

ICS 65.020.30

CCS\_B 41

# 团体标准

T/CAAA XXX—2021

## 养驴场马流产沙门氏菌病 防控技术规范

Technical specification for prevention and control of equine abortus  
salmonellosis in donkey farms

(征求意见稿)

2021-XX-XX 发布

2021-XX-XX 实施

中国畜牧业协会 发布

## 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》给出的规定起草。

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。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：聊城大学、东昌府区农业农村局畜牧兽医事业发展中心、东阿阿胶股份有限公司、中国农业科学院兰州兽医研究所、山东省农业科学院、北京美莱博医学科技有限公司、山东灼生物技术有限公司、聊城市农业综合执法支队、辽宁东阿黑毛驴牧业科技有限公司、聊城市畜牧兽医事业发展中心、禹城惠民农业科技有限公司。

本文件主要起草人：刘文强、刘志林、任慧英、张健鹏、曹学香、谭鹏飞、齐来勇、许文婷、李乐军、秦绪岭、贾国富、张敬文、许丹丹、尹桂军、李在建、张翠翠、张敬文、李培勇、李亮亮、王彤彤、何飞、李维克、李洪波、李启蒙、杨涛、于杰、张伟、刘桂芹、李旭勇、朱明霞、周苗苗、邢世帅、贾涛。

# 养驴场马流产沙门氏菌病防控技术规范

## 1 范围

本文件规定了养驴场马流产沙门氏菌病防控技术的临床诊断、实验室诊断、预防、治疗和档案管理。本文件适用于养驴场由马流产沙门氏菌导致母驴流产的防控。

## 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 13078	饲料卫生标准
NY/T 541	兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
NY/T 570	马流产沙门氏菌病诊断技术
SN/T 1382	马流产沙门氏菌凝集试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**养驴场马流产沙门氏菌病** equine abortus salmonellosis of donkey farms

由马流产沙门氏菌引起的以母驴流产为主要特征的驴传染病，该病多见于规模化驴场。

## 4 试剂和材料

见附录A。

## 5 器械和设备

见附录B。

## 6 流行病学

### 6.1 传染源

带有马流产沙门氏菌的驴是主要的传染源。

### 6.2 传播途径

主要通过消化道，也可以通过交配感染。隐性带菌动物可由内源感染而发病。

### 6.3 易感动物

主要感染马属动物，包括马、驴、骡。

### 6.4 发病特点

6.4.1 一年四季均可发生，主要发生于春秋季节。一般为散发，有时呈地方性流行。

6.4.2 通常在妊娠后期发生流产，9~11月龄多见。

## 7 临床诊断

## 7.1 临床症状

7.1.1 该病极易感染初产母驴和初生驴驹，多数母驴在流产发生前无明显的临床症状。驴驹感染后易发生关节炎。

7.1.2 少数患病孕驴在发生流产前，会出现拒绝饮食，精神不安，出汗，轻微腹痛，乳房有轻度肿胀，排尿频繁，阴道有时会流出血样液体，继而发生流产。

7.1.3 流产后的会引起子宫炎症，体温升高。阴道还会流出红色至灰白色粘性液体。

7.1.4 若出现继发感染，体温可高达40℃，并出现严重的全身症状，阴道流出污红色腥臭味液体。

## 7.2 病理变化

胎衣不下，流产胎儿、胎膜水肿、增厚，表面附有糠麸样物质，部分胎膜呈污红色坏死。胎儿皮肤、黏膜、浆膜及实质脏器呈现黄染和出血性败血症变化。个别脏器发生坏死，肝脏出血，脾脏边缘有出血点。羊水浑浊，呈淡黄色或紫红色。

## 7.3 判定

疑似病例可采用病原分离、PCR 检测、凝集实验等方法确诊。

## 8 细菌分离鉴定

### 8.1 样品采集

应按 NY/T 541 的规定执行。主要包括血液、肛拭子、胎衣、羊水和流产胎儿的肝脏、脾脏等。

### 8.2 细菌分离培养

8.2.1 将采集的样本取少量接种于四硫磺酸钠煌绿增菌液中，于 37℃ 培养 18 h~24 h。增菌液呈现均匀浑浊，管底有粘稠沉淀物。将培养物划线接种于 SS 琼脂上，出现正圆形、无色或淡桔红色、半透明中等菌落，产 H<sub>2</sub>S 的菌株使菌落中心带黑色。

