

doi:

# 鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品 制备用菌株的筛选

张媛, 魏财文, 李建, 王秀丽, 彭国瑞, 张一帆, 辛凌翔, 蒋玉文\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-08-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S852.6

**[摘要]** 为了制备鸡白痢沙门氏菌阳性血清标准型国家标准品及鸡白痢沙门氏菌阳性血清变异型国家标准品, 对中国兽医微生物菌种保藏管理中心保藏的 10 株来源背景清晰的鸡白痢沙门氏菌菌株的形态、生化特性、培养特性、血清学特性、抗原性进行了鉴定, 并进行了变异检查及沙门氏菌基于 *invA* 基因的 PCR 检测。结果表明, CVCC79201 株及 CVCC79207 株分别符合鸡白痢沙门氏菌标准型菌株及变异型菌株的特性, CVCC79201 株菌制备的抗原与 WHO 标准实验室提供的 Anti-S. Pullorum Serum(S) 及 Anti-S. Pullorum Serum(V) 国际标准品的强阳性血清和弱阳性血清均能发生 100% 凝集, CVCC79207 株菌制备的抗原与 Anti-S. Pullorum Serum(S) 国际标准品的弱阳性血清发生 75% 凝集, 与 Anti-S. Pullorum Serum(S) 国际标准品的强阳性血清及 Anti-S. Pullorum Serum(V) 国际标准品的强阳性血清和弱阳性血清均能发生 100% 凝集。用其制备免疫抗原免疫家兔后获得的阳性血清效价高于鸡白痢沙门氏菌阳性血清国际标准品。结果证明, CVCC79201 株及 CVCC79207 株可分别用于制备鸡白痢沙门氏菌阳性血清标准型国家标准品及鸡白痢沙门氏菌阳性血清变异型国家标准品。

**[关键词]** 鸡白痢; 沙门氏菌; 阳性血清; 国家标准品; 制备用菌株

## Selection of Strains for Preparation of the National *Salmonella pullorum* Standard Positive Sera

ZHANG Yuan, WEI Cai-wen, LI Jian, WANG Xiu-li, PENG Guo-rui,

ZHANG Yi-zhi, XING Ling-xiang, JIANG Yu-wen\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Yu-wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

**基金项目:** 家禽重要疫病诊断与检测新技术研究 (2016YFD0500800) 项目中课题“禽病检测标准物质与计量技术方法研究 (2016YFD0500809)”

**作者简介:** 张媛, 副研究员, 从事需氧菌类生物制品的检测工作; 魏财文, 副研究员, 从事细菌类兽用生物制品的检验及管理工作, 为共同第一作者。

**通讯作者:** 蒋玉文。E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

**Abstract:** To prepare *Salmonella pullorum* national standard positive sera (standard form) and *Salmonella pullorum* national standard positive sera (variant form), 10 strains of clear source background *Salmonella pullorum* were available from China veterinary culture collection center. Their bacterial morphology, biochemical characteristics, cultural characteristics, serological characteristics and antigenicity were identified. The variability check and *Salmonella invA* PCR detection were conducted. The results showed strain CVCC79201 and CVCC79207 were chosen for ideal strain characteristics. Antigen extracted from Strain CVCC79201 could 100% agglutinate strong/weak Anti-S.Pullorum Serum(S) or strong/weak Anti-S.Pullorum Serum(V), both available from the WHO standard laboratory. Antigen extracted from Strain CVCC79207 could 75% agglutinate weak Anti-S.Pullorum Serum(S), and 100% agglutinate strong Anti-S.Pullorum Serum(S) or strong/weak Anti-S.Pullorum Serum(V). The antigen extracted from strain CVCC79201 and CVCC79207 were used to immune rabbit with the antiserum prepared. The antiserum titers were higher than the international standard positive sera. And the results declared strain CVCC79201 and CVCC79207 were used for standard and variant form *Salmonella pullorum* national standard positive sera preparation.

