

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 7905-1:2008**

**ISO/TS 21872-1:2007**

Xuất bản lần 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***

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method*

*for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. –*

*Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae**

HÀ NỘI - 2008

## Lời nói đầu

TCVN 7905-1:2008 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 21872-1:2007;

TCVN 7905-1:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 7905:2008 (ISO/TS 21872:2007) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột*, gồm có các phần sau:

- TCVN 7905-1:2008 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;
- TCVN 7905-2:2008 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 2: Phát hiện các loài không phải là Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae.

## Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cẩn trọng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hòa các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là vì các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

**Vิ 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***

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. –*

*Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae*

**CẢNH BÁO** – Để đảm bảo an toàn cho nhân viên phòng thử nghiệm, cần chú ý rằng các phép thử phát hiện *Vibrio* spp. và đặc biệt là *Vibrio cholerae* có độc tố 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 qui định phương pháp phát hiện hai loài *Vibrio* chính gây bệnh đường ruột của người: *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae*.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi và
- các mẫu môi trường trong khu vực chế biến và vận chuyển thực phẩm.

**CHÚ THÍCH** Các lý do không áp dụng phương pháp này đã được đề cập trong lời giới thiệu.

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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.

TCVN 6263 (ISO 8261), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh.

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

TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), 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.

## 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

### 3.1

**Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae có khả năng gây bệnh đường ruột** (*potentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae*)

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 thử theo tiêu chuẩn này.

### 3.2

**Phát hiện Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae có khả năng gây bệnh đường ruột** (*Detection of potentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae*)

Xác định sự có mặt hay không có mặt của *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae* trong một lượng sản phẩm xác định, khi tiến hành thử theo tiêu chuẩn này.

## 4 Nguyên tắc

### 4.1 Yêu cầu chung

Việc phát hiện *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae* cần đến bốn giai đoạn liên tiếp (Xem Phụ lục A).

**CHÚ THÍCH 1** *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae* có thể có mặt với một lượng nhỏ và thường đi kèm với một lượng lớn đáng kể các loài vi sinh vật khác thuộc họ Vibrionaceae hoặc thuộc các họ khác. Do đó, cần phải có hai bước tăng sinh chọn lọc liên tiếp để phát hiện các vi sinh vật đích này.

#### **4.2 Tăng sinh lần đầu trong môi trường lỏng chọn lọc**

Cấy phần mẫu thử vào môi trường tăng sinh (nước pepton muối kiềm, ASPW) (5.1) ở nhiệt độ môi trường. Ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong  $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$  đối với các sản phẩm đông lạnh sâu hoặc ở  $41,5^{\circ}\text{C}$  trong  $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$  đối với sản phẩm tươi.

#### **4.3 Tăng sinh lần thứ hai trong môi trường lỏng chọn lọc**

Cấy dịch cấy thu được trong (4.2) vào môi trường tăng sinh (ASPW). Sau đó được ủ ở  $41,5^{\circ}\text{C}$  trong  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$ .

#### **4.4 Phân lập và nhận dạng**

Cấy dịch cấy thu được trong 4.2 và 4.3 vào hai môi trường đặc chọn lọc sau đây:

- thạch sacaroza, mật, xitrat và thiosulfat (TCBS);
- môi trường đặc chọn lọc thích hợp khác (do phòng thử nghiệm chọn), bổ sung cho thạch TCBS, để phát hiện *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae*.

Ủ môi trường TCBS ở  $37^{\circ}\text{C}$  và kiểm tra sau  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ . Việc ủ môi trường chọn lọc thứ hai theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

#### **4.5 Khẳng định**

Các khuẩn lạc *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae* giả định đã phân lập trong 4.4 được cấy truyền rồi khẳng định bằng các thử nghiệm sinh hoá thích hợp.

### **5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử**

Về thực hành trong phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

**CHÚ THÍCH** Do trong tiêu chuẩn sử dụng một lượng lớn môi trường nuôi cấy và thuốc thử, để cho nội dung tiêu chuẩn được gọn nên thành phần và cách chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử được đưa riêng vào trong Phụ lục B.

#### **5.1 Môi trường tăng sinh: Dung dịch nước pepton muối kiềm (ASPW)**

Xem B.1.

**5.2 Môi trường phân lập đặc chọn lọc**

**5.2.1 Môi trường thứ nhất: Thạch sacaroza, mật, xitrat và thiosulfat (TCBS)**

Xem B.2.

