

TCVN 6507-6:2015

ISO 6887-6:2013

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
CHUẨN BỊ MẪU THỬ, HUYỀN PHÙ BAN ĐẦU VÀ
DỊCH PHA LOÃNG THẬP PHẦN ĐỂ KIỂM TRA VI SINH VẬT –
PHẦN 6: CÁC NGUYÊN TẮC CỤ THỂ ĐỂ CHUẨN BỊ MẪU
ĐƯỢC LẤY TỪ GIAI ĐOẠN SẢN XUẤT BAN ĐẦU**

*Microbiology of food and animal feed – Preparation of test samples,
initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination –
Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage*

Lời nói đầu

TCVN 6507-6:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 6887-6:2013;

TCVN 6507-6:2015 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 6507 (ISO 6887), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật*, gồm các phần sau đây:

- TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999), *Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân*;
- TCVN 6507-2:2005 (ISO 6887-2:2003), *Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt*;
- TCVN 6507-3:2005 (ISO 6887-3:2003), *Phần 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản*;
- TCVN 6507-4:2005 (ISO 6887-4:2003, With Amd.1:2004), *Phần 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thủy sản và sản phẩm thủy sản*;
- TCVN 6507-5:2013 (ISO 6887-5:2010), *Phần 5: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu sữa và sản phẩm sữa*;
- TCVN 6507-6:2015 (ISO 6887-6:2013), *Phần 6: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu được lấy từ giai đoạn sản xuất ban đầu*.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 6: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu được lấy từ giai đoạn sản xuất ban đầu

*Microbiology of food and animal feed – Preparation of test samples,
initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination –
Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at
the primary production stage*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các nguyên tắc để chuẩn bị các mẫu được lấy ở giai đoạn sản xuất ban đầu từ trại chăn nuôi đến cơ sở giết mổ và huyền phù của chúng để kiểm tra vi sinh vật, khi cần chuẩn bị các mẫu theo các phương pháp khác với phương pháp nêu trong TCVN 6507-1 (ISO 6687-1). TCVN 6507-1 (ISO 6687-1) quy định nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

Tiêu chuẩn này không bao gồm việc chuẩn bị mẫu dùng cho các phương pháp vừa phát hiện vừa định lượng vì các chi tiết chuẩn bị được quy định trong các tiêu chuẩn liên quan.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các mẫu khác nhau lấy từ trại sản xuất giống, trại chăn nuôi, phương tiện vận chuyển hoặc động vật trong suốt quá trình vận chuyển hoặc từ động vật hoặc thân thịt tại các cơ sở giết mổ, để chỉ rõ tình trạng vi sinh vật của động vật có thể truyền bệnh sang người. Tiêu chuẩn này không áp dụng cho mẫu được lấy để đánh giá vệ sinh của thịt. Trường hợp đó được quy định trong TCVN 6507-2 (ISO 6887-2).

Tiêu chuẩn này không xem xét đến các mẫu được lấy từ môi trường nước (nước biển hoặc nước ngọt) ở giai đoạn sản xuất ban đầu. Trường hợp đó được quy định trong TCVN 6507-3 (ISO 6887-3).

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, 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.*

TCVN 10782 (ISO 13307), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Giai đoạn sản xuất ban đầu – Kỹ thuật lấy mẫu.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Mẫu phòng thử nghiệm (laboratory sample)

Mẫu được chuẩn bị để gửi đến phòng thử nghiệm để kiểm tra hoặc thử nghiệm.

3.2

Phần mẫu thử (test portion)

Lượng mẫu đại diện (theo thể tích hoặc khối lượng) được lấy từ mẫu phòng thử nghiệm (3.1) dùng để chuẩn bị huyền phù ban đầu (3.4).

3.3

Mẫu chung (pooled sample)

Mẫu hỗn hợp được lấy từ một số vật nuôi khác nhau hoặc từ các mẫu môi trường riêng rẽ.

