

## TÀI LIỆU KỸ THUẬT

# BAIRD-PARKER RPF AGAR

### ĐỊNH LƯỢNG VÀ XÁC ĐỊNH STAPHYLOCOCCI DƯƠNG TÍNH COAGULASE

## 1 MỤC ĐÍCH.

Baird Parker RPF (RPF = Rabbit Plasma Fibrinogen) Agar được sử dụng để phát hiện và định lượng staphylococci dương tính coagulase. Môi trường này có ưu điểm là giảm đáng kể số lượng phép thử khẳng định sự có mặt staphylococci dương tính coagulase đặc biệt khi quan sát thấy các khuẩn lạc không điển hình trên môi trường chọn lọc khác. Môi trường cho phép việc liệt kê và xác nhận đồng thời được thực hiện trong một thao tác duy nhất.

Thành phần môi trường tương ứng với thành phần được xác định trong các chỉ thị vi sinh thực phẩm NF EN ISO 6888, NF EN ISO 6888-2 và NF EN ISO 6888-3. Nó cũng tuân thủ các chỉ thị được sử dụng để kiểm soát nước NF T90- 412.

## 2 HISTORY

Việc sản xuất coagulase tự do được coi là đặc điểm chính để nhận biết khả năng gây bệnh của tụ cầu khuẩn, đặc biệt là *Staphylococcus aureus*, là nguồn gốc của sự phát triển của Baird Parker và Rabbit Plasma Fibrinogen. Các công thức ban đầu về việc kết hợp huyết tương trong môi trường nuôi cấy rắn cho thấy sự không nhất quán giữa kết quả thu được từ xét nghiệm ống coagulase và sự hình thành quầng đặc trưng của fibrin xung quanh khuẩn lạc. Sự khác biệt xuất phát từ thực tế là một số chủng nhất định có coagulase cũng kích hoạt hệ thống plasminogen-plasmin, dẫn đến tiêu sợi huyết và biến mất quầng fibrin. Để khắc phục khó khăn này nên bổ sung chất ức chế trypsin đậu nành.

Để thuận lợi cho việc phát hiện coagulase được tạo ra bởi *Staphylococcus aureus*, Devoyod và cộng sự. nghiên cứu vào năm 1976 về việc kết hợp huyết tương lợn vào môi trường Baird-Parker. Hauschild sau đó đã cải thiện hiệu suất của môi trường Devoyod thông qua việc đưa vào fibrinogen của bò và chất ức chế trypsin, với lượng huyết tương giảm tương ứng. Năm 1983, Beckers và cộng sự. môi trường Hauschild đã được sửa đổi, thay thế huyết tương lợn bằng huyết tương thỏ, được sử dụng phổ biến trong thử nghiệm ống coagulase. Các tác giả này cũng cấy sâu vào môi trường thay vì kỹ thuật hai lớp Devoyod được sử dụng trước đây. Cuối cùng, công thức này đã được Sawhney cải tiến vào năm 1986, sau khi hoàn thành các nghiên cứu liên quan đến độc tính của kali telurit đối với *Staphylococcus aureus* trong môi trường fibrinogen huyết tương thỏ.

## 3 NGUYÊN TẮC

Sự phát triển của staphylococci được tạo điều kiện thuận lợi bởi natri sodium pyruvate và glycine.

Hệ vi sinh vật đi kèm bị ức chế bởi lithium clorua và kali telurit (được bổ sung tạm thời), cũng như nồng độ glycine cao.

Rabbit plasma được chọn vì tính đặc hiệu tuyệt vời của nó đối với staphylococcal coagulase và khả năng nhanh chóng tạo ra cục máu đông bằng cách hình thành staphylofibrin từ protrombin. Huyết tương thỏ được tăng cường bằng fibrinogen bò. Staphylofibrin hoạt động bằng cách cắt các fibrinopeptide A và B của fibrinogen, từ đó bắt đầu quá trình trùng hợp dẫn đến sự xuất hiện các quầng fibrin xung quanh các khuẩn lạc.