**5.2.2 Môi trường thứ hai**

Việc chọn môi trường thứ hai là để cho phòng thử nghiệm tự chọn. Việc chuẩn bị môi trường phải tuân thủ một cách chính xác chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ Thạch tetrazolium clorua pepton đậu tương triphenyl (TSAT) và thạch sacaroza polymyxin natri dodecyl sulfat (SDSPS) (không nên dùng các loại thạch mCPC, CPC, CC để phân lập *V. parahaemolyticus*).

**5.3 Thạch muối dinh dưỡng (SNA)**

Xem B.3.

**5.4 Thuốc thử để phát hiện oxidaza**

Xem B.4.

**5.5 Thạch, sắt, ba đường và muối (TSI)**

Xem B.5.

**5.6 Môi trường muối để phát hiện ornithin decarboxylaza (ODC)**

Xem B.6.

**5.7 Môi trường muối để phát hiện lizin decarboxylaza (LDC)**

Xem B.7.

**5.8 Môi trường muối để phát hiện arginin dihydrolaza (ADH)**

Xem B.8.

**5.9 Thuốc thử để phát hiện oxidaza β-galactoxidaza**

Xem B.9.

**5.10 Môi trường muối để phát hiện indol**

Xem B.10.

### 5.11 Dung dịch pepton muối

Xem B.11.

### 5.12 Dung dịch natri clorua

Xem B.12.

## 6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

**CHÚ THÍCH** Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thuỷ tinh sử dụng nhiều lần nếu đáp ứng được các yêu cầu tương tự.

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 âm**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**6.2 Tủ âm hoặc nồi cách thuỷ**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**6.3 Nồi cách thuỷ**, có thể duy trì nhiệt độ từ  $44^{\circ}\text{C}$  đến  $47^{\circ}\text{C}$ .

**6.4 Nồi cách thuỷ**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Nên sử dụng các nồi cách thuỷ (6.2, 6.3 và 6.4) có chứa chất kháng khuẩn.

## 7 Lấy mẫu

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

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

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo phân tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) và/hoặc TCVN 6263 (ISO 8261) và tiêu chuẩn có liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn riêng đó thì các bên tự thoả thuận về vấn đề này.

## 9 Cách tiến hành (xem Phụ lục A)

### 9.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

Để chuẩn bị huyền phù ban đầu, sử dụng môi trường tăng sinh thứ nhất (ASPW) qui định trong 5.1.

Lấy một phần mẫu thử ( $x$  g hoặc  $x$  ml), tuỳ thuộc vào độ nhạy yêu cầu và đồng hoá trong vào  $9x$  ml (hoặc  $9x$  g) môi trường tăng sinh.

Trường hợp đối với các lượng mẫu thử lớn hơn, thì cần làm ấm môi trường ASPW đến  $37^{\circ}\text{C}$  trước khi cấy mẫu thử.

Nếu các công đoạn pha loãng và Ủ không thể thực hiện trong ngày thì bảo quản huyền phù ở  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  đến ngày hôm sau.

Để giảm bớt công đoạn kiểm tra, khi cần kiểm tra nhiều phần mẫu thử 25 g từ cùng một mẻ sản phẩm và khi có bằng chứng cho thấy hỗn hợp (của các phần mẫu thử) không làm thay đổi các kết quả liên quan đến sản phẩm cụ thể này, thì có thể trộn các phần mẫu thử.

VÍ DỤ Nếu có 10 phần mẫu thử 25 g cần kiểm tra, thì có thể gộp 10 phần đó để thu được mẫu tổng thể 250 g và bổ sung 2,25 l môi trường tăng sinh.

Số đếm tế bào *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae* suy giảm đáng kể khi bảo quản ở nhiệt độ lạnh. Khi có thể, nên tránh bảo quản các mẫu, các dung dịch huyền phù ở nhiệt độ đó và cần giữ ở mức tối thiểu.

### 9.2 Tăng sinh chọn lọc lần thứ nhất

Ủ huyền phù ban đầu (9.1) ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong  $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$  đối với các sản phẩm đông lạnh sâu hoặc ở  $41,5^{\circ}\text{C}$  trong  $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$  đối với sản phẩm tươi, khô hoặc sản phẩm đã ướp muối.

Cần chú ý khi áp dụng toàn bộ phương pháp cho các sản phẩm có hàm lượng muối cao, vì nồng độ muối cuối cùng trong môi trường có thể làm thay đổi các đặc tính [xem TCVN 6507-4 (ISO 6887-4)].

