TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8988 : 2012

Xuất bản lần 1

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Microbiology of foodstuffs – Enumeration of Vibrio parahaemolyticus

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 8988:2012 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật trong thực phẩm – Phương pháp định lượng *Vibrio parahaemolyticus*

Microbiology of foodstuffs – Enumeration of Vibrio parahaemolyticus

CẢNH BÁO – Để đảm bảo an toàn cho nhân viên phòng thử nghiệm, cần chú ý rằng các phép thử phát hiện *Vibrio parahaemolyticus* chỉ được thực hiện trong các phòng thử nghiệm được trang bị cho mục đích này và phải dưới sự kiểm soát của các nhà vi sinh vật học có kinh nghiệm và hết sức thận trọng khi thải tất cả các vật liệu đã nhiễm bẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng *Vibrio parahaemolyticus* trong thực phẩm.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.*

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Vibrio parahaemolyticus *(Vibrio parahaemolyticus)*

Vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc điển hình trên môi trường đặc chọn lọc và cho thấy rõ các đặc tính sinh hoá như đã mô tả, khi tiến hành các phép thử khẳng định theo tiêu chuẩn này.

3.2

Định lượng *Vibrio parahaemolyticus* (enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*)

Việc xác định số lượng *Vibrio parahaemolyticus* có các đặc tính sinh hoá như đã mô tả tìm thấy trong một gam hoặc một mililit mẫu khi tiến hành thử nghiệm theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Các dãy dung dịch pha loãng của mẫu thử được cấy vào các ống môi trường lỏng chọn lọc nồng độ kép và nồng độ đơn;

4.2 Ủ ấm các ống ở 35 °C trong 18 h đến 24 h trong điều kiện hoàn toàn hiếu khí;

4.3 Cấy các khuẩn lạc lấy từ các ống dương tính giả định lên bề mặt môi trường đặc chọn lọc TCBS;

4.4 Ủ các đĩa này ở 35 °C trong khoảng từ 18 h đến 24 h. Quan sát và nhận biết khuẩn lạc trên thạch TCBS.

4.5 Các khuẩn lạc điển hình được khẳng định bằng các phản ứng sinh hóa.

4.6 Số có xác suất lớn nhất của *Vibrio parahaemolyticus* trong một gam hay trong một mililit mẫu thử tính được bằng cách đối chiếu với các bảng số có xác suất lớn nhất (MPN) cho các độ pha loãng đã thử khẳng định.

5 Dịch pha loãng, môi trường cấy và thuốc thử

Chuẩn bị, sản xuất và thử nghiệm hiệu năng của môi trường nuôi cấy theo TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

5.1 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

5.2 Môi trường nuôi cấy, sử dụng các môi trường vô trùng pha chế sẵn dưới đây hoặc tham khảo thành phần và các bước chuẩn bị trong Phụ lục A.

5.2.1 Canh thang glucoza muối Teepol (GSTB)

Xem A.1.

5.2.2 Thạch thiosulfat - xitrat - muối mật - sacaroza (TCBS)

Xem A.2.

5.2.3 Canh thang trypton đậu tương (canh thang trypticaza đậu tương – TSB)

Xem A.3.

5.2.4 Thạch trypton đậu tương (thạch trypticaza đậu tương – TSA)

Xem A.4.

5.2.5 Thạch sắt ba đường (TSI)

Xem A.5.

5.2.6 Môi trường muối để phát hiện ornithin decarboxylaza (ODC)

Xem A.6.

5.2.7 Môi trường muối để phát hiện lyzin decarboxylaza (LDC)

Xem A.7.

5.2.8 Môi trường muối để phát hiện arginin dihydrolaza (ADH)

Xem A.8.

5.2.9 Canh thang muối trypton (canh thang muối trypticaza – STB)

Xem A.9.

5.2.10 Canh thang MR-VP (môi trường Clark-lubs)

Xem A.10.

5.2.11 Thạch Wagatsuma

Xem A.11.

5.3 Thuốc thử và vật liệu thử

5.3.1 Thuốc thử hoặc **giấy thử oxidaza.**

5.3.2 Thuốc nhuộm Gram.

5.3.3 Dung dịch KOH, 40 %.

5.3.4 α-Naphtol.

5.3.5 Nước cất hoặc **nước có chất lượng tương đương.**

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể như sau:

6.1 Tủ ấm hoặc **nồi cách thuỷ**, có thể duy trì nhiệt độ ở 35 °C ± 1 °C và 37 °C ± 1 °C.

Nên sử dụng các nồi cách thuỷ có chứa chất kháng khuẩn.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên tự thoả thuận về vấn đề này.