**Key words:** pullorum; *Salmonella*; positive sera; national standard; strains for preparation

鸡沙门氏菌病包括鸡白痢沙门氏菌引起的鸡白痢、鸡伤寒沙门氏菌引起的鸡伤寒以及由与人类食物中毒密切相关的不同血清群沙门氏菌引起的鸡副伤寒。鸡沙门氏菌病一直都是影响养鸡业的细菌性传染病,严重影响雏鸡成活率,也是成年鸡减产的重要隐患之一,而且造成其肉蛋产品的污染,从而带来或引起食品安全问题<sup>[1]</sup>。水平传播和垂直传播在鸡白痢的流行过程中均发挥着重要作用<sup>[2]</sup>,鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌能够造成种蛋孵化率降低,影响雏鸡成活率,使种鸡生产性能下降,经济损失巨大。感染鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌的种鸡所产的蛋带菌率高达 33%<sup>[3]</sup>。鸡沙门氏菌病普遍存于我国鸡养殖业中,对养鸡业危害极大<sup>[4-6]</sup>。

目前国内对于鸡沙门氏菌病,尤其是对鸡白痢和鸡伤寒还无有效的疫苗可用。控制鸡白痢、鸡伤寒最有效的措施是参照中华人民共和国农业行业标准《NY/T 536-2002 鸡伤寒和鸡白痢诊断技术》<sup>[7]</sup>对鸡群进行鸡白痢-鸡伤寒抗体检测,淘汰阳性鸡只,直到父母代鸡沙门氏菌抗体阳性率控制在 0.3% 以下,祖代鸡沙门氏菌抗体阳性率控制在 0.1% 以下。国内市场上现有的鸡白痢鸡伤寒诊断试剂质量参差不齐,中国兽医药品监察所是我国兽

用标准物质研制、供应的法定单位,已有多年制备鸡白痢抗原和阳性血清的经验,但还需继续对阳性血清进行系统标准化研究。

英国国家生物标准与检定所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC),是世界卫生组织 WHO 的一个国际标准品供应中心,研制和供应鸡白痢沙门氏菌阳性血清(每毫升含 1000 国际单位)标准型及变异型标准品。鸡白痢阳性血清国际标准品由于制备过程复杂、需组织国际协作标定、费用较高、供应量少等原因,而难于被广泛用于鸡白痢鸡伤寒诊断结果的确认、诊断技术的验证。

鸡白痢沙门氏菌是研究、制备鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品的基础,筛选出抗原性及免疫原性良好的制备用菌株是标准物质建立的关键和重要前提,对标准物质的质量具有很大影响。本课题组对中国兽医微生物菌种保藏管理中心保藏的 10 株来源背景清晰的鸡白痢沙门氏菌菌株,分别对其形态、生化特性、培养特性、血清学特性、抗原性进行了鉴定,并进行了变异检查及沙门氏菌基于 *invA* 基因的 PCR 检测,从中筛选出分别符合标准型菌株特性及变异型菌株特性且抗原效价最为理想的 CVCC79201 株菌株及 CVCC79207 株菌株,两

株菌均具备较好的免疫原性,可分别用于制备标准型鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品及变异型鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品。

## 1 材料与amp;方法

1.1 菌株 备选鸡白痢沙门氏菌菌株,共 10 株,均为 CVCC 保藏<sup>[8]</sup>。各菌株来源历史如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株

Tab 1 Strains in the test

菌株编号(CVCC)	来源历史
523	瑞典国家兽医研究所。强毒株,2 亿 CFU 活菌肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
526	英国威桥国际生物标准品实验室。强毒株,5 亿 CFU 活菌肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
527	英国威桥国际生物标准品实验室。强毒株,2000 万 CFU 活菌肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
528	美国国家兽医服务实验室。强毒株,2000 万 CFU 肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
529	美国国家兽医服务实验室。强毒株,2000 万 CFU 肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
530	美国国家兽医服务实验室。强毒株,2000 万 CFU 肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
531	英国威桥国际生物标准品实验室。强毒株,2000 万 CFU 肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
532	英国威桥国际生物标准品实验室。强毒株,2000 万 CFU 肌注 3 日龄内雏鸡可致死。
79201	分离自北京双桥农场。强毒株,2 亿 CFU 肌注 5 日龄内雏鸡可致死。
79207	瑞典国家兽医研究所。强毒株,2 亿 CFU 活菌肌注 3 日龄内雏鸡可致死。

1.2 培养基及试剂 普通肉汤、普通琼脂、硫代硫酸钠琼脂、磷酸盐缓冲盐水(0.07 mol/L, pH7.0~7.2)均购自北京中海动物保健科技公司。革兰氏染色液、沙门氏菌生化鉴定管均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。国际标准品 Anti-S. Pullorum Serum(S)、Anti-S. Pullorum Serum(V)购自英国国家生物标准与检定所。沙门氏菌 O9 定型血清购自丹麦国家血清研究院。Premix Taq 购自 TaRaKa 公司。Marker II 购自 Biomed 公司。琼脂糖购自宝生物工程(大连)有限公司。染料 Goldview 购自 Biotium 公司。细菌比浊标准管购自中国食品药品检定研究院。沙门氏菌 O12<sub>2</sub>、O12<sub>3</sub> 定型血清、1:500 吡啶黄溶液、PCR 阴性对照品(大肠杆菌 PCR 产物)、鸡白痢鸡伤寒多价染色平板抗原参考品均由中国兽药药品监察所细菌制品检测室提供。

