

ICS 11.220

CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXX-202X

绵羊流产沙门氏菌病诊断技术

Diagnostic techniques for Salmonellosis Abortusovis in Sheep

(征求意见稿)

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。

(注：征求意见时必须保留这句话。)

XXXX 发布

XXXX 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言.....	II
引言.....	IV
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	1
5.临床诊断.....	2
6 样本采集与保存.....	2
7 细菌分离培养.....	2
8. PCR 检测.....	3
9 综合判定.....	5
附录 A(规范性)试剂溶液的配制方法.....	6
附录 B(规范性)引物序列及探针序列.....	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。

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这些专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC 181）归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、西北农林科技大学、延边大学、安徽省动物疫病预防与控制中心。

本文件主要起草人：田莉莉、樊晓旭、刘宝元、高旭、聂龙志、李嘉琪、王娟、陈曦、邵卫星、王琳、黄孟锴、孙明军、南文龙、靳继惠。

引言

沙门氏菌病 (*Salmonellosis*) 是一种由沙门氏菌属细菌引起的人兽共患传染病。沙门氏菌 (*Salmonella*) 属于肠杆菌科的一类革兰氏阴性肠道杆菌，在自然界中分布广泛，人类和多种动物均为其宿主。不同血清型的沙门氏菌，其可感染的宿主范围以及能导致的疾病存在差异。

多种沙门氏菌都能感染羊，从而引发羊的沙门氏菌病，但基本不会造成地方性流行。羊流产沙门氏菌 (*Salmonella enterica spp. enterica serovar Abortusovis, Salmonella Abortusovis*) 是沙门氏菌肠炎亚种的一种血清型，具有较高的宿主特异性，仅感染绵羊，会引发以怀孕绵羊流产为主要特征的传染病，也称为绵羊流产沙门氏菌病，世界动物卫生组织 (WOAH) 将其列为规定报告疫病。

羊流产沙门氏菌在欧洲、中东、非洲和南美洲的部分国家有感染报告，曾在南欧、西亚和北非等地区引发流行，导致了一定程度的经济损失。而在我国，有关羊流产沙门氏菌的相关报道相对较少，目前尚未有明确的分离菌株。该标准参考了 WOAH 《陆生动物诊断试验与疫苗手册》、沙门氏菌标准以及相关文献，构建了诊断流程和检测方法，增加鉴别导致绵羊流产的病原。

绵羊流产沙门氏菌病诊断技术

1 范围

本文件描述了绵羊流产沙门氏菌病的临床诊断和实验室诊断方法。

本文件适用于绵羊流产沙门氏菌病的诊断、检测和流行病学调查。

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）适用本文件。

GB4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 46668 动物和动物产品沙门氏菌检测方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

绵羊流产沙门氏菌病（*Salmonellosis Abortusovis*）：标准中指由羊流产沙门氏菌（*Salmonella.Abortusovis*）引起的以怀孕绵羊流产为主要特征的传染病。

4 缩略语

BPW：缓冲蛋白胨水（Buffered peptone water）

BS：亚硫酸铋（Bismuth sulfite）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction）

XLD：木糖赖氨酸脱氧胆酸盐（Xylose Lysine Desoxycholate）

5 临床诊断

5.1 易感动物

羊流产沙门氏菌是一种宿主特异型血清型，对绵羊具有高度特异性。不同品种、性别的绵羊均可感染。

5.2 流行特点

在未曾感染过的羊群中，主要临床症状表现为妊娠母羊于妊娠晚期（产前2~3个月）出现流产情况，且多发生在头胎母羊身上。对于存在地方性流行状况的羊群而言，流产现象通

常仅见于新购入的绵羊或者初产母羊。在产羔季节，流产的胎儿、胎盘以及阴道分泌物是主要的感染源，感染途径为粪口传播。

5.3 临床症状

母羊除孕晚期发生流产、死胎外，未流产感染母羊产下的羔羊通常会在1月龄内出现菌血症并死亡。偶尔出现母羊死于败血症、急性子宫炎和由胎盘滞留引起的腹膜炎。公羊和未孕母羊一般无症状。

5.4 病理变化

对流产以及产出死胎的病死母羊进行剖检，发现子宫发生肿胀、充血，里面存在出血性浆液性渗出物以及坏死组织，部分甚至滞留胎盘。其产出死羔具有全身败血病变，肝脏、脾脏发生肿大、充血，并存在坏死灶。

