



中华人民共和国国家标准

GB/T 43173—2023

种鸡场鸡白痢沙门菌净化规程

Code of practice for eliminate *salmonella pullorum* in breeding chicken farm

2023-09-07 发布

2024-04-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

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：四川大学、中国动物疫病预防控制中心、中国动物卫生与流行病学中心、山东农业大学、扬州大学。

本文件主要起草人：王红宁、张安云、辛盛鹏、翟新验、雷昌伟、翟海华、孙淑红、顾小雪、彭大新、陈素娟、李阳、杨鑫、唐艺芝、李翠、鞠孜敬。



种鸡场鸡白痢沙门菌净化规程

1 范围

本文件确立了种鸡场鸡白痢沙门菌净化程序,规定了鸡白痢阳性鸡淘汰、净化鸡群生物安全措施等阶段的操作指示,描述了净化效果评估方法。

本文件适用于种鸡场鸡白痢沙门菌的净化。

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。

- GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB/T 5750.2 生活饮用水标准检验方法 水样的采集与保存
- GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
- GB/T 25886 养鸡场带鸡消毒技术要求
- GB/T 36195 畜禽粪便无害化处理技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

种鸡场 **breeding chicken farm**

饲养曾祖代、祖代或父母代种鸡的规模化养殖场。

3.2

鸡白痢 **pullorum disease**

由鸡白痢沙门菌引起以雏鸡下痢和败血症、成年鸡隐性感染为特征的传染病。

3.3

鸡白痢沙门菌净化 **eliminate salmonella pullorum**

在一个饲养场或指定区域内,通过持续检测和监测发现鸡白痢沙门菌病原或抗体阳性鸡只,并通过淘汰阳性鸡只和维持阴性鸡群的生物安全措施,以消除本场鸡群鸡白痢沙门菌感染的过程。

4 种鸡场鸡白痢沙门菌净化程序

种鸡场鸡白痢沙门菌净化程序包含 3 个阶段,其中第一阶段为鸡白痢阳性鸡淘汰,第二阶段为净化鸡群生物安全措施,第三阶段为净化效果评估。程序流程如图 1 所示。

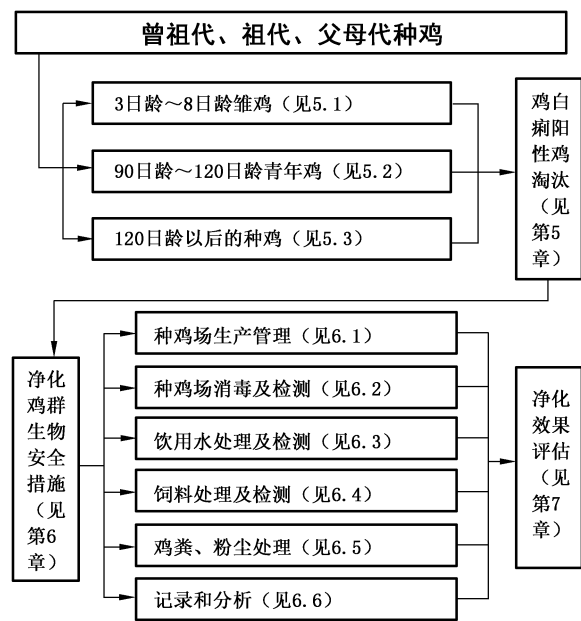


图 1 种鸡场鸡白痢沙门菌净化程序流程图

5 鸡白痢阳性鸡淘汰

5.1 3 日龄~8 日龄雏鸡

5.1.1 样品采集

采集 3 日龄~8 日龄雏鸡泄殖腔拭子样品，每 10 只鸡泄殖腔拭子样品混合为 1 份进行鸡白痢病原检测。

5.1.2 检测方法

5.1.2.1 按照附录 A 中 A.1 进行鸡白痢沙门菌的分离或按照 A.2 进行实时荧光定量 PCR 检测。

5.1.2.2 复检:任一方法检测出的鸡白痢沙门菌病原或抗体阳性样品，采用相同方法对所检样品的每一只鸡进行复检。

5.1.3 检测后的处理

对复检结果为阳性鸡只进行淘汰和无害化处理，同时对阳性鸡所在栋舍按照 GB/T 25886 要求进行消毒。对检测为阴性的鸡只按照第 6 章生物安全措施进行饲养。

5.2 90 日龄~120 日龄青年鸡

5.2.1 样品采集

采集 90 日龄~120 日龄青年鸡的全血或血清样品进行鸡白痢沙门菌抗体检测；或采集泄殖腔样品，每 10 只鸡泄殖腔拭子样品混合为 1 份进行鸡白痢沙门菌病原检测。

