

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2838—2015

---

## 禽沙门氏菌病诊断技术

**Diagnostic techniques of avian salmonellosis**

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

---

**中华人民共和国农业部** 发布

青岛立见诊断技术发展中心 提供下载 [www.qdregen.com](http://www.qdregen.com)

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:扬州大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:陈素娟、魏荣、彭大新、杨林、陈继明。

# 禽沙门氏菌病诊断技术

## 1 范围

本标准规定了禽沙门氏菌病诊断技术操作规范。  
本标准适用于禽沙门氏菌病的诊断和禽沙门氏菌携带者判定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本文件。

GB 4789.4—2010 食品微生物学检验 沙门氏菌检验  
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法  
SN/T 1222—2012 禽伤寒和鸡白痢检疫技术规范  
世界动物卫生组织(OIE)陆生动物诊断试验和疫苗标准手册(第七版,2012)

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMSO:dimethyl sulfoxide,二甲基亚砷

DNA:deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸

dNTP:deoxynucleoside triphosphate,三磷酸脱氧核苷酸

PCR:polymerase chain reaction,聚合酶链式反应

SPF:specific pathogen free,无特定病原

TBE:trihydroxymethyl aminomethane-borecic acid-ethylene diaminetetra acetic acid,三羟甲基氨基甲烷—硼酸—乙二胺四乙酸

EB:ethidium bromide,溴化乙锭

## 4 培养基和试剂

本方法实验操作中所用各类培养基以及试剂如下:

- a) 除另有规定,本方法实验用水应按照 GB/T 6682 中规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。
- b) 亮绿—胱氨酸—亚硒酸氢钠增菌液、普通营养琼脂、鲜血琼脂、麦康凯琼脂、沙门—志贺菌属(SS)琼脂、去氧胆酸盐枸橼酸盐琼脂、伊红美蓝琼脂和亮绿中性红琼脂的配制,参见附录 A。
- c) 缓冲蛋白胨水(BPW)、四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、亚硫酸铋(BS)琼脂、Hektoen Enteric(HE)琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、三糖铁(TSI)琼脂、蛋白胨水及靛基质试剂、尿素琼脂(pH 7.2)、氰化钾(KCN)培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、糖发酵管、邻硝基酚 $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG)培养基、半固体琼脂和丙二酸钠培养基的配制,见 GB 4789.4—2010 附录 A。
- d) 沙门氏菌 O 和 H 诊断血清。
- e) 生化鉴定试剂盒。
- f) Taq DNA 聚合酶。
- g) 电泳缓冲液(TBE)。
- h) DNA 分子量标准品。

- i) PCR 引物。
- j) 鸡白痢/鸡伤寒多价染色抗原和凝集抗原:见附录 B。
- k) 阳性血清:用标准株和变异株鸡白痢沙门氏菌制成的灭活抗原分别接种 SPF 鸡,采血,分离制得血清。
- l) 阴性血清:SPF 鸡采血,分离制得血清。
- m) 生理盐水。

## 5 设备和器材

本方法实验操作中所用各种设备以及器材如下:

- a) 37℃ 培养箱;玻璃研磨器或组织匀浆机;台式高速离心机;生物安全柜或者超净工作台;振荡混匀器;PCR 扩增仪;电泳仪;电泳槽;紫外凝胶成像系统;水浴锅;2℃~4℃ 冰箱;-20℃ 冰箱。
- b) 酒精灯;玻璃板或白瓷板;剪刀;镊子;灭菌试管;试管架;滴管;一次性注射器等。可调微量移液器一套:0.5 μL~10 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL,12 道可调微量移液器 10 μL~100 μL,及与移液器配套的滴头。1.5 mL PE 管;0.2 mL PCR 管;96 孔 U 型微量反应板。
- c) 工作服;一次性手套;口罩;帽子等。

## 6 临床诊断

### 6.1 总则

当禽出现 6.2 至 6.4 中部分或全部情形时,作为初步诊断的依据之一。

### 6.2 流行病学

不同种类、不同日龄的家禽均可感染沙门氏菌,鸡白痢多见于雏鸡,禽伤寒多见于青年鸡或成年鸡。病禽和带菌禽是本病主要传染源。病原随粪便排出,污染水源和饲料等,经消化道感染。本病还可通过呼吸道感染,也可经蛋垂直传播。鼠类可传播本病。本病发生无季节性,但多雨潮湿季节多发。一般呈散发性或地方流行性,应激因素可促进本病的发生。

