch của từng chủng vào các lọ vô trùng riêng biệt đã dán nhãn tương ứng (tổng số 60 lọ mẫu/chủng). Lưu trữ mẫu tại tủ bảo quản sạch ở nhiệt độ phòng.

Bước 3: Đánh giá chất lượng mẫu dung dịch.

Độ đồng nhất: Đánh giá bởi kết quả tương đồng khi nhuộm soi và kiểm tra độ thuần nhất của 10 mẫu/chủng x 8 chủng.

Độ ổn định: Đánh giá tương tự như đánh giá độ đồng nhất, hàng ngày phân tích 02 mẫu/chủng x 8 chủng kéo dài trong 40 ngày.

Thực nghiệm xác định độ ổn định dưới tác động của điều kiện vận chuyển

Tiến hành đóng gói 4 thùng mẫu, mỗi thùng gồm 8 mẫu đông khô và 8 mẫu dung dịch tương ứng với 8 chủng thử nghiệm theo tiêu chuẩn quốc tế cho các mẫu bệnh phẩm chứa chất lây nhiễm loại B. Thực nghiệm mô phỏng điều kiện vận chuyển (Bảng 1).

Bảng 1. Mô phỏng điều kiện vận chuyển mẫu

Thùng mẫu	Rung lắc trong 2 giờ	Thả rơi 2 mét	Nhiệt độ vận chuyển	Thời gian vận chuyển	Thời gian lưu kho 2 - 8°C
01	Có	Có	2 - 8°C	5 ngày	2 ngày

Thùng mẫu	Rung lắc trong 2 giờ	Thả rơi 2 mét	Nhiệt độ vận chuyển	Thời gian vận chuyển	Thời gian lưu kho 2 - 8°C
02	Có	Có	20 - 25°C	5 ngày	2 ngày
03	Có	Có	25 - 30°C	5 ngày	2 ngày
04	Có	Có	35 - 40°C	5 ngày	2 ngày

Xử lý số liệu

Số lượng khuẩn lạc được xác định bởi phần mềm Open CFU 3.9.0.

Phân tích thống kê trên phần mềm SPSS Statistics v.20.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện vì mục đích khoa học. Các chủng nấm có nguồn gốc rõ ràng được cấp phép sử dụng trong quy mô phòng xét nghiệm. Quá trình nghiên cứu tuân thủ quy định về an ninh/an toàn sinh học và các quy định khác tại

đơn vị nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả xây dựng quy trình sản xuất mẫu đông khô

Thực nghiệm quy trình đông khô trên thiết bị *Virtis Advantage Pro SP Scientific* ở các nhiệt độ sấy sơ cấp và độ đục khác nhau cho kết quả: Một số sản phẩm không đạt (KĐ): đóng bánh một phần, co vón ở đáy lọ và sản phẩm đạt tiêu chuẩn (ĐTC): đóng bánh đều, xốp mịn, màu sắc đồng nhất (Bảng 2).

Bảng 2. Đặc điểm của sản phẩm thực nghiệm đông khô

STT	Độ đục (McF)	Lượng dung dịch (gram)	Nhiệt độ sấy sơ cấp				Lượng nước thăng hoa (gram)
			-31°C	-32°C	-33°C	-34°C	
1	0,5	1,026	KĐ	ĐTC	ĐTC	ĐTC	0,998
2	1	1,030	KĐ	ĐTC	ĐTC	ĐTC	0,994
3	2	1,031	KĐ	ĐTC	ĐTC	ĐTC	0,998
4	3	1,036	KĐ	KĐ	ĐTC	ĐTC	1,007

Hoàn nguyên mẫu đông khô bằng 1 gram nước cất vô khuẩn kết quả cấy đếm cho mật độ và tỷ lệ sống như sau (Bảng 3).

Bảng 3. Mật độ và tỷ lệ sống của các chủng sau quá trình hoàn nguyên

Độ đục (McF)	Chủng	Mật độ x10 ⁶ CFU/ml (1*)	Tỷ lệ sống sau đông khô				Mật độ x10 ⁶ CFU/ml (2*)
			-31°C	-32°C	-33°C	-34°C	
0,5	<i>C. albicans</i>	1,62	69%	83%	99%	99%	> 1,04
	<i>C. auris</i>	1,65	62%	76%	100%	100%	> 0,98
	<i>C. tropicalis</i>	1,80	65%	69%	100%	100%	> 1,07
	<i>C. neoformans</i>	1,53	65%	75%	98%	98%	> 0,88

