

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 559—2002

禽曲霉菌病诊断技术

Diagnostic techniques for avian aspergillosis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

禽曲霉菌病(avian aspergillosis)是多种禽类、哺乳动物和人畜共患的一种真菌病。主要侵害呼吸系统,在肺和气囊发生炎症和小结节,导致呼吸困难,甚至窒息死亡。病原体主要为曲霉属(*Aspergillus*)中的烟曲霉(*A. fumigatus*)和黄曲霉(*A. flavus*),其次为构巢曲霉(*A. nidulans*)、黑曲霉(*A. niger*)和土曲霉(*A. terreus*)等。本病发生于世界各地,对雏鸡的危害最大,可引起幼雏大批死亡,造成重大经济损失。

对曲霉菌病的诊断,近年来提出了一些新技术。但是,各国确定的常用方法,仍是本标准规定的病理学检查和病原学检查。病理学检查(包括在病变组织内发现曲霉菌)可以确定病性,病原学检查不仅可以提高诊断率,而且能够鉴定曲霉菌菌种。

国际上无相应的诊断标准或规范可供参照。本标准的实施,对提高我国禽曲霉菌病的诊断水平,保证养禽业健康发展,将起到重要的作用。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国人民解放军军需大学。

本标准主要起草人:宣华、向华。

禽曲霉菌病诊断技术

1 范围

本标准规定了禽曲霉菌病病理学和病原学检查的技术要求。

本标准适用于禽(鸟)类曲霉菌病的诊断和检疫。

2 病理学检查

2.1 材料准备

2.1.1 器材

小动物解剖器具,灭菌试管(供采集真菌学检查样品用),普通显微镜等。

2.1.2 试剂

体积分数为10%的甲醛溶液,30%甘油缓冲溶液,其配方见附录A。

2.2 尸体剖检方法

按照常规的禽类尸体剖检术式,将可疑病禽的各内脏器官取出,逐一检查。重点检查呼吸系统。如发现可疑病变,先取1份置于无菌中试管内或30%甘油缓冲溶液(见第A.1章)中,供病原学检查用,再取1份置入10%甲醛溶液内,供病理组织学检查用。

2.3 主要病理变化

禽曲霉菌病的病变主要见于呼吸系统,在肺脏和气囊形成数量不等、粟粒大至绿豆粒大的结节,结节质地较硬,切面呈同心圆层状。显微镜检查,见结节周边为淋巴细胞、多核巨细胞和成纤维细胞构成的肉芽组织,中央为干酪样坏死区,内含大量的霉菌菌丝。可在气囊、气管、支气管、肺脏及腹膜表面形成大小不一的霉菌斑,菌斑上有灰绿色粒状物或绒球状物。此外,有时在眼睑内、肝、脾、肾、消化系统乃至神经系统表面也能发现类似的结节或菌斑病变。

3 病原学检查

3.1 材料准备

3.1.1 器材

载玻片,盖玻片,培养皿,铂金耳或针,恒温箱,手术刀,普通显微镜等。

3.1.2 试剂

20%氢氧化钾溶液,乳酸酚棉蓝染色液,沙保劳(Sabouraud)氏葡萄糖琼脂培养基或改良察贝克(Czapek)氏琼脂培养基等,其配制方法见附录A。

3.1.3 样品采集

对病理学检查可疑的病禽,应无菌操作采取带有病变(如结节、霉菌斑等)的组织各数小块,置于灭菌容器(如中试管)内冷藏,并尽快送检,如果不能立即送检,可暂时保存于30%甘油缓冲液中。

3.2 检查方法

3.2.1 压滴标本法

取结节置于载玻片上,用手术刀切开,由切面刮取干酪样坏死组织,或由病变组织表面刮取霉菌斑,或用铂金针钩取纯培养物置于载玻片中央,加1~2滴乳酸酚棉蓝染色液或生理盐水,用大头针将组织块或菌团撕扯开,压上盖玻片(注意勿产生气泡),制成压滴标本。如果组织碎块较硬,可改用1~2滴

20%氢氧化钾(KOH)溶液,并在火焰上微微加温后压片。显微镜检查时,先用低倍物镜发现目标,再用高倍物镜仔细观察菌体形态。经棉蓝(见第 A.2 章)染色的菌体呈蓝色。