6 样本采集与保存

6.1 流产胎儿实质器官

按照NY/T 541规定，无菌采集无腐败的流产胎儿肝、脾、肺等实质器官，每份约50g，置于无菌采样袋密封并做好标记，立即4℃保存运输，尽量于24h内处理。

6.2 阴道拭子

将无菌棉签伸入绵羊阴道内，旋转3~5次，取出棉签折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记，立即4℃保存运输，尽量于24h内处理。

7 细菌分离培养

7.1 仪器设备

7.1.1 II级生物安全柜。

7.1.2 离心机。

7.1.3 恒温培养箱。

7.1.4 涡旋仪。

7.1.5 均质器。

7.2 试剂材料

7.2.1 BPW 增菌液，按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

7.2.2 BS 琼脂，按照附录 A 中 A.2 的规定配制。

7.2.3 XLD 琼脂，按照附录 A 中 A.3 的规定配制。

7.3 预增菌

参照GB4789.4中5.1预增菌进行。取25g样品放入盛有225mL BPW的无菌均质杯中，以8000~10000 r/min均质1~2min，或置于盛有225mL BPW的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打1~2min。拭子样品放入盛有40mL中BPW的无菌均质袋中，使拭子充分浸润。均质袋密封后，直接置于恒温培养箱36℃±1℃培养8h~18h。

7.4 分离培养

用接种环取增菌液培养物一环，分别划线接种于一个BS琼脂平板和一个XLD琼脂平板，于36℃±1℃分别培养48~72h。观察各个平板上生长的菌落，是否符合沙门氏菌的菌落特征。

7.5 结果判定

观察各个平板上生长的菌落，是否符合沙门氏菌的菌落特征，可参考GB4789.4中5.3列表。绵羊流产沙门氏菌生长缓慢，通常情况下，菌落在生长48~72小时后约1~2毫米。

8 PCR 检测

8.1 仪器设备

- 8.1.1 II级生物安全柜。
- 8.1.2 离心机。
- 8.1.3 涡旋仪。
- 8.1.4 全自动核酸提取仪。
- 8.1.5 PCR 仪。
- 8.1.6 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。
- 8.1.7 凝胶成像仪或紫外线投射仪。
- 8.1.8 微量可调移液器

8.2 试剂材料

- 8.2.1 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 8.2.2 无菌去离子水。
- 8.2.3 普通 PCR 酶混合液（含 Taq 酶，dNTPs，Mg²⁺等）
- 8.2.4 1×TAE 缓冲液，按照附录 A 中 A.4 的规定配制。
- 8.2.5 上样缓冲液，按照附录 A 中 A.5 的规定配制。
- 8.2.6 1%琼脂糖凝胶，按照附录 A 中 A.6 的规定配制。
- 8.2.7 DNA 标准分子质量。
- 8.2.8 引物序列见附录 B.1，加无核酸酶水配置成 10 μmol/L 的工作浓度。
- 8.2.9 阳性对照：羊流产沙门氏菌提取的基因组核酸。若菌株难以获取，可采用羊流产沙门氏菌 IS200 特异性插入位置基因片段。

8.3 阴性对照：无菌去离子水。

8.4 核酸制备

8.4.1 BPW 增菌培养液

吸取经7.3.1经BPW增菌培养后的液体1mL,12000r/min 离心5min,用移液枪缓慢吸掉上清液(尽量避免吸取菌体沉淀),沉淀用1mL 无菌去离子水离心洗涤1次,重悬沉淀至200 μ L 无菌去离子水中。

沸水浴10min,迅速移至碎冰块上,使其迅速冷却10min后,12000r/min 离心5min,取上清液即为待测样品DNA模板;或用商品化基因组提取试剂盒提取其基因组 DNA 作为模板。

8.4.2 疑似沙门氏菌菌落

挑选培养基疑似沙门氏菌菌落重悬至200 μ L 无菌去离子水中。沸水浴10min,迅速移至碎冰块上,使其迅速冷却10min后,12000r/min 离心5min,取上清液即为待测样品DNA模板;或使用商品化基因组提取试剂盒提取其基因组DNA作为模板。