8 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

8.1 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thực phẩm được cắt nhỏ hoặc xay nhuyễn trong điều kiện vô trùng cho tới khi đồng nhất. Đối với sản phẩm đông lạnh, phải rã đông trước.

Phần mẫu thử được sử dụng đối với một số loại thủy sản cụ thể như sau:

– Đối với cá: tách lấy phần cơ thịt cá, ruột và mang cá.

– Đối với nhuyễn thể hai mảnh vỏ: tách lấy toàn bộ cơ quan nội tạng.

– Đối với các loài giáp xác: tách lấy thịt và cơ quan nội tạng, có thể tách riêng các bộ phận như ruột, mang... để thử nghiệm riêng rẽ, nếu cần.

8.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu 10^{-1}

Cân chính xác 50 g mẫu thử (hoặc 50 ml mẫu thử dạng lỏng) đã được chuẩn bị (8.1), cho vào bình nón chứa sẵn 450 ml canh thang STB (5.2.9) có chứa 3 % NaCl. Lắc đều khoảng 2 min đến 3 min, thu được huyền phù ban đầu 10^{-1}.

8.3 Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo 10^{-2},10^{-3},10^{-4}...

Lấy chính xác khoảng 50 ml huyền phù ban đầu 10^{-1} cho vào ống nghiệm chứa sẵn 450 ml canh thang STB (5.2.9) có chứa 3 % NaCl. Lắc đều trong 2 min đến 3 min, thu được dung dịch 10^{-2}.

Tiếp tục quy trình pha loãng như trên để thu được các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo: 10^{-3}, 10^{-4}...

9 Cách tiến hành

9.1 Nuôi cấy

Dùng pipet vô trùng lấy chính xác 10 ml huyền phù ban đầu (8.2), cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 10 ml môi trường GSTB (5.2.1) nồng độ kép và 1 ml huyền phù ban đầu (8.2) cho vào 10 ml môi trường GSTB (5.2.1) nồng độ đơn. Mỗi độ pha loãng cấy 3 ống.

Lấy 1 ml dung dịch mẫu thử từ các độ pha loãng 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, cho vào ống nghiệm chứa sẵn 10 ml GSTB (5.2.1) nồng độ đơn, mỗi độ pha loãng cấy vào 3 ống GSTB (5.2.1). Ủ ấm ở 35 ^{0}C trong 18 h đến 24 h.

V. parahaemolyticus hiếu khí tuyệt đối, nên sẽ phát triển tạo thành váng trên bề mặt ống canh thang và chuyển màu môi trường sang màu vàng do lên men đường.

Đánh dấu lên các đĩa thạch TCBS (5.2.2) với nồng độ dung dịch mẫu thử tương ứng.

9.2 Phân lập và nhận dạng

Lấy dịch cấy từ ống canh thang có độ pha loãng cao nhất vẫn cho thấy có *V. parahaemolyticus* phát triển, cấy sang các đĩa thạch TCBS (5.2.2). Ria cấy để tạo được các khuẩn lạc mọc riêng rẽ. Ủ ấm ở 35 ^{0}C trong khoảng từ 18 h đến 24 h.

Các khuẩn lạc điển hình của *V. parahaemolyticus* trên thạch TCBS: hình tròn, lồi, bờ đều, đường kính từ 2 mm đến 3 mm, các khuẩn lạc có màu xanh do không lên men sacaroza, một số khuẩn lạc có tâm màu xanh sẫm.

9.3 Khẳng định

9.3.1 Chọn khuẩn lạc để khẳng định

Từ mỗi môi trường chọn lọc (xem 9.2), lấy ra ít nhất năm khuẩn lạc được coi là điển hình, mỗi khuẩn lạc cấy đồng thời vào canh thang TSB (5.2.3) để xem di động và hình thể, cấy vào thạch TSA (5.2.4) để thử khẳng định sinh hóa. Ủ ấm các môi trường đã nuôi cấy ở 35 ^{0}C từ 18 h đến 24 h.

9.3.2 Các phép thử khẳng định

9.3.2.1 Hình thể và tính chất di động

Lấy dịch nuôi cấy (9.3.1) để nhuộm Gram và soi tươi xem khả năng di động.