8.2.2 挑取疑似菌落接种普通斜面进行纯培养，并接种三糖铁琼脂和尿素琼脂，于 37℃ 孵育 18 h~24 h。三糖铁上出现斜面黄色或红色，底层黄色，产气，不分解尿素，产 H<sub>2</sub>S 的菌株使菌落底层带黑色。

### 8.3 显微镜检

将分离的菌落进行涂片，革兰氏染色，镜检。显微镜下（100×）可见中等大小、散在、着色良好的杆菌，革兰氏阴性。

### 8.4 生化特性鉴定

挑取斜面上的纯培养物，分别接种糖发酵管、蛋白胨水、磷酸盐葡萄糖蛋白胨水以及枸橼酸盐琼脂，于 37℃ 温箱中孵育 18 h~24 h。发酵葡萄糖产酸、不发酵乳糖，吲哚实验阴性，MR 实验阳性，VP 实验阴性，利用枸橼酸盐。

### 8.5 PCR 检测

#### 8.5.1 DNA 抽提

将采集组织样品加入 5 体积的无菌 PBS 研磨匀浆，5000 ×g 离心 15 min，收集 100 μL 上清液提取制备细菌模版 DNA，测其浓度后冻存备用。

#### 8.5.2 PCR 检测

在 0.2 mL PCR 薄壁管中配置 PCR 体系：12.5 μL 2×Taq PCR Master Mix、上下游引物（20 μmol/L）

各 1  $\mu\text{L}$ ，待测样品 DNA 模版（基因组 DNA 20~50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）2  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 8.5 $\mu\text{L}$ ，共 25  $\mu\text{L}$  体系。设置空白对照（以水为模板）。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$  30 s、60 $^{\circ}\text{C}$  30 s、72 $^{\circ}\text{C}$  20 s，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析，设立马流产沙门氏菌阳性片段和 DNA 标准分子量作为对照，电泳后用凝胶成像系统观察结果。

### 8.5.3 核酸序列测定

按照商品化胶回收试剂盒的说明书回收纯化 PCR 产物，连接至 pMD19-T 载体，转化 DH5  $\alpha$  感受态细胞，选择阳性克隆，提取质粒测序。将测序获得的基因序列使用 NCBI 中的 BLAST 进行检索。

### 8.5.4 结果判定

若电泳结果显示，待测样品扩增出大小为 411 bp 的核酸片段，与阳性对照条带一致，则初步判定马流产沙门氏菌核酸阳性，同时空白对照无条带，否则视为无效。待测样品扩出的阳性片段应进行核酸序列测定，若测序序列与提供的标准序列同源性大于 90%，则可以确诊为马流产沙门氏菌感染阳性，否则判定为阴性。

## 8.6 凝集实验

应按 SN/T 1382 规定的方法进行。

## 9 预防

### 9.1 环境卫生

9.1.1 对圈舍、产房、活动场、用具、环境定期消毒。

9.1.2 对流产病例的房舍、动物体表及周围环境进行严格消毒处理，严禁动物进入，消毒后检测合格方可进入。

9.1.3 及时清除潮湿的垫料和粪便，在固定地点高温堆肥处理。

### 9.2 饲养管理

#### 9.2.1 饮水

自由饮水，水质应符合 NY 5027 的要求。

#### 9.2.2 饲料

应符合 GB 13078 的要求。

#### 9.2.3 管理

饲喂优质牧草，秋冬做好保温，加强病驴驹护理。

### 9.3 检疫检查

9.3.1 对驴群应定期检疫，建立阴性健康种驴群，发现病驴和带菌驴应及时隔离治疗。

9.3.2 种公驴配种前应作马流产沙门氏菌检测，呈阴性方可配种。

9.3.3 新引进驴进行隔离检疫，确认健康后方可混群饲养。

### 9.4 无害化处理

将流产胎儿、胎衣与消毒剂混合后深埋或焚烧，对被污染的环境及用具，用 10%~20% 生石灰乳或 5% 来苏儿液彻底消毒，垫草应烧毁。

## 9.5 疫苗免疫

应注射疫苗预防为主。可使用马流产沙门氏菌活疫苗（C355 弱毒株）进行免疫。临用时，按瓶签注明的头份，加入 20%氢氧化铝胶生理盐水或生理盐水，稀释为每 1 头份 1 mL，于驴臀部肌肉注射。每年注射 2~3 次，间隔约 4 个月。怀孕驴可在当年 9~10 月和次年 1~2 月各注射 1 次。

