

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4138—2022

蜜蜂孢子虫病诊断技术

Protocol of diagnosis for nosema disease in honeybees

2022-07-11 发布

2022-10-01 实施



中华人民共和国农业农村部 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》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：吉林省养蜂科学研究所。

本文件主要起草人：王志、牛庆生、李志勇、庄明亮、王琦、何金明、李剑飞、孙智禹。

蜜蜂孢子虫病诊断技术

1 范围

本文件规定了蜜蜂孢子虫病的临床诊断、采样及实验室诊断等内容。
本文件适用于蜜蜂孢子虫病的诊断。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
SN/T 1683 蜜蜂微孢子虫病诊断方法
SN/T 5283 熊蜂微孢子虫检疫技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蜜蜂孢子虫病 *nosema disease in honeybees*
由蜜蜂孢子虫引起的蜜蜂成虫肠道传染病,别名微孢子病。

3.2

蜂场 *apiary*
可作为单一流行病学单元进行管理和防治的一个或一组蜂箱组成的场地。

3.3

蜂群 *colony*
由蜜蜂组成的社会性群体,也是蜜蜂自然生存和蜂场饲养管理的基本单位。一个蜂群由一只蜂王、数千至数万只工蜂和若干只雄蜂组成。

4 设备和材料

- 4.1 研钵。
4.2 培养皿(90 mm×20 mm)。
4.3 玻片(76 mm×26 mm)。
4.4 光学显微镜(400×)。
4.5 电子天平(精度 0.000 1 g)。
4.6 PCR 扩增仪。
4.7 电泳仪。
4.8 凝胶成像系统。
4.9 冰箱(4 ℃、-20 ℃)。

5 试剂

- 5.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
5.2 乙醇溶液(75%以上)。

- 5.3 10×PCR 缓冲液。
- 5.4 dNTPs(含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP)。
- 5.5 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.6 1×TAE 缓冲液(配制方法见附录 A 中的 A.1)。
- 5.7 1.5%琼脂糖凝胶(配制方法见 A.2)。
- 5.8 DNA 相对分子质量标准物 Marker。
- 5.9 PCR 引物(见附录 B 中的 B.1)。