Chất ức chế trypsin đậu nành ngăn ngừa tiêu sợi huyết.

Màu đen của khuẩn lạc tụ cầu là do sự khử kali telurit thành Telluride. Ngoài ra, sự có mặt của Tellurite còn giúp ức chế sự lây nhiễm của hệ vi sinh vật gram dương.

## 4 THÀNH PHẦN

Thành phần có thể được điều chỉnh để đạt được hiệu suất tối ưu

Cho 1 lít Baird Parker-Rabbit Plasma Fibrinogen agar:

- Tryptone .....	9.0 g
- Meat extract .....	4.5 g
- Yeast extract.....	0.9 g
- Sodium pyruvate.....	9.0 g
- Glycine.....	10.8 g
- Lithium chloride.....	4.5 g
- Bacteriological agar .....	13.5 g
- Bovine fibrinogen .....	5.0 g
- Rabbit plasma, EDTA .....	25 mL
- Trypsin inhibitor .....	25 mg
- Potassium tellurite .....	25 mg

### Trong 58 g môi trường bột khô BK055

- Tryptone .....	10.0 g
- Meat extract .....	5.0 g
- Yeast extract .....	1.0 g
- Sodium pyruvate .....	10.0 g
- Glycine .....	12.0 g
- Lithium chloride .....	5.0 g
- Bacteriological agar.....	15.0 g

pH of the base medium at 25°C: 7.2 ± 0.2

### For one vial of supplement BS034

(Qsp 100 mL)

- Bovine fibrinogen .....	0.5 g
- Rabbit plasma, EDTA .....	2.5 mL
- Trypsin inhibitor .....	2.5 mg
- Potassium tellurite .....	2.5 mg

### For one vial of supplement BS038

(Qsp 500 mL)

- Bovine fibrinogen .....	2.5 g
- Rabbit plasma, EDTA .....	12.5 mL
- Trypsin inhibitor .....	12.5 mg
- Potassium tellurite .....	12.5 mg

## 5 CHUẨN BỊ

### Chuẩn bị môi trường nuôi cấy:

- Hòa 58g môi trường bột khô(BK055) vào 950 mL nước cất hoặc nước khử khoáng. Có thể tăng thể tích để đạt 1 lít môi trường cơ bản theo ISO 6888-2
- Từ từ đun sôi, khuấy liên tục cho đến khi hòa tan hoàn toàn.
- Phân phối vào bình hoặc lọ bằng cách thêm 90 mL, hoặc bội số của 90mL mỗi bình.
- Khử trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 15 phút.
- Làm mát và duy trì ở nhiệt độ 44-47°C.

✓ **Pha loãng:**

**58 g for 950 mL**

✓ **Tiệt trùng:**

**15 min at 121 °C**

### Sử dụng với môi trường cơ bản đã sẵn sàng để tan chảy

- Làm tan chảy môi trường cơ bản có trong bộ dụng cụ hoặc nếu được chuẩn bị trước trong khoảng thời gian tối thiểu cần thiết để đạt được sự hóa lỏng hoàn toàn.
- Làm mát và duy trì ở nhiệt độ 44-47°C.

### Hoàn nguyên chất bổ sung đông khô:

- Hòa tan chất đông khô bằng cách thêm một lượng nước cất vô trùng một cách vô trùng như sau:
  - Qsp 100 mL of complete medium (BS034, BS045): 10 mL of sterile, distilled water
  - Qsp 500 mL môi trường hoàn chỉnh (BS038): 50 mL nước cất vô trùng.
  - Qsp 200 mL môi trường hoàn chỉnh - dành riêng cho bộ B7010 (BS075): 10 mL nước cất vô trùng.
- Quá trình hòa tan sẽ diễn ra nhanh hơn nếu nước được làm nóng trước (không vượt quá 44°C).