### 9.3 Tăng sinh chọn lọc lần thứ hai

9.3.1 Chuyển 1 ml dịch cấy thu được trong 9.2 được lấy từ bề mặt cho vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường ASPW (5.1).

9.3.2 Ủ môi trường ASPW trong  $18\text{ h} \pm 1\text{ h}$  ở nhiệt độ  $41,5^{\circ}\text{C}$ .

#### 9.4. Phân lập và nhận dạng

**9.4.1** Dùng vòng lấy mẫu lấy dịch cấy thu được trong ASPW (9.2 và 9.3.2), cấy lên bề mặt thạch TCBS (5.2.1), sao cho thu được các khuẩn lạc tách biệt tốt.

Tiến hành tương tự với môi trường phân lập chọn lọc thứ hai (5.2) sử dụng vòng lấy mẫu mới.

**9.4.2** Lật ngược các đĩa thạch. Trong trường hợp các đĩa thạch TCBS (9.4.1) thì đặt chúng vào tủ ấm (6.1) ở 37 °C. Đối với môi trường phân lập thứ hai thì theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

**9.4.3** Sau khi ủ 24 h ± 3 h, kiểm tra các đĩa (9.4.1 và 9.4.2) về sự có mặt các khuẩn lạc điển hình của *Vibrio* spp. giả định gây bệnh. Đánh dấu các vị trí này dưới đáy đĩa.

Có hai hình thái điển hình của các khuẩn lạc *Vibrio* spp. trên thạch TCSB (5.2.1) như sau:

- các khuẩn lạc điển hình *V. parahaemolyticus* trơn nhẵn, có màu xanh (âm tính sacaroza), đường kính từ 2 mm đến 3 mm;
- các khuẩn lạc điển hình *V. cholerae* trơn nhẵn, có màu vàng (dương tính sacaroza), đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

Ủ môi trường chọn lọc thứ hai ở nhiệt độ thích hợp trong một khoảng thời gian thích hợp, rồi kiểm tra sự có mặt của các khuẩn lạc theo các đặc trưng của chúng, có thể được coi là *V. parahaemolyticus* hoặc *V. cholerae*.

#### 9.5 Khẳng định

##### 9.5.1 Yêu cầu chung

Có thể sử dụng các bộ kit thử nhận dạng sinh hoá có sẵn để nhận dạng *Vibrio* đến mức độ loài, với điều kiện là chúng được cấy với các huyền phù của khuẩn lạc cần nhận dạng trong môi trường muối thích hợp hoặc dịch pha loãng và với điều kiện là bảng dữ liệu hoặc bảng nhận dạng đối với sản phẩm đã dựa trên các phản ứng thu được khi sử dụng môi trường tương tự như mô tả trong tiêu chuẩn này. Sử dụng các bộ kit thử này theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

**CHÚ THÍCH** Việc nhận biết các khuẩn lạc *Vibrio* đòi hỏi phải có nhiều kinh nghiệm và hình dạng bên ngoài của chúng đôi khi có thể không chỉ thay đổi từ loài này sang loài khác, mà còn có thể thay đổi từ mè môi trường cấy này đến mè môi trường khác.

### 9.5.2 Chọn lọc các khuẩn lạc để khảng định và chuẩn bị dịch cấy tinh khiết

Để khảng định, từ mỗi môi trường chọn lọc (xem 9.4), lấy ra ít nhất năm khuẩn lạc được coi là điển hình hoặc giống với từng *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh (*V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*) để cấy truyền. Nếu trên đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc thì cấy truyền tất cả các khuẩn lạc này.

**CHÚ THÍCH** Các loại thực phẩm, đặc biệt là hải sản có thể chứa một lượng lớn vi khuẩn, kể cả *Vibrio* spp. không gây bệnh mà có thể phát triển nhờ quá trình cấy chọn lọc. Việc cấy truyền các lượng nhỏ các khuẩn lạc có thể làm thoát khỏi các loài có khả năng gây bệnh.

Cấy các khuẩn lạc đã chọn lên bề mặt các đĩa thạch muối dinh dưỡng hoặc mặt nghiêng của thạch muối dinh dưỡng (5.3) để thu được các khuẩn lạc tách biệt. Ủ ấm các đĩa đã cấy (9.4.2) ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sử dụng các dịch cấy tinh khiết này để khảng định sinh hoá.