### 6.3 临床症状

#### 6.3.1 鸡白痢

##### 6.3.1.1 雏鸡

垂直传播的雏鸡出雏后品质差、发病迅速,1 周内为死亡高峰;出壳后感染的雏鸡,2 周龄~3 周龄为死亡高峰,死亡率可高达 100%。最急性者,无临诊症状迅速死亡。稍缓者,精神不振,嗜睡,开始采食减少或废绝,嗉囊空虚,两翼下垂,绒毛松乱,腹泻,粪便呈石灰样,封肛,发出尖锐叫声,最后因呼吸困难及心力衰竭而死。引起关节炎时,胫跗关节肿胀,跛行。引起全眼球炎时,角膜混浊呈云雾状,失明。耐过鸡生长发育不良,成为慢性病例或带菌者。

##### 6.3.1.2 成年鸡

一般无临诊症状,产蛋量与受精率有所下降。极少数病鸡下痢,产蛋下降甚至停止。有的病鸡因卵黄囊炎引起腹膜炎,腹膜增生出现“垂腹”现象。

#### 6.3.2 禽伤寒

雏鸡和雏鸭发病症状与 6.3.1.1 相似。

青年鸡及成年鸡易感。急性型病鸡突然停食,排黄绿色稀粪,体温升高至 43℃~44℃,拉稀,迅速死亡,死亡率 10%~90%。慢性型可拖延数周,贫血,渐进性消瘦,死亡率低。

#### 6.3.3 禽副伤寒

2 周龄以内的鸡感染呈败血症经过,突然死亡,症状与 6.3.1.1 相似。雏鸭感染后表现为颤抖、喘息及眼睑浮肿。年龄较大的幼禽常取亚急性经过,表现为精神萎靡、闭眼、翅下垂、羽毛粗乱、怕冷、扎

堆、拉稀、脱水、肛门有稀粪，病死率 10%~20%，严重者高达 80% 以上。成年禽一般无临床症状，为隐性带菌。

## 6.4 病理变化

### 6.4.1 鸡白痢

#### 6.4.1.1 雏鸡

急性病例肝脏呈土黄色，有大量灰白色坏死点。卵黄吸收不良，其内容物色黄如油脂状或干酪样。病程稍长者，在心肌、肺、肝、肌胃和其他脏器中可见灰白色坏死结节。有的有出血性肺炎，稍大的病雏，肺有灰黄色结节和灰色肝变。胆囊肿胀。盲肠中有干酪样渗出物堵塞肠腔，有时还混有血液，常有腹膜炎。输尿管充满尿酸盐而扩张。育成阶段的鸡肝肿大，呈暗红色至深紫色，表面可见散在或弥漫性的出血点或黄白色大小不一的坏死灶，质地脆，易破裂，常见有内出血变化，腹腔内积有大量血水，肝表面有较大的凝血块。

#### 6.4.1.2 成年鸡

成年母鸡最常见卵子变形、变色、变质。与卵巢相连的卵子内容物色黄如油脂状或干酪样，卵黄囊增厚。有些卵子经输卵管逆行坠入腹腔，引起广泛的腹膜炎及腹腔脏器粘连。常有心包炎。成年公鸡的睾丸极度萎缩，有小脓肿，输精管管腔增大，充满稠密的均质渗出物。

### 6.4.2 禽伤寒

雏禽病理变化与 6.4.1.1 相似。

成年鸡急性型常见肝、脾、肾充血肿大。亚急性和慢性型表现肝肿大，呈青铜色。肝和心肌有灰白色粟粒状坏死灶，大小不等。脾肿大，可达正常的 2 倍~3 倍，出血，表面有坏死点。小肠出血严重，有时可见溃疡灶。慢性型卵子及腹腔的病理变化与 6.4.1.2 相似。

