

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 1022:1992

**SINH VẬT PHẨM –
PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA TÍNH VÔ KHUẨN**

General requirements for the sterility of biological substances

HÀ NỘI – 2008

Lời nói đầu

TCVN 1022:1992 thay thế TCVN 1022:1970;

TCVN 1022:1992 do Trung tâm Quốc gia Kiểm định Sinh vật phẩm biên soạn, Vụ Vệ sinh và Môi trường (Bộ Y tế) đề nghị, Vụ Khoa học và Đào tạo (Bộ Y tế) trình duyệt, Bộ Y tế ban hành;

Tiêu chuẩn này được chuyển đổi năm 2008 từ Tiêu chuẩn Việt Nam cùng số hiệu thành Tiêu chuẩn Quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

Sinh vật phẩm – Phương pháp kiểm tra tính vô khuẩn

General requirements for the sterility of biological substances

Tiêu chuẩn này qui định các biện pháp phòng ngừa, phát hiện, kiểm tra tính vô khuẩn áp dụng cho các chế phẩm vắc-xin-huyết thanh, sinh vật phẩm được coi là vô khuẩn khi sinh vật đo không có lẫn bất cứ loại sinh vật nào khác.

Tiêu chuẩn này không đề cập đến vấn đề phát hiện virus, mycoplasma và sinh vật đơn bào nhiễm vào sinh vật phẩm.

1 Qui định chung

1.1 Để đề phòng lây nhiễm trong quá trình sản xuất và kiểm định, phải tuân thủ đúng các qui chế về vô khuẩn.

1.2 Kiểm tra vô khuẩn phải tiến hành trong phòng thiết kế đặc biệt và phải có phòng trung gian.

1.3 Người kiểm tra vô khuẩn phải là những cán bộ được đào tạo đặc biệt cho công việc này, có kiến thức đầy đủ về lý thuyết và thực hành.

1.4 Kiểm tra vô khuẩn chỉ được phép dùng các nguyên liệu chai, bình... đã được xử lý vô khuẩn.

1.5 Để kiểm tra tính vô khuẩn của các sinh vật phẩm, môi trường được dùng là môi trường thioglycolat dạng nước, thành phần và yêu cầu chất lượng được ghi trong Phụ lục 1 của tiêu chuẩn này.

2 Cách lấy mẫu và số lượng lấy mẫu

Theo TCVN 5666:1992.

3 Tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn

3.1 Khi làm việc trong buồng vô khuẩn phải đảm bảo vô khuẩn trang bị và con người, hạn chế đến mức tối thiểu các chuyển động và nói chuyện.

TCVN 1022:1992

Trước khi đem ampun hoặc lọc vào buồng vô khuẩn phải kiểm tra độ chân không, độ kín. Sau đó ampun, lọ phải được khử khuẩn bằng dung dịch ôxi già từ 2 % đến 3 % hoặc cồn 70°. Lấy mẫu bằng ống hút vô khuẩn và quả bóp. Mỗi mẫu kiểm tra phải dùng riêng một ống hút và cấy sâu vào môi trường nhưng không được bơm khí vào. Những ống hút, ampun, lọ sau khi dùng phải ngâm vào dung dịch nước khử khuẩn, sau đó xử lý tiếp.

Trước khi cấy những tiêu bản thể lỏng phải lắc kỹ, vì vi khuẩn lây nhiễm có thể lắng xuống đáy. Sinh phẩm khô phải hòa tan bằng nước hồi chỉnh kèm theo, và theo đúng chỉ dẫn ghi ở nhãn và sau đó cấy lên môi trường nuôi cấy. Tính vô khuẩn của nước hồi chỉnh được kiểm tra bằng cách lấy 2 ml vào hai ống thioglycolat 20 ml, ủ ở nhiệt độ từ 30 °C đến 36 °C và từ 20 °C đến 25 °C trong vòng 14 ngày cùng với các mẫu kiểm tra. Phải kiểm tra tính vô khuẩn của nước hồi chỉnh trước và sau khi làm. Nếu khi hòa tan các tiêu bản khô, phải sử dụng một vài chai nước thì mỗi chai đều phải kiểm tra tương tự như trên.

