



CHICK
PROGRAM

第9期/2013年5月

保障孵化质量的微生物学监测：之采样方法

Vincent TURBLIN 博士，诗华动物保健公司亚太地区家禽部区域市场副经理，雪兰莪州，马来西亚

为了检查孵化场卫生、消毒方案效果的稳定性和持续性，应定期进行全面评估，一旦有必要，可以立即加以改进。事实上，种蛋和1日龄雏鸡的污染可能源于种鸡场，也可能发生在种蛋存储以及孵化过程中。这种的例行监测至少应采集孵化场空气和一些物体表面。日常监测所获得的数据，会使我们在发现问题时能够更好地进行回顾和诊断。如果发生某些需要特殊解决的问题，可使用更加深入和更加准确的方法，例如，种蛋清洗、对雏鸡采样和分离细菌的进一步鉴定等。



图1 被细菌污染的种蛋

1 在对环境采样前需要准备的工作

负责监测的工作人员应按照下列步骤进行：

- 画出一幅采样流程图和孵化场内部流程图；
- 确定监测的目标微生物或危害；
- 确定关键控制点；
- 确定采样地点；
- 安排实验室工作人员准备无菌设备和无菌试验材料；
- 根据采样地点确定采集材料并做好记录。

如需获得关于孵化场清洁和消毒效果的信息，建议在完成清洁和消毒程序后立即进行采样。

如需获得关于孵化场微生物状况和生物安全方面的信息，建议不要在消毒后立即进行采样。

2 如何对孵化场空气进行采样？

主要有两种方法：



鸡计划

CHICK PROGRAM

最常用的就是“空气平皿”法。这种方法主要用于孵化场的走廊、种蛋贮藏室、出雏室、孵化器和出雏器。平皿底部应标记采样的地点。将装有特定培养基的培养皿暴露于空气中，小心翼翼地将平皿（在底部放置培养基）置于一平整表面。培养基暴露于空气中时间的长短取决于该采样点的污染程度。某些时候，当需要对不同时间段进行比较时，暴露的时间应该一致。如果采样地点污染相对较轻，如孵化器、走廊或清洁过的孵化器，暴露时间建议为10分钟。



图2 “空气平皿”法采样

某些空气采样的机器[如Anderson空气采样器/RCS单位或OMNI3000便携式采样器（见下图）]，一般由电池供电，且可设定一定量的空气通过琼脂孔，这使得操作人员能够评估污染水平。标准的时间为1分钟，可根据采样种类选择琼脂培养基类型。



图3 OMNI3000便携式采样器

左：接触器

右，从上到下：排气过滤器，液体袋，样品柱，排气管

3 如何对平整的物体表面进行取样？

该方法适用于清洁并干燥后的孵化器墙壁、蛋架、出雏盒或风机页片。和平常一样，所有平皿（平皿的半部分装有培养基）必须在底部做标注，以标明监测表面的类型和地点。



鸡计划

CHICK PROGRAM

拭子法适用于在任何表面积超过1或2平方英寸（1平方英寸=6.4516 cm²，译者注）物品的表面采样。超过1 m²的墙壁和地板首选用布条采样，末端裹有纺织物的拭子和海绵适用于设备或其他小接触面的物体（100 cm²）。用无菌溶液湿润拭子或制备好的湿润拭子轻轻擦过采样物体表面，然后用该拭子轻轻划过平皿培养基表面几次，画成锯齿状。如果样品需要运输到他处（需送检，译者注），应将预先湿润的拭子、布条或海绵一一分装，且所用容器内不能有残留的液体。

注：使用两个拭子进行对照是一种非常好的方法。



图4 对平整物体表面进行采样

对物体表面采样的另一种方法是采用RODAC（琼脂直接接触微生物培养法）接触平皿。实际上，这种平皿推荐用于对平整、无渗透性的表面进行采样；Petrifilm™推荐用于对不规则表面进行采样。