5.2.2 检测方法

5.2.2.1 采集的全血或血清样品，采用平板凝集试验检测鸡白痢沙门菌抗体，按照 A.3 进行。

5.2.2.2 采集鸡泄殖腔拭子样品,按照 A.1 进行鸡白痢沙门菌的分离或按照 A.2 进行实时荧光定量 PCR 检测。

5.2.2.3 复检:任一方法检测出的鸡白痢沙门菌病原或抗体阳性样品,采用相同方法对所检样品的每一只鸡进行复检。

5.2.3 检测后的处理

对复检结果为阳性鸡只进行淘汰和无害化处理,同时对阳性鸡所在栋舍按照 GB/T 25886 要求进行消毒。对检测为阴性的鸡只按照第 6 章生物安全措施进行饲养。

5.3 120 日龄以后的种鸡

5.3.1 样品采集

种鸡群 120 日龄以后,每间隔 3 个月,按照 20% 比例采集全血或血清样品进行鸡白痢沙门菌抗体检测。或按照 20% 的比例采集泄殖腔样品,每 10 只鸡泄殖腔拭子样品混合为 1 份进行鸡白痢沙门菌病原检测。

5.3.2 检测方法

同 5.2.2。

5.3.3 检测后的处理

5.3.3.1 对复检结果为阳性鸡只进行淘汰和无害化处理,同时对阳性鸡所在栋舍按照 GB/T 25886 要求进行消毒。对检测为阴性的鸡只按照第 6 章进行管理。

5.3.3.2 若样品阳性率超过 0.2%,则采用相同方法增加全群普检 1 次,淘汰和无害化处理阳性鸡。对检测为阴性的鸡只按照第 6 章生物安全措施进行饲养。

6 净化鸡群生物安全措施

6.1 种鸡场生产管理

6.1.1 种鸡场同一品种鸡执行全进全出制度。

6.1.2 饲养已经净化的品系时,避免不同品种或不同来源的种鸡在同一鸡场饲养而发生交叉感染。

6.1.3 一个鸡场在同一时期只能饲养同一来源的种鸡。

6.1.4 开展本场投入品(饲料、饮水、疫苗等)的沙门菌检测,避免外来病原传入风险。

6.1.5 不同来源的种蛋在孵化和出雏之时分开,避免与其他鸡群(特别是非净化鸡群)同时孵化和出雏,防止孵化交叉感染。

6.1.6 鸡白痢阴性群的工作人员、物品、用具、设备等均需固定化,避免其他鸡群的工作人员进入实施净化的鸡群中工作。

6.2 种鸡场消毒及检测

6.2.1 对引进雏鸡前对鸡舍及周边环境进行全面消毒,消毒后采集鸡舍内墙角、鸡笼、地面、墙面等拭子样品按照 A.1 或 A.2 中的方法对鸡白痢沙门菌进行检测,确保鸡舍环境无鸡白痢沙门菌污染。

6.2.2 每月采用沉降法对鸡舍空气中细菌总数进行检测,根据测定结果制定消毒程序,并按照 GB/T 25886 进行消毒。

6.3 饮用水处理及检测

6.3.1 鸡场饮水应进行净化处理,可采用酸化剂(酸性电解水等)进行饮水消毒,使饮水达到 GB 5749 要求。

6.3.2 每 3 个月按照 GB/T 5750.2 的规定进行鸡场饮水样品采集,进行沙门菌病原检测,检测方法按照 A.1 或 A.2 的方法进行。通过检测确保水中无鸡白痢沙门菌污染。

6.4 饲料处理及检测

6.4.1 鸡场饲料储运过程需实现全封闭。

6.4.2 饲料中沙门菌检测应按照 GB/T 13091 的规定进行,检测不合格原料和成品不应使用。

6.5 鸡粪、粉尘处理

6.5.1 鸡场鸡粪每天进行清理,地面平养垫料及时翻耙,避免潮湿或结块。粪便的无害化处理应符合 GB/T 36195 的规定。

6.5.2 每周对鸡舍内和鸡舍尾端粉尘进行清理。

6.6 记录和分析

对 6.1~6.5 中涉及操作进行记录,每月进行 1 次统计分析。且保存记录应不少于 3 年。

7 净化效果评估

7.1 评估方法

7.1.1 样品采集

90 日龄以内鸡只采集 300 份种鸡泄殖腔拭子,超过 90 日龄鸡只采集 300 份血清样品或 300 份泄殖腔拭子样品。

7.1.2 样品检测

按照 A.1、A.2 或 A.3 任一检测方法进行检测。当检测结果不一致时,以实时荧光定量 PCR 检测方法为准。

7.2 净化效果判定

曾祖代、祖代种鸡场鸡白痢沙门菌病原或抗体阳性率低于 0.2%,父母代鸡场鸡白痢沙门菌病原或抗体阳性率低于 0.5%,且公鸡鸡白痢沙门菌病原或抗体阳性率为 0,种鸡场连续 2 年以上无鸡白痢临床病例,即认为本场达到鸡白痢沙门菌净化状态。