Trước khi tiến hành kiểm tra tính vô khuẩn của một sinh phẩm, phải xác định chế phẩm đó có chứa các chất có khả năng diệt khuẩn hoặc ức chế sự phát triển của vi khuẩn không, hoặc có chứa các chất bảo quản có tính chất như trên. Trong trường hợp này phải có biện pháp thích hợp để làm mất tác dụng như dùng một lượng lớn môi trường để pha loãng hoặc lọc qua màng lọc.

3.2 Kỹ thuật kiểm tra vô khuẩn

3.2.1 Kiểm tra vô khuẩn bán thành phẩm cuối cùng phải cấy thành 3 mẫu, mỗi mẫu không ít hơn 2 ml vào một ống môi trường và ủ ở nhiệt độ từ 30 °C đến 37 °C và từ 20 °C đến 25 °C.

3.2.2 Kiểm tra vô khuẩn lô thành phẩm cấy bằng ống hút không được ít hơn 2 ml vào 2 ống môi trường thioglycolat. Một ống ủ ở nhiệt độ từ 30 °C đến 36 °C để phát hiện vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí, ống kia ủ ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C để phát hiện nấm.

Đối với các chế phẩm không làm đục môi trường nuôi cấy (glôbulin miễn dịch, dị nguyên gây bệnh và không gây bệnh, các kháng huyết thanh, các dung dịch hồi chỉnh...) theo dõi trong vòng 14 ngày ở các nhiệt độ như đã nêu ở trên.

Đối với các chế phẩm làm đục môi trường nuôi cấy (những chế phẩm có chất hấp thụ, sinh khối, tế bào não...) cũng tiến hành như trên, nhưng trong khoảng 2 ngày đến 5 ngày, phải cấy chuyển ít nhất 1 ml sang 2 ống thioglycolat khác. Cả ống môi trường cấy lần đầu cũng như ống môi trường cấy chuyển phải ủ ở nhiệt độ từ 30 °C đến 36 °C và từ 20 °C đến 25 °C, tổng số thời gian theo dõi ít nhất là 14 ngày. Những ống cấy lần đầu phải giữ cho đến hết thời gian theo dõi kiểm tra vô khuẩn.

3.2.3 Kiểm tra vô khuẩn để phát hiện mycoplasma

Đối với các vắc xin virus được sản xuất bằng cách nuôi cấy virus trên tế bào nuôi hoặc mô động vật, phải kiểm tra sự có mặt của mycoplasma trong dịch nuôi cấy tế bào, việc kiểm tra các môi trường đặc biệt dùng cho từng chế phẩm riêng biệt do Cơ quan Kiểm định Quốc gia quy định.

3.2.4 Kiểm tra vô khuẩn để phát hiện virut

Việc kiểm tra sự có mặt của virut ngoại lai trong chế phẩm phải được tiến hành theo một phương pháp đặc biệt đối với từng loại chế phẩm riêng biệt và theo những quy định riêng của Cơ quan Kiểm định Quốc gia.

3.2.5 Kiểm tra các vi sinh vật đặc biệt

Việc kiểm tra sự bất hoạt hoàn toàn của các vi sinh vật trong một vắc xin bất hoạt và các thử nghiệm bổ sung để kiểm tra sự có mặt của các vi sinh vật ngoại lai trong các loại chế phẩm này phải được thực hiện một cách đặc biệt theo những tiêu chuẩn riêng cho từng loại sinh phẩm. Đọc kết quả cuối cùng bằng cách quan sát đại thể, trong trường hợp có nhiễm khuẩn phải kiểm tra vi thể toàn bộ nuôi cấy trong 14 ngày theo dõi.

4 Đánh giá

Bản thành phẩm cuối cùng được coi là vô khuẩn nếu không có một ống môi trường nào bị nhiễm.

Trường hợp bị nhiễm dù chỉ một ống, phải kiểm tra lại bằng mẫu lưu, kiểm tra mỗi mẫu như quy trình đã nêu ở trên. Trường hợp bị nhiễm phải làm đồ phiến nhuộm gram soi kính hiển vi. Nhuộm gram để phát hiện vi khuẩn gram (-) hay (+). Nếu không bị nhiễm ở lần kiểm tra thứ hai thì chế phẩm được coi là vô khuẩn. Khi bị nhiễm ở lần kiểm tra thứ hai dù chỉ một ống và nhiễm cùng loại vi khuẩn như lần thứ nhất thì loại sinh vật phẩm đó không đạt yêu cầu về vô khuẩn, phải hủy bỏ. Nếu ở lần kiểm tra thứ nhất và thứ hai phát hiện thấy các loại vi khuẩn khác nhau, phải tiến hành ở lần kiểm tra thứ ba. Ở lần kiểm tra thứ ba, nếu không bị nhiễm, chế phẩm được coi là vô khuẩn. Nếu trong trường hợp này phát hiện thấy bị nhiễm dù chỉ một ống, không phụ thuộc vào loại vi khuẩn, chế phẩm coi như không đạt yêu cầu về vô khuẩn.