3.4

Huyền phù ban đầu/dung dịch pha loãng ban đầu (initial suspension/primary dilution)

Huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương thu được, sau khi cân hoặc đong một lượng sản phẩm xác định cần kiểm tra (hoặc của mẫu thử đã chuẩn bị từ sản phẩm) được trộn với một lượng dung dịch pha loãng thường là gấp chín lần thì để các hạt to lắng xuống, nếu có.

CHÚ THÍCH 1 Đôi khi cần chuẩn bị các dung dịch pha loãng ban đầu cao hơn hoặc thấp hơn, ví dụ: 1 thành 5 hoặc 1 thành 100 ($V_1 \rightarrow V_2$).

3.5

Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (further decimal dilutions)

Huyền phù hoặc dung dịch thu được bằng cách trộn một thể tích xác định của huyền phù ban đầu (3.4) với chín thể tích dung dịch pha loãng và bằng cách lặp lại các thao tác này với từng dung dịch được chuẩn bị theo cách này cho đến khi thu được các dãy dung dịch pha loãng thập phân thích hợp cho việc cấy trong môi trường nuôi cấy.

4 Nguyên tắc

Chuẩn bị huyền phù ban đầu (3.4) sao cho vi sinh vật phân bố trong mẫu thử càng đồng đều càng tốt mà không làm giảm đi khả năng sống của chúng.

Chuẩn bị huyền phù tăng sinh sơ bộ hoặc huyền phù tăng sinh theo cách tương tự, sử dụng môi trường được khuyến cáo bởi phương pháp phân tích có liên quan, trừ các trường hợp cụ thể liên quan đến từng sản phẩm trong tiêu chuẩn này.

Nếu cần, chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (3.5) để giảm bớt số lượng vi sinh vật trên một đơn vị thể tích, sao cho sau khi ủ quan sát thấy được sự phát triển (trong trường hợp môi trường lỏng) hoặc định lượng các khuẩn lạc (trong hoặc trên đĩa thạch), được quy định trong từng tiêu chuẩn cụ thể.

Để giới hạn phạm vi định lượng đến khoảng đã định hoặc nếu dự đoán được số lượng vi sinh vật lớn thì có thể chỉ cấy các dung dịch pha loãng thích hợp (ít nhất hai dung dịch pha loãng liên tiếp) theo công thức tính nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218), nếu cần.

5 Dung dịch pha loãng và chất khử trùng

Thường sử dụng các dung dịch pha loãng nêu trong TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

5.1 Chất trung hòa

Sử dụng dịch trung hòa được chuẩn bị theo TCVN 10782 (ISO 13307), ở nồng độ 10 % phần thể tích trong dung dịch pha loãng, nếu cần. Chất trung hòa thường được thêm vào khi lấy mẫu thử, trước khi chuyển đến phòng thử nghiệm.

CHÚ THÍCH Nếu hàm lượng formalin dự kiến trong mẫu cao thì cũng có thể thêm L-histidin (0,9 %) vào canh thang tăng sinh sơ bộ.

5.2 Chất khử trùng dùng cho quá trình kiểm tra trong phòng thử nghiệm

Chất khử trùng được nêu trong 6.2.4 của TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

6 Thiết bị, dụng cụ và đồ dùng thủy tinh

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh [xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và TCVN 6406 (ISO 7218)] và cụ thể sau đây:

6.1 Bộ đồng hóa

6.1.1 Bộ đồng hóa kiểu nhu động (dạng túi).

6.1.2 Bộ đồng hóa quay (bộ trộn).

6.1.3 Máy trộn kiểu rung (tạo xung).

6.2 Búa hoặc đục bằng chất dẻo vô trùng.

6.3 Cát, chà và cối vô trùng.

6.4 Kẹp, kéo, dao mổ, dao trộn và thìa vô trùng.

6.5 Bình hoặc chai có nắp vặn vô trùng, có dung tích thích hợp.

6.6 Pipet chia vạch xả hết, đầu tip pipet vô trùng.

7 Các loại mẫu được gửi đến phòng thử nghiệm

Các mẫu được lấy và vận chuyển theo TCVN 6404 (ISO 7128) và TCVN 10782 (ISO 13307).