Độ đục (McF)	Chủng	Mật độ x10 ⁶ CFU/ml (1*)	Tỷ lệ sống sau đông khô				Mật độ x10 ⁶ CFU/ml (2*)
			-31°C	-32°C	-33°C	-34°C	
1	<i>C. albicans</i>	3,20	75%	97%	99%	100%	> 2,00
	<i>C. auris</i>	4,00	75%	88%	99%	98%	> 2,80
	<i>C. tropicalis</i>	3,65	77%	94%	99%	99%	> 2,50
	<i>C. neoformans</i>	3,15	79%	86%	99%	98%	> 2,00
2	<i>C. albicans</i>	6,25	75%	93%	99%	99%	> 4,70
	<i>C. auris</i>	8,00	73%	89%	100%	96%	> 5,30
	<i>C. tropicalis</i>	7,10	72%	95%	98%	98%	> 4,80
	<i>C. neoformans</i>	6,25	85%	93%	99%	99%	> 4,40
3	<i>C. albicans</i>	10,30	61%	86%	94%	93%	> 5,90
	<i>C. auris</i>	9,35	66%	88%	95%	96%	> 5,10
	<i>C. tropicalis</i>	9,80	67%	91%	99%	99%	> 5,70
	<i>C. neoformans</i>	11,65	61%	85%	97%	98%	> 6,30

(1*) mật độ khuẩn lạc trung bình trước đông khô

(2*) mật độ khuẩn lạc nhỏ nhất sau đông khô

Kết quả kiểm tra độ thuần nhất: toàn bộ các lọ chỉ có một loại khuẩn lạc như chủng ban đầu, không có nhiễm chéo. Số lượng khuẩn lạc tối thiểu là $8,8 \times 10^5$ CFU/ml thỏa mãn tiêu chuẩn TCVN 9298:2014 ($\geq 10^3$ CFU/ml).

Kết quả định danh và kháng sinh đồ của 04 cặp chủng cũng cho thấy sự đồng nhất giữa kết quả trước và sau đông khô. Kết quả phiên giải kháng sinh đồ (R: kháng, S: nhạy, I: trung gian) ở toàn bộ các chủng có phiên giải (*C. albicans*, *C. tropicalis*) cho thấy sự đồng nhất 100% trên từng loại kháng sinh (Fluconazole,

Voriconazole, Caspofungin, Micafungin, Amphotericin B, Flucytosine) ở từng chủng thử nghiệm trước và sau đông khô.

Quy trình đông khô tối ưu được thiết lập trên thiết bị Virtis Advantage Pro SP Scientific là: “Giai đoạn làm đông -40°C, nhiệt độ sấy sơ cấp -33°C duy trì trong 12 giờ, nhiệt độ sấy thứ cấp 25°C duy trì trong 5 giờ, áp suất 200mtor, chất nền lactose 10%, độ đục huyền dịch 0,5 McF”.

Kết quả kiểm tra độ đồng nhất: Sau khi sử dụng quy trình đông khô tối ưu để sản xuất mẫu (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả độ đồng nhất của sản phẩm sau đông khô

STT	Nội dung kiểm tra	Tiêu chuẩn	Kết quả
1	Cảm quan	Mẫu đóng bánh đều, xốp mịn có màu sắc đồng nhất	Đạt
	Tính chất vật lý	Độ ẩm tồn dư	< 4%
	Khối lượng nước thăng hoa	1 gram	≤ 1,06%
			1 gram

STT	Nội dung kiểm tra	Tiêu chuẩn	Kết quả
2	C. albicans [®]	≥ 10 ³ CFU/ml	≥ 1,06 x 10 ⁶
	C. auris [®]		≥ 1,01 x 10 ⁶
	C. tropicalis [®]		≥ 1,03 x 10 ⁶
	C. neoformans [®]		≥ 9,4 x 10 ⁵
	C. albicans ^{BN}		≥ 1,04 x 10 ⁶
	C. auris ^{BN}		≥ 1,02 x 10 ⁶
	C. tropicalis ^{BN}		≥ 1,04 x 10 ⁶
	C. neoformans ^{BN}	≥ 9,5 x 10 ⁵	
3	Độ thuần nhất	100% thuần nhất	Đạt
4	Hình thái	Duy trì hình thái đặc trưng của chủng ban đầu	Đạt
5	Kết quả định danh	100% đồng nhất với kết quả định danh ban đầu	Đạt
6	Kết quả kháng sinh đồ	100% kết quả kháng sinh được phiên giải giống với kết quả ban đầu	Đạt

Kết quả kiểm tra độ ổn định: Kết quả hoàn toàn tương đồng với kết quả kiểm tra độ đồng nhất.