5 Lập hồ sơ và lưu hồ sơ

Phải ghi chép đầy đủ và rõ ràng toàn bộ các bước tiến hành kiểm tra vô khuẩn bao gồm nhiệt độ và thời gian ủ, toàn bộ thông số có liên quan đến mẫu kiểm tra lấy từ các giai đoạn của quá trình sản xuất của loại chế phẩm nào đó. Mẫu ghi chép kiểm tra vô khuẩn phải thống nhất và do cơ quan Kiểm định Quốc gia quy định. Toàn bộ các ghi chép tay trong khi tiến hành kiểm tra phải lưu lại không loại trừ một thông số nào. Những số liệu này phải được lưu lại cho đến khi hết hạn sử dụng của loại chế phẩm đó và phải sẵn sàng cung cấp đầy đủ cho cơ quan Kiểm định Quốc gia khi cần thanh tra.

Đối với mỗi thử nghiệm kiểm tra vô khuẩn phải ghi lại toàn bộ các thông số về tên gọi, loạt số của loại chế phẩm, số lượng mẫu lấy kiểm tra, số lượng môi trường, loại môi trường dùng để kiểm tra, nhiệt độ theo dõi, ngày thực hiện, ngày đọc kết quả, thời gian theo dõi và kết luận, tên và chức vụ người kiểm định.

Phụ lục 1

Môi trường dùng để phát hiện vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí và nấm**1 Qui định chung**

1.1 Môi trường nuôi cấy dùng để kiểm tra vô khuẩn phải do cơ quan Kiểm định Quốc gia qui định. Môi trường này phải đảm bảo sự phát triển tốt cho phần lớn các loại vi sinh vật hiếu khí, kỵ khí thường có trong không khí của cơ sở sản xuất.

1.2 Để kiểm tra tính vô khuẩn của các sinh phẩm phải dùng môi trường thioglycolat dạng nước. Thành phần của môi trường được mô tả trong phần tiếp theo. Mỗi loại môi trường thioglycolat mới được điều chế phải được kiểm tra về tính vô khuẩn, khả năng làm cho vi sinh vật phát triển và tinh trung hòa.

1.3 Để kiểm tra tính vô khuẩn của các chế phẩm không có chất bảo quản merthiolat, có thể dùng môi trường thioglycolat mới pha trong vòng 2 tuần kể từ ngày pha chế. Môi trường sau khi sản xuất phải bảo quản ở nhiệt độ phòng (từ 20 °C đến 30 °C) và tránh ánh sáng.

Để kiểm tra sinh phẩm có chứa merthiolat có thể dùng môi trường thioglycolat mới pha từ 1 ngày đến 3 ngày, kể từ ngày sản xuất.

Thời hạn sử dụng cụ thể của môi trường thioglycolat được xác định bằng cách kiểm tra tinh trung hòa của môi trường sau 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày.

2 Thành phần và cách pha chế môi trường thioglycolat lỏng

a) L-cystin	0,50 g
b) NaCl	2,50 g
c) Đường glucoza (C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂₀)	5,50 g
d) Thạch (agar)	0,75 g
e) Chiết suất men (tan trong nước)	5,00 g
f) Casein thủy phân bằng men tụy	15,00 g
g) Nước cất	1000,00 ml
h) Thioglycolat Na	0,50 g
q) Resazurin Na (dung dịch 0,01 % mới pha)	1,00 ml
r) pH cuối cùng từ 7,0 đến 7,2 (sau khi sấy 121 °C từ 18 min đến 20 min).	