1.3 PCR 引物 选取沙门氏菌 invA 基因合成引物,上游引物为 5'-TGTTTCGTCATTCCATTACCT-3',下游引物为 5'-ATCGGCATCAATACTCATCT-3',引物均由上海 Invitrogen 公司合成。

1.4 实验动物 1.5~2.0 kg 健康家兔购自北京维

通利华实验动物技术有限公司。

1.5 形态 取菌种培养物进行革兰氏染色,镜检。

1.6 生化特性 参照试剂的使用说明书进行检定。

1.7 培养特性 菌种接种普通肉汤和普通琼脂平板,37 ℃ 培养 24 h,观察细菌生长特性。

1.8 变异检查 将菌种的普通琼脂新鲜培养物,与 1:500 吡啶黄溶液及生理盐水分别进行平板凝集反应。

1.9 PCR 检测 无菌操作取 1.0 mL 灭菌生理盐水于 1.5 mL EP 管中,用接种环挑取不同菌种的菌落纯培养物置于灭菌生理盐水中,沸水浴 5 min,放置低温迅速冷却,备用。PCR 体系:Premix Taq 12.5 μL,上游引物和下游引物各 0.5 μL,模板溶液 2 μL,三蒸水 10.5 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 45 s,53 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 32 个循环;最后 72 ℃ 5 min,20 ℃ 5 min。PCR 产物电泳鉴定:配制 2.0 % 琼脂糖溶液,按 50 μL/L 加 Goldview 制胶,取 7 μL PCR 产物点样,以 Marker II 作对照,120 V 电泳 20 min 取出凝胶,在凝胶成像仪上观察

结果。

1.10 血清学特性 参照试剂的使用说明书进行检定。

1.11 抗原性鉴定 用菌种接种硫代硫酸钠琼脂扁瓶培养基,收集菌苔后,调整菌液浓度为  $2.0 \times 10^{10}$  CFU/mL,灭活后制备成平板凝集反应抗原。将 WHO 标准实验室提供的 Anti-S.Pullorum Serum (S) 及 Anti-S.Pullorum Serum (V) 国际标准品进行稀释,使其终浓度分别为 500 IU/mL (强阳性血清) 及 10 IU/mL (弱阳性血清)。取稀释好的强阳性血清与弱阳性血清分别与反应抗原进行平板凝集试验,2 min 内记录结果。

1.12 免疫原性

1.12.1 免疫抗原的制备 根据抗原性鉴定结果,分别选择抗原效价最好的标准型鸡白痢沙门氏菌及变异型鸡白痢沙门氏菌各 1 株制备免疫抗原。接种硫代硫酸钠琼脂扁瓶,置 37 °C 培养 48 h,取纯粹生长的扁瓶,吸弃凝集水,用含 2 % 甲醛溶液的磷酸盐缓冲盐水 (0.07 mol/L, pH7.0~7.2) 将培养物洗下,收集于带玻璃珠的中性玻璃瓶中,振荡打碎菌块,置 37 °C 灭活 48 h,经无菌检验合格后,无水乙醇沉淀浓缩,以细菌比浊标准管为标准确定其浓度。保存于 2~8 °C 备用。

1.12.2 免疫程序 家兔静脉注射免疫原 6 次,免疫剂量分别为  $1.0 \times 10^9$  CFU/只、 $2.0 \times 10^9$  CFU/只、 $4.0 \times 10^9$  CFU/只、 $8.0 \times 10^9$  CFU/只、 $1.6 \times 10^{10}$  CFU/只、 $3.2 \times 10^{10}$  CFU/只,每次间隔 7 日,末次注射 7 日后试血。如血清效价不够,再用最后免疫剂量注射 1 次,当血清效价达到 1 : 2560 以上,方可采血。

1.12.3 血清制造 以常规方法采血,提取血清,按血清总量的 0.02 % 加入硫柳汞。

1.12.4 血清效价测定 用菌种接种硫代硫酸钠琼脂扁瓶培养基,收集菌苔后,调整菌液浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL,灭活后制备成试管凝集反应抗原。将血清稀释成 1 : 400、1 : 800、1 : 1600……1 : 12800 等稀释度;同法稀释 Anti-S.Pullorum Serum (S) 及 Anti-S.Pullorum Serum (V) 国际标准品。吸取每个稀释度的血清加入试管中,每管 1.0 mL,每管加入