### 6.4.3 禽副伤寒

#### 6.4.3.1 雏禽

雏鸡卵黄吸收不良和脐炎。肝脏轻度肿大，病程稍长的肝脏充血并有条纹状出血和灰白色坏死灶。盲肠内有干酪样渗出物。有时有心包炎及心包粘连。肠道发生出血性、卡他性炎症。雏鸭肝脏显著肿大或呈青铜色，有灰白色坏死灶。

#### 6.4.3.2 成年鸡

急性型肝、脾、肾充血肿胀，有出血性坏死性肠炎、心包炎，输卵管坏死增生，卵巢坏死化脓，形成腹膜炎。慢性型和带菌者一般无明显病变，有的可见肠道变性、坏死性溃疡，心脏有结节，卵子变形。

## 7 细菌分离培养

### 7.1 样品采集

无菌采集存活禽的新鲜粪便、泄殖腔棉拭样品；病死或带菌禽的肝脏、胆囊、脾脏及其他病变组织，盲肠扁桃体及肠内容物。

### 7.2 样品的保存

样品均放入 4℃ 冰箱内保存，并在 24 h 内送到指定实验室。如果在 24 h 内不能送达的，应将组织块剪碎加入无菌的终浓度为 50% 甘油生理盐水或 15% 二甲基亚砷 (DMSO) PBS，与样本混匀后放 -20℃ 或 -70℃ 冰箱保存。

### 7.3 培养方法

#### 7.3.1 非污染样品

取组织器官和胆囊内容物，无菌条件下在非选择性琼脂平板（普通琼脂平板或鲜血琼脂平板）和选择性琼脂平板（麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、SS 琼脂、去氧胆酸钠-枸橼酸盐琼脂、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆酸钠琼脂、亚硫酸铋 BS 琼脂或亮绿中性红琼脂等）上使用接种环三区划线培养，同时将组织

器官均浆,1:10 的体积接种缓冲蛋白胨水,37℃培养 24 h,之后再按 1:10 的体积转接增菌培养液(四硫磺酸钠煌绿增菌液、亚硒酸盐胱氨酸增菌液或亮绿—胱氨酸—亚硒酸氢钠增菌液),培养 24 h 和 48 h 后,再在选择性琼脂平板传代。

7.3.2 污染样品

将泄殖腔棉拭、新鲜粪便、盲肠扁桃体、肠内容物等样品(非液体性样品先制成匀浆液),按 1:10 的体积接种缓冲蛋白胨水,37℃培养 24 h,之后再按 1:10 的体积转接增菌培养液(四硫磺酸钠煌绿增菌液、亚硒酸盐胱氨酸增菌液或亮绿—胱氨酸—亚硒酸氢钠增菌液),培养 24 h 和 48 h 后,再在非选择性和选择性琼脂平板传代。

7.4 结果判定

各种培养基平板上沙门氏菌的菌落特征见表 1。

表 1 沙门氏菌属在不同琼脂平板上的菌落特征

培养基种类	沙门氏菌的菌落特征
普通营养琼脂	光滑型菌落,一般呈无色、透明或半透明,圆形、光滑、较扁平的菌落,菌落直径 2 mm~4 mm,但鸡白痢、鸡伤寒及猪伤寒等少数菌型菌落细小、生长贫瘠
血琼脂	菌落常为灰白色、不溶血
麦康凯琼脂	菌落呈无色至浅橙色,透明或半透明,菌落中心有时为暗色。鸡白痢沙门氏菌比其他沙门氏菌小
伊红美蓝琼脂	无色至浅橙色,透明或半透明,光滑湿润的圆形菌落
SS 琼脂	无色至灰白色,半透明或不透明,菌落中心有时带黑色
去氧胆酸钠枸橼酸钠琼脂(DC)	菌落呈无色至淡黄色,半透明或不透明,菌落中心有时带黑褐色。鸡白痢沙门氏菌形成很小的,稀疏的红色菌落;鸡伤寒沙门氏菌形成中间有黑点的隆起菌落
HE 琼脂	蓝绿色或蓝色,多数菌落中心黑色或全黑色;有些菌株为黄色,中心黑色或几乎全黑色
亚硫酸铋(BS)琼脂	菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色,菌落周围培养基可呈现黑色或棕色,有些菌株形成灰绿色的菌落,周围培养基颜色不变
木糖赖氨酸脱氧胆酸钠琼脂(XLD)	菌落呈粉红色,带或不带黑色中心,有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心,或呈现全部黑色的菌落;有些菌株为黄色菌落,带或不带黑色中心
亮绿中性红琼脂	菌落粉红色,半透明。鸡白痢沙门氏菌比其他沙门氏菌小