Thông tin chi tiết hơn về mẫu thử cần lấy trong các điều kiện khác nhau được nêu trong Điều 9. Dưới đây là các ví dụ:

- các mẫu được lấy tại trại chăn nuôi:
 - từ môi trường (ví dụ: gạc, rác thải, phân, bụi, nước);
 - từ động vật (ví dụ: gạc);
- mẫu được lấy tại cơ sở giết mổ (ví dụ: lượng chứa trong trực tràng hoặc trong manh tràng, hạch bạch huyết màng treo ruột);
- mẫu được lấy tại nơi ấp trứng (ví dụ: lớp lót lồng ấp, vỏ trứng vỡ);
- mẫu được lấy trên phương tiện vận chuyển, các bộ phận máy móc và các sọt vận chuyển động vật (ví dụ: gạc).

8 Chuẩn bị mẫu

8.1 Yêu cầu chung

Tất cả việc chuẩn bị và các thao tác bằng tay cần được thực hiện sử dụng các kỹ thuật vô trùng tốt và dùng dụng cụ vô trùng để tránh nhiễm bẩn vi sinh vật vào mẫu từ tất cả các nguồn bên ngoài [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Nếu mẫu được chuyển sang các vật chứa khác và toàn bộ mẫu phòng thử nghiệm được sử dụng thì đảm bảo rằng tất cả các mẫu được chuyển (ví dụ: khi chuyển các bao gạc bọc ủng từ vật chứa ban đầu sang một vật chứa mới thì chuyển cẩn thận sao cho không còn sót lại mẫu trong vật chứa đầu tiên).

Nêu rõ trong báo cáo về quy trình đã sử dụng để phân tích nếu khác với quy trình được nêu trong tiêu chuẩn này.

8.2 Bảo quản

Mẫu phải được bảo quản trong các điều kiện thích hợp để đảm bảo sự sống sót các vi sinh vật đích theo TCVN 6404 (ISO 7218).

9 Cách tiến hành cụ thể

9.1 Quy trình thực hiện đối với mẫu được lấy tại trại chăn nuôi

9.1.1 Mẫu từ môi trường hoặc động vật sống

9.1.1.1 Gạc vải

Nếu có thể, cho trực tiếp một lượng/số lượng thích hợp môi trường vào mẫu đựng trong vật chứa để vận chuyển. Lượng môi trường cụ thể được cho vào tùy thuộc vào kích thước miếng gạc và mục đích của phép thử. Đảm bảo rằng miếng gạc ngập hoàn toàn.

Cần tính đến ảnh hưởng của lượng/số lượng môi trường cho vào đến giới hạn phát hiện của phép thử (xem chú thích trong 3.4).

Để định lượng, cho vừa đủ lượng/số lượng môi trường để làm ướt toàn bộ miếng gạc trong khi bổ sung một lượng tối thiểu chất lỏng tự do cần thiết để định lượng và đối với phương pháp phát hiện phải đủ lượng chất lỏng tự do.

Ví dụ: để định lượng vi sinh vật từ miếng bọt biển kích thước 10 cm × 10 cm thì cho 100 ml dung dịch pha loãng. Bóp miếng bọt biển vài lần (ví dụ: bằng tay nếu vật chứa là túi) sao cho các vi sinh vật được giải phóng vào trong huyền phù, sau đó lắc kĩ.

Để phát hiện, miếng gạc được đưa vào cùng với môi trường nuôi cấy.

9.1.1.2 Tăm bông

Chuyển gạc tăm bông vào vật chứa thích hợp. Bể (hoặc cát nếu cần) tăm bông bằng dụng cụ vô trùng, bổ sung lượng/số lượng thích hợp môi trường và trộn. Nếu phân gạc tăm bông cho sẵn trong ống hoặc vật chứa thích hợp khác thì bổ sung môi trường vào vật chứa đó, trừ khi vật chứa tăm bông đã có sẵn môi trường vận chuyển sẵn.