### 9.5.3 Các phép thử nhận dạng giả định

#### 9.5.3.1 Phép thử phản ứng oxidaza

Dùng vòng lấy mẫu, que thẳng bằng platin iridi hoặc đũa thuỷ tinh, lấy một phần dịch cấy tinh khiết từ thạch muối dinh dưỡng (9.5.2) và cấy vạch lên giấy lọc đã làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza (5.4), hoặc sử dụng loại có bán sẵn, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Không sử dụng vòng lấy mẫu bằng niken-crom hoặc que bằng kim loại. Phép thử được coi là dương tính nếu màu chuyển sang màu tím hoa cà, màu tím hoặc tím sẫm trong 10 s.

#### 9.5.3.2 Kiểm tra bằng kính hiển vi

Đối với mỗi dịch cấy tinh khiết thu được trong 9.4.2, tiến hành kiểm tra theo a) và b) như sau:

- Chuẩn bị màng để nhuộm Gram [xem TCVN 6404 (ISO 7218)]. Sau khi nhuộm, kiểm tra hình thái và phản ứng Gram bằng kính hiển vi và ghi lại kết quả.
- Cấy vào ống đựng dung dịch nước pepton muối kiểm (ASPW) (5.1). Ủ ở 37 °C trong khoảng từ 1 h đến 6 h. Cho một giọt dịch cấy lên phiến kính sạch, đầy lam men và kiểm tra tính di động bằng kính hiển vi. Ghi lại các ống cho kết quả dương tính về tính di động.

#### 9.5.3.3 Chọn dịch cấy để thử sinh hoá

Giữ lại các khuẩn lạc dương tính oxidaza và âm tính Gram cho kết quả dương tính về tính di động để khảng định sinh hoá.

## 9.5.4 Khẳng định sinh hoá

### 9.5.4.1 Yêu cầu chung

Dùng que cấy vòng, cấy từng dịch cấy thu được từ các khuẩn lạc được giữ lại trong 9.5.3.3 vào môi trường quy định trong 9.5.4.2 đến 9.5.4.8.

### 9.5.4.2 Thủ nghiệm trên thạch TSI muối (5.5)

Cấy đậm sâu xuống đáy ống thạch và cấy ria theo mặt nghiêng của thạch. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Điễn 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: sinh khí hydro sulfua;
- có bọt hoặc rạn nứt: 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).

Các phản ứng điển hình của *V. parahaemolyticus* ứng với cấy bể mặt nghiêng kiềm (màu đỏ) và cấy đậm sâu axit (màu vàng) mà không sinh hydro sulfua hoặc khí.

Các phản ứng điển hình của *V. cholerae* ứng với cấy bể mặt nghiêng axit (màu vàng) và cấy đậm sâu axit (màu vàng) mà không sinh hydro sulfua hoặc khí.

Thời gian ủ không quá 24 h, vì cấy bể mặt nghiêng thì màu vàng *V. cholerae* có thể chuyển sang màu đỏ sau 24 h.

### 9.5.4.3 Phát hiện ornithin tách nhóm cacboxyl (decarboxylaza)

Cấy dung dịch muối lỏng (5.6) ngay dưới bể mặt. Thêm khoảng 1 ml dầu khoáng vô trùng lên mặt môi trường. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

## **TCVN 7905-1:2008**

Sau khi ủ mà thấy đục hoặc có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính [có vi khuẩn mọc và có sự tách nhóm cacboxyl (decarboxylation) của ornithin]. Màu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

### **9.5.4.4 Phát hiện L-lyzin tách nhóm cacboxyl (decarboxylaza)**

Cấy dung dịch muối lỏng (5.7) ngay dưới bề mặt. Thêm khoảng 1 ml dầu khoáng vô trùng lên mặt môi trường. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sau khi ủ mà thấy đục hoặc có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính [có vi khuẩn mọc và có sự tách nhóm cacboxyl (decarboxylation) của lyzin]. Màu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

### **9.5.4.5 Phát hiện dihydrolaza arginin**

Cấy môi trường dung dịch muối (5.8) ngay dưới bề mặt. Thêm khoảng 1 ml dầu khoáng vô trùng lên mặt môi trường. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sau khi ủ mà thấy đục hoặc có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính [có vi khuẩn mọc và có sự dihydro hoá của arginin]. Màu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

### **9.5.4.6 Phát hiện β-galactoxidaza**

Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào ống chứa 0,25 ml dung dịch muối (5.12). Thêm 1 giọt toluen và lắc ống.

Đặt ống vào nồi cách thuỷ (6.4) để ở 37 °C và để yên khoảng 5 min.