V. parahaemolyticus có hình dấu phảy, Gr (–), di động mạnh.

9.3.2.2 Phép thử oxidaza

Lấy khuẩn lạc thuần khiết (9.3.1) thu được trên môi trường TSA (5.2.4), thực hiện phản ứng oxidaza bằng giấy thử hoặc thuốc thử (5.3.1). Đọc kết quả trong vòng 10 s đầu. Nếu xuất hiện màu tím sẫm là phản ứng dương tính, không màu là phản ứng âm tính.

V. parahaemolyticus cho kết quả oxidaza dương tính.

9.3.2.3 Thử nghiệm trên thạch TSI

Cấy đâm sâu vi khuẩn (xem 9.3.1) xuống đáy ống thạch và cấy ria theo mặt nghiêng của thạch TSI (5.2.5). Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Diễn giải các phản ứng như sau:

a) Quan sát ở đáy cột thạch

- màu vàng: dương tính glucoza (lên men glucoza);
- màu đỏ hoặc không đổi màu: âm tính glucoza (không lên men glucoza);
- màu đen: tạo thành hydro sulfua;
- có bóng hơi hoặc gây nứt thạch: sinh khí từ glucoza.

b) Quan sát trên mặt nghiêng của thạch

- màu vàng: dương tính lactoza và/hoặc sacaroza (sử dụng lactoza và/hoặc sacaroza);
- màu đỏ hoặc không đổi màu: âm tính lactoza và sacaroza (không sử dụng lactoza hoặc sacaroza).

V. parahaemolyticus lên men đường glucoza sinh khí, không lên men đường lactoza, sacaroza, không sinh H_2S.

9.3.2.4 Phát hiện ornithin decacboxylaza (phép thử ODC)

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ thạch TSA ở 9.3.1, chuyển vào ống môi trường ODC (5.2.6). Nới lỏng nút bông, để ở nhiệt độ 37 ^{0}C trong 24 h. Nếu môi trường chuyển sang màu tím sẫm là phản ứng dương tính, môi trường chuyển sang màu vàng là phản ứng âm tính.

V. parahaemolyticus cho thấy dương tính với phép thử ODC.

9.3.2.5 Phát hiện lysin decacboxylaza (phép thử LDC)

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ thạch TSA ở 9.3.1, chuyển vào ống môi trường LDC (5.2.7). Nới lỏng nút bông, để ở nhiệt độ 37 ^{0}C trong 24 h. Nếu môi trường chuyển sang màu tím sẫm là phản ứng dương tính, môi trường chuyển sang màu vàng là phản ứng âm tính.

V. parahaemolyticus cho thấy dương tính với phép thử LDC.

9.3.2.6 Phát hiện arginin dihydrolaza (phép thử ADH)

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ thạch TSA ở 9.3.1, chuyển vào ống môi trường ADH (5.2.8). Nới lỏng nút bông, để ở nhiệt độ 37 ^{0}C trong 24 h. Nếu môi trường chuyển sang màu tím sẫm là phản ứng dương tính, môi trường chuyển sang màu vàng là phản ứng âm tính.

V. parahaemolyticus cho thấy âm tính với phép thử ADH.

9.3.2.7 Phép thử khả năng chịu mặn

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ thạch TSA ở 9.3.1, cấy vào ống canh thang STB (5.2.9) có chứa NaCl với các nồng độ: 0 %, 6 %, 8 % và 10 %. Ủ ấm ở 37 ^{0}C trong 24 h.

V. parahaemolyticus cho thấy âm tính với các nồng độ NaCl 0 % và NaCl 10 %, dương tính với các nồng độ NaCl 6 % và 8 %.

9.3.2.8 Phép thử VP

Dùng que cấy lấy vi khuẩn từ thạch TSA ở 9.3.1, cấy vào canh thang MR-VP (5.2.10), ủ ấm ở 37 ^{0}C trong 48 h. Nhỏ 0,2 ml dung dịch KOH 40 % (5.3.3) và 0,6 ml α-naphtol (5.3.4). Để ở nhiệt độ thường trong 1 h sau đó đọc kết quả.

V. parahaemolyticus cho thấy âm tính với phép thử VP.

9.3.2.9 Phép thử Kanagawa

Phép thử này xác định khả năng làm tan máu thỏ dạng β (phép thử phân biệt giữa *V. parahaemolyticus* phân lập từ người và từ thuỷ sản).

Cấy vi khuẩn sau khi nuôi cấy 18 h lên bề mặt thạch Wagatsuma (5.2.11) có máu thỏ thành các chấm. Thử nghiệm phải có mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.

Ủ các đĩa ở 35 ^{0}C và đọc kết quả sau 24 h.