Khi thích hợp, có thể gộp các tăm bông, cho một thể tích môi trường thích hợp.

9.1.1.3 Bao gạc bọc ủng, gạc tấm, gạc dây

Khi có thể, cho chính xác lượng/số lượng môi trường thích hợp vào vật chứa để vận chuyển.

Đảm bảo rằng gạc ngập hoàn toàn.

Ví dụ: đối với phép thử *Salmonella* thì cho ít nhất 225 ml dung dịch pha loãng thích hợp [xem Phụ lục D trong TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002)] vào một đôi bao gạc bọc ủng.

9.1.1.4 Gạc Moore (gạc lót bông)

Xử lý các miếng gạc này giống như bao gạc bọc ủng (xem 9.1.1.3) nhưng vì một lượng lớn các sinh vật tích tụ trong thời gian dài, nên tốt nhất là dùng dung dịch pha loãng 1/20.

9.1.1.5 Các mẫu rác thải và các mẫu phân hỗn hợp tự nhiên

Điều quan trọng là đồng hóa mẫu phòng thử nghiệm bằng cách trộn các nguyên liệu khô hoặc cho mẫu vào một lượng/số lượng dung dịch pha loãng bằng với lượng đựng trong cùng vật chứa dùng để vận chuyển. Trộn để tạo thành hỗn hợp nhão. Để yên từ 10 min đến 15 min và trộn lại. Chuyển 50 ml huyền phù (có chứa 25 g mẫu ban đầu) vào một thể tích dung dịch pha loãng thích hợp theo quy định trong tiêu chuẩn này đối với các vi sinh vật đích.

9.1.1.6 Các mẫu phân

Mẫu riêng rẽ: lấy một phần hoặc toàn bộ, nếu ít. Trộn nhẹ và bổ sung lượng/số lượng môi trường thích hợp theo quy trình cụ thể dưới đây.

Đối với các mẫu khó trộn, tham khảo 9.1.1.5.

Các mẫu hỗn hợp: trộn từng mẫu càng kĩ càng tốt, mỗi mẫu lấy một lượng bằng nhau, cho lượng/số lượng môi trường thích hợp theo tiêu chuẩn cụ thể đối với các vi sinh vật đích và trộn kĩ lại.

Tốt nhất là gộp không quá hai mươi mẫu phân động vật.

9.1.1.7 Bụi

Mẫu này thường liên quan đến vi khuẩn *Salmonella* hoặc các sinh vật ổn định khác nhưng không liên quan đến vi khuẩn *Campylobacter*.

Kiểm tra ít nhất 10 g bụi. Với tỉ lệ mẫu và môi trường tăng sinh sơ bộ 1:20 là thuận lợi để phát hiện *Salmonella* trong các mẫu hấp thụ rất khô như bụi. Các mẫu bụi lớn phải được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm bằng cách trộn với dung dịch pha loãng theo tỉ lệ 1:4, sau đó lấy một mẫu con rồi pha loãng trong môi trường tăng sinh sơ bộ theo tỉ lệ 1:5, đảm bảo có ít nhất 10 g mẫu ban đầu. Các mẫu lớn đến 25 g có thể được cấy luôn mà không cần lấy mẫu con.

Để hạn chế việc xử lý bụi trong phòng thử nghiệm và giảm nguy cơ lây nhiễm chéo, nên thu gom bụi cần phân tích trong túi hoặc bình đủ lớn để cho lượng/số lượng môi trường cần thiết trong phòng thử nghiệm. Bụi nhỏ cần được xử lý trong tủ thông khí phân tầng.

9.1.1.8 Nước

Có thể cho các thể tích nước nhỏ (ví dụ 100 ml) vào một thể tích tương tự của môi trường nuôi cấy nồng độ kép. Cho nước vào vật chứa có kích thước thích hợp, bổ sung môi trường theo tỉ lệ đã được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể và trộn.