- Lật ngược lại để hòa tan. Tránh làm dung dịch tạo bọt. Nếu không hòa tan hoàn toàn ngay lập tức, có thể sử dụng máy trộn cơ học (loại Vortex) để tăng tốc độ phản ứng. Chất bổ sung phải được hòa tan hoàn toàn trước khi thêm vào nền Baird-Parker Agar.

### Chuẩn bị môi trường hoàn chỉnh

- Đối với 90 mL môi trường cơ bản có trong bộ BT005 hoặc được chuẩn bị từ cơ sở khử nước, thêm 10 mL Chất bổ sung Fibrinogen Huyết tương Thỏ đã hoàn nguyên (BS034, BS045 hoặc BS038) một cách vô trùng.
- 190 mL chất nền cụ thể có trong bộ BT010 (BM158), thêm 10 mL chất bổ sung Fibrinogen Huyết tương Thỏ cụ thể từ bộ sản phẩm (BS075) một cách vô trùng.
- Trộn đều
- Sử dụng ngay để đổ đĩa hoặc đổ đĩa Petri rộng dùng để xác nhận.

✓ **Kit BT005**  
Add 10 mL of BS045 to  
90 mL of BM040

✓ **Kit BT010**  
Add 10 mL of BS075  
to 190 mL of BM158

### LƯU Ý:

Môi trường hoàn chỉnh không thể được giữ trong thời gian dài ở nhiệt độ 44-47°C.

## 6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

### Định lượng tụ cầu dương tính với coagulase, Vi sinh thực phẩm (NF EN ISO 6888-2)

- Transfer Chuyển 1 mL mẫu cần phân tích đã pha loãng 10 lần vào đĩa Petri đường kính 90mm vô trùng.
- Đổ môi trường đã pha vào các đĩa
- Chuyển động nhẹ đĩa thành vòng tròn trên mặt phẳng
- Để đông đặc hoặc để bề mặt nguội.
- Ủ ở 34-38°C trong 24 ± 2h và nếu không có khuẩn lạc thì ủ lại thêm 24 ± 2 giờ.

### Xác nhận tụ cầu khuẩn gây bệnh, Vi sinh thực phẩm

✓ **Cấy:**  
Độ sâu 1 mL (đổ đĩa)

Ủ:  
✓ 24 ± 2 h ở 34-38 °C

### NF EN ISO 6888-3

- Đổ môi trường đã chuẩn bị hoàn chỉnh vào các đĩa Petri vô trùng hoặc sử dụng các đĩa đổ sẵn (BM067).
- Dùng que cấy vòng cấy mẫu từ các ống môi trường tăng sinh (Giolitti & Cantoni).
- Ủ ở 37 ± 1°C trong (24 ± 2) giờ và kéo dài thêm 24 giờ nếu cần thiết.

### NF EN ISO 6888-1

- Chọn các khuẩn lạc đặc trưng bằng que cấy đầu nhọn trên môi trường thạch RPF.
- Ủ các đĩa ở 34-38°C trong 24 giờ đến 48 giờ.

### Định lượng tụ cầu gây bệnh, Vi sinh vật trong nước và nước bể bơi (NF T90-412)

- Đổ môi trường đã chuẩn bị hoàn chỉnh vào các đĩa Petri Ø 55 mm vô trùng hoặc sử dụng các đĩa đổ sẵn (BM159).
- Tiến hành lọc bằng màng đối với các mẫu nước cần kiểm tra
- Đặt màng lên thạch đã đông đặc, mặt lọc hướng lên trên, đảm bảo không có bong bóng hình thành giữa màng và bề mặt thạch.
- Lật ngược đĩa và ủ ở 36 ± 2°C.
- Ghi lại kết quả đầu tiên sau 21 ± 3 giờ. Nhẹ nhàng nâng màng lên để quan sát sự hiện diện của các vùng đông tụ trên môi trường thạch.
- Ghi lại kết quả chính xác sau (44 ± 4) giờ.

✓ **Cấy:** Màng lọc

Ủ:  
✓ 44 ± 4 h ở 36 ± 2°C

### LƯU Ý:

Sự biến mất của các vùng mờ đôi khi có thể xảy ra sau 48 giờ hoặc lâu hơn.