V. parahaemolyticus từ thuỷ sản cho thấy âm tính với phép thử Kanagawa.

10 Tính kết quả

Khuẩn lạc điển hình trên môi trường TCBS tương ứng với nồng độ pha loãng lớn nhất của môi trường GSTB có vi khuẩn phát triển và có tính chất sinh hóa phù hợp theo các phép thử khẳng định. Tra bảng MPN [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)] ở nồng độ tương ứng để tính số khuẩn lạc có trong mẫu thử.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

a) mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;

b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;

c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;

d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tuỳ ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;

e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị một số môi trường

A.1 Canh thang glucoza muối Teepol (GSTB)

A.1.1 Thành phần

Chất chiết thịt bò:	3 g
Pepton:	10 g
Natri clorua:	30 g
Glucoza:	5 g
Tím metyl:	0,002 g
Teepol:	4 ml
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.1.2 Chuẩn bị

Đối với canh thang nồng độ kép thì khối lượng mỗi thành phần tăng gấp 2 lần (trừ nước), chuyển vào các ống nghiệm kích thước 20 mm x 150 mm, mỗi ống 10 ml.

Đối với canh thang nồng độ đơn: chuyển vào các ống nghiệm kích thước 18 mm x 150 mm, mỗi ống 10 ml.

Nếu định lượng mẫu xét nghiệm 25 g, dùng bình có nắp chứa 225 ml canh thang nồng độ đơn. Hấp áp lực trong 15 min ở nhiệt độ 121 ^{0}C, pH = 7,4 ± 0,2.

A.2 Thạch thiosulfat - xitrat - muối mật - sacaroza (thạch TCBS)

A.2.1 Thành phần

Chất chiết nấm men:	5 g
Pepton:	10 g
Sacaroza:	20 g
Natri thiosulfat ($Na_2S_2O_3.5H_2O$):	10 g

Natri xitrat ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$):	10 g
Natri cholat:	3 g
Mật bò:	8 g
Natri clorua:	10 g
Sắt (III) xitrat:	1 g
Xanh bromothymol:	0,04 g
Xanh thymol:	0,04 g
Thạch:	từ 8 g đến 18 g [a)]
Nước vừa đủ:	1 000 ml

[a)] Tùy vào cường độ gel của thạch.

A.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun đến sôi. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 8,6 ± 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần. Không hấp áp lực. Chuyển vào các đĩa 20 ml, kích thước 15 mm x 100 mm.

A.3 Canh thang trypton đậu tương (TSB)

A.3.1 Thành phần

Trypticaza pepton (trypton):	17 g
Phyton pepton:	3 g
Natri clorua:	5 g
Dikali hydrophosphat:	2,5 g
Glucoza:	2,5 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.3.2 Chuẩn bị

Đun nóng chảy các thành phần nêu trên. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,3 ± 0,2 ở 25 ^{0}C. Chuyển các thể tích 225 ml hỗn dịch này vào các bình 500 ml. Hấp áp lực ở 121 ^{0}C trong 15 min.

Khi dùng để xác định *V. parahaemolyticus*, phải cho thêm NaCl với nồng độ 25 g/l.

A.4 Thạch trypton đậu tương (TSA)

A.4.1 Thành phần

Trypticaza pepton:	15 g
Phyton pepton:	5 g
Natri clorua:	5 g
Thạch:	15 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.4.2 Chuẩn bị

Đun nóng chảy các thành phần nêu trên, sau đó đun sôi trong 1 min. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,3 ± 0,2 ở 25 °C. Chuyển môi trường vào các ống nghiệm hoặc bình cầu. Hấp áp lực ở 121 °C trong 15 min.

Khi dùng để xác định *V. parahaemolyticus*, phải cho thêm NaCl với nồng độ 25 g/l.

A.5 Thạch sắt ba đường (TSI)

A.5.1 Thành phần

Chất chiết thịt:	3,0 g
Chất chiết nấm men:	3,0 g
Pepton:	20,0 g
Natri clorua:	5,0 g
Lactoza:	10,0 g
Sacaroza:	10,0 g
Glucoza:	1,0 g
Sắt (III) xitrat:	0,3 g
Natri thiosulfat:	0,3 g
Đỏ phenol:	0,024 g
Thạch:	9 g đến 18 g [a)]
Nước vừa đủ:	1 000 ml

[a)] Tùy vào cường độ gel của thạch.