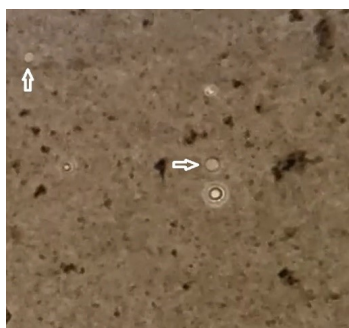
2. Kết quả xây dựng quy trình sản xuất mẫu dung dịch

Kết quả kiểm tra độ thuần nhất: toàn bộ các lọ chỉ có một loại khuẩn lạc như chủng ban đầu, không có nhiễm chéo.

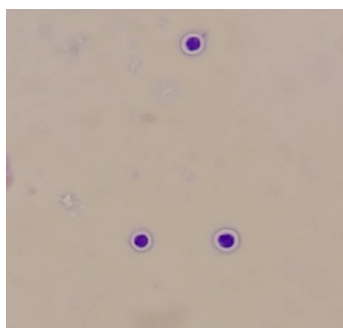
Kết quả kiểm tra độ đồng nhất: 100% các mẫu cho kết quả hình thái giống với chủng ban đầu.

đầu.

Kết quả kiểm tra độ ổn định: Trong môi trường nước muối sinh lý, hình thái của tất cả các chủng thử nghiệm duy trì độ ổn định trong 32 ngày. Ngày 33 của thử nghiệm trên chủng *C. neoformans* ghi nhận một số hình ảnh chủng mất dần khả năng chiết quang khi nhuộm mực tàu (Hình 1), mặc dù kết quả nhuộm Gram vẫn cho hình ảnh đặc trưng (Hình 2). Các chủng còn lại cho kết quả không đổi đến hết 40 ngày.



Hình 1. Hình ảnh *C. neoformans* mất chiết quang khi nhuộm mực tàu



Hình 2. Hình ảnh *C. neoformans* phương pháp nhuộm Gram

3. Kết quả thực nghiệm xác định độ ổn định trong các điều kiện vận chuyển mô phỏng

Phân tích các mẫu sau thực nghiệm mô phỏng điều kiện vận chuyển thu về kết quả như sau (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả đánh giá tác động thực nghiệm mô phỏng điều kiện vận chuyển mẫu.

Thùng mẫu	Hiện tượng		Thay đổi khi thực hiện kiểm tra					Đánh giá
	Nứt vỡ	Tràn đổ	Thuần nhất	Nhuộm soi	Định danh	Kháng sinh đồ	Mật độ sống	
01	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Đạt yêu cầu
02	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Đạt yêu cầu
03	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Đạt yêu cầu
04	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Có	Không đạt

IV. BÀN LUẬN

Với kết quả xây dựng quy trình sản xuất mẫu đông khô, tính chất vật lý là kết quả quan trọng hàng đầu giúp đánh giá chất lượng của quá trình đông khô mẫu ngoại kiểm nắm. Các sản phẩm chỉ đông khô được một phần hoặc một phần bị co vón, tỷ lệ sống của các chủng sụt giảm. Kết quả của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của J. F. Berny và G. L. Hennebert (1991), Song Miao cùng cộng sự (2008): Khi quá trình đông khô chưa đạt đến điểm đông tới hạn hay nhiệt độ dao động lớn quanh giá trị này, quá trình sấy sơ cấp tạo nên sản phẩm có hiện tượng bị co vón thì tỷ lệ sống sẽ bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Khi sản phẩm được đông khô hoàn toàn thì tỷ lệ sống gần như không có sự thay đổi.^{6,7} Quá trình sấy sơ cấp ở nhiệt độ -33°C tạo nên các sản phẩm đóng bánh đều, xốp mịn có màu sắc đồng nhất, tan nhanh khi hoàn nguyên đáp ứng theo tiêu chuẩn TCN 34:1999.⁸ Kết quả nghiên cứu của chúng tôi giống với kết quả nghiên cứu của Rongjun Chen và cộng sự (2008) khi nghiên cứu so sánh quá trình đông khô trên chất nền lactose và sucrose.⁹ Mật độ sống từ các sản phẩm đông khô hoàn toàn trên nghiên cứu đạt ~100%, kết quả này cao

hơn kết quả nghiên cứu của Yukie Miyamoto-Shinohara (2000), Song Miao (2008) khi đông khô trên một số vi khuẩn Gram âm và Gram dương với mật độ sống sau đông khô tương ứng là 50% và ~93,7%.^{7,10} Với kết quả mật độ sống $\geq 9,5 \times 10^5$ CFU/ml, không bị tạp nhiễm quy trình đông khô tạo nên sản phẩm thỏa mãn tiêu chuẩn TCVN 9298:2014 ($\geq 10^3$ CFU/ml).¹¹

