



中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.8—2008
代替 GB/T 17999.7—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 8 部分: SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 8: Examination of *Salmonella pullorum* for SPF chicken

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会



前 言

GB/T 17999《SPF 鸡 微生物学监测》分为 10 个部分：

- 第 1 部分：SPF 鸡 微生物学监测总则；
- 第 2 部分：SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验；
- 第 3 部分：SPF 鸡 血清中和试验；
- 第 4 部分：SPF 鸡 血清平板凝集试验；
- 第 5 部分：SPF 鸡 琼脂扩散试验；
- 第 6 部分：SPF 鸡 酶联免疫吸附试验；
- 第 7 部分：SPF 鸡 胚敏感试验；
- 第 8 部分：SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验；
- 第 9 部分：SPF 鸡 试管凝集试验；
- 第 10 部分：SPF 鸡 间接免疫荧光试验。

本部分为 GB/T 17999 的第 8 部分。

本部分修订参照了 NY/T 556—2002《鸡传染性喉气管炎诊断技术》和 OIE《陆生动物(哺乳动物、禽鸟和蜜蜂)诊断试验和疫苗手册》(第五版)中的有关规定。

本部分代替 GB/T 17999.7—1999《SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验》。

本部分与 GB/T 17999.7—1999 相比主要变化如下：

- 增加了活禽泄殖腔拭子检测样品；
- 增加了沙门氏菌菌体抗原血清学检测方法；
- 增加了附录 A“革兰氏染色方法及生化试验结果判定”；
- 对试验操作程序进行了修订,将细菌镜检程序提前；
- 在范围中进一步明确了本部分使用的情况；
- 删除了引用标准；
- 修订了试验操作程序。

本部分的附录 A 为规范性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本部分起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、济南斯帕法斯家禽有限公司。

本部分主要起草人：曲连东、姜睿、韩凌霞、邵卫星、朱果、单忠芳、刘家森、司昌德、郭东春、于海波、孟庆文。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 17999.7—1999。

SPF 鸡 微生物学监测

第 8 部分:SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了鸡白痢沙门氏菌检验的技术要求。

本部分适用于对 SPF 鸡进行鸡白痢沙门氏菌的分离和鉴定。

用血清平板凝集试验进行鸡白痢沙门氏菌的抗体检测,结果难以判断时,可采用本部分进行复检。

2 原理

取待检样品(肠内容物、有关脏器匀浆、活禽泄殖腔拭子)接种于增菌培养基中进行增菌,然后将培养物转移到选择、鉴别培养基上培养,挑选可疑菌落接种于营养琼脂培养基上,取培养物进行生化试验与血清学试验,以确定鸡白痢沙门氏菌。

3 试剂和器材

3.1 材料

3.1.1 培养基

营养肉汤培养基、DHL 琼脂、SS 琼脂、亚硫酸铋琼脂(BS)、三糖铁培养基(TSI)、营养琼脂、半固体琼脂。

3.1.2 生化反应试剂

糖发酵培养基、蛋白胨水、硝酸盐培养基、氧化酶试剂、氨基酸脱羧酶试验培养基、尿素培养基(结果判定见附录 A)。

3.1.3 沙门氏菌因子血清

A-F 多价 O 血清、O₁₂ 因子血清、O₁₂ 因子血清、H-a 因子血清、H-d 因子血清、H-g. m 因子血清和 H-g. p 因子血清。

3.2 器材

37℃ 恒温培养箱。

4 操作步骤

4.1 采样

无菌采取卵巢、肝、脾以及小肠和盲肠、活禽泄殖腔拭子。

4.2 分离培养

将采集样品放入灭菌乳钵或均浆器中研磨成匀浆,加入少量营养肉汤稀释。取培养物或活禽泄殖腔拭子分别在 SS 或 BS 和 DHL 琼脂平板培养基上划线接种,置(36±1)℃ 培养 24 h~48 h。在 DHL 培养基上若出现黄褐色透明小菌落;或在 SS 琼脂平板上出现无色半透明圆形小菌落;或在 BS 琼脂平板上出现黑色或黑绿色小菌落,则为可疑菌落。如果经 24 h~48 h 培养后未发现可疑菌落,再取增菌培养物重复划线分离培养 1 次。