8 细菌生化鉴定

按照 GB 4789.4—2010 中 5.4 的规定执行。

区别鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌的生化特征见表 2。

表 2 鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌的生化试验

试验	鸡白痢沙门氏菌	鸡伤寒沙门氏菌
三糖铁葡萄糖(产酸)	+	+
三糖铁葡萄糖(产气)	V	-
三糖铁乳糖	-	-
三糖铁蔗糖	-	-
三糖铁硫化氢	V	V
葡萄糖产气(Durham 培养管)	+	-
分解尿素	-	-
赖氨酸脱羧作用	+	+
鸟氨酸脱羧作用	+	-
麦芽糖发酵	- ,或后+	+
卫矛醇	-	+
运动性	-	-

注: + ,在 1 d~2 d 有 90% 以上为阳性; - ,90% 以上没有反应; V,有不同的反应。

## 9 细菌血清型鉴定

按照 GB 4789.4—2010 中 5.5 的规定执行。

## 10 鸡白痢/鸡伤寒血清学试验

按照《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》的要求,适用于鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌感染鸡的抗体检测。

### 10.1 快速全血凝集试验

按照 SN/T 1222—2012 第 6 章中的规定执行。

### 10.2 快速血清凝集试验

#### 10.2.1 血清样品的采集

以一次性注射器于家禽翅静脉采血 1 mL~2 mL,斜放凝固析出血清,分离血清,置 4℃ 待检。

#### 10.2.2 操作方法

与快速全血凝集试验相同,以血清代替全血。

#### 10.2.3 结果判定

与快速全血凝集试验相同。

### 10.3 试管凝集试验

#### 10.3.1 操作方法

在试管架上依次摆放 3 支试管,吸取多价抗原 2 mL 置第 1 管,吸取各 1 mL 置第 2、第 3 管。先吸取被检血清 80  $\mu$ L 注入第 1 管,充分混匀后再吸取 1 mL 移入第 2 管,充分混匀后再吸取 1 mL 移入第 3 管,混合后吸出 1 mL 舍弃。最后将试管振摇数次,使抗原血清充分混合,37℃ 温箱孵育 18 h~24 h 后观察结果,同时设阳性和阴性血清对照。

#### 10.3.2 结果判定

如果阳性血清对照呈现阳性结果,而阴性血清对照呈现阴性结果,则检测结果可信。试管 1、试管 2、试管 3 的血清稀释倍数依次分别为 1:25、1:50 和 1:100,凝集阳性者,抗原显著凝集于管底,上清液透明;阴性者,试管呈现均匀浑浊;可疑者,介于前两者之间。在鸡 1:50 以上凝集者为阳性,在火鸡 1:25 以上凝集者为阳性。

### 10.4 微量凝集试验

#### 10.4.1 操作方法

使用 96 孔一次性 U 形反应板,每 1 列为 1 份样本,1 板可同时检测 12 份样本。用 12 道可调微量移液器,在 A 行各孔中加入 90  $\mu$ L 0.85% 生理盐水,其余各孔加入 50  $\mu$ L。用单道微量移液器,将样本 10  $\mu$ L 分别加入到 A 行各孔中。12 道移液器调至 50  $\mu$ L,从 A 行开始,同时将 12 份样本倍比稀释到 H 行,最后 50  $\mu$ L 去掉。每孔中加入 50  $\mu$ L 沙门氏菌凝集抗原,轻轻震荡混匀后,加盖板,放入温箱。将反应板封好,置 37℃ 培养 18 h~24 h 或 48 h,同时设阳性和阴性血清对照。最终稀释度从 A 行到 H 行为 1:20~1:2560。

#### 10.4.2 结果判定

如果阳性血清对照呈现阳性结果,而阴性血清对照呈现阴性结果,则检测结果可信。阳性反应会出现明显的絮状沉淀,上清液清亮;而阴性反应则呈现纽扣状沉淀。滴度为 1:40 通常被认为是阳性,但火鸡血清常出现假阳性反应。