## 7 KẾT QUẢ

Staphylococci dương tính với coagulase được đặc trưng bởi sự hình thành các khuẩn lạc màu xám, đen hoặc trắng được bao quanh bởi quầng fibrin mờ đục rõ ràng, ổn định và có thể nhìn thấy rõ. Việc sử dụng kỹ thuật RPF giúp loại bỏ nhu cầu xác nhận kết quả bằng xét nghiệm ống coagulase. Các vi sinh vật khác có thể phát triển bằng cách hình thành khuẩn lạc màu xám đến đen nhưng chúng không có phản ứng coagulase dương tính (không có quầng sáng mờ bao quanh khuẩn lạc).

**LƯU Ý :** Để biết thêm chi tiết về hình thái khuẩn lạc, hãy tham khảo NF EN ISO 6888-2.

Xem PHỤ LỤC 1: HỒ TRỢ HÌNH ẢNH.

## 8 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

**Môi trường bột khô:** bột màu trắng kem, chảy tự do và đồng nhất.

**RPF supplement:** dạng viên màu trắng đến hồng hào, sau khi pha sẽ tạo thành dung dịch màu hổ phách, trong và hơi đục.

**Môi trường đĩa đồ sẵn:** thạch màu hổ phách.

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 48 giờ ủ trên môi trường hoàn chỉnh ở 37°C (NF ISO 6888-2, NF T90-412, NF EN ISO 11133):

Microorganisms	Growth (Productivity Ratio: $P_R$ )	Đặc trưng
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	$P_R \geq 50 \%$	Khuẩn lạc màu đen, có quầng mờ đục
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> WDCM 00159	Chậm, score 0-1	Khuẩn lạc màu đen hoặc xám, không có quầng mờ đục-
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	Ức chế, score 0	

## 9 BẢO QUẢN

**Môi trường bột khô:** 2-30 °C.

**Freeze-dried Rabbit Plasma Fibrinogen supplements:** 2-8 °C.

**Kits:** 2-8 °C.

**Môi trường đĩa đồ sẵn:** 2-8 °C

Xem hạn sử dụng được in trên nhãn dán

**Môi trường cơ bản chuẩn bị sẵn trong ống (\*):** 180 days at 2-8 °C.

**Chất bổ sung đã hoàn nguyên (\*):** 8 ngày ở 2-8 °C. Trả về nhiệt độ 37 °C trước khi sử dụng

**Môi trường đĩa đồ sẵn hoàn chỉnh:** 30 ngày ở 2-8 °C.

**Môi trường hoàn chỉnh chuẩn bị sẵn trong lọ (\*):** Sử dụng ngay lập tức

(\* ) Giá trị chuẩn được xác định trong điều kiện chuẩn bị tiêu chuẩn, theo hướng dẫn của nhà sản xuất

## 10 ĐÓNG GÓI

**Môi trường bột khô**

500 g/ chai ..... BK055HA

5 kg/ thùng ..... BK055GC

**Rabbit Plasma Fibrinogen Supplement**

8 lọ qsp 100 mL ..... BS03408

1 lọ qsp 500 mL ..... BS03808

**Kit (6 x 100 mL)**

6 lọ 90 mL môi trường cơ bản và 6 RPF bổ sung đông khô ..... BT00508

**Kit (6 x 200 mL)**

6 lọ 190 mL môi trường cơ bản và 6 chất bổ sung đông khô RPF (BS075) ..... BT01008