附 录 A
(规范性)
种鸡场鸡白痢沙门菌抗体、病原检测方法

A.1 鸡白痢沙门菌的分离方法

- A.1.1 采集样品加入 5 mL 缓冲蛋白胨水(BPW)前增菌液中,置于 37 ℃摇床中,220 r/min 培养 18 h~24 h。
- A.1.2 取培养后的前增菌液 0.5 mL 加入 4.5 mL 四硫磺酸钠煌绿基础(TTB)增菌液中,置于 42 ℃摇床中,220 r/min 培养 18 h~24 h。
- A.1.3 接种针蘸取培养后的 TTB 增菌液,三区划线于木糖赖氨酸脱氧胆酸琼脂(XLD)或木糖赖氨酸硫酸四癸钠琼脂(XLT4)选择性培养基平板,倒置于 37 ℃培养箱中,培养 18 h~24 h。
- A.1.4 可疑沙门菌菌落呈粉红色,带或不带黑色中心,或呈现全部黑色的菌落。
- A.1.5 可疑沙门菌落的血清型鉴定,按照 GB 4789.4 进行。

A.2 鸡白痢沙门菌实时荧光定量 PCR 检测

A.2.1 鸡白痢沙门菌的增菌培养

采集样品加入缓冲蛋白胨水(BPW)前增菌液中,置于 37 ℃摇床中,220 r/min 培养 18 h~24 h。取 1 mL 培养液,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取待检样品基因组 DNA。同时培养鸡白痢(CVCC535)标准株,提取 DNA 作为阳性对照。

A.2.2 实时荧光定量 PCR 扩增体系

鸡白痢沙门菌 *SEP* 基因作为特异性检测引物,进行实时荧光定量 PCR 检测。引物序列及探针见表 A.1,实时荧光定量 PCR 反应体系见表 A. 2。选择 FAM 通道检测鸡白痢沙门菌荧光信号;设置反应程序:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,共 40 个循环,于每一循环结束时收集 FAM 荧光信号;设置反应体系为 20 μL。

表 A.1 鸡白痢沙门菌实时荧光定量 PCR 引物序列

名称	引物序列	片段大小	荧光标记探针
<i>SEP</i> 1-Forward	F 5'-CCCGGATTGGACCTCAAGTG-3'	98 bp	5'-FAM 3'-BHQ1
<i>SEP</i> 1-Reverse	F 5'-ATGTTACGGGACGAGTGGGT -3'		
<i>SEP</i> 1-Probe	F 5'-ACGCACAATCACTGTGCGACCATCCGG-3'		

表 A.2 实时荧光定量 PCR 反应体系

组分	体积/μL
2× <i>Taq</i> Man Fast qPCR 预混液	10
上游引物	0.6
下游引物	0.6

表 A.2 实时荧光定量 PCR 反应体系（续）

组分	体积/ μL
Taq Man 探针	0.6
无菌无核酸酶水	3.2
模板 DNA	5
总计	20

A.2.3 实时荧光定量 PCR 结果的判定

当阳性对照 Ct 值小于或等于 28.0 且出现典型扩增曲线,阴性对照无 Ct 值无扩增曲线时,试验成立。当被检样品出现典型的扩增曲线且 Ct 值小于或等于 35.0 时,判为鸡白痢沙门菌核酸阳性;被检样品无 Ct 值,判为鸡白痢沙门菌核酸阴性;对于 Ct 值大于 35.0 的样品且出现典型的扩增曲线时应重检,如重检 Ct 值小于或等于 35.0 时,判为鸡白痢沙门菌核酸阳性,否则判为阴性。

A.3 鸡白痢沙门菌抗体平板凝集检测方法

A.3.1 材料准备

A.3.1.1 鸡伤寒和鸡白痢多价染色平板抗原。标准品阳性血清（500 IU/mL）、弱阳性血清（10 IU/mL）、阴性血清。

A.3.1.2 玻璃板、移液器、吸管、金属丝环（内径 7.5 mm~8.0 mm）、酒精灯、针头、消毒盘和酒精棉等。

A.3.2 操作步骤

在 20℃~25℃ 环境条件下,用移液器或吸管吸取抗原,垂直滴于玻璃板上 1 滴（约 0.05 mL）,然后用消毒的针头刺破鸡的翅静脉或冠尖,取血 0.05 mL（相当于内径 7.5 mm~8.0 mm 金属丝环的两满环血液）或者 0.05 mL 血清,与抗原混合均匀,并使其散开至直径约为 2 cm,计时判定结果。同时,设强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清对照。

A.3.3 结果判定

在 2 min 内,抗原与强阳性血清呈 100%凝集（++++）,弱阳性血清呈 50%凝集（++）,阴性血清不凝集（-）,则判试验有效。被检全血与抗原出现 50%（++）及以上凝集者为阳性,不发生凝集则为阴性。介于两者之间为可疑反应,需应用试管凝集法重复检测 1 次。凝集结果具体判定如下:

- 100% 凝集（++++）:紫色凝集块大而明显,反应液清亮;
- 75% 凝集（+++）:紫色凝集块较明显,反应液有轻度浑浊;
- 50% 凝集（++）:出现明显的紫色凝集颗粒,反应液较为浑浊;
- 25% 凝集（+）:仅出现少量的细小颗粒,反应液浑浊;
- 0% 凝集（-）:无凝集颗粒出现,反应液浑浊。