## 11 细菌多重 PCR 鉴定

适用于临床样品中沙门氏菌和培养细菌的快速鉴定。

### 11.1 样品的采集

同 7.1。

### 11.2 基因组 DNA 的提取

在样本制备区进行,有关生物安全和防止交叉污染的措施见附录 C。

使用市售的 DNA 提取试剂盒提取组织、培养物中的 DNA,具体操作参照试剂盒说明。

### 11.3 多重 PCR 反应所用的混合引物

引物 hut - F、hut - R、SE - F、SE - R、SPY - F、SPY - R、SGP - F、SGP - R、SG - F、SG - R 的序列及其特异性参见附录 D。各引物浓度用灭菌双蒸水稀释为 25  $\mu\text{mol/L}$ ,然后等体积混合,每个引物的终浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 11.4 对照样品

多重 PCR 试验中阳性对照样品分别为热灭活的猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、鸡伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌和肠炎沙门氏菌标准株的液体培养物。阴性对照样品为灭菌双蒸水。

### 11.5 多重 PCR 反应体系及反应条件

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系,在 PCR 管中按顺序加入以下成分:

10 × 缓冲液	2.5 $\mu\text{L}$
双蒸水	14.3 $\mu\text{L}$
10 mmol/L dNTPs	0.2 $\mu\text{L}$
25 mmol/L $\text{Mg}^{2+}$	1.5 $\mu\text{L}$
1 U/ $\mu\text{L}$ Taq DNA 聚合酶	1.5 $\mu\text{L}$
混合引物	5.0 $\mu\text{L}$
模板 DNA	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	25.0 $\mu\text{L}$

除模板 DNA,上述组分应在反应混合物配制区进行,模板 DNA 加样在样本处理区进行。

瞬时离心后,置 PCR 扩增仪内进行扩增。同时设阳性对照、阴性对照。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,56 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 11.6 检测与结果判定

#### 11.6.1 产物检测

使用 2% 琼脂糖凝胶在 5 V/cm 的电场强度的 TBE 缓冲液中电泳 1.5 h~2 h。在紫外灯下观察结果。

#### 11.6.2 质量控制

如阳性对照样品扩增出相应大小的片段而阴性对照未扩增出相应大小的片段,则 PCR 反应判定为有效;如阳性对照样品未扩增出相应大小的片段,或阴性对照扩增出相应大小的片段,则反应无效。

#### 11.6.3 多重 PCR 结果判定

阳性对照样品多重 PCR 检测电泳结果参见附录 E。在 PCR 反应有效的前提下,按以下方法进行判定:如果扩增出 495 bp 和 304 bp 大小的两个特异性条带,则判断为肠炎沙门氏菌 PCR 扩增阳性;如果扩增出 495 bp 和 401 bp 大小的两个条带,则判断为鼠伤寒沙门氏菌 PCR 扩增阳性;如果扩增出 495 bp 和 252 bp 大小的两个条带,则判断为鸡白痢沙门氏菌 PCR 扩增阳性;如果扩增出 495 bp、252 bp 和 174 bp 大小的 3 个条带,则判断为鸡伤寒沙门氏菌 PCR 扩增阳性;如果扩增出 495 bp 大小的一个条带,且没有其他条带或者其他条带的大小与上述情形都不符合,则判断为其他沙门氏菌 PCR 扩增阳性;如果未扩增出 495 bp 大小的条带,则判断为沙门氏菌 PCR 扩增阴性。

## 12 诊断结果判定

符合 6 中规定的流行病学、临床症状、病理变化,判定为临床疑似病例。



疑似病例按第 7、8、9 章中规定进行细菌的分离与鉴定,根据细菌鉴定结果可确诊为鸡白痢、禽伤寒或禽副伤寒。

疑似病例按第 11 章中多重 PCR 方法进行细菌鉴定,根据细菌鉴定结果可确诊为鸡白痢、禽伤寒或禽副伤寒。

无临床症状禽,按第 7、8、9 章中规定进行细菌的分离与鉴定,或按第 11 章中多重 PCR 方法进行细菌鉴定,阳性者判为禽沙门氏菌携带者。

无临床症状禽,按第 10 章中进行任一血清学试验,阳性者判为禽沙门氏菌携带者。

**附录 A**  
(资料性附录)  
**培养基的配方和制法**

**A.1 亮绿—胱氨酸—亚硒酸氢钠增菌液****A.1.1 成分**

蛋白胨	5 g
乳糖	4 g
亚硒酸氢钠	4 g
磷酸氢二钠	5.5 g
磷酸二氢钠	4.58 g
L-胱氨酸	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL
0.1%亮绿	0.33 mL