## 9.6 药物预防

应提前 3~5 天给予敏感抗生素、微生态制剂或中兽医药。

## 9.7 生物安全管理

驴场内严禁饲养其他动物。生产区内不应屠宰和解剖驴只，不应带入任何畜产品。料库和驴舍应有防鸟防鼠设施。

## 10 治疗

### 10.1 抗菌药物治疗

根据药敏试验选取抗菌药物进行治疗。链霉素，肌肉注射，一次量，每 1 kg 体重 10 mg~15 mg。每日两次，连用 2 d~3 d。停药 2 d 后重复 1~2 个疗程。土霉素，肌肉注射，一次量，每 1 kg 体重 5 mg~10 mg，每日两次，隔天注射，连用 5 d~10 d。

### 10.2 对症治疗

流产后应及时用 0.5%高锰酸钾溶液冲洗子宫和阴道，或子宫注射青霉素 100 万 IU、红霉素 40 万 IU 和链霉素 1 g 溶液（分别用生理盐水 50 mL~100 mL 稀释），每天 1 次，直至无分泌物流出为止。

## 11 档案管理

### 11.1 记录

记录应统一、规范。记录内容包括驴的年龄、发病时间及症状，药品使用，药品的生产场家、生产日期、剂量、疗程、消毒、免疫、实验室检测结果，疗效及停药时间。

### 11.2 存档

分类归档，保存期限应按《畜禽标识和养殖档案管理办法》的规定执行。

附录 A  
(资料性)  
目的基因参考序列

### A.1 试剂和材料

A.1.1 商品化 Taq PCR Master mix 酶

A.1.2 ddH<sub>2</sub>O

A.1.3 引物：浓度 20 μM/L，其序列（5'→3'）为：

F: GTCAGGCGATTGCTAACC

R: CGCTCTTCACATCATATTTTT

扩增细菌基因中的 411 bp 的 DNA 片段。

A.1.4 SS 琼脂；四硫磺酸钠煌绿增菌液。

A.1.5 甲基红(MR)试剂及维培(VP)试剂，革兰氏染色液。

A.1.6 琼脂糖、50×TAE 缓冲液、核酸染料、DNA 相对分子质量标准物 Marker。

A.1.7 磷酸盐缓冲液 (PBS)：配置参见附录 B。

A.1.8 pMD19-T 载体、感受态细胞 DH5α。

A.1.9 马流产沙门氏菌标准阳性血清。

### A.2 器械和设备

A.2.1 PCR 扩增仪。

A.2.2 电泳仪和电泳槽。

A.2.3 凝胶成像仪。

A.2.4 恒温水浴锅。

A.2.5 高压灭菌锅。

A.2.6 高速离心机。

A.2.7 显微镜。

A.2.8 旋涡振荡仪。

### A.3 PCR 方法检测目的基因参考序列

PCR 方法检测目的基因参考序列如下：

GTCAGGCGATTGCTAACCGTTTCACCGCGAACATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC  
GCTAACGACGGTATCTCCATTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCT  
GCAGCGTGTGCGTGAACGGCGGTTGAGTCTGCTAACAGCACCAACTCCCAGTCTGACCTCGACT  
CCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTC  
AACGGCGTGAAAGTCCTGGCGCAGGACAACACCCTGACCATCCAGGTTGGTGCCAACGACGGTG  
AAACCATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCTGGGTCTGGATACGCTGAATGTGC  
AGAAAAAATATGATGTGAAGAGCG (411 bp)

注：参考序列菌株：*Salmonella enterica subsp strain 8356/95*, (GenBank: HE801378.1)

附录 B  
(规范性)  
试剂及其配制

B.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)

磷酸盐缓冲液 (PBS) 如下:

1L PBS (pH7.4) 配方: 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{P}_04$ ): 0.27 g, 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HP}_04$ ): 1.42 g, 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ): 8 g, 氯化钾 ( $\text{KCl}$ ) 0.2g, 加去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解, 然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4, 最后定容到 1L。

---