

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3463—2019

禽组织滴虫病诊断技术

Diagnostic techniques for histomoniasis

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:扬州大学。

本标准主要起草人:许金俊、孔令明、陶建平、秦爱建、刘丹丹、侯照峰、宿世杰、曲昌宝、嵯振男、郭平、王子静、陈乔光、戎杰。

引 言

禽类组织滴虫病(Histomoniasis),又称盲肠肝炎或黑头病,是由于火鸡组织滴虫(*Histomonas meleagridis*)感染鸡形目禽类所导致的以肝脏坏死和盲肠肿大为主要临床特征的寄生虫病。近年来,随着家庭农场、生态放养及圈养模式的示范推广,该病在我国地面平养、放养和散养鸡群中流行普遍,造成严重的经济损失。为做到组织滴虫病的早期诊断,从而避免给养殖业造成经济损失,同时为避免未知新基因型虫体引入我国甚至导致贸易纠纷,特制定本标准。

禽组织滴虫病诊断技术

1 范围

本标准规定了禽组织滴虫病临床诊断和实验室诊断(组织脏器中病原的体外分离培养与镜检;分离的虫体、组织脏器和泄殖腔内容物中病原 DNA 的聚合酶链式反应扩增检测)的技术方法和实验程序。

本标准适用于禽组织滴虫病的诊断和检疫。其中,临床诊断、病原的分离培养、分离的虫体及组织脏器中病原 PCR 检测方法适用于组织滴虫病的诊断,泄殖腔内容物中病原的 PCR 检测方法适用于组织滴虫病的流行病学调查及检疫。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

火鸡组织滴虫 *Histomonas meleagridis*, *H. meleagridis*

原动物界肉足鞭毛门鞭毛虫亚门动鞭毛虫纲毛滴目单尾滴虫科组织滴虫属的原虫。

3.2

组织滴虫病 *histomoniasis*

盲肠肝炎或黑头病

由火鸡组织滴虫引起的鸡形目禽类的以肝脏坏死和盲肠肿大为特征的寄生虫病。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

Taq 酶:TaqDNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

5 临床诊断

5.1 流行特点

5.1.1 鸡形目禽类火鸡、鸡、孔雀、鹌鹑、野鸭、鹧鸪、鸵鸟、珍珠鸡等均可感染,火鸡最为易感。

5.1.2 雏禽如 4 周龄~6 周龄的雏鸡、3 周龄~12 周龄的雏火鸡感染后易发病死亡,成年禽症状不明显且死亡率低。

5.1.3 潜伏期一般 15 d~21 d,病程 1 周~3 周,死亡率可达 50%~85%。

5.1.4 地面平养、放养和散养的禽群多发,温暖潮湿的季节多发。

5.2 临床症状

5.2.1 病禽缩头、垂翅、羽毛松乱,排黄绿色的恶臭稀粪。

5.2.2 急性严重的病禽粪便带血或排泄物全是血液。

5.2.3 部分病禽的头部皮肤发绀。

5.3 病理变化

5.3.1 肝脏肿大,典型病变为表面呈现黄绿色、中心凹陷且边缘隆起似火山口样的圆形坏死灶,单独存在或融合成片状(参见附录 A 中的图 A.1),少数病例坏死灶呈现点状。

5.3.2 盲肠一侧或两侧肿胀,肠壁肥厚,肠腔内形成干酪状的肠芯(参见图 A.2)。

5.4 结果判定

符合 5.1 流行特点,病禽出现 5.2 中任何一种临床症状和/或 5.3 中的任何一种病理变化,可判为疑似组织滴虫病,应进行实验室确诊。

6 实验室诊断

以下实验室诊断过程中,实验用水的要求按照 GB/T 6682 中一级水的要求执行,实验室生物安全要求按照 GB 19489 的规定执行;涉及动物的要求按照 GB/T 27401 的规定执行;涉及诊断样品采集、保存和运输的要求按照 NY/T 541 的规定执行。