Đối với các thể tích nước lớn hơn lấy từ hệ thống cấp nước: lọc mẫu qua màng lọc cỡ lỗ 0,45 µm (đối với vi khuẩn *Campylobacter*, lọc qua màng lọc cỡ lỗ 0,20 µm), sau đó nuôi cấy màng lọc. Thể tích nước lọc lớn hơn thì độ nhạy phát hiện cao hơn.

Để biết thêm chi tiết, xem TCVN 9716 (ISO 8199).

9.1.2 Động vật trong trại chăn nuôi

9.1.2.1 Yêu cầu chung

Tốt nhất nên thực hiện trong phòng mổ riêng hoặc nếu không có thì nên thực hiện phòng hoặc các khu vực dành riêng cho việc giết mổ.

9.1.2.2 Gia cầm

Quá trình phân lập vi khuẩn từ nội tạng gia cầm cần đặc biệt chú ý đến nguy cơ lây nhiễm chéo và cần mổ lấy các bộ phận cần phân tích. Việc mổ xẻ phải được thực hiện cẩn thận để tránh lây nhiễm chéo, đặc biệt là tránh phát tán lông tơ hoặc lông. Các bề mặt như bàn hoặc bàn mổ phải được khử trùng kĩ giữa các lần thực hiện. Tốt nhất nên sử dụng các tấm lót bàn thí nghiệm thích hợp riêng.

Các quy trình dưới đây thường được sử dụng để phát hiện *Salmonella*.

9.1.2.2.1 Gà con từ một đến ba ngày tuổi

Lấy vô trùng gan và noãn hoàng của 60 con gà con cho vào các túi chất dẻo hoặc vật chứa vô trùng đủ lớn để tiếp tục đồng hóa và pha loãng phần mẫu thử.

Lấy ra toàn bộ manh tràng cùng lượng chứa trong manh tràng của 30 con gà cho vào các túi chất dẻo hoặc các thùng vô trùng đủ lớn để tiếp tục đồng hóa và pha loãng phần mẫu thử.

Đảm bảo rằng các lượng chứa trong manh tràng được đưa ra hết trước khi pha loãng, ví dụ: bằng cách bóp phía ngoài túi nhu động hoặc cắt ruột bằng kéo.

9.1.2.2.2 Gia cầm trên ba ngày tuổi

Lấy vô trùng các cơ quan nội tạng hoặc các phần hoặc các lượng chứa của các cơ quan nội tạng (gan, lách, buồng trứng, ống dẫn trứng, manh tràng). Gộp các mẫu manh tràng lấy từ 30 con hoặc các mẫu khác lấy từ 60 con. Cẩn thận lấy phần trên của ống dẫn trứng cùng buồng trứng. Không trộn các mẫu manh tràng với các cơ quan khác. Sử dụng các túi chất dẻo hoặc các vật chứa vô trùng đủ lớn để tiếp tục đồng hóa và pha loãng phần mẫu thử.

9.1.2.3 Các vật nuôi khác (lợn, bò, cừu, ngựa, v.v...)

Toàn bộ thân thịt hoặc các cơ quan nội tạng và các vật chất sinh học được lấy từ xác động vật tại trại chăn nuôi hoặc cơ sở giết mổ có thể được gửi đến phòng thử nghiệm. Không nên tiếp nhận toàn bộ thân thịt nếu phòng thử nghiệm không có phòng mổ xác chuyên dụng.

Các cơ quan nội tạng được sử dụng để phân tích thay đổi tùy thuộc vào các loài vi sinh vật cần phát hiện/định lượng

9.2 Các quy trình thực hiện trên mẫu được lấy từ cơ sở giết mổ

9.2.1 Lợn

9.2.1.1 Các mẫu manh tràng

Khử trùng bề mặt manh tràng bằng chất khử trùng thích hợp (như đã nêu trong 6.2.4 của TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007) hoặc tiệt trùng bằng sắt nung đỏ hoặc ngọn lửa. Sử dụng các thiết bị vô trùng để tạo một vết mổ và loại bỏ một mẫu, thường từ 10 g đến 25 g bề mặt bằng thìa hoặc dao trộn vô trùng. Cho mẫu vào vật chứa vô trùng. Tiếp tục thực hiện theo quy định trong 9.1.1.5.

