

trại chăn nuôi Phương pháp kiểm tra vệ sinh

*Farms for feeding domestic animals
Methods for hygenic control*

TCVN 5376-1991 Trung tâm chẩn đoán Thú y Quốc gia biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn-Đo lường-Chất lượng đề nghị và được Ủy ban Khoa học Nhà nước ban hành theo quyết định số 343/QĐ ngày 11 tháng 6 năm 1991

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp kiểm tra vi sinh vật trong không khí, nước, ký sinh trùng và vi sinh vật trong đất của các trại chăn nuôi.

1. Kiểm tra vi sinh vật trong không khí

1.1. Các loại vi sinh vật cần kiểm tra

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí
- Vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm
- Vi sinh vật chỉ điểm vệ sinh

1.2. Điểm kiểm tra

a) Đối với chuồng trại : Kiểm tra ngẫu nhiên ở mỗi loại chuồng (giồng, thịt....) 1 gian theo quy định sau :

- Chuồng nuôi gia cầm : 1 gian
- Chuồng nuôi lợn : 1 gian
- Chuồng nuôi đại gia súc : 1 gian

b) Đối với diện tích không phải là chuồng trại: Kiểm tra ngẫu nhiên các “khu kiểm tra” (100m²) trên các sân chơi, khu vực vật nuôi hay đi lại, hoặc khu chế biến thức ăn theo quy định sau:

<u>Diện tích</u>	<u>Số “khu kiểm tra”</u>
Đến 200m ²	1
Trên 200 đến 500m ²	2
Trên 500 đến 1000m ²	3
Trên 1000m ²	4

c) Mỗi gian hoặc mỗi khu kiểm tra, xác định 5 điểm đặt mẫu nằm trên đường chéo của nền chuồng hoặc khu đất cần kiểm tra theo hình vẽ.

d) Tại mỗi điểm kiểm tra đặt 3 mẫu để xác định các loại vi sinh vật theo mục 1.1.

1.3. Tiến hành kiểm tra

1.3.1. Dụng cụ và môi trường

- Hộp lồng vô trùng bằng thủy tinh
- Hộp kín vô trùng
- Tủ ẩm điều chỉnh được 28' và $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Các dụng cụ kiểm tra vi sinh vật thông thường khác
- Môi trường thạch thường
- Môi trường thạch máu
- Môi trường thạch Sabouraut

1.3.2. Đặt mẫu

- Tại mỗi điểm đã xác định, đặt 3 hộp lồng chứa 3 môi trường thạch thường, thạch máu và thạch Sabouraut.
- Tùy theo mật độ bụi dự đoán có trong không khí để quyết định thời gian mở nắp hộp lồng theo các hệ số sau:
 - Hệ số là 1: Thời gian mở nắp là 5
 - Hệ số là 2: Thời gian mở nắp là 10
 - Hệ số là 3: Thời gian mở nắp là 15
- Chú ý các điểm kiểm tra trên diện tích ngoài chuồng trại cần tránh ánh sáng trực xạ của mặt trời.

1.3.3. Xử lý mẫu

- a) Các hộp mẫu sau khi đậy nắp, để vào hộp kín vô trùng và chuyển về nuôi tại phòng thí nghiệm.
- b) Chuyển các hộp chứa môi trường thạch thường và thạch máu vào tủ ẩm 37°C trong 24 giờ, các hộp chứa môi trường Sabouraut vào tủ ẩm 28°C trong 7 đến 10 ngày.

1.3.4. Tính kết quả

- a) Tính tổng số vi sinh vật hiếu khí trong 1m^3 không khí theo các bước :
 - Đếm số khuẩn lạc điển hình mọc trong hộp lồng chứa môi trường thạch thường. Số khuẩn lạc (A) của vi sinh vật hiếu khí trong một hộp lồng là trung bình cộng của 5 hộp đặt tại 5 điểm kiểm tra.

Tính tổng số vi sinh vật hiếu khí (X) trong 1m^3 không khí theo công thức :

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{S \times K}$$

Trong đó :

- A : Số khuẩn lạc trung bình của 5 hộp lồng;
- S : Diện tích đĩa thạch, cm^2 ;
- K : Hệ số thời gian (1, 2 hoặc 3);

100 : Diện tích quy ước, cm²;

100 : Hệ số tính chuyển thành m³;

b) Phát hiện vi sinh vật gây bệnh.