**A.1.2 制法**

1% L-胱氨酸—氢氧化钠溶液的配法:称取 L-胱氨酸 0.1 g(或 DL-胱氨酸 0.2 g),加 1 mol/L 氢氧化钠 1.5 mL,使溶解,再加入蒸馏水 8.5 mL 即成。

将除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸以外的各成分溶解于 900 mL 蒸馏水中,加热煮沸,待冷备用。另将亚硒酸氢钠溶解于 100 mL 蒸馏水中,加热煮沸,待冷,以无菌操作与上液混合。再加入 1% L-胱氨酸—氢氧化钠溶液 1 mL。分装于灭菌瓶中,每瓶 100 mL,pH 应为(7.0±0.1)。

**A.2 营养琼脂(普通琼脂)****A.2.1 成分**

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

**A.2.2 制法**

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15%氢氧化钠溶液约 2 mL,调 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装,121℃ 高压灭菌 15 min。

**A.3 鲜血琼脂****A.3.1 成分**

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g

蒸馏水	1 000 mL
灭菌脱纤维羊血或兔血	50 mL~100 mL

### A.3.2 制法

取高压好的普通营养琼脂待冷至 45℃~50℃(调 pH 至 7.2~7.4),用无菌操作于每 100 mL 营养琼脂加灭菌脱纤维羊血或兔血 5 mL~10 mL,轻轻摇匀,立即倾注于平板或分装试管,制成斜面备用。

## A.4 麦康凯培养基

### A.4.1 成分

蛋白胨	20 g
氯化钠	5 g
乳糖	10 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL
1%中性红溶液	3 mL~4 mL
1%结晶紫	0.1 mL

### A.4.2 制法

除去中性红水溶液外,其余各成分混合于锅内加热溶解。调 pH 至 7.0~7.2,煮沸,以脱脂棉过滤。加入 1%中性红水溶液,摇匀,121℃高压灭菌 15 min,待冷却至 50℃时,倾倒入皿。待皿内培养基凝固后,置温箱内烤干表面水分即可用。保存于冰箱内(4℃)。现有厂家专门配制、出售麦康凯琼脂干粉剂,用时,加水溶解,灭菌后即成。

## A.5 伊红美蓝琼脂

### A.5.1 成分

蛋白胨	10 g
蔗糖	5 g
琼脂	15 g
0.65%美蓝溶液	10 mL
乳糖	5 g
磷酸氢二钾	2 g
20%伊红水溶液	20 mL
蒸馏水	1 000 mL

### A.5.2 制法

上述成分混合溶解后,调 pH 至 7.2,加入指示剂。121℃高压灭菌 15 min 灭菌后,倾倒入皿备用。已有市售粉剂,加水溶解,灭菌,即可使用。

## A.6 去氧胆酸盐枸橼酸盐琼脂

### A.6.1 成分

牛肉粉	9.5 g
蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
柠檬酸钠	20.0 g
柠檬酸铁铵	2.0 g

去氧胆酸钠	5.0 g
中性红	0.02 g
琼脂	13.0 g

**A. 6.2 制法**

称取本品 69.52 g,加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,不停搅拌,煮沸 1 min,冷却至 50℃左右时,倾入无菌平皿,无需高压灭菌。在 25℃下,pH 为 6.9~7.5。

**A. 7 SS 琼脂(Salmonella Shigella agar)****A. 7.1 成分**

蛋白胨	5 g
乳糖	10 g
胆盐	10 g
枸橼酸钠	10 g~14 g
硫代硫酸钠	8.5 g
枸橼酸铁	0.5 g
牛肉膏	5 g
琼脂	25 g~30 g
0.5%中性红	4.5 mL
0.1%亮绿	0.33 mL
蒸馏水	1 000 mL