3.2.2 分离培养法

取沙保劳(Sabouraud)氏葡萄糖琼脂培养基(见第 A.3 章)或改良察贝克氏琼脂(见第 A.4 章)培养皿若干个(通常每份样品用 4 个),做好标记。将铂金耳在火焰上烧灼灭菌,冷却后钩取干酪样坏死组织或霉菌斑,均匀涂抹于培养基表面;或者用铂金针蘸取样品,小块点播刺种于培养基表层。接种完毕,将铂金耳或针在火焰上烧灼灭菌,将接种过的培养皿放在 27℃或 37℃恒温箱内进行培养。通常于 36 h 后即可见菌落出现。菌落形态见附录 B(B.2.1.1,B.2.2.1,B.2.3.1,B.2.4.1 和 B.2.5.1)。

4 结果判定

在可疑病禽(鸟)的病变组织中,观察到或分离出曲霉菌,即可确诊为禽曲霉菌病。如要确定为何种曲霉菌所感染,则需参照附录 B,依据菌落和菌体的形态特征,对所分离的曲霉菌进行菌种鉴定。

附 录 A
(规范性附录)
主要试剂的配制方法

A.1 质量浓度为 30 % 的甘油缓冲液

甘油(化学纯)	30.0 mL
氯化钠(NaCl)	0.5 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.0 g
蒸馏水	加至 100.0 mL

先用少量蒸馏水溶解氯化钠和磷酸氢二钠,再加入甘油,最后用蒸馏水补足量,混合,分装,于 103.6 kPa 灭菌 15 min~20 min 后保存备用。

A.2 乳酸酚棉蓝染色液

结晶石炭酸	20.00 g
乳酸	20.00 mL
甘油	40.00 mL
棉蓝	0.05 g
蒸馏水	20.00 mL

将棉蓝溶于蒸馏水中,再加入结晶石炭酸、乳酸、甘油,混匀,备用。

A.3 沙保劳(Sabouraud)氏葡萄糖琼脂培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
琼脂粉	18 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

将以上成分倒入烧杯或三角烧瓶内,先加少量蒸馏水加热溶解。待完全溶解后补足蒸馏水至所需要的总体积,并加入氯霉素 50 μg/mL~100 μg/mL,用四层纱布过滤,按要求定量分装于小烧瓶或中试管内,塞以棉塞,再于棉塞外加包牛皮纸和油纸各一层,挂上标签,于 103.6 kPa 灭菌 10 min~15 min 后保存备用。

A.4 改良察贝克(Czapek)氏琼脂培养基

蔗糖	30.00 g
硝酸钠(NaNO ₃)	3.00 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.00 g
硫酸镁(MgSO ₄)	0.50 g
氯化钾(KCl)	0.50 g
硫酸亚铁(FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.01 g
氯化钠(NaCl)	60.00 g
琼脂粉	18 g~20.00 g
蒸馏水	1 000.00 mL
配制法同 A.3。	

附录 B

(规范性附录)