Theo tiêu chuẩn quốc tế ISO/IEC 17043:2010 và ISO/IEC 13528:2015 để các mẫu có thể triển khai các chương trình ngoại kiểm, trước tiên các mẫu cần đạt độ đồng nhất và đạt độ ổn định. Với xét nghiệm định tính như nhuộm soi, định danh và kết quả phiên giải kháng sinh đồ trên mẫu ngoại kiểm nắm độ đồng nhất cần đạt 100%. Theo hướng dẫn, 10% số lượng mẫu (ít nhất 10 lọ mẫu/ chủng) đã được lựa chọn ngẫu nhiên hệ thống để đánh giá độ đồng nhất trên tất cả các thông số xét nghiệm cần kiểm tra.^{12,13} Các kết quả của chúng tôi cho thấy, các mẫu đạt tiêu chuẩn về độ đồng nhất, đủ điều kiện để theo dõi tiêu chuẩn độ ổn định. Hàng tháng, các mẫu dạng đông khô duy trì độ ổn định ở tất cả các thông số xét nghiệm trong tối thiểu 8 tháng. Kết quả này tương đương với nghiên cứu của

Morsi El Soda và Sherif Kandil (2015).¹⁴ Kết quả nhuộm soi bộ mẫu dạng dung dịch cho thấy độ ổn định thấp hơn trong nghiên cứu của M. R. McGinnis, A. A. Padhye, và L. Ajello (1974).¹⁵ Đối chiếu lại quy trình nghiên cứu của nhóm tác giả trên chúng tôi nhận thấy rằng, tác giả chỉ thực hiện kiểm tra nhuộm Gram và kiểm tra mật độ sống tại thời điểm đầu và cuối nghiên cứu, không thực hiện phương pháp nhuộm mực tàu với chủng *C. neoformans* nên có thể chưa ghi nhận được đặc điểm hình thái biến đổi khi thực hiện phương pháp này. Một số nghiên cứu trên thế giới còn chỉ ra rằng các mẫu đông khô chủng nấm độ ổn định có thể kéo dài trên 30 năm, mẫu nấm lưu giữ trong dung dịch nước muối có thể kéo dài độ ổn định tới 12 tháng.^{15,16} Đây là cơ sở để chúng tôi tiếp tục thực hiện mở rộng nghiên cứu với nhiều chủng nấm khác trong khoảng thời gian dài hơn.

Kết quả mô phỏng thực nghiệm điều kiện vận chuyển cho thấy, chỉ nên vận chuyển mẫu ở nhiệt độ $\leq 30^{\circ}\text{C}$ để đảm bảo tính ổn định của các sản phẩm là tốt nhất. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây của các tổ chức ngoại kiểm trên thế giới như RCPA, UK NEQAS khi vận chuyển mẫu sinh vật đông khô.¹⁷

V. KẾT LUẬN

Hoàn thiện xây dựng quy trình sản xuất mẫu ngoại kiểm đông khô phù hợp với xét nghiệm nhuộm soi, định danh, kháng sinh đồ nấm và quy trình sản xuất mẫu ngoại kiểm dạng dung dịch phù hợp với xét nghiệm nhuộm soi nấm. Quy trình sản xuất đáp ứng tiêu chuẩn ISO/IEC 17043 của nhà cung cấp các chương trình thử nghiệm thành thạo, và tiêu chuẩn thống kê ISO/IEC 13528:2015. Các đặc tính vật lý, mật độ sống của mẫu ngoại kiểm dạng đông khô đáp ứng theo tiêu chuẩn quốc gia về bảo quản dài hạn vi sinh vật dùng trong nông nghiệp TCVN 9298:2014 và tiêu chuẩn bảo quản dài

hạn nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp bằng phương pháp đông khô TCN 34:1999.