6.1 病原分离鉴定

6.1.1 试剂

6.1.1.1 Medium 199(1×)基础培养基。

6.1.1.2 马血清。

6.1.1.3 胎牛血清。

6.1.1.4 米粉。

6.1.1.5 哥伦比亚血琼脂平板。

6.1.1.6 青霉素。

6.1.1.7 链霉素。

6.1.1.8 两性霉素 B。

6.1.1.9 灭菌生理盐水:0.9%NaCl。

6.1.2 耗材

6.1.2.1 手术剪刀。

6.1.2.2 镊子。

6.1.2.3 接种环。

6.1.2.4 细菌培养皿。

6.1.2.5 细胞培养瓶。

6.1.2.6 EP 管:1.5 mL。

6.1.2.7 蜡烛。

6.1.2.8 载玻片。

6.1.2.9 盖玻片。

6.1.3 仪器

6.1.3.1 电子天平:1 mg~520 g。

6.1.3.2 微量移液器:0.2 μ L~2 μ L、2 μ L~10 μ L、10 μ L~100 μ L、20 μ L~200 μ L、100 μ L~1 000 μ L,并配备与之匹配的枪头。

6.1.3.3 无菌操作台。

- 6.1.3.4 隔水式电热恒温培养箱。
- 6.1.3.5 可密封的烛缸。
- 6.1.3.6 普通光学显微镜。
- 6.1.3.7 相差显微镜(有条件时选用,非必备)

6.1.4 病原分离

可选下列 1 种或 2 种样品分离病原:

- a) 盲肠中虫体的分离:有条件时,在分离培养之前先直接镜检有无虫体。步骤如下:取病鸡的新鲜盲肠内容物,用 40℃ 生理盐水制成悬液标本,立即放到相差显微镜下镜检。虫体分离时,取 5 g~10 g 病禽盲肠内容物及盲肠壁刮取物至含 9 mL 的 M199 培养基的细胞瓶中,加入米粉 11 mg、终浓度为 15% 的胎牛血清、终浓度为 200 IU/mL 的青霉素、终浓度为 200 μg/mL 的链霉素、终浓度为 2.5 μg/mL 的两性霉素 B,培养瓶放入 40℃ 恒温培养箱中,于烛缸中进行厌氧培养,48 h~72 h 后观察培养结果。
- b) 肝脏虫体的分离培养:在无菌条件下,取病禽肝脏的坏死灶组织 5 g~10 g,放入无菌的 1.5 mL EP 管中剪碎,然后接种至含 9 mL 的 M199 培养基的细胞瓶中,加入 11 mg 米粉,终浓度为 10% 的马血清,另外加入一接种环的盲肠细菌。盲肠细菌来自健康鸡的盲肠,将其盲肠内容物无菌接种于哥伦比亚血琼脂平板培养基上,37℃ 恒温培养箱中培养过夜所获得。培养瓶放入烛缸中,点燃蜡烛密封后放入 40℃ 恒温培养箱中厌氧培养,48 h~72 h 后观察培养结果。

6.1.5 病原镜检

分别取 6.1.4 中 a) 和 (或) b) 少量培养液滴到载玻片上,盖上盖玻片,静置 2 min 后,在光学显微镜下观察有无虫体生长。

6.1.6 结果判定

盲肠内容物中虫体在相差显微镜下呈核桃状,一端有短的鞭毛,呈钟摆式来回运动。M199 培养基中生长的火鸡组织滴虫呈圆形或椭圆形,虫体内存有数个米粉颗粒,具有折光性,虫体直径为 10 μm~20 μm,运动缓慢微弱呈钟摆样(参见附录 B 中的图 B.1)。

6.2 聚合酶链式反应(PCR)检测

6.2.1 试剂

- 6.2.1.1 除另有规定外,所用试剂均为分析纯。
- 6.2.1.2 灭菌生理盐水:0.9% NaCl。
- 6.2.1.3 基因组 DNA 提取试剂盒。
- 6.2.1.4 Taq DNA 聚合酶:5 U/μL,带含有 Mg²⁺ 的 10×PCR 缓冲液。
- 6.2.1.5 dNTP Mixture:2.5 mmol/L。
- 6.2.1.6 DL 2 000 DNA Marker。
- 6.2.1.7 电泳级琼脂糖。
- 6.2.1.8 1×TAE 电泳缓冲液,配置方法见附录 C。
- 6.2.1.9 琼脂糖凝胶电泳加样缓冲液:6×DNA Loading Buffer。
- 6.2.1.10 溴化乙锭。
- 6.2.1.11 阳性对照:组织滴虫病鸡肝脏、阳性、含虫体的培养液;阴性对照:SPF 鸡肝脏、盲肠和不含虫体的培养液。
- 6.2.2 耗材
- 6.2.2.1 手术剪刀。
- 6.2.2.2 镊子。
- 6.2.2.3 EP 管:1.5 mL。