Thêm 0,25 ml thuốc thử để phát hiện β-galactoxidaza (5.9) và trộn. Đặt ống vào nồi cách thuỷ để ở 37 °C, để yên trong 24 h ± 3 h, kiểm tra liên tục.

Màu vàng chứng tỏ phản ứng dương tính (có mặt β-galactoxidaza). Phản ứng thường xảy ra sau 20 min. Sau 24 h không có màu chứng tỏ phản ứng âm tính.

Nếu sử dụng các đĩa giấy có bán sẵn thì theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

### **9.5.4.7 Phát hiện indol**

Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào ống chứa 5 ml môi trường muối trypton-tryptophan (5.10). Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h. Sau khi ủ, thêm 1 ml thuốc thử Kovacs.

Việc hình thành vòng màu đỏ chứng tỏ phản ứng dương tính (hình thành indol). Vòng màu nâu-vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

### **9.5.4.8 Phép thử khả năng chịu mặn**

Chuẩn bị một dây nước pepton (5.11) với nồng độ muối (NaCl) tăng dần: 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 % và 10 %.

Chuẩn bị huyền phù có khuẩn lạc cần nhận dạng và cấy nhẹ vào mồi ống (bằng một vòng cấy đầy). Ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

Nếu quan sát thấy đặc chứng tỏ vi khuẩn nghi ngờ có thể phát triển với nồng độ natri clorua có mặt trong ống đựng nước pepton muối.

#### 9.5.4.9 Diện giải các phép thử sinh hoá

Các chủng *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus* thường cho các phản ứng như trong Bảng 1.

Bảng 1 – Diện giải các phép thử sinh hoá

Các phép thử (môi trường chứa 1 % NaCl)	<i>V. cholerae</i> *	<i>V. parahaemolyticus</i> *
Oxidaza	+	+
Sinh khí (glucoza)	-	-
Lactoza	-	-
Sacaroza	+	-
ODC	+	+
LDC	+	+
ADH	-	-
Thuỷ phân ONPG	+	-
Sinh indol	+	+
Phát triển trong nước pepton với		
0 % NaCl	+	-
2 % NaCl	+	+
6 % NaCl	-	+
8 % NaCl	-	+
10 % NaCl	-	-

\* Dấu + nghĩa là từ 76 % đến 89 % dương tính.

CHÚ THÍCH Các phản ứng nêu trong Bảng 1 là để hướng dẫn nhận dạng các loài đã liệt kê. Các phép thử kiểu hình bổ sung là cần thiết để phân biệt đầy đủ giữa loài này với loài khác và giữa các loài của *Vibrio* không gây bệnh với các sinh vật âm tính Gram lên men khác như *Aeromonas* spp., *Vibrio mimicus*, các loài gây bệnh nêu trong TCVN 7905-2 (ISO/TS 21872-2), cho các phản ứng giống với *V. cholerae* trong dãy các phép thử này, trừ phép với âm tính sacaroza.

#### 9.5.4.10 Khẳng định từng bước (nếu cần)

Thực hiện các phép thử để kiểm tra sự phát triển trong dung dịch nước muối pepton 10 % (5.11) và arginin dihydrolaza (5.8), sử dụng các dịch cấy đã chọn trong 9.5.3.3. Tiếp tục bằng các phép thử khẳng định khác trên bất kỳ khuẩn lạc nào cho thấy không phát triển trong dung dịch nước muối pepton 10 % và cho phản ứng âm tính arginin dihydrolaza.

**CHÚ THÍCH** Nên cấy truyền vào dung dịch nước muối pepton 2 % hoặc cấy truyền vào thạch muối dinh dưỡng tại cùng một thời điểm để chắc chắn rằng "không phát triển" trong dung dịch nước muối pepton 10 % không phải vi sinh cấy đã hỏng.

### **9.5.5 Khẳng định việc nhận dạng bằng sinh hoá và xác định các yếu tố gây bệnh**

Việc nhận dạng sinh hoá của *Vibrio* là rất khó, tốt nhất để khẳng định chính xác các chủng *V. cholerae* hoặc *V. parahaemolyticus* bằng cách gửi đến phòng thử nghiệm chuẩn/chuyên dụng.

Để vận chuyển chúng, cấy vào bề mặt nghiêng của thạch dinh dưỡng muối (5.3).