A.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,4 ± 0,2 ở 25 °C. Chuyển các thể tích 10 ml hỗn dịch này vào các ống nghiệm hoặc các đĩa. Hấp áp lực trong 15 min ở nhiệt độ 121 °C. Đặt nghiêng để thạch có bề dày trên đáy từ 2,5 cm đến 5 cm.

A.6 Môi trường muối để phát hiện ornithin decarboxylaza (ODC)

A.6.1 Thành phần

L-Ornithin monohydroclorua:	5 g
Chất chiết nấm men:	3 g
Glucoza:	1 g
Đỏ tía bromocresol:	0,015 g
Natri clorua:	10 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.6.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 6,8 ± 0,2 ở 25 °C, nếu cần. Chuyển môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống nhỏ. Hấp áp lực trong 15 min ở nhiệt độ 121 °C.

A.7 Môi trường muối để phát hiện lysin decarboxylaza (LDC)

A.7.1 Thành phần

L-lysin monohydroclorua:	5 g
Chất chiết nấm men:	3 g
Glucoza:	1 g
Đỏ tía bromocresol:	0,015 g
Natri clorua:	10 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.7.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 6,8 ± 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần. Chuyển môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống hẹp. Hấp áp lực trong 15 min ở nhiệt độ 121 ^{0}C.

A.8 Môi trường muối để phát hiện arginin dihydroxylaza (ADH)

A.8.1 Thành phần

L-Arginin monohydro clorua:	5 g
Chất chiết nấm men:	3 g
Glucoza:	1 g
Đỏ tía bromocresol:	0,015 g
Natri clorua:	10 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.8.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 6,8 ± 0,2 ở 25 ^{0}C. Chuyển môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống nhỏ. Hấp áp lực trong 15 min ở nhiệt độ 121 ^{0}C.

A.9 Canh thang muối trypton (STB)

A.9.1 Thành phần

Trypticaza pepton:	10 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.9.2 Chuẩn bị

Cho vào mỗi lít môi trường này 0 g, 60 g, 80 g, 100 g NaCl để canh thang có nồng độ NaCl là 0 %, 6 %, 8 % và 10 %. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,2 ± 0,2 ở 25 ^{0}C. Hấp áp lực trong 15 min ở nhiệt độ 121 ^{0}C.

A.10 Canh thang MR-VP (môi trường Clark-lubs)

A.10.1 Thành phần

Pepton:	7 g
Glucoza:	5 g
Dikali hydrophosphat:	5 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.10.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần nêu trên trong nước, đun nóng chảy nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 6,9 ± 0,2 ở 25 ^{0}C. Hấp áp lực ở 121 ^{0}C trong 15 min.

A.11 Thạch Wagatsuma

A.11.1 Thành phần

Chất chiết nấm men:	3 g
Pepton:	10 g
Natri clorua:	70 g
Dikali hydrophosphat:	5 g
Mannitol:	10 g
Tím tinh thể:	0,001 g
Thạch:	15 g
Nước vừa đủ:	1 000 ml

A.11.2 Chuẩn bị

Đun từ từ để hòa tan các thành phần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 8,0 ± 0,2 ở 25 ^{0}C. Đun sôi 30 min (không hấp để tiệt trùng) sau đó để nguội đến 50 ^{0}C. Rửa máu thỏ 3 lần bằng nước muối sinh lí. Cho máu vào thạch với tỉ lệ 5 % máu. Lắc và đổ đĩa. Các đĩa thạch phải được dùng ngay sau khi chuẩn bị.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Diễn giải các phép thử khẳng định *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus thường cho các phản ứng như trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Diễn giải các phép thử khẳng định *V. parahaemolyticus*

Các phép thử	Kết quả	Các phép thử	Kết quả
Oxidaza	+	Khả năng chịu mặn (môi trường STB)	
Gram	–	0 % NaCl	–
Sinh khí (glucoza)	+	6 % NaCl	+
Lactoza	–	8 % NaCl	+
Sacaroza	–	10 % NaCl	–
ODC	+	VP	–
LDC	+	Kanagawa	–
ADH	–		

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] *Thường quy kỹ thuật định lượng Vibrio parahaemolyticus trong thực phẩm* ban hành kèm theo Quyết định số 3349/2001/QĐ-BYT ngày 31 tháng 7 năm 2001 của Bộ trưởng Bộ Y tế

[2] TCVN 7905-1:2008 (ISO 21872-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột – Phần 1: Phát hiện Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae.*

[3] *Methods of Test for Food Microbiology – Test of Vibrio parahaemolyticus* (3). Taiwanese FDA.