6.2.2.4 一次性注射器:50 mL、20 mL、10 mL、5 mL、2 mL、1 mL。

6.2.2.5 PCR管:200 μ L。

6.2.3 仪器

6.2.3.1 电子天平:1 mg~520 g。

6.2.3.2 pH计。

6.2.3.3 微量移液器:0.2 μ L~2 μ L、2 μ L~10 μ L、10 μ L~100 μ L、20 μ L~200 μ L、100 μ L~1 000 μ L,并配备与之匹配的枪头。

6.2.3.4 手持式电动组织匀浆器。

6.2.3.5 小型高速离心机:最大离心速度在12 000 r/min以上。

6.2.3.6 恒温水浴锅。

6.2.3.7 涡旋仪。

6.2.3.8 PCR扩增仪。

6.2.3.9 微波炉。

6.2.3.10 核酸电泳仪。

6.2.3.11 凝胶成像仪。

6.2.4 引物

用于火鸡组织滴虫特异性18S rRNA基因扩增的引物序列和扩增产物大小见附录D中的表D.1。

6.2.5 样品采集

样品的采集选择下列1种、2种或3种:

- a) 分离的虫体:将培养的含有虫体的培养液吸取1.5 mL到灭菌的EP管中,然后在3 000 r/min离心5 min,弃去上清液,取沉淀物-20℃冻存,作为待检样品;
- b) 组织器官:用灭菌眼科剪采集禽类的肝脏或盲肠,每份100 mg,标记后放入1.5 mL离心管,用眼科剪剪碎组织,匀浆器匀浆,-20℃冻存,作为待检样品;
- c) 泄殖腔内容物:用1.0 mL以上的注射器,将2 mL的40℃灭菌生理盐水注入禽类泄殖腔,以洗涤泄殖腔,然后将洗涤液收集于1.5 mL离心管中,以3 000 r/min离心沉淀5 min后,弃去上清液,取沉淀物-20℃冻存,作为待检样品。

6.2.6 PCR模板的制备

按商品化的DNA提取试剂盒说明书的方法提取6.2.5中a)和/或b)和/或c)样品以及阳性和阴性对照样品的基因组DNA模板。

6.2.7 PCR扩增

6.2.7.1 PCR反应体系

25 μ L的PCR反应体系见表D.2。

6.2.7.2 PCR扩增条件

PCR扩增条件为:95℃预变性2 min,95℃变性35 s,43℃退火35 s,72℃延伸45 s,40个循环,72℃延伸5 min,4℃保存。

6.2.7.3 PCR产物电泳

6.2.7.3.1 取1.5 g琼脂糖加入100 mL 1×TAE电泳缓冲液(见附录C.2)中,于微波炉中加热,充分溶化、制胶。

6.2.7.3.2 在电泳槽中加入1×TAE电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。

6.2.7.3.3 取20 μ L PCR扩增产物和相应量加样缓冲液混合后加样,进行电泳。电压根据电泳槽长度来确定,一般控制在4 V/cm,电泳时间40 min。

6.2.7.3.4 将电泳好的凝胶放入终浓度为0.5 μ g/mL的溴化乙锭染色缓冲液中染色20 min。

6.2.7.3.5 凝胶成像仪上观察结果,拍照并做好试验记录。

6.2.8 结果判定

6.2.8.1 试验结果成立条件

阳性对照的 PCR 产物电泳后在 570 bp 的位置出现一条特异性条带,阴性对照 PCR 产物电泳后没有条带,试验结果成立;否则,结果不成立(参见附录 E 中的图 E.1)。

6.2.8.2 结果判断

在试验结果成立的前提下,如果待检样品中 PCR 产物在 576 bp 的位置出现一条特异性条带,判断为阳性,该禽感染火鸡组织滴虫(必要且有条件时可以测序,目的序列参见图 E.2)。