Cách pha chế

Cho lần lượt 6 thành phần đầu vào 1 cốc. Khuấy trong 1 l nước nóng, cho nốt phần nước còn lại, sau đó đun cách thủy cốc đựng môi trường, chú ý sao để cho L-cystin được tan hoàn toàn. Cho thioglycolat Na, tiếp đó cho dung dịch NaOH 1 N tính sao để sau khi sấy pH phải là 7,0 đến 7,2. Đun nóng lại, không được đun sôi, nếu cần, lọc qua giấy lọc ướt, sau đó cho thêm rezazurin. Phân chia vào ống nghiệm thích hợp tùy theo yêu cầu. Sấy ướt 121 °C trong thời gian từ 18 min đến 20 min. Khi lấy từ lò sấy ướt ra, làm lạnh ngay dưới vòi nước cho tới 25 °C. Bảo quản ở nhiệt độ từ 20 °C đến 30 °C, tránh ánh sáng. Nếu quá 1/3 phần trên ống môi trường đổi thành màu hồng, không nên dùng hoặc nếu muốn dùng phải hấp hơi nước lại 1 lần. Môi trường bảo quản quá 3 tuần không được dùng.

3 Yêu cầu về chất lượng của môi trường nuôi cấy

Môi trường thioglycolat sau khi điều chế phải đạt các yêu cầu sau:

3.1 Tính vô khuẩn: Phải vô khuẩn.

3.2 Tính chất phát triển: Phải đảm bảo cho chủng *Alcaligenes feacalis* 415 phát triển chậm nhất sau 48 h và không thấp hơn độ pha loãng 1/10000000 và chủng *Clostridium novyi oedematien* 198 không thấp hơn độ pha 1/100000.

3.3 Tính chất trung hòa: Phải đảm bảo cho chủng *Alcaligenes feacalis* 415 phát triển chậm nhất vào ngày thứ 5 trong môi trường có merthiolat ở nồng độ 1:10000 và không thấp hơn độ pha 1/1000000 (xem Phụ lục 2).

Phụ lục 2

Phương pháp kiểm tra chất lượng môi trường thioglycolat

1 Kiểm tra tính vô khuẩn

Để kiểm tra tính vô khuẩn của một loạt môi trường thioglycolat, sau khi hấp khử trùng lấy ít nhất 2 % số ống ủ trong tủ ấm 37 °C. Đọc kết quả sau 48 h bằng cách xem tất cả các ống môi trường. Trong trường hợp bị nhiễm khuẩn (đục), toàn bộ loạt môi trường đó phải bỏ đi. Những ống môi trường đã ủ ở nhiệt độ 37 °C không được dùng để kiểm tra vô khuẩn sinh vật phẩm.

2 Kiểm tra tính tăng sinh

Để kiểm tra tính chất này của môi trường người ta dùng những chủng gốc sau:

- Hiếu khí: *Alcaligenes feacalis* 415.
- Kị khí: *Clostridium novyi oedematiens* 198.

2.1 Các chủng gốc

Alcaligenes feacalis 415: Nhận từ Viện Lister (Luân Đôn) vào năm 1946. Trục khuẩn gram (-), di động. Hiếu khí tuyệt đối không gây hại cho người và động vật.

Clostridium novyi oedematiens 198: phân lập được vào năm 1930. Trục khuẩn loại to, gram(+), tạo nha bào. Nha bào có hình bầu dục. Kị khí tuyệt đối. Không gây bệnh cho chuột lang và chuột nhắt trắng. Chủng kiểm tra do Viện Kiểm định Quốc gia cấp phát theo yêu cầu và có hộ chiếu kèm theo. Không được phép thay đổi những chủng đã qui định để kiểm tra chất lượng môi trường.

2.2 Giữ chủng và chuẩn bị chủng kiểm tra để cấy vào môi trường thioglycolat**2.2.1 *Alcaligenes feacalis* 415**

Mở ống chủng đông khô *Alcaligenes feacalis* 415, dùng một ống hút vô khuẩn cho thêm (khoảng 0,5 ml) canh thang hottzinger, hút trộn thật đều cho đến khi có được một hỗn dịch đồng nhất chuyển sang 1 ống canh thang hottzinger và một ống thạch nghiêng hottzinger ủ nuôi cấy trong thời gian từ 20 h đến 24 h ở 37 °C. Sau 48 h đọc kết quả.