- Nhận biết các khuẩn lạc gây bệnh truyền nhiễm trong các hộp lồng chứa thạch máu theo các đặc điểm điển hình sau:

Vi khuẩn *Pasteurella* : Khuẩn lạc thể S, bóng láng hơi lồi.

Vi khuẩn *Erysipelothrix* : Khuẩn lạc thể S nhỏ, trong như giọt sương.

Vi khuẩn *Salmonella* : Khuẩn lạc màu trắng đục, to hơn khuẩn lạc tụ huyết trùng, không dung huyết.

- Xác định các vi sinh vật gây bệnh trên bằng phản ứng kháng huyết thanh đặc hiệu theo TCVN 4829-89; và các quy định hiện hành.
- Xác định độc lực của vi sinh vật gây bệnh bằng thử phản ứng trên động vật thí nghiệm theo quy định hiện hành.

c) Phát hiện vi sinh vật chỉ điểm vệ sinh

- Phát hiện *Protéus* và *Ecoli* theo TCVN 4883-89, phát hiện *Welchi* theo TCVN 4991-89.
- Nếu có các loại vi sinh vật trên chứng tỏ không khí đã bị nhiễm bẩn.

2. Kiểm tra vi sinh vật trong nước.

2.1. Các loại vi sinh vật cần kiểm tra theo mục 1.1 của tiêu chuẩn này.

2.2. Lấy mẫu: Tại các nguồn nước trong trại, lấy ngẫu nhiên 100ml nước cho vào lọ vô trùng, nút mài theo quy định sau:

- Nước giếng: Lấy dưới lớp nước mặt khoảng 30cm
- Nước ao, hồ, sông: Tùy theo diện tích của ao, hồ mà xác định điểm lấy mẫu cách bờ từ 1 đến 5m, sâu khoảng 30cm.
- Nước máy: Lấy ngẫu nhiên khi vòi nước đang chảy.

2.3. Tiến hành kiểm tra

2.3.1. Dụng cụ và môi trường

- Lọ 100ml có nắp đậy kín đã được sấy hấp vô trùng
- Quang treo vô trùng dùng để đựng lọ khi lấy mẫu nước từ xa
- Môi trường thạch thường
- Môi trường thạch máu
- Môi trường SC TCVN 4881-89 để tìm *Cl. Perfringens*
- Môi trường VRBL TCVN 4883-84 để số E. Coli

2.3.2. Xử lý mẫu

2.3.2.1. Tìm tổng số vi khuẩn

- Mẫu nước được pha loãng bằng nước cất vô trùng theo tỷ lệ 1/10; 1/100; 1/1000 tùy theo độ bẩn của nước.
- Lấy 1ml nước pha loãng láng đều trên mặt đĩa thạch thường và thạch máu (một mẫu nước dùng 2 đĩa thạch) để ủ ấm 37°C trong 24 giờ.

- Tính toán kết quả
- Đếm tổng số khuẩn lạc trên đĩa thạch nhân với độ pha loãng sẽ là tổng số vi khuẩn trong 1ml nước (X).

Thí dụ:

- Đĩa thạch 1 pha loãng 1/100 có 13 khuẩn lạc
- Đĩa thạch 2 pha loãng 1/10 có 170 khuẩn lạc

Tổng số vi khuẩn trong 1ml mẫu (X_1) được xác định theo công thức:

$$X_1 = \frac{(13 \times 100) + (170 \times 10)}{2} = 1500 \text{ vi khuẩn}$$

2.3.2.2. Phát hiện vi sinh vật gây bệnh

Nhận xét các khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh và chỉ điểm vệ sinh theo các đặc điểm nêu trong mục (b) và (c) điều 1.3.4.

3. Kiểm tra vi sinh vật và ký sinh trùng trong đất

3.1. Các loại vi sinh vật và ký sinh trùng cần kiểm tra

- Vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm
- Vi sinh vật chỉ điểm vệ sinh
- Trứng của hệ ký sinh trùng đường tiêu hoá

3.2. Điểm kiểm tra

Các điểm kiểm tra đất theo quy định trong điều 1.2.