试管凝集反应抗原 1.0 mL。抗原对照为含 0.5 % 苯酚生理盐水 1.0 mL 与试管凝集反应抗原 1.0 mL 混合,观察是否有自凝现象。振摇混匀后,置 37 °C 反应 20 h,然后置室温 2 h,记录结果。

## 2 结果

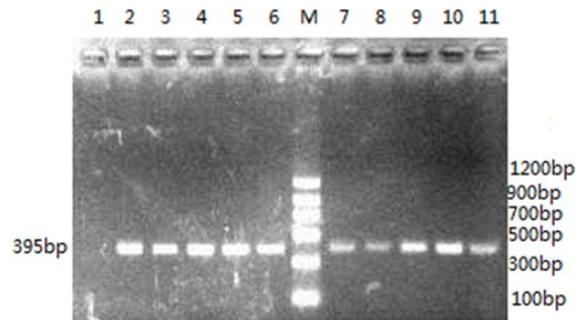
2.1 形态 经染色观察,10 株菌均为革兰氏阴性小杆菌。

2.2 生化特性 10 株菌的生化特性均符合沙门氏菌的特性。

2.3 培养特性 10 株菌在普通肉汤中的生长均为一致混浊,在普通琼脂平板上均生长为光滑湿润、微隆起、半透明的圆整菌落。

2.4 变异检查 经平板凝集试验,10 株菌与 1 : 500 吡啶黄溶液和生理盐水均不发生凝集。

2.5 PCR 检测 用根据沙门氏菌 invA 基因合成的引物进行 PCR 扩增,10 株菌均可扩增出 395 bp 的特异性条带,扩增结果见图 1。



M: Marker II ; 1: 阴性对照: 大肠杆菌; 2: 79207 株; 3: 79201 株; 4: 532 株; 5: 531 株; 6: 530 株; 7: 529 株; 8: 528 株; 9: 527 株; 10: 526 株; 11: 523 株  
M: Marker II ; 1: Negative control: E.coli; 2: CVCC79207 strain; 3: CVCC79201 strain; 4: CVCC532 strain; 5: CVCC531 strain; 6: CVCC530 strain; 7: CVCC529 strain; 8: CVCC528 strain; 9: CVCC527 strain; 10: CVCC526 strain; 11: CVCC523 strain

图 1 10 株菌 invA PCR 产物的电泳

Fig 1 Electrophoresis of invA PCR products from 10 strains

2.6 血清学特性 经平板凝集试验, CVCC523、526、527、528、79201 株菌的血清型为沙门氏菌 O9、O12<sub>3</sub>, 为标准型鸡白痢沙门氏菌; CVCC529、530、

531、532、79207 株菌的血清型为沙门氏菌 O9、O12<sub>2</sub>,为变异型鸡白痢沙门氏菌。

2.7 抗原性鉴定 经抗原性鉴定, CVCC523、526、527、528、529、530、531、532、79201、79207 株菌制备的抗原与 WHO 标准实验室提供的 Anti-S.Pullorum Serum(S) 及 Anti-S.Pullorum Serum(V) 国际标准品的强阳性血清和弱阳性血清均能发生不同程度的凝集反应,但标准型菌株中的 CVCC79201 株及变异型菌株中的 CVCC79207 株制备的抗原与国际标准品 Anti-S.Pullorum Serum(S) 及 Anti-S.Pullorum

Serum(V) 的凝集效价均高于其它抗原,效价测定结果见表 2。平板凝集反应判定标准:++++表示出现明显的颗粒状或片状凝集,液体完全透明,即 100%凝集;+++表示出现明显的颗粒状或片状凝集,但液体微混浊,即 75%凝集;++表示出现均匀一致的凝集颗粒,液体中等混浊,即 50%凝集;+表示出现细微颗粒,液体混浊不透明,即 25%凝集;-表示未出现凝集,液体完全混浊不透明,即无凝集。当 50 μL 抗原与 50 μL 含 0.5% 苯酚生理盐水无凝集(-)时试验成立。