8.5 沙门氏菌 PCR 检测

按照GB/T 46668 动物和动物产品沙门氏菌检测方法中11.3章的PCR检测进行。阳性样品进行8.6羊流产沙门氏菌PCR检测。

8.6 羊流产沙门氏菌 PCR 检测

8.6.1 反应体系

配制 25 μ L 反应体系所需试剂如下:

——12.5 μ L 普通 PCR 酶混合液;

——8.5 μ L 无菌去离子水;

——1 μ L 上游引物(10 μ mol/L);

——1 μ L 下游引物(10 μ mol/L);

——2 μ L 样品核酸或菌液。

每次进行 PCR 扩增时均应设立阳性、阴性对照。

注:反应体系依据所用试剂的不同而适当改变。

8.6.2 反应程序

将反应管瞬时离心,放入PCR仪内,设定反应程序进行扩增。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性5min,94 $^{\circ}$ C 变性1min,55 $^{\circ}$ C 退火1min,72 $^{\circ}$ C 延伸1min,25个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸10min。反应结束后立即电泳,或将扩增产物置于4 $^{\circ}$ C 保存。

8.6.3 PCR 反应产物检测

配制好的1%琼脂糖凝胶放入水平电泳槽,使1 \times TAE缓冲液刚好没过胶面,取5 μ L~10 μ L PCR扩增产物进行电泳。每次电泳同时加DNA标准分子质量、阳性对照和阴性对照。80V~100V恒压电流20 min ~30 min。电泳结束后,使用紫外线透射仪或凝胶成像系统观察并保存结果。

8.6.4 试验条件成立

阳性对照PCR产物电泳后出现932bp，阴性对照无任何条带或只出现片段较小的引物二聚体条带，试验成立；否则，试验不成立。

8.6.5 判定标准

8.6.5.1 被检样本 PCR 产物电泳出现 932 bp 的条带，判定为绵羊流产沙门氏菌核酸阳性；

8.6.5.2 被检样本 PCR 产物未出现特异性大小条带，判定为绵羊流产沙门氏菌核酸阴性。

9 综合判定

9.1 符合 5.3 临床症状，经 7.4 分离培养出疑似为沙门氏菌落，经 8.5 沙门氏菌 PCR 判定为阳性的，判定为感染沙门氏菌。

9.2 符合 9.1，经 8.6 羊流产沙门氏菌 PCR 判定为阳性的，判定为感染羊流产沙门氏菌，引起绵羊流产沙门氏菌病。

9.3 符合羊沙门氏菌病疑似病例，经 8.6 判定为阴性的，判定为感染其他沙门氏菌，如需进一步鉴定，可按照 GB4789.4 进行生化试验和血清学鉴定。

附录 A
(规范性)
培养基与试剂的配制

A.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

配制 BPW 所需试剂如下:

- 10.0g 的胰蛋白胨;
- 5.0g 的氯化钠 (NaCl);
- 9.0g 的磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄);
- 1.5g 的磷酸二氢钾 (KH₂PO₄);
- 0.25g 的硫酸亚铁 (FeSO₄)。

溶剂加蒸馏水溶解至 1000mL, 使用 1mol/LNaOH 或 HCl 溶液调节 pH 为 7.2±0.2, 121 °C 高压灭菌 15min, 室温保存备用。

A.2 亚硫酸铋 (BS) 琼脂

配制 BS 琼脂 所需试剂如下:

- 蛋白胨 10.0g
- 牛肉浸粉 5.0g
- 葡萄糖 5.0g
- 硫酸亚铁 0.3g
- 磷酸氢二钠 4.0g
- 煌绿 0.025g
- 柠檬酸铋铵 2.0g
- 亚硫酸钠 6.0g
- 琼脂 18.0g

溶剂加蒸馏水溶解至 1000mL, 必要时调节 pH。煮沸, 勿过度加热, 勿高压灭菌。冷却至 48 °C±2 °C 倾注平皿, 煮沸后的培养基在 25 °C 的 pH 为 7.5±0.2。

A.3 木糖赖氨酸脱氧胆盐 (XLD) 琼脂

配制 XLD 琼脂 所需试剂如下:

- 酵母浸粉 3.0g
- L-赖氨酸 5.0g
- 木糖 3.75g
- 乳糖 7.5g
- 蔗糖 7.5g
- 脱氧胆酸钠 2.5g
- 枸橼酸铁铵 0.8g
- 硫代硫酸钠 6.8g
- 氯化钠 5.0g
- 酚红 0.08g
- 琼脂 15.0g