Ngoài ra, không phải tất cả các chủng *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus* đều là loài gây bệnh. Để xác nhận các đặc trưng gây bệnh của các chủng, tốt nhất là thử huyết thanh đối với *V. cholerae* (ít nhất là để xác định xem chúng thuộc nhóm huyết thanh O1 hay O139) và để phát hiện xem có sản sinh độc tố hay không hoặc gen mang tính độc của *V. cholerae* và haemolysin hoàn toàn bền nhiệt (TDH) hoặc gen haemolysin liên quan đến TDH đối với *V. parahaemolyticus*. Các phép thử này cần được phòng thử nghiệm chuyên dụng thực hiện. Cần lưu ý rằng tỷ lệ các chủng gây bệnh trong môi trường và trong các mẫu thực phẩm thường thấp (đối với *V. parahaemolyticus* chúng thường chiếm khoảng 1 % tổng *V. parahaemolyticus* có trong mẫu) và do đó khả năng phát hiện các chủng gây bệnh bằng cách cấy truyền một lượng nhỏ các khuẩn lắc để nhận dạng và khẳng định là rất thấp.

## **10 Biểu thị kết quả**

Theo diễn giải các kết quả, ghi lại sự có mặt hay không có mặt *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột có trong x g hoặc x ml sản phẩm [xem TCVN 6404 (ISO 7218)], nêu rõ tên loài vi khuẩn có liên quan.

## **11 Báo cáo thử nghiệm**

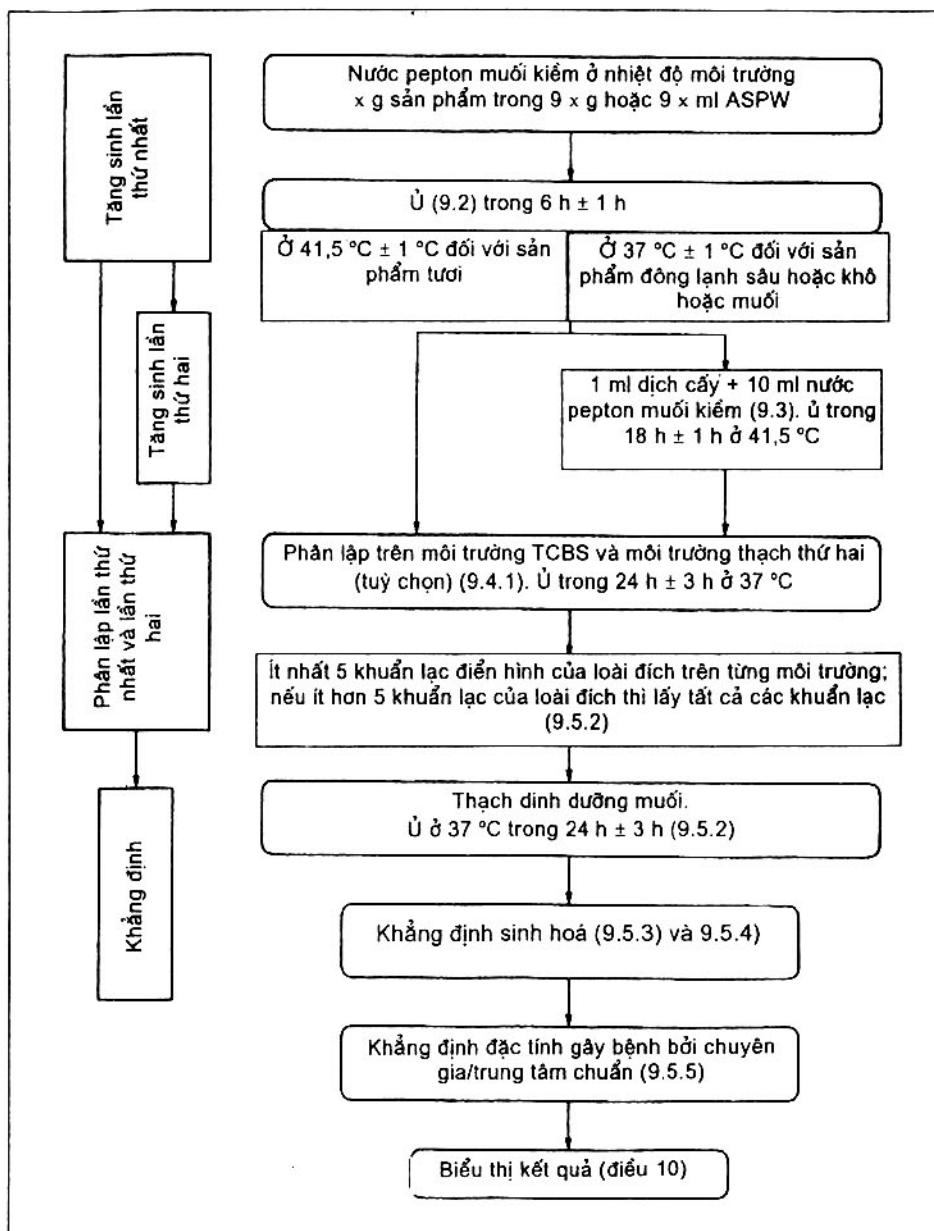
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- mọi sai lệch liên quan đến môi trường tăng sinh hoặc điều kiện ủ đã sử dụng;
- mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- các kết quả thử nghiệm thu được, đặc biệt là khả năng gây bệnh của các chủng phân lập đã khẳng định;