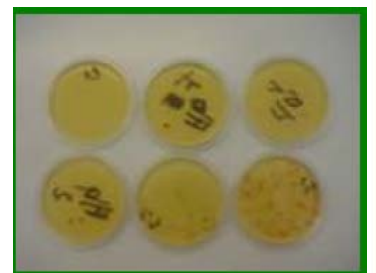


图5 用拭子在琼脂表面上画成锯齿状

→ Rodac平皿法（RODAC平皿覆盖的表面积大约为25cm²）

- 佩戴无菌手套，打开装有RODAC平皿的袋子，并取出一个RODAC平皿。RODAC平皿的琼脂应稍高于平皿边际。
- 移除塑料盖，并小心翼翼地用琼脂表面接触采样物体表面并轻压。
- 通过向平皿底部均衡施压，确保整个琼脂表面都充分接触到了需要采样的区域。
- 盖好盖子，每5~10个一摞，并用胶带固定。
- 将平皿置于Whirlpak™包或其他适当的容器内。
- 在送往实验室途中，使用密封袋密封并小心持拿。

注意：由于对可能因采样造成污染的担心，在采样之后，应使用无菌湿布或消毒剂（如70%酒精）擦拭已采样的表面。

→ Petrifilm™ 法（RODAC平皿覆盖的表面积大约为20cm²）

- Petrifilm平皿必须在使用前由实验室工作人员恢复湿度。
- 佩戴无菌手套，揭开Petrifilm™平皿表面的薄膜（凝胶会附着在薄膜上）。



CHICK PROGRAM

- 凝胶（附着在顶部薄膜上的凝胶，而不是附着在平皿底部的凝胶）必须置于欲检测的表面并与之接触。
- 不要用手指接触生长区和底部纸板，或用脚踩踏未经采样的表面。
- 在整个附着有琼脂薄膜背侧的整个表面上用手指摩擦，以确保与采样表面接触良好。
- 从采样表面揭开薄膜，使Petrifilm™的顶部和底部薄层重新结合。

注意：有时在揭开上层膜时，琼脂会裂开（Petrifilm™顶部和底部均附着有凝胶），裂开的凝胶不影响产品的性能，应按上述说明使用。

4 如何对液体采样？

应向无菌琼脂平皿中滴加0.5~1 mL被检液，然后用无菌拭子或无菌“L”形玻璃棒，将被检液均匀涂布于培养基表面。培养基表面过多的水分应置于保温箱中两小时使之干燥。同样，非常有必要在平皿底部标注以区别监测的物质。

5 如何对软毛状物体和其他固体取样？

第一步，无菌操作称取一定量欲检固体后，用无菌生理盐水稀释10倍。必须尽力摇晃或漩涡搅拌至少30秒，以使溶液非常均匀（1 mL母液加入到9 mL无菌生理盐水中，制成10%的稀释液）。

除10%溶液外，按同样方法制得0.01%、0.1%和1%的溶液。用1 mL移液管取1 mL每种稀释液，滴入每个培养皿，并用无菌“L”形玻璃棒均匀涂布于培养基表面。同样，在将该平皿放入适当位置之前，通过此方法浸湿的培养基应在保温箱中干燥两小时，使平皿培养基干燥。

6 对蛋壳表面采样

来自种鸡场的种蛋表面一定会被细菌污染，这就是为什么在种鸡场和运抵孵化场后要立即用化学品（如福尔马林）对种蛋消毒以尽可能降低污染的原因所在。

因此，蛋壳表面微生物监测对评估生产过程的有效性非常有帮助，当我们实施死胚检查程序时如发现不正常的污染问题需要即时考虑对种蛋进行微生物检测。

表1 种蛋表面的菌落数量

	蛋品质	每个种蛋上的菌落数量
	新产种蛋	300以上
	清洁蛋	3000以上
	地面蛋	2.5万以上
	脏蛋	40万以上



CHICK PROGRAM

6.1 监测蛋壳表面的常用方法之一是在平皿内琼脂表面滚动种蛋。在采用该方法时，首先将平皿盖取下置于清洁的表面。应用手指尖持拿种蛋，并用未接触手指的蛋壳表面在培养基表面滚动。应按这种方式滚动两次，然后轻轻盖好平皿盖。这种方法可用作普查试验，但不能和下文讲到的方法一样用于准确的微生物计数。