Lời cảm ơn

Đề tài nghiên cứu của chúng tôi đã nhận được sự hỗ trợ kinh phí của đề án 316/316/QĐ-TTg “Quyết định của Thủ tướng chính phủ phê duyệt đề án tăng cường năng lực hệ thống quản lý chất lượng xét nghiệm y học giai đoạn 2016 - 2025” của Thủ tướng chính phủ và sự hỗ trợ nhiều mặt từ phía trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng xét nghiệm Y học thuộc Trường Đại học Y Hà Nội. Nhóm nghiên cứu cam kết không có xung đột lợi ích với bất kỳ tổ chức, cá nhân nào từ kết quả nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Libeer JC. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clin Chim Acta*. 2001;309(2):173-177. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00518-6.
2. Soisangwan P. External quality assessment in blood group serology in the World Health Organization South-East Asia Region. *WHO South-East Asia Journal of Public Health*. 2012;1(4):423-431.
3. Stop neglecting fungi. *Nature Microbiology*. 2017;2(8):1-2. doi: 10.1038/nmicr.obiol.2017.120.
4. Quyết định số 316/QĐ-TTg. Quyết định của Thủ tướng chính phủ phê duyệt đề án tăng cường năng lực hệ thống quản lý chất lượng xét nghiệm y học giai đoạn 2016-2025. Thủ tướng chính phủ; 2016.
5. Miller WG, Jones GR, Horowitz GL, Weykamp C. Proficiency testing/external quality assessment: Current challenges and future directions. *Clinical Chemistry*. 2011;57(12):1670-1680. doi: 10.1373/clinchem.2011.168641.
6. Berny JF, Hennebert GL. Viability

and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: Effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*. 1991;83(6):805-815. doi: 10.2307/3760439.

7. Miao S, Mills S, Stanton C, F. Fitzgerald G, Roos Y, Paul Ross R. Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics. *Dairy Science & Technology*. 2008;88(1):19-30.

8. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Tiêu chuẩn ngành 10 TCN 349:1999 về bảo quản dài hạn nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp bằng phương pháp đông khô. Accessed October 11, 2021. <https://vanbanphapluat.co/10-tcn-349-1999-bao-quan-dai-han-nguon-gen-vi-sinh-vat-nong-nghiep>

9. Chen R, Slater NKH, Gatlin LA, Kramer T, Shalaev EY. Comparative rates of freeze-drying for lactose and sucrose solutions as measured by photographic recording, product temperature, and heat flux transducer. *Pharm Dev Technol*. 2008;13(5):367-374. doi: 10.1080/10837450802244744.

10. Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*. 2000;41(3):251-255. doi: 10.1006/cryo.2000.2282.

11. Bộ Khoa học và Công nghệ. Tiêu

ch chuẩn quốc gia TCVN 9298:2014 : vi sinh vật - bảo quản dài hạn vi sinh vật dùng trong nông nghiệp - phương pháp đông khô. Published online 2014.

12. ISO 13528:2015(E). Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparison. International Standard. Second edition; 2015.

13. ISO/IEC 17043:2010(en). Conformity assessment - General requirements for proficiency testing. Published Feb 2010. <https://www.iso.org/standard/29366.html>.

14. Kandil S, El Soda M. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. *Advances in Microbiology*. 2015;05:371-382. doi: 10.4236/aim.2015.56039.

15. McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Appl Microbiol*. 1974;28(2):218-222.

16. Bond C. Freeze-drying of yeast cultures. *Methods Mol Biol*. 2007;368:99-107. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_6.

17. Urine Module. Survey instructions. QAP Portal. Accessed August 25, 2022. <https://myqap.rcpaqap.com.au/round-enrolments/33515263320803237/instructions>.

Summary

DEVELOPING PROCEDURE FOR PRODUCING EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PANEL FOR FUNGI

Optimizing the technology and process for producing external quality assessment (EQA) panel is an important requirement for an EQA provider. The procedure for producing EQA panel for fungal staining, fungal identification, and antifungal biotics check was studied on 4 fungal strains, isolated from patients and cultured from standard strains: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*,

and *Candida auris*. The lyophilizing process included freezing stage at -40°C, primary drying at -33°C, secondary drying at 25°C, pressure at 200mtor, on 10% lactose substrate using Virtis Advantage Pro SP Scientific instrument. The lyophilized products had required criteria as survival > 10³ CFU/ml, residual moisture < 4%, homogeneity at 100%, and stable for at least 8 months. For the liquid samples set: the morphology of *Cryptococcus neoformans* remained stable for 32 days, the morphology of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida auris* remained stable for at least 40 days.

Keywords: fungals, external quality assessment.