**Môi trường hoàn chỉnh chuẩn bị trong đĩa petri (Ø 90 mm)**

20 plates ..... BM06708

**Môi trường hoàn chỉnh chuẩn bị trong đĩa petri (Ø 55 mm)**

20 plates ..... BM15908

**11 THAM KHẢO**

- Loeb, L.. 1903. The influence of certain bacteria on the coagulation of blood. *Journal of Medical Research*, **10** : 407-419.
- Duthie, E.S.. 1954. Evidence of two forms of staphylococcal coagulase. *Journal of General Microbiology*, **10** : 427-436.
- Baird-Parker, A.C...1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, **25** : 12-19.
- Devoyod, J.J., Millet, L. et Mocquot G... 1976. Un milieu gélosé pour le dénombrement direct de *Staphylococcus aureus* : milieu au plasma de porc pour *S. aureus* (PPSA). *Canadian Journal of Microbiology*, **22 (11)** : 1603-1611.
- Stadhouders, J., Hassing, F. and van Aalst-van Maren, N.O... 1976. A pour-plate method for the detection and enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in the Baird-Parker medium without egg yolk. *Netherland Milk Dairy Journal*, **30** : 222-229.
- Hauschild, A.H., Park, C.E. and Hilsheimer, R.. 1979. A modified pork plasma agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Canadian Journal of Microbiology*, **25** : 1052-1057.
- Beckers, H.J., van Leusden, F.M., Bindschedler, O. and Guerraz, D... 1984. Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. *Canadian Journal of Microbiology*, **30** : 470-474.
- SAWHNEY, D., 1986. The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *Journal of Applied Bacteriology*, **149** : 149-155.
- De Buyser, M.L., Audinet, N., Delbart, M.O., Maire, M. and Francoise, F ... 1998. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food microbiology*, **15**: 339-346.
- NF EN ISO 6888-2. September 2021. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 2: technique using rabbit plasma fibrinogen agar.
- NF EN ISO 6888-3. June 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 3 : detection and MPN technique for low numbers.
- NF T 90-412. June 2016. Qualité de l'eau. Dénombrement des staphylocoques pathogènes (à coagulase positifs)- Méthode par filtration sur membrane.
- NF EN ISO 6888-1. September 2021. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1 : method using Baird-Parker agar medium.

**12 THÔNG TIN THÊM**

Thông tin được cung cấp trên nhãn được ưu tiên hơn các công thức hoặc hướng dẫn được mô tả trong tài liệu này và có thể sửa đổi bất cứ lúc nào mà không cần cảnh báo

Mã tài liệu: BAIRD PARKER PLF\_EN\_V20

Ngày tạo: 06-2003

Cập nhật: 12-2021

Nguồn sử đổi: Cập nhật theo sự phát triển của tiêu chuẩn ISO 6888-2 và ISO 6888-1

## PHỤ LỤC 1: HÌNH ẢNH MINH HỌA

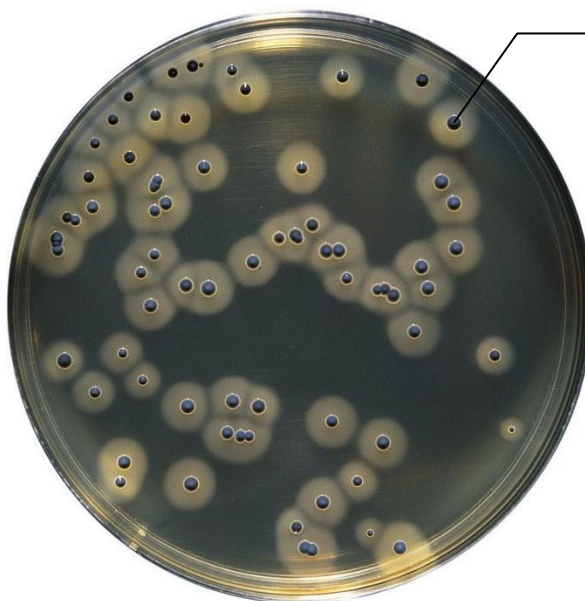
---

### BAIRD-PARKER RPF Agar

Định lượng và khẳng định staphylococci dương tính với coagulase.

#### Kết quả:

Sự tăng trưởng thu được sau 24 giờ ủ ở 37°C.



#### *Staphylococcus aureus*

Các khuẩn lạc đặc trưng:  
Các khuẩn lạc màu xám  
đen được bao quanh  
bởi quầng fibrin mờ đục.