**A. 7.2 制法**

除中性红与亮绿溶液外,其余各成分混合,煮沸溶解。调 pH 至 7.0~7.2,加入中性红与亮绿溶液,充分混合后再加热煮沸,待冷却至 45℃左右时,制成平板。制备好的培养基应在 2 d~3 d 内用完,否则影响细菌分离效果。亮绿溶解好后置暗处,于一周内用完。

**A. 8 亮绿中性红琼脂培养基****A. 8.1 成分**

蛋白胨或酪蛋白胨	10.0 g
酵母提取物	3.0 g
氯化钠	5.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
Agar 琼脂	20.0 g
中性红	80.0 mg
亮绿	12.5 mg
蒸馏水	1 000 mL

**A. 8.2 制法**

称取本品 58 g,加入 1 000 mL 蒸馏水中,调 pH 至 6.7~7.1,加热煮沸溶解,分装,121℃ 高压灭菌 15 min 备用。

**A. 9 0.5×TBE 溶液****A. 9.1 成分**

硼酸	2.75 g
Tris 碱	5.4 g
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	2 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.3±0.2

#### A.9.2 制法

0.5 mol/L EDTA pH8.0 的配制:在 800 mL 水中加入 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠,在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0,然后定容至 1 L,分装后 121℃ 高压灭菌 15 min 备用。

称取 2.75 g 硼酸,5.4 g Tris 碱溶解在少量蒸馏水中,摇匀,再加入 2 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)混匀到 1 000 mL,备用。

### A.10 生理盐水

#### A.10.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.3±0.2

#### A.10.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠,溶解在少量蒸馏水中,稀释到 1 000 mL,分装,121℃ 高压灭菌 15 min 备用。

## 附 录 B

### (规范性附录)

#### 鸡白痢/鸡伤寒多价染色抗原和多价凝集抗原的制备

##### B.1 鸡白痢/鸡伤寒多价染色抗原

选择鸡白痢标准菌株(O:1,9,12<sub>3</sub>)和变异株(O:1,9,12<sub>2</sub>)各1株,分别在琼脂斜面划线接种,置37℃培养24 h后,用无菌生理盐水洗下,接种琼脂平皿,培养48 h,此时可产生很多单个菌落,选择典型的单个菌落用含1:500吡啶黄的盐水在玻板上进行凝集试验。挑出不产生凝集反应的光滑菌落,接种琼脂斜面,培养24 h。大量培养后收获培养物,以含1%福尔马林溶液的磷酸盐缓冲液制成菌液,振摇,直至培养物成均匀悬液,静置15 min,革兰氏染色,检测细菌形态和悬液纯度。用1:2的乙醇处理,振摇混匀,静置36 h,至完全沉淀。取少许上述混合物离心去酒精,用无菌盐水稀释,然后用已知阳性和阴性血清检查标准株和变异株的凝集性,如合格,将两种菌株2 000 g离心10 min去掉上层乙醇,等量混合后加终浓度为1%的结晶紫乙醇溶液(3%)和10%的甘油磷酸盐缓冲液作用48 h后,配制成每毫升含150亿个细菌的标准抗原。密封保存于0~4℃,有效期为6个月。

##### B.2 鸡白痢/鸡伤寒多价凝集抗原

培养和处理过程同染色抗原,等量混合后加10%的甘油磷酸盐缓冲液制成,每毫升含菌3亿个。

## 附 录 C

### (规范性附录)

#### 检测过程中生物安全和防止交叉污染的措施

##### C.1 样品处理和核酸制备

按照《兽医系统实验室考核管理办法》中要求,样品处理过程中必须在符合要求的分子生物学检测室中进行,并且严格执行有关的生物安全要求,穿实验服,戴一次性手套、口罩和帽子,一次性手套要经常更换。提取 DNA 过程或 PCR 反应液配制过程应分别在专用的超净工作台上进行;若没有专用超净工作台时可选取一个相对洁净的专用区域。