溶剂加蒸馏水溶解至 1000mL, 搅匀后加热溶解, 必要时调节 pH。煮沸, 勿过度加热, 勿高压灭菌。冷却至 48 °C±2 °C 倾注平皿, 煮沸后的培养基在 25 °C 的 pH 为 7.4±0.2。

A.4 1×TAE缓冲液

称取 242 g Tris、18.612 g EDTA，加蒸馏水 800 mL，充分搅拌均匀后加入 57.1 mL 的冰乙酸，充分溶解，用氢氧化钠调 pH 至 8.3，加水定容至 1L 后，配制成 50×TAE 贮存液，室温保存。使用前加蒸馏水进行 50 倍稀释配成 1×TAE 缓冲液。

A.5 上样缓冲液（5×）

称取 0.2 g 溴酚蓝、50 g 蔗糖，加蒸馏水定容至 100 mL。

A.6 1%琼脂糖

称取 1 g 琼脂糖，加入 100 mL 的 1×TAE 缓冲溶液，加热融化后冷却至 50 °C~60 °C 时加入 1 μL 的核酸染料，混匀后倒入处于水平台面的凝胶盘中，胶板厚 5 mm 左右。依据样品选择适宜的梳子，待琼脂糖胶凝固后拔出梳子。

附录 B
(规范性)
引物序列

B.1 羊流产沙门氏菌PCR引物序列

依据羊流产沙门氏菌的IS200元件及其两侧的边界基因序列，设计PCR引物，可扩增932bp的目的片段。

上游引物：5'TTCTCTTGTCAGTCTCAAAC 3'

下游引物：5'CGATGAAAGCGTAAATAAGG 3'

参 考 文 献

- [1] 世界动物卫生组织（WOAH）陆生动物诊断试验与疫苗手册
- [2] Giulia, Amagliani, Maria E, La Guardia, Sabrina, Dominici et al. *Salmonella Abortusovis*: An Epidemiologically Relevant Pathogen.[J]. *Curr Microbiol*, 2021, 79: 3.
- [3] Assiya, Mussayeva, Zhandos, Abay, Aigul, Dossanova et al. First report on identification of *Salmonella*
- [4] *Abortusovis* from ovine abortion cases in Kazakhstan.[J]. *Front Vet Sci*, 2026, 12: 1717314. Michael, Payne, Sarah, Williamson, Qinning, Wang et al. Emergence of Poultry-Associated Human *Salmonella enterica* Serovar *Abortusovis* Infections, New South Wales, Australia.[J]. *Emerg Infect Dis*, 2024, 30: 691-700.
- [5] Assiya, Mussayeva, Natalya, Yegorova, Aidar, Namet et al. *Salmonella* sheep abortion: Distribution, diagnosis, and control measures.[J]. *J Appl Anim Welf Sci*, 2023, undefined: 1-15.
- [6] C R, Beuzón, A, Schiaffino, G, Leori et al. Identification of *Salmonella abortusovis* by PCR amplification of a serovar-specific IS200 element.[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2082-5. *Salmonella* infections in sheep. Publication: *Salmonella* in domestic animalspp. 295-304, <https://doi.org/10.1079/9781845939021.0295>
- [7] Teresa, García-Seco, Carlos, Montbrau, Mireia, Fontseca et al. Efficacy of a *Salmonella enterica* serovar *Abortusovis* (*S. Abortusovis*) inactivated vaccine in experimentally infected gestating ewes.[J]. *Res Vet Sci*, 2020, 135: 486-494.
- [8] I, Lantier, C R, Moreno, P, Berthon et al. Quantitative trait loci for resistance to infection in sheep using a live *Salmonella Abortusovis* vaccine.[J]. *Anim Genet*, 2012, 43: 632-5.
- [9] Sophie, Wirz-Dittus, Luc, Belloy, Daniela, Hüßy et al. Seroprevalence survey for *Salmonella Abortusovis* infection in Swiss sheep flocks.[J]. *Prev Vet Med*, 2010, 97: 126-30.
- [10] Sophie, Wirz-Dittus, Luc, Belloy, Marcus G, Doherr et al. Use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies in sheep naturally infected with *Salmonella Abortusovis*. [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2010, 22: 531-6.
-