在试验结果成立的前提下,如果待检样品中 PCR 产物在 576 bp 的位置未出现一条特异性条带,判断为阴性,该禽未感染火鸡组织滴虫。

7 综合判定

符合 5.1 中流行特点,出现 5.2 中任一临床症状和/或 5.3 中任一病理变化判断为疑似病例;疑似病例,同时出现 6.1.6 和/或 6.2.8 阳性结果时,判断为确诊病例;未出现 5.1 中任一临床症状和/或 5.2 中任一病理变化,但出现 6.1.6 和/或 6.2.8 阳性结果时,判断为火鸡组织滴虫携带者。

附录 A
(资料性附录)
组织滴虫病典型病理变化

A.1 肝脏的典型病理变化

禽组织滴虫病肝脏的典型病理变化见图 A.1。

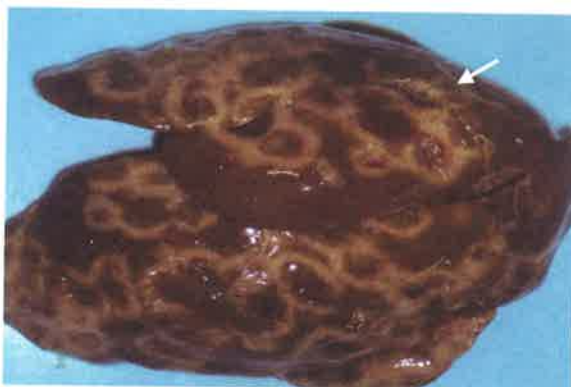


图 A.1 肝脏表面呈现黄绿色、圆形、边缘隆起似火山口样的坏死灶(箭头所示)

A.2 盲肠的典型病理变化

禽组织滴虫病盲肠的典型病理变化见图 A.2。



图 A.2 盲肠肿胀、肠壁肥厚、肠腔内形成干酪状的肠芯(箭头所示)

附录 B
(资料性附录)
培养的火鸡组织滴虫形态图

体外培养的火鸡组织滴虫见图 B.1。虫体内颗粒为虫体吞入的米粉粒。

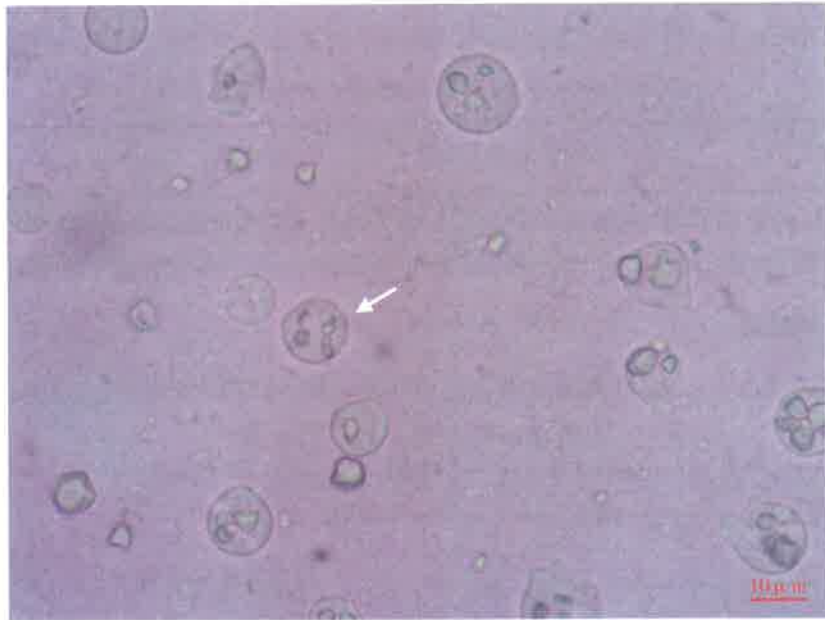


图 B.1 体外培养的火鸡组织滴虫
(箭头所示, ×400)

附录 C
(规范性附录)
试剂配制

C.1 50×TAE 缓冲液配制(pH 8.0)

C.1.1 成分

| | |
|--|--------|
| Tris | 242 g |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 37.2 g |