6 临床诊断

6.1 蜂群症状

患病蜂群蜂箱外壁及周围地面上出现棕色长条状的粪便痕迹。

6.2 个体症状

6.2.1 工蜂症状

患病工蜂飞翔能力下降,蜇刺反应丧失,腹部末端变黑,第1、第2腹节背板呈棕黄色,略透明,少数腹部膨大。中肠呈灰白色,无环纹,无弹性和光泽,易破裂。

6.2.2 蜂王症状

患病蜂王产卵力下降。

6.3 结果判定

临床诊断为蜜蜂孢子虫病时,出现6.1、6.2的典型症状,可判为疑似阳性。

7 采样

7.1 采样比例

蜂群及蜂王采样比例按 SN/T 1683 的规定执行。

7.2 采样方法

7.2.1 工蜂采样

从每个待检蜂群中随机采集30只工蜂,标记群号,立即镜检。若现场无法检测,将蜂样保存于75%以上的乙醇溶液中,备镜检。

7.2.2 蜂王粪便采样

将待检蜂王放入培养皿内,标记群号,收集蜂王粪便放入冰箱,4℃冷藏备用,采样后将蜂王送回原群。

8 显微镜诊断

8.1 样品制备

取活体工蜂中肠,放入研钵,按照1:10加入蒸馏水,充分研磨,备用。

取蜂王粪便放入离心管中,按照1:10加入蒸馏水混匀,备用。

8.2 镜检

从8.1制备的样品中取20μL滴于载玻片,盖上盖玻片,在400×光学显微镜下观察。先看中间,调节微调旋钮,慢慢移向四周,保证每个标本观察不少于20个视野。

8.3 典型特征

镜检时,蜜蜂孢子虫为特征性的鉴定对象。蜜蜂孢子虫类似谷粒状的椭圆形粒子,并有微弱的蓝色折光,粒子长4μm~6μm,宽2μm~3μm。

8.4 结果判定

镜检观察到8.3的典型特征,可判为阳性(见B.2)。

9 PCR 诊断

9.1 设立对照

每次反应设置空白对照、阴性对照和阳性对照。空白对照可用水代替样品；阴性对照为未感染蜜蜂孢子虫的健康蜜蜂腹部组织；阳性对照为感染蜜蜂孢子虫的蜜蜂腹部组织。

9.2 提取

按照 SN/T 5283 的规定执行。

9.3 PCR 扩增

按照表 1 配制 50 μL 的 PCR 反应体系，设置 PCR 反应程序如下：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2.5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，61.8 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s，共 36 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 补充延伸 7 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。同时设阳性、阴性和空白对照，得到 PCR 扩增产物。PCR 扩增也可以采用等效的商品化 DNA 扩增试剂盒。

表 1 PCR 反应体系

试剂	加样量, μL
10 \times PCR 缓冲液	5
10 mmol/L dNTPs	1
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	1
DNA 模板	1
上游引物 <i>Ceranae</i> F(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
下游引物 <i>Ceranae</i> R(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
ddH ₂ O	40
总体积	50

9.4 电泳检测

制备 1.5% 琼脂糖凝胶，取 5 μL PCR 扩增产物进行电泳，恒压 5 V/cm~8 V/cm 电泳约 0.5 h，凝胶成像系统下观察结果。

9.5 结果判定

经 PCR 扩增并电泳后阳性对照出现一条大小约 218 bp 的特异性 DNA 条带，而阴性对照和空白对照无条带时，成立。待检样品出现大小约 218 bp 的 DNA 条带并经测序验证，测序结果同参考序列同源性达到 98% 以上，可判为阳性。

10 综合判定

凡具有第 6 章的临床症状，并符合第 8 章或第 9 章的阳性结果，可判为蜜蜂孢子虫病。

附录 A
(资料性)
主要溶液配制

A.1 1×TAE 缓冲液

蒸馏水	990 mL
50×TAE 浓缩液	10 mL
取 10 mL 50×TAE 浓缩液,加入蒸馏水定容至 1 000 mL。	

A.2 1.5%琼脂糖凝胶

琼脂糖	0.75 g
1×TAE 缓冲液	50 mL
核酸染料	3 μ L

将 0.75 g 琼脂糖加入 50 mL 1×TAE 缓冲液中,加热溶解,冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右,加入 3 μ L 核酸染料,倒入胶槽内,待自然凝固。



附录 B
(资料性)
蜜蜂孢子虫病

B.1 引物序列

见表 B.1。

表 B.1 蜜蜂孢子虫 PCR 引物序列

引物序列	产物大小, bp
上游引物 Ceranae F: 5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218
下游引物 Ceranae R: 5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'	

B.2 蜜蜂孢子虫镜检图例

见图 B.1。

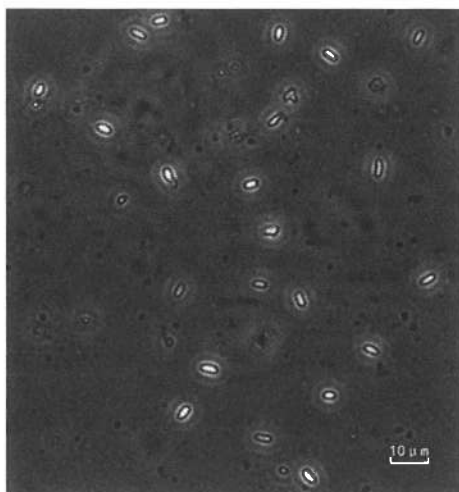


图 B.1 蜜蜂孢子虫阳性镜检图(400×)

中华人民共和国
农业行业标准
蜜蜂孢子虫病诊断技术

NY/T 4138—2022

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15千字

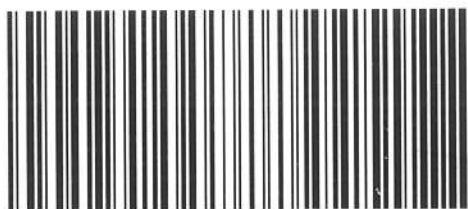
2022年8月第1版 2022年8月北京第1次印刷

书号: 16109·9029

定价: 24.00元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 4138—2022