Có thể gộp năm mẫu manh tràng riêng rẽ.

9.2.1.2 Lượng chứa trong manh tràng hoặc trực tràng

Xem 9.1.1.6.

9.2.1.3 Hạch bạch huyết màng treo ruột (ruột tịt, đuôi, hồng tràng đầu gần hạch bạch huyết màng treo ruột)

Loại bỏ phần mỡ dính và mô liên kết ra khỏi bề mặt hạch bạch huyết. Khử trùng bề mặt của từng hạch bạch huyết cẩn thận bằng ngọn lửa hoặc nhúng chìm trong chất khử trùng thích hợp và để khô. Dùng kéo hoặc dao mổ và kẹp vô trùng cắt thành các miếng nhỏ, cân và cho vào vật chứa vô trùng. Làm mềm các hạch bạch huyết bằng cách đập túi chất dẻo vô trùng bền chắc có chứa mẫu hoặc sử dụng cát vô trùng, chà và cối.

Bổ sung 9 ml dung dịch pha loãng thích hợp vào mỗi gam mẫu thử.

9.2.1.4 Amidan

Khử trùng bề mặt của amidan bằng cách ngâm trong nước sôi hoặc trong dung dịch khử trùng thích hợp và để khô. Sử dụng kéo hoặc dao mổ và kẹp vô trùng cắt thành các miếng nhỏ hoặc làm mềm, cân rồi cho vào vật chứa vô trùng. Cho 9 ml dung dịch pha loãng thích hợp vào một gam mẫu thử.

9.2.2 Động vật nhai lại, ngựa, thỏ và các vật nuôi lấy thịt khác

9.2.2.1 Lượng chứa trong manh tràng hoặc trực tràng

Xem 9.1.1.6.

9.2.2.2 Hạch bạch huyết màng treo ruột (manh tràng, đuôi, hồng tràng ở gần hạch bạch huyết màng treo ruột)

Xem 9.2.1.3.

9.2.3 Gia cầm

9.2.3.1 Lượng chứa trong manh tràng

Gộp lượng chứa của 30 manh tràng như sau:

Dùng kéo vô trùng, cắt các manh tràng còn nguyên vẹn và trộn toàn bộ lượng chứa trước khi lấy phần mẫu thử.

Cách khác: dùng kéo vô trùng cắt một manh tràng còn nguyên vẹn của một con gia cầm. Sử dụng vòng bơm 10 µl hoặc tăm bông vô trùng chuyển một phần các lượng chứa trong manh tràng vào ống có chứa một thẻ tích nhỏ dung dịch pha loãng (đến 5 ml). Lặp lại quy trình này để gộp các mẫu còn lại. Trộn kỹ mẫu đã gộp.

9.2.3.2 Manh tràng bao gồm cả đoạn nối ruột tịt

Quy trình này thường chỉ áp dụng cho *Salmonella* ở gia cầm lấy thịt và nuôi đẻ.

Có thể gộp 30 manh tràng của các gia cầm khác nhau. Khử trùng bề mặt của từng manh tràng bằng ngọn lửa rồi cắt manh tràng thành nhiều miếng bằng kéo vô trùng. Cân và cho 9 ml dung dịch pha loãng vào mỗi gam mẫu.

9.3 Quy trình đối với các mẫu được lấy từ gia cầm tại trại giống hoặc khi vận chuyển từ trại giống đến trại chăn nuôi

Các mẫu này được lấy chỉ để phát hiện *Salmonella*. Có thể sử dụng phương pháp cụ thể nêu trong TCVN 4829 (ISO 6579).