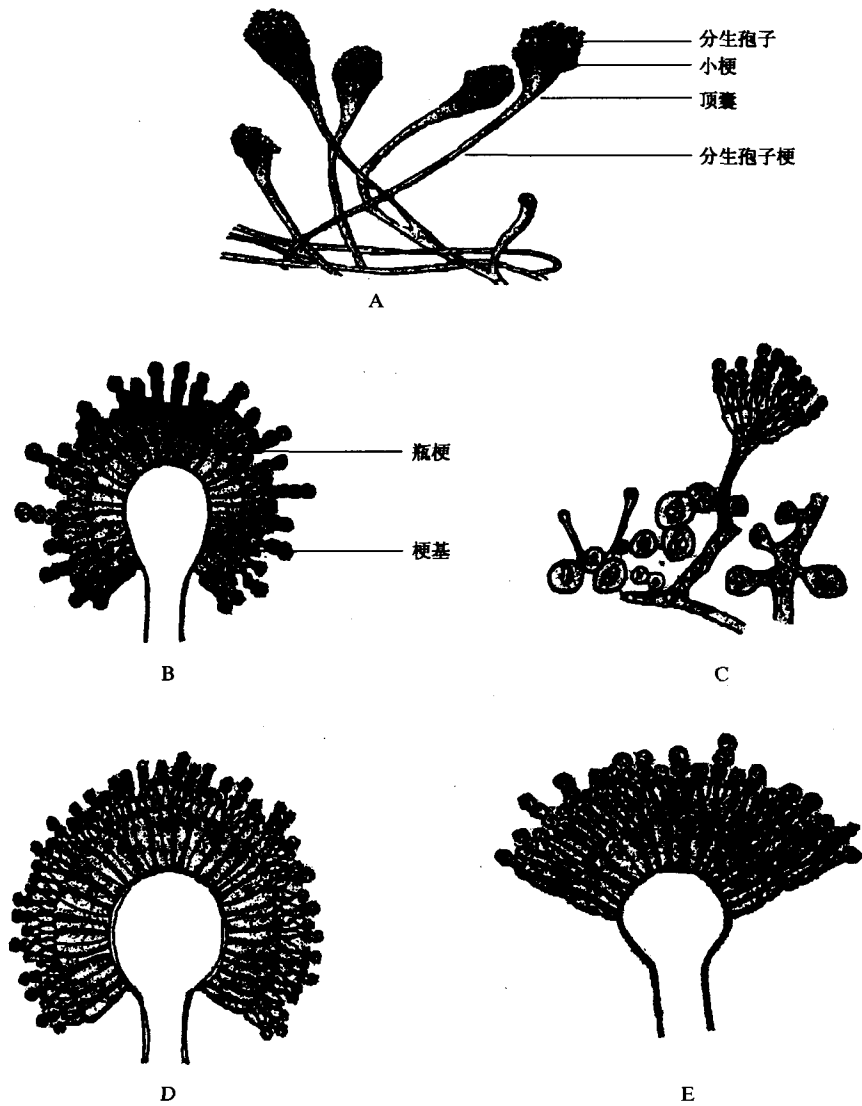
禽曲霉菌病有关的曲霉菌的鉴别要点

B.1 概述

引起禽曲霉菌病的病原体主要为烟曲霉和黄曲霉,其次为构巢曲霉、黑曲霉和土曲霉等,这些曲霉菌都具有如下共同的形态结构:

- a) 菌丝:有隔,细胞多核;
- b) 分生孢子梗:由特化的膨大而厚壁的菌丝细胞(即足细胞)的中部向上叉生而成;
- c) 顶囊:分生孢子梗顶端的膨大部分,呈球形、椭球形、烧瓶形或棍棒形;
- d) 小梗:被覆于顶囊周边,一层或两层。如为两层,则内层叫梗基,外层叫瓶梗;
- e) 分生孢子:成串排列于小梗的游离端。

但是,不同的菌种在这些结构的形态上又有明显的不同。根据这些不同点,特别是分生孢子头(顶囊、小梗、分生孢子三部分的合称)的特征,结合菌落的形态和颜色,可将这几种曲霉菌区别开。禽曲霉菌病中常见曲霉菌形态见图 B.1。



- A——烟曲霉；
- B——黄曲霉；
- C——构巢曲霉；
- D——黑曲霉；
- E——土曲霉。

图 B.1 禽曲霉菌病中常见曲霉菌形态比较示意图

B.2 鉴别要点

B.2.1 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)

B.2.1.1 菌落形态

烟曲霉在沙保劳氏葡萄糖琼脂培养基上生长良好,发育很快。开始菌落呈白色绒毛样或棉花丝样,3 d~4 d内,菌落中心变为烟绿色或深绿色,表面微细粉末状或绒毛样(形成大量分生孢子之故)。菌落背面无色或略带黄褐色。

在察贝克氏培养基上,生长旺盛,菌落呈绒毛状,气生菌丝直立而丰富,分生孢子头初呈白色或微带蓝色,有呈绿色者,继而转变为黑褐色。菌落背面无色或呈黄色,老菌落则可呈暗红色。

B.2.1.2 菌体形态

参见图 B.1 中 A。

- a) 分生孢子梗:光滑,较短(300 μm ~500 μm),宽 5 μm ~8 μm ,常带绿色;
- b) 顶囊:烧瓶形,直径 20 μm ~30 μm ,绿色;
- c) 小梗:生于顶囊上部,单层,梗长 6 μm ~8 μm ,梗粗 2.5 μm ~3.0 μm ,排列紧密;
- d) 分生孢子:球形或近球形,直径 2.5 μm ~3.0 μm ,表面粗糙有细刺,带绿色;
- e) 菌核:不产生。

B.2.2 黄曲霉(*Aspergillus flavus*)

B.2.2.1 菌落形态

菌落生长迅速,至 10 d~14 d 时,直径可达 3 cm~7 cm。初似黄色粉末,继而密集隆起,变为黄绿色,日久则成棕绿色。表面平坦或有放射状沟纹。菌落背面无色或带褐色。