C.1.2 配制

将 C.1.1 成分加入定量容器中,加入 800 mL 灭菌去离子水,充分搅拌溶解,加入 57.1 mL 的冰醋酸(CH₃COOH),充分混匀,用 NaOH 或 HCl 调 pH 至 8.0,补充去离子水定容到 1 000 mL,室温保存备用。

C.2 1×TAE 缓冲液配制

取 50×TAE 缓冲液 2 mL,加入 98 mL 灭菌去离子水,即为 1×TAE 缓冲液。

附 录 D
(规范性附录)
PCR 引物及 PCR 反应体系

D.1 PCR 引物

用于火鸡组织滴虫特异性 18S rRNA 基因扩增的引物序列和扩增片段大小见表 D. 1。

表 D. 1 用于火鸡组织滴虫 PCR 检测的引物

| 引物名称 | 目 的 | 引物序列(5'-3') | 扩增片段大小 |
|------|------|-------------------------|-------------------------|
| HMF | 正向引物 | GAAAGCATCTATCAAGTGGAA | 18S rRNA 基因 (576 bp) |
| HMR | 反向引物 | GATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA | |

D.2 PCR 反应体系

用于火鸡组织滴虫特异性 18S rRNA 基因扩增的反应体系见表 D. 2。

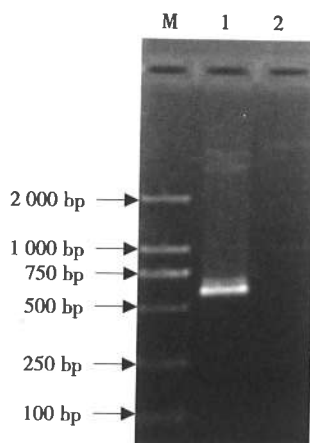
表 D. 2 PCR 反应体系配置表

| 组 分 | 体积, μL |
|--|-------------------|
| 灭菌去离子水 | 18.25 |
| 含有 Mg^{2+} 的 $10\times$ PCR 缓冲液 | 2.50 |
| dNTP Mixture(2.5 mmol/L) | 2.00 |
| HMF(10 $\mu\text{mol/L}$) | 0.50 |
| HMR(10 $\mu\text{mol/L}$) | 0.50 |
| <i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL) | 0.25 |
| PCR 模板 | 1.00 |

附录 E
(资料性附录)
PCR 产物电泳例图及产物参考序列

E.1 PCR 产物电泳例图

PCR 产物电泳结果例图见图 E.1。



说明：

M —— DL 2 000 DNA Marker；

1 —— 已知阳性样品；

2 —— 已知阴性对照样品。

图 E.1 PCR 产物电泳结果(产物大小对照)

E.2 PCR 产物参考序列

GAAAGCATCTATCAAGTGGAATTCTATCGATCAAGGGCGAGAGTAGGAGTATCCAACCG
GATCAGAGACCCGGGTAGTTCCTACCTTAAACTATGCCGACGAGGGCTTATTTTTTATTTA
GAAGTAGGACCATTAGAGAAATCAATAGTTCATGGGCTCTGGGGAACTACGACCGCAAGG
CTGAAACTTGAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGGGTGGAGCTTGTGGCTTAATTTGA
ATCAACACGGGGAACTTACCAGAACCAGATATTTTTTATGACTGATCAGGATGAAGTTCT
TTCAGGATATAATTTTTGGTGGTGATGGCCGTTGGTGGTGCGTGGGTTGACCTGTCTAGCG
TTGATTCAGATAACGAGCGAGATTATTACCAATTAATAATTAATAATTTTTAAATATTA
ATATAATTTCTAATTGGGACTCCCTGCGTCTAAGCAGGAGGAAGAGGATAGCAATAACAGG
TCCGTGATGTCCTTTAGATGCTCTGGGCTGCACGCGCTACAATGTTAAAAACAATAAGAA
TAATTTAAAGCTAATTTGAAAAGATC

中华人民共和国
农业行业标准
禽组织滴虫病诊断技术
NY/T 3463—2019

* * *

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)

中农印务有限公司印刷
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 1 字数 20 千字

2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4884

定价: 26.00 元



NY/T 3463—2019

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261