图6 平皿内琼脂表面滚动种蛋

6.2 测定蛋壳表面污染水平更定量化的方法是一种被称作“整蛋清洗”的方法。用干净纸巾拿起种蛋，将其置于装有 20 mL 无菌生理盐水的无菌whirl-pack袋中。然后用蛋轻轻摩擦whirl-pack袋1分钟，之后静置1分钟，然后再摩擦1分钟。注意在取出种蛋时要避免其它的对洗蛋液的污染。

然后分别向相应培养基接种0.1和1 mL洗蛋液来进行霉菌或细菌计数。和平常一样，洗蛋液应使用无菌拭子或无菌“L”形玻璃棒均匀涂布于培养基表面，平皿应在恒温箱中孵育两小时，以使多余的水分浸入培养基。有必要谨记，例行监测蛋壳表面污染时，了解微生物菌群数量随时间变化的趋势要比鉴定是何种微生物来得重要。应计算平皿上的菌落数，并根据稀释倍数（1：20和1：200）校正，并记录。

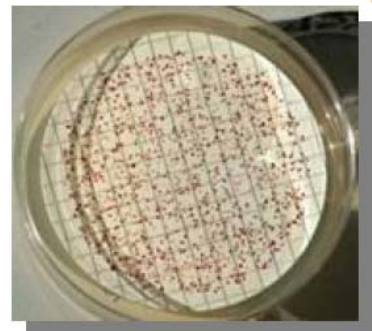


图7 对洗蛋法的采样进行细菌计数

6.3 无菌胶带条也可用于代替上述方法。可将胶带（1.8 cm×1.6 cm）贴在蛋壳表面，并小心翼翼地揭下来，然后在琼脂平板上做一次按压。两个粘贴种蛋的胶带按压即可充分评估蛋壳表面的细菌总数。然而，使用胶带法获得的细菌计数，趋向于比使用洗蛋法获得的细菌计数低。

7 对雏鸡采样

应通过对1日龄雏鸡的微生物指标的分析对种鸡群进行间接监测。基于此，首先选取10只雏鸡断髓致死。为防止气源性污染，只有在将雏鸡在用水和消毒剂打湿后，才能剖开腹腔。完成此步骤后，用无菌的湿拭子插入卵黄囊，然后在卵黄囊内转动。该方法的最后一步是，非常小心地取出浸满卵黄的拭子，然后，用拭子在琼脂平板表面画成条纹状，以使采样雏鸡携带的细菌能够生长。同时，还要避免任何外源污染，在画完条纹后应立即小心地将平皿盖盖好。

8 结论

在孵化场对微生物监测程序定期评估是很最重要的步骤。必须确保所有的结果记录在案，并能够随时察觉到发生的任何异常。因此，采样方法在实施之前必须进行良好规划，而且必须遵循所有的步骤，并记录样品的相关识别标志。然后，把检测地点的监测结果与最终的孵化率和雏鸡成活率数据进行比对。



CHICK PROGRAM

在下一期，我们将对实行此类微生物监测所需的材料和实验室方法进行讨论。实际上，在对既定目标消毒后，无论是上述的哪个方面，所监测到的微生物水平应不超过20个菌落数。根据目前卫生状况和孵化场的结构，应以渐进性的方式通过一段时间的努力来达到标准。超标的菌落数量反映出消毒方法效果不佳，或种蛋生产过程出现的问题。通过检测越早期的发现问题，可最大程度地减少雏鸡的质量问题，雏鸡的质量对肉鸡生产性能有极其重要的意义。