3.3. Tiến hành kiểm tra

3.3.1. Dụng cụ và môi trường

- Lọ 100ml vô trùng
- Xẻng xúc đất
- Các dụng cụ kiểm tra vi sinh vật thông thường
- Các dụng cụ kiểm tra trứng ký sinh trùng
- Môi trường thạch thường
- Môi trường thạch máu và Mackonkey
- Môi trường nước thịt và gan yếm khí
- Môi trường S.C và VRBL.

3.3.2. Lấy mẫu

- Dùng xẻng đào 100g đất lớp trên mặt và 100g đất sâu dưới 10cm.
- Đất mẫu được để vào lọ vô trùng đem về phòng thí nghiệm

3.3.3 Kiểm tra ký sinh trùng

3.3.3.1 . Tìm trứng các loại giun tròn theo phương pháp Fiilleborn

a) Chuẩn bị dung dịch nước muối bão hoà.

1 lít nước + 400g muối ăn (đun sôi, lọc qua gạc, khi nguội dưới đáy phải có muối kết tinh).

b) Cho khoảng 5 đến 10 g đất ở trên mặt vào một cốc thủy tinh (dung tích từ 50 đến 100ml). Đổ nước muối bão hòa cho đầy, khuấy đều. Hớt các cặn bã ở trên đi, để lắng khoảng 30 phút. Lấy một cái vòng dây thép (có cán để cầm) đường kính từ 0,5 đến 1cm. Để chạm nhẹ vòng dây thép vào mặt nước, lấy cái màng nước trong vòng thép cho lên phiến kính, đặt lá kính và kiểm tra trên kính hiển vi.

3.3.3.2 . Tìm trứng các loại sán lá, sán giây theo phương pháp rửa sạch.

Lấy khoảng 10g đất lớp đất ở trên mặt cho vào một cốc tam giác 250ml. Đổ 100ml nước sạch vào, lấy đũa thủy tinh khuấy cho tan đều rồi để lắng cặn. Đổ nước ở trên đi và cho nước khác vào khuấy đều rồi lại để cho lắng cặn. Làm nhiều lần cho đến khi nước ở trên trong. Đổ nước đi, dùng ống hút lấy cặn để kiểm tra.

3.3.3. Kiểm tra vi khuẩn.

Lấy nước cát vô trùng pha loãng đất theo tỷ lệ 1/10, cấy vào các môi trường kiểm nghiệm:

- Thạch máu 1 đĩa
- Thạch Mackonkey 1 đĩa
- Nước thịt canh thang 2 ống
- Nước gan yếm khí 2 ống

Để vào tủ ấm sau 24 giờ lấy ra xem khuẩn lạc trên thạch đĩa. Nhận biết và thử phản ứng sinh hoá các loại vi khuẩn gây bệnh và chỉ điểm vệ sinh theo các mục (b) và (c) điều 1.3.4.

Phụ lục
Pha chế các môi trường kiểm nghiệm

1. Môi trường thạch thường

- Nước thịt đã pha chế 1000ml
 - Na tri clorua tinh khiết 5g
 - Agar bột 25g
 - Hộp petri $\phi = 9 \text{ cm} \pm 0,1$
- Mỗi hộp đổ 12ml thạch đun chảy

2. Môi trường thạch máu

- Thạch thường
- Máu thỏ hay máu cừu vô trùng
- Đun chảy thạch thường, để nguội 40°C . Pha thêm máu thỏ (hoặc máu cừu) theo tỷ lệ 10%, lắc đều đổ vào các hộp petri như thạch thường).

3. Môi trường Sabouraut

- Agar bột 20g
- Clucoza 20g
- Pepton 10g
- Nước cất 1000ml

Pha chế như thạch thường, đun chảy, đổ vào các hộp petri.

4. Môi trường VRBL

- Pepton 7g
- Cao men 3g
- Lactoza 10g
- Natri clorua 5g
- Muối mật 1,5g
- Đỏ trung tính 0,03g
- Crystal violet 0,002g
- Nước cất 1000ml
- Agar bột 9 đến 18g

5. Môi trường thạch S.C

- Tryptoza 15g
- Soyton 5g
- Chất chiết men 5g
- Natri disulfite khan ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 1g
- Agar 12 đến 18g
- Nước cất 1000ml.