2.2.2 *Clostridium novyi oedematiens* 198

Mở ống chủng đông khô, dùng một ống hút vô khuẩn cho thêm (khoảng 1 ml) môi trường Tarushi (đã đun cách thủy lại trước khi dùng), trộn cẩn thận và chuyển sang 2 ống cùng loại môi trường (chủng

chuyển sang phải cấy tận đáy ống môi trường). Nuôi cấy đem ủ ở nhiệt độ 37 °C, 48 h. Chủng nhận được ở cả 2 ống đem chuyển sang 2 chai vô khuẩn có dung tích từ 20 ml đến 30 ml (không hút miếng thịt băm) và ly tâm 3000 r/min trong 20 min. Sau đó dùng pipet hút bỏ nước nổi và cho thêm vào sinh khối thu được một ít dung dịch nước pha loãng trộn và chuyển sang ống nghiệm để đo độ đục tương ứng với 10 đơn vị.

Sau khi đo độ đục, lấy từ 10 ống đến 15 ống môi trường dinh dưỡng đã đem đun sôi để đuổi không khí, cấy vào ống 1 ml để có được chủng ở dạng nha bào. (Để kiểm tra độ thuần chủng ở tất cả các ống cấy chuyển nên cấy kiểm tra trên thạch nghiêng hottzinger) sau đó ủ nuôi cấy 48 h 37 °C, dùng pipet trộn đều ống môi trường đã cấy chủng làm tiêu bản (nhuộm bằng dung dịch 1 % tím gentian trong 30 s), soi kính và xác định số lượng nha bào (M) tính bằng % theo công thức:

$$M = (n / N) \times 100 \%$$

trong đó:

n – số nha bào có trong 3 đến 5 kính trường;

N – tổng số (không ít hơn 100) tế bào (trực khuẩn và nha bào) trong 3 đến 5 kính trường.

Đậy nút cao su lên các ống môi trường cấy chủng có ít nhất là 5 % nha bào và bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

Trong trường hợp cần thiết (kiểm tra thường kỳ) cần phải có một số lượng lớn ống chủng, phải giữ một số lượng lớn ống chủng cấy chuyển ở dạng nha bào sang môi trường Taroshi (từ 5 ống đến 6 ống) ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 48 h và sau đó tiến hành tạo nha bào như phương pháp đã nêu ở trên. Để có chủng làm việc *Clostridium novyi* 198, dùng pipet trộn đều chủng ở dạng nha bào được giữ trên môi trường thạch mềm và cấy vào 2 ống đến 3 ống 10 ml môi trường Taroshi, mỗi ống 1 ml. Mỗi chủng dạng nha bào *Clostridium novyi* 198 dùng cho 2 đến 3 cấy chuyển. Nuôi cấy ủ từ 24 h đến 48 h ở 37 °C cho đến khi có được một canh trùng rõ rệt ở dạng làm đục môi trường đang khuếch tán với những vùng trong suốt riêng biệt. Sau đó tiến hành cấy chuyển lần 2 chủng kiểm tra sang 2 ống đến 3 ống cùng loại môi trường, ủ từ 17 h đến 18 h ở 37 °C.

Đối với trường hợp kiểm tra gấp thì dùng chủng *Clostridium novyi* 198, từ 24 h đến 28 h, nhận được sau khi cấy chuyển từ ống chủng đông khô ra, cấy chuyển sang 2 ống đến 3 ống môi trường Taroshi ủ từ 17 h đến 19 h ở 37 °C và chủng nhận được dùng trực tiếp để kiểm tra môi trường thioglycolat.

Chủng làm việc cấy trên môi trường Taroshi (2 cấy chuyển) đem ly tâm và đo độ đục. Từ hỗn dịch thu được hút 1 ml vào ống 9 ml dung dịch pha loãng (độ pha loãng 10-1) cho pipet sâu vào dung dịch. Cứ như vậy pha loãng bậc 10 đến độ pha loãng thứ 6 (1/1000000).

TCVN 1022:1992

Dùng ba độ pha cuối cùng (1/10000; 1/100000; 1/1000000) để cấy lên môi trường thử nghiệm. Từ các độ pha trên, bắt đầu từ độ pha loãng cuối cùng cấy vào 3 ống 10 ml môi trường thioglycolat (cấy sâu pipet vào môi trường) mỗi ống 0,5 ml môi trường. Ủ ở nhiệt độ 37 °C. Sau 48 h đọc kết quả.

