ICS 65.120
CCS B20

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T XXXX—XXXX

鸡伤寒沙门氏菌快速检测技术

Rapid detection technology of Salmonella gallinarum

（送审稿）

（本草案完成时间：2023 年 10 月 23 日）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

辽宁省市场监督管理局　　发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　培养基和主要试剂 1
5　主要仪器设备和玻璃器皿 1
6　样品采集、储存及运输 2
7　沙门氏菌的分离鉴别 2
附录 A（资料性）　培养基和试剂配制 4
附录 B（资料性）　细菌 DNA 提取 7

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件起草单位：辽宁省农业发展服务中心、大连三仪动物药品有限公司。

本文件主要起草人：汲全柱、江国托、刘艳、单春乔、李娟、刘秋晨、于洪敏、王岩、翟宏旭、田晶、栾新红、曹中赞、徐艺娜、吴怡琦、唐峰、冷寒冰、吴倩、郭小会。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862

文件起草单位通讯地址：辽宁省大连市甘井子区营城子镇营旭路9号，联系电话：0411-66886298

鸡伤寒沙门氏菌快速检测技术

1 范围

本标准规定了鸡伤寒沙门氏菌鉴别培养基和CPA检测技术

本标准适用于各种禽类携带鸡沙门氏菌的检疫、诊断、监测和流行病学，也可用于规模化种鸡场中伤寒沙门氏菌的净化。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

NY/2838-2015 沙门氏菌病诊断技术

GB/4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T13091-2018 饲料中沙门氏菌的测定

GB/T19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 培养基和主要试剂

4.1 BPW 前增菌液（见附录 A.1）。

4.2 SC 增菌液（见附录 A.2）。

4.3 TTB 增菌液（见附录 A.3）。

4.4 沙门氏菌显色培养基（见附录 A.4）。

4.5 革兰氏染色液（见附录 A.5）。

4.6 细菌生化鉴定试剂盒。

4.7 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

4.8 2X SG Fast qPCR 预混液。

5 主要仪器设备和玻璃器皿

5.1 恒温培养箱：37℃±1℃。

5.2 电热恒温水槽。

5.3 普通冰箱。

5.4 天平：感量为0.1 g、0.01 g、0.0001 g。
5.5 振荡器或漩涡混合器。
5.6 显微镜：1000倍。
5.7 pH计：精确度0.1。
5.8 无菌玻璃或塑料培养皿Φ=90 mm、无菌锥型瓶、无菌玻璃或塑料涂布棒。
5.9 量筒：250 mL。
5.10 微量移液器（最大量程分别为 10μL、20μL、100μL、1000μL）。
5.11 20000 g 低温高速离心机。
5.12 实时荧光 PCR仪。

6 样品采集、储存及运输

按照NY/T2838-2015中描述，选择具有典型临床症状的病死鸡，无菌取其病死或带菌禽的肝脏、脾脏、肺脏、肾脏及其他病变组织，标记名称和日期，冷藏运送到试验室进行检验。按照NY/T541-2016中6.2执行。

6.1 肠内容物样品按照NY/T541-2016中执行，粪便样品按照NY/T541-2016中6.8.1执行，泄殖腔拭子按照NY/T541-2016中6.8.1执行。
6.2 样品采集和样品处理应做好防护措施，避免交叉污染。

7 沙门氏菌的分离鉴别

本标准前增菌、增菌方法按照GB4789.4-2016中5.1和5.2执行。

7.1 鉴别培养

7.1.1 取组织器官（均浆）、粪便、肛拭子等样品，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的体积转增菌培养液，培养24 h。

7.1.2 分别用接种环取增菌液 1 环，划线接种于沙门氏菌属显色培养基平板。于 36 ℃ ±1 ℃分别培养 18 h～24 h 。

7.1.3 自显色培养基平板上挑取典型单菌落，做革兰氏染色（A.5）镜检。

7.2 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1。

表1 鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌的生化试验特征

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	+	-

表1　鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌的生化试验特征（续）

试验	鸡白痢沙门氏菌	鸡伤寒沙门氏菌
尿素酶	-	-
氯化钾	-	-
氯化钾对照	+	+
赖氨酸	+	+
赖氨酸对照	+	+
甘露醇	+	+
山梨醇	+	+
水杨苷	-	-
丙二酸盐	-	-
运动性	-	-
ONPG	-	-
鸟氨酸脱羧作用	+	-
麦芽糖发酵	-或后+	+
卫矛醇	-	+
注:+,在1d~2d有90%以上为阳性; -,90%以上没有反应; V有不同的反应。		