Báo cáo thử nghiệm cũng phải nêu rõ kết quả dương tính có thu được hay không khi sử dụng chỉ một môi trường phân lập (5.2) không được quy định trong tiêu chuẩn này.

**Phụ lục A**

(qui định)

**Sơ đồ cách tiến hành**

**Phụ lục B**

(qui định)

**Thành phần và chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử****B.1 Dung dịch pepton muối kiểm (ASPW)****B.1.1 Thành phần**

Pepton	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	20,0 g
Nước	1 000 ml

**B.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $8,6 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường với các lượng cần thiết cho phép thử vào các bình cầu hoặc ống có dung tích thích hợp (9.1 và 9.3.1). Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.2 Thạch sacaroza, mật,xitrat thiosulfat (TCBS)****B.2.1 Thành phần**

Pepton	10,0 g
Dịch chiết nấm men	5,0 g
Natri xitrat	10,0 g
Natri thiosulfat	10,0 g
Sắt (III) xitrat	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Mật bò khô	8,0 g
Sacaroza	20,0 g
Bromothymol xanh	0,04 g
Thymol xanh	0,04 g
Thạch	Từ 8,0 g đến 18 g *
Nước	1 000 ml

\* Tuỳ thuộc vào sức đóng của thạch.

### B.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  $8,6 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần. Không hấp áp lực.

### B.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Phân phối các lượng từ 15 ml đến 20 ml môi trường vừa mới chuẩn bị, làm nguội đến khoảng  $50^{\circ}\text{C}$ , vào các đĩa Petri và để yên cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch (tốt nhất là mở nắp và lật úp đĩa) cho đến khi mặt thạch khô.

### B.2.4 Kiểm chứng môi trường

Xem ISO/TS 11133 về các hướng dẫn.

Thực hiện ước tính hiệu quả của thạch đỗ đĩa đối với mỗi mẻ TCBS sử dụng thạch dinh dưỡng muối (SNA) làm môi trường so sánh và các chủng sau đây:

- *V. parahaemolyticus*: NCTC 10885;
- *V. furnissii*: NCTC 11218;
- *Escherichia coli*: ATCC 25922, 8739 hoặc 11775.

Hiệu quả thạch đỗ đĩa được tính bằng công thức sau đây:

$$\left( \frac{N_{TCBS}}{N_{SNA}} \times 100 \right)$$

trong đó  $N$  là số lượng khuẩn lạc đếm được.

Hiệu quả thạch đỗ đĩa phải ít nhất là 50 % đối với mỗi chủng *Vibrio* (sinh vật kiểm chứng dương tính) và nhỏ hơn 1 % đối với *E. coli* (sinh vật kiểm chứng âm tính). Các khuẩn lạc *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 phải là màu xanh (âm tính sacaroza), trong khi đó các khuẩn lạc *V. furnissii* và NCTC 11218 phải là màu vàng (dương tính sacaroza).

**B.3 Thạch dinh dưỡng muối (SNA)****B.3.1 Thành phần**

Dịch chiết thịt	5,0 g
Pepton	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Thạch	Từ 8 g đến 18 g *
Nước	1 000 ml

\* Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.

**B.3.2 Chuẩn bị**

Hòa tan các thành phần khô hoặc mồi trường hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Điều chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,2 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Chuyển mồi trường này vào các vật chứa có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.3.3 Chuẩn bị các đĩa mồi trường thạch dinh dưỡng muối**

Phân phôi các lượng từ 15 ml đến 20 ml mồi trường và làm nguội đến khoảng  $50^{\circ}\text{C}$ , vào các đĩa Petri và để yên cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch (tốt nhất là mở nắp và lật úp đĩa) cho đến khi mặt thạch khô.