表 2 10 株菌的抗原性鉴定结果

Tab 2 Antigenic characteristics of 10 strains

菌株编号	Anti-S.Pullorum Serum(S)		Anti-S.Pullorum Serum(V)	
	强阳性血清	弱阳性血清	强阳性血清	弱阳性血清
CVCC523	++++	++++	++++	+++
CVCC526	++++	+++	++++	++
CVCC527	++++	++++	++++	++
CVCC528	++++	++++	++++	++
CVCC79201	++++	++++	++++	++++
CVCC529	++++	++	++++	++
CVCC530	++++	+	++++	+++
CVCC531	++++	+	++++	+++
CVCC532	++++	+	++++	++
CVCC79207	++++	+++	++++	++++

经形态、生化特性、培养特性、变异检查、PCR 检测结果表明, CVCC523、526、527、528、529、530、531、532、79201、79207 均为沙门氏菌。根据血清学特性、抗原性鉴定结果, CVCC79201 株及 CVCC79207 株分别符合鸡白痢沙门氏菌标准型菌株及变异型菌株的特性,且抗原效价最为理想。

2.8 免疫原性 免疫 CVCC79201 株制备的标准型抗原的 6 只家兔血清试管凝集效价均高于 Anti-S.Pullorum Serum(S) 国际标准品血清效价,免疫 CVCC79207 株制备的变异型抗原的 6 只家兔血清试管凝集效价均高于 Anti-S.Pullorum Serum(V) 国际标准品血清效价,见表 3、表 4。试管凝集反应判

定标准:++++表示抗原呈坚实凝块或呈细沙粒样均匀铺于孔底,且孔底不可见抗原沉积,即 100%凝集;+++表示抗原均匀铺于孔底,边缘可有卷曲,且孔底可见微量抗原沉积,即 75%凝集;++表示抗原沉积于孔底,可形成扣状或环状,孔底沉积的抗原明显少于生理盐水对照,且沉积的抗原四周有明显凝集颗粒,即 50%凝集;+表示抗原沉积于孔底,可形成扣状或环状,孔底沉积的抗原略小于生理盐水对照,且沉积的抗原的四周有少量凝集颗粒,即 25%凝集;-表示抗原沉积于孔底,边缘光滑整齐,且不可见凝集颗粒者,即无凝集。判定时应按血清最终稀释度计算,如第一管中血清稀释倍数为 1:

400,其加入等量抗原后最终稀释度为 1 : 800。当 "+" 凝集的最高血清最终稀释度判定为血清效价。抗原对照无凝集 (-) 时试验成立,以出现不低于 "+"

表 3 抗鸡白痢沙门氏菌血清(标准型)效价测定结果

Tab 3 Potency of Anti-S.Pullorum Serum(S)

血清编号	血清最终稀释度					
	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 25600
1	++++	++++	+++	+++	++	+
2	++++	++++	+++	+++	++	+
3	++++	++++	++++	+++	++	+
4	++++	++++	++++	++++	+++	++
5	++++	++++	++++	++++	+++	++
6	++++	++++	+++	+++	++	+
S 国际	++++	+++	+	-	-	-

表 4 抗鸡白痢沙门氏菌血清(变异型)效价测定结果

Tab 4 Potency of Anti-S.Pullorum Serum(V)

血清编号	血清最终稀释度					
	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	1 : 6400	1 : 12800	1 : 25600
1	++++	++++	+++	+++	++	+
2	++++	++++	+++	+++	++	++
3	++++	++++	++++	++	+	-
4	++++	++++	+++	++	++	+
5	++++	++++	+++	++	+	+
6	++++	++++	+++	++	++	+
V 国际	++++	+++	+	-	-	-

可见, CVCC79201 株及 CVCC79207 株均具备较好的免疫原性,故选用标准型鸡白痢沙门氏菌 CVCC79201 株作为制备鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品(标准型)的生产菌株,选用变异型鸡白痢沙门氏菌 CVCC79207 株作为制备鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品(变异型)的生产菌株。

### 3 讨论

根据《中华人民共和国兽药典》二〇一五年版<sup>[9]</sup>规定,鸡白痢、鸡伤寒多价染色平板凝集试验阳性血清诊断试剂制备方法中要求使用鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品进行标定。但是,鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品尚未形成统一的

标准化的制备规程。课题组按照《中华人民共和国兽药典》二〇一五年版及《兽用生物制品规程》二〇〇〇年版相关要求,开展鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品的研制工作。生产用菌株是制备标准物质最主要的原材料,菌株自身的特性直接关系到标准物质的质量,因此选定生产用菌种是研制鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品的首要工作。