9.3.1 Lốp lót lồng ấp

Cho vào túi chất dẻo vô trùng ít nhất năm lớp lót trên một ổ để có được ít nhất 1 m² diện tích bề mặt, bổ sung từ 1 lít đến 2 lít môi trường tăng sinh sơ bộ đã được làm ấm trước đến nhiệt độ phòng (hoặc tốt nhất là đến 37 °C vì thể tích của dung dịch pha loãng lớn).

9.3.2 Vỏ trứng vỡ

Nghiền nát và trộn đều mẫu vỏ trứng sau đó bổ sung môi trường tăng sinh sơ bộ với độ pha loãng thập phân, ví dụ: lấy phần mẫu thử 25 g và bổ sung 225 ml môi trường tăng sinh sơ bộ.

9.3.3 Lông tơ trong lồng ấp

Để tránh việc xử lý lông tơ trong phòng thử nghiệm và hạn chế nguy cơ lây nhiễm chéo, nên thu một lượng lông tơ cần phân tích vào các túi hoặc các bình đủ lớn để bổ sung thể tích hoặc khối lượng môi trường cần thiết trong phòng thử nghiệm hoặc trong các bình cho phép chuyển toàn bộ mẫu thử mà không làm phát tán lông tơ.

9.3.4 Phân su

Thông thường phòng thử nghiệm nhận được phân su của 250 con đến 300 con gà con. Bổ sung một lượng/số lượng môi trường thích hợp theo tỉ lệ từ 1 đến 9.

9.3.5 Mẫu lấy tại các lồng ấp

Tiến hành theo 9.1.1.1 (dùng miếng gạc vải).

9.3.6 Mẫu chất thải ướt tại nơi ấp trứng

Tiến hành như đối với các mẫu vỏ trứng vỡ (9.3.2) hoặc đối với các mẫu lấy bằng miếng gạc vải (xem 9.1.1.1), nếu sử dụng để lấy mẫu.

9.3.7 Phôi chết trong vỏ

9.3.7.1 Trứng đã ấp có vỏ nguyên vẹn

Lượng chứa bên trong trứng phải được lấy vô trùng. Vỏ được tiệt trùng bằng cách ngâm trong nước sôi từ 2 s đến 5 s hoặc ngâm trong dung dịch khử trùng thích hợp từ 1 min đến 2 min, đảm bảo rằng trứng và chất khử trùng ở nhiệt độ môi trường để tránh sự hấp thu chất khử trùng. Sau khi khử trùng, để trứng khô, bóc vỏ và kiểm tra các lượng chứa bên trong.

- Nếu có phôi đã phát triển thì các mẫu này phải được chuẩn bị giống như gà con từ một đến ba ngày tuổi (xem 9.1.2.2.1).
- Nếu phôi chưa phát triển thì có thể gộp lượng chứa trong 30 quả trứng vào túi chất dẻo hoặc vật chứa đủ lớn vô trùng để tiếp tục đồng hóa và pha loãng phần mẫu thử.

Một vài quả trứng không có phôi phát triển có thể chứa một lượng lớn các vi khuẩn đích (*Salmonella*) mà không bị nhiễm bản thứ cấp hoặc không có sinh vật liên quan. Các chất đồng nhất có thể được kiểm tra bằng cách cấy đĩa trực tiếp và tăng sinh hoặc chỉ tăng sinh.

Khi kiểm tra bằng phương pháp tăng sinh, pha loãng các mẫu trong một thể tích môi trường thích hợp (tỉ lệ từ 1 đến 9).

9.3.7.2 Trứng đã ấp bị vỡ vỏ

Đây là các quả trứng bị rỗng khí: vỏ trứng không còn nguyên vẹn, khi vỏ đã bắt đầu vỡ nhưng gà không chui ra khỏi vỏ.

Không cần thiết khử trùng bên ngoài vỏ. Lượng chứa bên trong trứng được chuẩn bị theo cùng một cách như gà con từ một đến ba ngày tuổi (9.1.2.2.1).

9.3.8 Gà loại

Xem 9.1.2.2.1.

10 Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4829 (ISO 6579), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella trên đĩa thạch.*
- [2] TCVN 9716 (ISO 8199), *Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy.*
-