**B.3.4 Chuẩn bị các ống thạch nghiêng**

Phân phôi khoảng 10 ml mồi trường đã làm nguội đến khoảng  $50^{\circ}\text{C}$  vào các ống có dung tích thích hợp.

Để nghiêng ống cho đông đặc.

**B.4 Thuốc thử phát hiện oxidaza****B.4.1 Thành phần**

<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylenediamin dihydrochlorua	1,0 g
Nước	100 ml

**B.4.2 Chuẩn bị**

Hòa tan thành phần trên trong nước lạnh ngay trước khi sử dụng.

**B.5 Thạch, sắt, ba đường và muối (TSI)****B.5.1 Thành phần**

Pepton	20,0 g
Dịch chiết thịt	3,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Lactoza	10,0 g
Sacaroza	10,0 g
Glucoza	1,0 g
Sắt (III) xitrat	0,3 g
Đỗ phenol	0,024 g
Thạch	Từ 8 g đến 18 g *
Nước	1 000 ml

\* Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.

**B.5.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Điều chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phổi môi trường này với các lượng 10 ml vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

Để yên ở tư thế nghiêng cho đông đặc, sao để thu được khoảng 2,5 cm chiều sâu ống.

Nếu sau khi chuẩn bị, môi trường được sử dụng sau 8 ngày, thì phục hồi môi trường này bằng cách làm tan chảy trên nồi cách thuỷ hoặc bằng thổi hơi nước tự do trong 10 min. Để cho đông đặc như mô tả ở trên.

**B.6 Môi trường muối để phát hiện Ornithin decarboxylaza (ODC)****B.6.1 Thành phần**

L-Ornithin monohydrochlorua	5,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1 000 ml

### B.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  $6,8 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống nhỏ. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

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

### B.7.1 Thành phần

L-lysin monohydroclorua	5,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1 000 ml

### B.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  $6,8 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống hẹp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

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

### B.8.1 Thành phần

L-Arginin monohydro clorua	5,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1 000 ml

### B.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  $6,8 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

Phân phối môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống nhỏ. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121 °C.

### B.9 Thuốc thử phát hiện $\beta$ -galactoxidaza

#### B.9.1 Dung dịch ONPG

##### B.9.1.1 Thành phần

2-ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)	0,08 g
Nước	15 ml

##### B.9.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan ONPG trong nước ở khoảng 50 °C. Làm nguội dung dịch.

#### B.9.2 Dung dịch đệm

##### B.9.2.1 Thành phần

Natri dihydro phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	6,9 g
Natri hydroxit ( $\text{NaOH}$ ) (dung dịch 0,1 mol/l)	Xấp xỉ 3 ml
Nước, lượng đủ cho thể tích cuối cùng	50 ml

##### B.9.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri dihydro phosphat trong khoảng 45 ml nước trong bình định mức.

Chỉnh pH đến  $7,0 \pm 0,2$  ở 25 °C bằng dung dịch natri hydroxit. Thêm nước đến 50 ml.

#### B.9.3 Thuốc thử hoàn chỉnh

##### B.9.3.1 Thành phần

Dung dịch đệm (B.9.2)	5 ml
Dung dịch ONPG (B.9.1)	15 ml

##### B.9.3.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch đệm vào dung dịch ONPG. Bảo quản dung dịch này ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

**B.10 Môi trường muối để phát hiện indol**

**B.10.1 Môi trường muối tryptophan**

**B.10.1.1 Thành phần**

Sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym	10,0 g
DL-Tryptophan	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1000 ml

**B.10.1.2 Chuẩn bị**

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần và lọc. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng 5 ml môi trường này vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.10.2 Thuốc thử Kovacs**

**B.10.2.1 Thành phần**

4-Dimethylaminobenzaldehyt	5 g
Axit clohydric, $\rho = 1,18 \text{ g/ml}$ đến $1,19 \text{ g/ml}$	25 ml
2-Metylbutan-2-ol	75 ml

**B.10.2.2 Chuẩn bị**

Trộn các thành phần trên.

**B.11 Dung dịch của nước pepton muối**

**B.11.1 Thành phần**

Pepton	10 g
Natri clorua (NaCl)	0 g, 20 g, 60 g, 80 g hoặc 100 g
Nước	1000 ml

**B.11.2 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  $7,5 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phổi môi trường này vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

**B.12 Dung dịch natri clorua****B.12.1 Thành phần**

Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1000 ml

**B.12.2 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  $7,5 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

Phân phổi môi trường này vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$ .

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] ISO/TS 11133-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*
  - [2] ISO/TS 11133-2, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.*
-