##### C.2 PCR 检测过程

C.2.1 使用 75% 的酒精或 0.1% 的新洁尔灭擦拭工作台面,注意保持工作台面和环境的清洁干净。

C.2.2 使用紫外灯对超净工作台进行照射,消除 DNA 交叉污染。

C.2.3 抽样和制样工具必须清洁干净,经无菌处理,PCR 试验的器皿、离心管和 PCR 管等必须经过 121℃, 15 min 高压灭菌后才可使用。

C.2.4 扩增前应检查各 PCR 管盖是否盖紧,对于采用热盖加热(PCR 管中不加石蜡油)的 PCR 扩增仪除要注意检查各 PCR 管盖是否盖紧外,还要注意检查不同 PCR 管放入加热槽后高度是否一致,以保证热盖压紧所有 PCR 反应管。

C.2.5 PCR 反应混合液配制、DNA 提取、PCR 扩增、电泳和结果观察等应分区或分室进行,实验室运作应从洁净区到污染区单方向进行。

C.2.6 所有的试剂、器材、仪器都应专用,不得交叉互用。

##### C.3 培养物等废弃物无害化处理

将细菌培养物及相关已污染的器械用可高压灭菌袋分装,封口,贴灭菌指示带,置高压锅中 121℃ 高压灭菌 20 min,按《兽医系统实验室考核管理办法》中要求处理。

**附 录 D**  
(资料性附录)  
引物及 PCR 产物的大小

引物及 PCR 产物的大小见表 D. 1。

**表 D. 1 引物及 PCR 产物的大小**

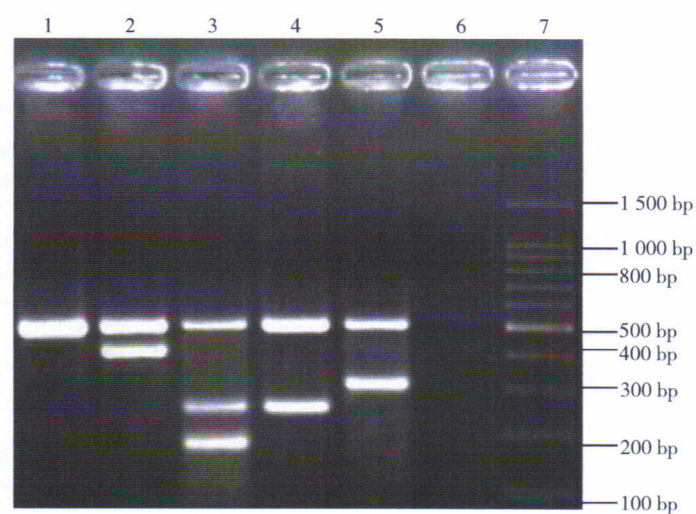
基因	引物名称	引物序列	目的片段大小 bp	引物特异性
hut	hut - F	5'- atgttgctcctgccctggtaagaga - 3'	495	沙门氏菌属
	hut - R	5'- actggcgttatccctttctctgctg - 3'		
Sdf I	SE - F	5'- tgtgttttatctgatgcaagagg - 3'	304	肠炎沙门氏菌
	SE - R	5'- tgaactacgttcggttctctgg - 3'		
SPY	SPY - F	5'- ttgttcaacttttaccctgaa - 3'	401	鼠伤寒沙门氏菌
	SPY - R	5'- ccctgacagccgtagatatt - 3'		
glgc	SGP - F	5'- cgggtgactgcccgctat - 3'	252	鸡白痢/ 鸡伤寒 沙门氏菌
	SGP - R	5'- ctgggcattgacgcaaa - 3'		
spec	SG - F	5'- gatctgctgccagctcaa - 3'	174	鸡伤寒沙门氏菌
	SG - R	5'- ggccttttcaaacata - 3'		



附录 E  
(资料性附录)

沙门氏菌多重 PCR 检测阳性对照样品检测电泳图(2%琼脂糖凝胶)

E.1 沙门氏菌多重 PCR 检测阳性对照样品检测电泳图



说明:

1——猪霍乱沙门氏菌;  
2——鼠伤寒沙门氏菌;  
3——鸡伤寒沙门氏菌;  
4——鸡白痢沙门氏菌;

5——肠炎沙门氏菌;  
6——阴性对照;  
7——DNA 分子量标准品。

图 E.1 沙门氏菌多重 PCR 的电泳图

E.2 说明

琼脂糖凝胶的浓度为 2%。