CHÚ THÍCH:

- 1 Sau khi mở ống đồng khô phải kiểm tra lại đặc tính của chủng phù hợp với hộ chiếu kèm theo.
- 2 Nếu trường hợp môi trường thạch nghiêng không thấy mọc có thể cấy từ canh thang hottzinger sang thạch nghiêng hottzinger khác.

2.3 Kiểm tra tính chất trung hòa

Để xác định tính chất này của môi trường thioglycolat, người ta dùng chủng kiểm tra *Alcaligenes Faecalis* 415, đặc điểm, cách bảo quản và chuẩn bị chủng để cấy vào môi trường thioglycolat đã mô tả ở phần trên (phần 2.2).

Dung dịch muối sinh lý vô trùng 0,85 % phân chia vào 3 ống nghiệm, ống thứ nhất 8 ml nước muối sinh lý và 1 ml merthiolat, dung dịch merthiolat nồng độ 1/1000, còn 2 ống khác 9 ml nước muối sinh lý và 1 ml dung dịch merthiolat. Trộn đều 2 ống, sau đó hút bỏ đi 1 ml từ mỗi ống để cho mỗi ống còn lại là 9 ml.

Để tiến hành pha loãng kiểm tra *Alcaligenes Faecalis* 415 với nồng độ merthiolat cần thiết, dùng chủng pha loãng 1/100000 có được theo phương pháp đã mô tả ở trên (xem phần xác định tính tăng sinh). Từ độ pha loãng này (1/10000) lấy 1 ml chủng cho vào ống thứ nhất, trong 3 ống có merthiolat. Trộn đều hỗn dịch như vậy ta có được độ pha loãng chủng 1/100000 với nồng độ merthiolat 1/10000.

Từ độ pha loãng này, hút 1 ml sang ống thứ 2 có nước muối sinh lý và merthiolat, ta có được độ pha loãng 1/1000000 cũng với nồng độ merthiolat như thế (1/10000).

Tương tự, ta có được độ pha loãng 1/100000000 (cũng với nồng độ merthiolat 1/10000).

Để đánh giá khả năng trung hòa merthiolat của môi trường thioglycolat người ta dùng 3 độ pha (10-6, 10-7, 10-8) có merthiolat.

Từ mỗi độ pha, bắt đầu từ độ pha cuối cùng cấy vào 3 ống môi trường thioglycolat 10 ml (cấy sâu pipet vào môi trường) mỗi ống 0,5 ml và đem ủ ở nhiệt độ 37 °C. Đọc kết quả sau từ 2 ngày đến 5 ngày.

2.4 Cách đọc kết quả

Khi thời gian ủ nuôi cấy kết thúc, tiến hành xem xét các ống môi trường đã cấy chủng. Kết quả kiểm tra ghi vào 1 sổ theo dõi riêng và trả lời kết quả về chất lượng của môi trường thioglycolat.

Môi trường được coi là tốt nhất về tính tăng sinh nếu chậm nhất là 48 h ủ nuôi cấy chủng kiểm tra:

a. *Alcaligenes feacalis* 415, phát triển ở độ pha 1/10000000. Nếu ở độ pha 1/10000000 không có chủng phát triển, nhưng ở độ pha 1/100000000 có chủng phát triển thì kết quả được coi là dương tính (vi khuẩn phát triển làm đục phần trên của cột môi trường).

b. *Clostridium novyi* 198 ở độ pha 1/100000. Nếu ở độ pha 1/100000 không có chủng phát triển, nhưng ở độ pha 1/1000000 có vi khuẩn phát triển thì kết quả được coi là dương tính (vi khuẩn sau 24 h ở dạng những khuẩn lạc hình cầu riêng biệt, sau 48 h làm đục môi trường và đang lan tỏa có những vùng trong suốt rõ rệt ở phần trên của cột môi trường). Môi trường thioglycolat được coi là tốt về tính chất trung hòa nếu chậm nhất là 5 ngày ủ nuôi cấy, phải nhìn thấy rõ chủng *Alcaligenes Feacalis* 415 phát triển trong môi trường. Những loại môi trường thioglycolat không đạt về tính chất trung hòa nhưng đạt về tính tăng sinh có thể dùng để kiểm tra vô khuẩn những sinh vật phẩm không chứa merthiolat.