英国威桥国际生物标准品实验室(NIBSC)是 WHO 的一个国际标准品供应中心实验室。美国国家兽医服务实验室(NVSL)和瑞典国家兽医研究所(SVA)是分别隶属于美国农业部和瑞典农业部领导的动物疫病诊断官方权威机构,均是国家兽医参

考实验室。本研究选用的备选菌株多数是中国兽医微生物菌种保藏管理中心从此三家实验室引进的标准菌株,具备研究背景清晰、毒力强、免疫原性稳定的特点,适宜用作制备阳性血清国家标准品的候选菌株。

本研究选定 CVCC79201 株及 CVCC79207 株分别作为制备鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品(标准型)及鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品(变异型)的生产用菌株,此两株菌不仅完全符合鸡白痢沙门氏菌的特性,而且具备良好的抗原性及免疫原性。标准型鸡白痢沙门氏菌 CVCC79201 株抗原制备的抗血清效价均不低于 1:12800,变异型鸡白痢沙门氏菌 CVCC79207 株抗原制备的抗血清效价均不低于 1:6400,均高于标准型及变异型鸡白痢沙门氏菌阳性血清国际标准品 1:1600 的血清效价,这不仅保证了用此两株菌制备的国家标准血清含有不低于国际标准血清的活性物质,而且可获得较高的产量。

下一步,课题组将按照“兽用生物制品国家标准物质的制备与标定规定”的相关要求完成标准物质候选物的筛选、制备及标定工作。重点将开展生物标准物质的量值溯源及传递工作,对鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品中的生物活性物质进行度量,建立由生物特性决定的相关溯源体系,研究确定适合生物标准物质特点的相关导出单位。制备出的鸡白痢沙门氏菌阳性血清国家标准品将作为实物标尺用于鸡白痢沙门氏菌抗原参考品、诊断液以及鸡白痢沙门氏菌阳性血清诊断液的效价标定,减少不同厂家及同一厂家不同批次产品间差异,使种鸡场鸡白痢抗体检测结果更准确,从而促进鸡白痢净化工作的开展。

## 参考文献:

[1] 谢懋英,赖婧,马立才,等.肉鸡产业链中沙门菌流行情况及其耐药性[J].中国兽医学报,2014,34(11):1790-1794.  
Xie M Y, Lai J, Ma L C, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in a broiler meat production chain from

farm level to retail[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(11): 1790-1794.

- [2] 殷俊磊,李求春,耿士忠,等.鸡白痢沙门菌研究进展[J].中国兽医学报,2016,36(9):1624-1629.  
Yin J L, Li Q C, Geng S Z, et al. Advances in *Salmonella pullorum*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016, 36(9): 1624-1629.
- [3] 张永第.鸡白痢沙门氏菌的分离鉴定及微量平板凝集抗原的制备[D].山西:西北农林科技大学,2010.  
Zhang Y D. Isolation and identification of *Salmonella pullorum* and preparation of micro plate agglutination antigen[D]. Shanxi: Northwest Agriculture and Forestry University, 2010.
- [4] 王亮.山东省部分种鸡场鸡白痢和滑液囊支原体病的流行病学调查[D].山东:山东农业大学,2015.  
Wang L. The epidemiology investigation of Pullorosis and Mycoplasma Synovial on Partial Breeding Chicken Farms, Shandong [D]. Shandong: SHANDONG Agricultural University, 2015.
- [5] 方翟.湖北省鸡源沙门氏菌的分离鉴定和耐药性分析[D].湖北:华中农业大学,2014.  
Fang D. Isolation, identification and antibiotic resistance study of Salmonella from chickens in Hubei province[D]. Hubei: HUAZHONG Agricultural University, 2014.
- [6] 钱明珠,王申峰,许兰菊,等.河南鸡源沙门菌的分离鉴定及其耐药性分析[J].畜牧与兽医,2012,44(8):29-33.  
Qian M J, Wang S F, Xu L J, et al. Isolation and identification of Salmonella from chickens in Henan and drug resistance [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2012, 44(8): 29-33.
- [7] NY/T 536-2002.鸡伤寒和鸡白痢诊断技术[S].  
NY/T 536-2002. Diagnostic techniques for fowl typhoid and pullorum disease[S].
- [8] 中国兽医药品监察所.中国兽医菌种目录[M].2版.北京:中国农业科学技术出版社,2002:94-95.  
China Institute of Veterinary Drugs Control. China veterinary species catalogue [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2002: 94-95.
- [9] 中华人民共和国药典二〇一五年版三部[S].  
Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (volume III, 2015) [S].