7.3　探针法实时荧光定量 PCR 验证

7.3.1　DNA 的提取

用商用细菌基因组DNA提取试剂盒或常用提取方法（附录B）提取试样DNA，并设置阴性、阳性对照。

7.3.2　引物

引物和Taqman探针序列见表2。

表 2　引物和探针信息表

菌株名称	引物和探针序列（5'-3'）	扩增长度/bp
鸡伤寒沙门氏菌	F:CACGTTATGGTGGTAGTGCAT	100
	R:AGTTACACAAAGCGTCCAGTT	
	P: FAM—ACGACCTAAATTAGGCAGTACGATCCA—TAMR	

7.3.3　反应体系和程序设定

实时荧光 PCR 反应体系为20 μL，模板 DNA 2μL、2X SG Fast qPCR 预混液10 μL，TaqMan 探针20 μmol／L 0.2 μL，正向和反向引物 20 μmol／L 0.2 μL，去离子水7.4 μL。实时荧光 PCR 反应参数为95℃ 3 min，95℃ 5 s，60℃ 15 s，72℃ 30 s，45个循环。

7.3.4　结果判定

实时荧光 PCR 扩增曲线指数期明显，Ct<37 为阳性判定原则。其中以 Ct＜35 且扩增曲线指数期明显可直接判定为阳性。Ct 值在 35～37 之间判断为可疑，需要加大模板量进行重复实验，如出现指数期明显的扩增曲线方可判定为阳性，否则为阴性。

附 录 A
（资料性）
培养基和试剂配制

A.1 BPW前增菌液

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠(Na:HP0.12H20)	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
水	1000 mL

A.1.2 制备

将各成分加热溶解于1000 mL水中，121℃高压灭菌15 min备用。

A.2 SC增菌液

A.2.1 成分

蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
亚硒酸氢钠	4.0 g
磷酸氢二钠	10.0 g
L-胱氨酸	0.01 g
水	1 000 mL

A.2.2 制备

将各成分加热溶解于1000 mL蒸馏水中，无菌操作分装于灭菌三角瓶或试管中备用。当天制备当天使用，无需高压灭菌。

A.3 TTB增菌液

A.3.1 成分

蛋白胨	9.0 g
牛肉粉	4.5 g
氯化钠	2.7 g
碳酸钙	40.5 g
胆盐	5.0 g
硫代硫酸钠	50.0g
水	1 000 mL

A.3.2 制备

将各成分溶解于1000 mL蒸馏水中，加热煮沸，临用前加入20%碘液 20 mL，0.1% 煌绿10 mL，现配现用，不宜久置。

A.4 沙门氏菌显色培养基

A.4.1 成分

琼脂	15.0 g
蛋白胨和酵母粉	7.0 g
色素和选择性物质	12.9 g
水	1 000 mL

A.4.2 制备

A.4.2.1 取瓶内干粉 34.9g 溶于 1000 mL 去离子水的洁净三角瓶中,充分搅排混匀。也可根据需要按照 34.9 g/L 的比例扩大或缩小制备培养基的量。

A.4.2.2 加热至 100℃，不停搅拌，使其完金溶解。切勿加热超过 100℃，切勿 121℃高压灭菌。若使用微波炉，应将培养基加热沸腾，立即移出，轻轻摇匀,再放入微波炉加热，观察小气泡变为大气泡,直至完全溶解即可。切勿使培养基溢出，

A.4.2.3 加热后的培养些冷却至 45℃~50℃,轻轻地摇动均匀，倾注平皿,使其凝固,惊干备用。

A.5 革兰氏染色

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 成分

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加人蒸馏水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g

95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色法

将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染色1 min，水洗；滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗；滴加95%乙醇脱色，约30 s，水洗；滴加沙黄复染液，复染1 min，水洗，待干，镜检。

附 录 B
（资料性）
细菌 DNA 提取

B.1 细菌 DNA 提取步骤

B.1.1 细菌培养

细菌接种于5 mL液体培养基中，37 ℃摇床（300 rpm）培养过夜。

B.1.2 细菌收集

取1 mL培养物于1.5 mL无菌EP管中，室温8000 rpm离心5 min，弃上清，沉淀重新悬浮于1 mL TE（pH 8.0）中或用dd H2O。

B.1.3 菌体裂解

加入6 μL 50 mg/mL的溶菌酶，37 ℃作用2 h。再加2 mol/L NaCl 50 μL，10%SDS 110 μL，20 mg/mL的蛋白酶K 3μL，50 ℃作用3 h或37 ℃过夜（此时菌液应为透明粘稠液体）。

B.1.4 抽提

菌液均分到两个1.5 mL无菌EP管，加等体积的酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)，混匀，室温放置5 min～10 min，12000 rpm离心10 min，抽提两次（上清很粘稠，吸取时应小心）。

B.1.5 沉淀

加0.6倍体积的异丙醇，混匀，室温放置10 min，12000 rpm离心10 min。

B.1.6 洗涤

沉淀用75%的乙醇洗涤。

B.1.7 稀释

抽（凉）干后，溶于50μL dd H_2O中，取适量作为PCR模板。