B.2.2.2 菌体形态

参见图 B.1 中 B

- a) 分生孢子梗:长约 400 μm ~1 000 μm ,宽约 10 μm ~20 μm ,微弯曲,梗壁极粗糙,近顶囊处略膨大,无色;
- b) 顶囊:烧瓶形、球形或近球形,直径约 10 μm ~65 μm ,但多数在 25 μm ~45 μm 间;
- c) 小梗:单层、双层或单层双层并存于一个顶囊上,但以双层者居多。梗基长约 7 μm ~10 μm ,宽约 4.0 μm ~5.5 μm ,布满顶囊表面。瓶梗长约 6.5 μm ~10.0 μm ,宽约 3 μm ~5 μm ;
- d) 分生孢子:球形、近球形或梨形,直径约 3.5 μm ~6.0 μm ,表面粗糙;
- e) 菌核:有些菌系产生褐色菌核。

B.2.3 构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)

B.2.3.1 菌落形态

在察贝克氏琼脂培养基上于 27 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,菌落生长快速,至 14 d 时直径达 5 cm~6 cm。最初为光滑绒毛状,亮绿色,平铺生长,继而变为暗绿色,中心呈粉末状,边缘有绒毛状菌丝。菌落背面深红色至紫红色。当闭囊壳形成时,菌落中心向外长出一些小白点,菌落呈黄褐色。

B.2.3.2 菌体形态

参见图 B.1 中 C。

- a) 分生孢子梗:极短(长约 75 μm ~100 μm ,宽约 3.5 μm ~5.0 μm),常有波状弯曲,近顶囊处稍膨大,壁光滑,带褐色或肉桂褐色;
- b) 顶囊:半球形,直径 8 μm ~10 μm ;
- c) 小梗:双层,梗基短(长约 5 μm ~6 μm ,宽约 2 μm),分布于顶囊的顶部,呈放射状排列;瓶梗长约 5 μm ~6 μm ,宽约 2.0 μm ~2.5 μm ;
- d) 分生孢子:球形,直径 3.0 μm ~3.5 μm ,表面粗糙有小刺,绿色;
- e) 闭囊壳:为该菌有性阶段的产物,球形,直径约 135 μm ~150 μm ,略呈紫红色,内含子囊孢子。成熟的闭囊壳被淡黄色的壳细胞所包围。

B.2.4 黑曲霉(*Aspergillus niger*)

B.2.4.1 菌落形态

在察贝克氏琼脂培养基上于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,菌落扩展迅速,至 10 d~14 d 直径可达 2.5 cm~3.0 cm。初期有丰富的白色羊毛状气生菌丝,并常出现鲜黄色区域,继而变成粗绒状,黑色、黑褐色。菌落背面无色,或仅中心部分略带黄褐色。

B.2.4.2 菌体形态

参见图 B.1 中 D。

- a) 分生孢子梗:长约 200 μm ~400 μm ,也有长达 1 000 μm 以上者,宽约 10 μm ~20 μm ,壁厚、光滑,无色或梗的上部稍带黄色;

- b) 顶囊:球形或近球形,直径 $45\ \mu\text{m}\sim 75\ \mu\text{m}$,无色或带黄褐色;
- c) 小梗:双层,紧密排列于整个顶囊表面,呈放射状,褐色。梗基约 $400\sim 500$ 个,每个梗基长约 $20\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m}$,宽约 $5\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$,有时更宽并具有横隔;瓶梗较短,长约 $7\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$,宽约 $3.0\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m}$;
- d) 分生孢子:球形,直径 $4\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$,褐色,表面极为粗糙;
- e) 菌核:有些菌系产生菌核,从不定形到圆形,直径约 $1\ 000\ \mu\text{m}$ 。

B.2.5 土曲霉(*Aspergillus terreus*)

B.2.5.1 菌落形态

在察贝克氏琼脂培养基上生长较快,至 10 d 时菌落直径达 $3.5\ \text{cm}\sim 5.0\ \text{cm}$ 。呈圆形,初平坦,或有放射状皱纹,渐而表面呈绒状,偶呈絮状,肉桂色或沙褐色。菌落背面培养基黄色或污褐色。

B.2.5.2 菌体形态

参见图 B.1 中 E。

- a) 分生孢子梗:长约 $100\ \mu\text{m}\sim 250\ \mu\text{m}$,宽约 $4.5\ \mu\text{m}\sim 6.0\ \mu\text{m}$,微弯曲,近顶囊处稍膨大,光滑,无色;
 - b) 顶囊:半球形,直径 $10\ \mu\text{m}\sim 16\ \mu\text{m}$;
 - c) 小梗:双层,梗基长约 $5\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$,宽约 $2.0\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m}$,平行密集于顶囊顶部;瓶梗长约 $5.5\ \mu\text{m}\sim 7.5\ \mu\text{m}$,宽 $1.5\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m}$;
 - d) 分生孢子:球形或近球形,直径约 $2\ \mu\text{m}$,表面光滑无棘;
 - e) 菌核:不产生。
-