4.3 病原鉴定

4.3.1 镜检

取可疑菌落,涂片作革兰氏染色,具体操作见附录 A。镜检可见革兰氏阴性杆菌,大小为

(0.3 μm~0.5 μm)×(1 μm~2.5 μm),无芽胞,多单个散在。

4.3.2 生化鉴定及运动性检查

4.3.2.1 生化鉴定

接种 TSI,斜面划线,底部穿刺,置(36±1)°C培养 24 h。其生化反应为斜面呈红色,底层变黄,有或无气体,不产生硫化氢(H₂S)。如果符合则进行其他项目的检测及血清学鉴定,不符合则判为阴性。

4.3.2.2 运动性试验

将可疑菌落穿刺接种半固体培养基,(36±1)°C培养 24 h后,观察结果。鸡白痢沙门氏菌无运动性。

4.3.3 生化项目

发酵葡萄糖产酸或产气,不发酵乳糖和蔗糖。触酶、赖氨酸脱羧酶、硝酸盐还原试验阳性。氧化酶、尿素酶、吲哚试验、卫矛醇、麦芽糖阴性。鸟氨酸脱羧作用阳性。

4.4 沙门氏菌 A~F 群多价 O 血清玻片凝集试验

取可疑培养物接种三糖铁琼脂斜面,37 °C培养 18 h~24 h,先用 A~F 多价 O 血清与培养物作平板凝集反应,若呈阳性,再分别用 O₉、O₁₂、H-a、H-d、H-g. m 和 H-g. p 单价因子血清作平板凝集反应,如果培养物与 O₉、O₁₂ 因子血清呈阳性反应,而与 H-a、H-d、H-g. m 和 H-g. p 因子血清呈阴性反应时,则鉴定为鸡白痢沙门氏菌。

5 结果判定

符合上述各项实验结果,为鸡白痢沙门氏菌阳性,否则结果为阴性。生化试验和血清学试验不一致时,以血清学试验为主。

附录 A

(规范性附录)

革兰氏染色方法及生化试验结果判定

A.1 革兰氏染色法

A.1.1 涂片,在火焰上固定。

A.1.2 滴加结晶紫染色液,染色 1 min,流水冲洗,甩干。

A.1.3 滴加碘液,媒染 1 min,流水冲洗,甩干。

A.1.4 滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s,流水冲洗,甩干。

A.1.5 滴加沙黄复红染液,染色 10 s~20 s,流水冲洗,甩干、风干或滤纸吸干后镜检。

A.1.6 结果:使用油镜放大 1 000 倍观察,革兰氏阳性菌呈蓝紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

A.2 三糖铁琼脂培养基(TSI)结果观察

斜面 and 高层均变黄者为分解葡萄糖、蔗糖和乳糖;高层破碎者为产气;高层变黄而斜面不变或变红者为分解葡萄糖,不分解蔗糖和乳糖;高层沿接种线变黑者为硫化氢阳性。

A.3 靛基质试剂结果观察

培养物中加入柯凡克试剂者,在两种溶液交界处呈红色为阳性;加入欧-波试剂者,在两种溶液交界处呈玫瑰红为阳性。对弱阳性者可先在培养物中加入少量二甲苯,充分混匀后再加入靛基质试剂。

A.4 甲基红试验结果观察

向培养物中加入甲基红试剂一滴,立即变为鲜红色为阳性,黄色为阴性。

A.5 V-P 试验结果观察

向培养物中加入 6% α -萘酚-乙醇溶液 0.5 mL,40%氢氧化钾溶液 0.2 mL,数分钟内出现红色者为阳性,不变色为阴性。

A.6 硝酸盐培养基结果观察

培养物中先加入甲液 3 滴~5 滴,再加入乙液 3 滴~5 滴,出现红色者为阳性。

A.7 氧化酶试验结果观察

取滤纸条粘取菌落,加氧化酶试剂一滴,30 s 内呈现红色至紫红色为阳性,于 2 min 内不变色为阴性;对弱阳性者应同时用绿脓杆菌做阳性对照,用大肠杆菌做阴性对照。

注:不能用接种针挑取菌落,只能用玻棒或竹签。

A.8 氨基酸脱羧酶试验结果观察

从琼脂斜面上挑取培养基接种,于(36±1)°C 培养 18 h~24 h,观察结果。氨基酸脱羧酶阳性者由于产碱,培养基应呈紫色,阴性者无碱性,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管为黄色。

A.9 尿素试验结果观察

培养基由黄变红者为阳性。