ICS 65.020.30
CCS B 41

中华人民共和国国家标准

GB/T 40253—2021

牡蛎小胞虫病诊断规程　显微镜检查组织法

Code of diagnosis for mikrocytosis of oysters—Microscopic methods

2021-05-21 发布　　2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　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》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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：白昌明、杨冰、王崇明、黄倢、李清、万晓媛、辛鲁生、李晨、余卫忠。

库七七 www.kqqw.com 标准下载

牡蛎小胞虫病诊断规程　显微镜检查组织法

1　范围

本文件规定了牡蛎小胞虫病诊断规程中普遍适用的显微镜检查组织法的要求，针对主要病原马可尼小胞虫(*Mikrocytos mackini*)，给出了组织印片检测法和组织病理检测法所需试剂或材料、仪器设备、样品、试验步骤和结果判定。

本文件适用于牡蛎感染马可尼小胞虫的普查和初步诊断；以及牡蛎感染马可尼小胞虫的流行病学调查和诊断；其他贝类可参照执行。

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。

SC/T 7205.1—2007　牡蛎包纳米虫病诊断规程　第1部分：组织印片的细胞学诊断法

SC/T 7209.3—2007　牡蛎小胞虫病诊断规程　第3部分：透射电镜诊断法

3　术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4　缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DAFA：戴维森氏乙醇-福尔马林-乙酸固定液(davidson's alcohol-formalin-acetic acid fixative)

5　试剂或材料

5.1　除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

5.2　苏木素。

5.3　碘酸钠。

5.4　钾明矾。

5.5　柠檬酸。

5.6　水合三氯乙醛。

5.7　伊红Y(水溶性)。

5.8　焰红B(水溶性)。

5.9　石蜡(熔点52 ℃～54 ℃)：切片级。

5.10　中性树胶：生物染色用。

5.11　甲醇。

库七七 www.kqqw.com 标准下载

5.12 二甲苯。

5.13 无水乙醇。

5.14 95%乙醇。

5.15 甲醛(37%)。

5.16 冰醋酸。

5.17 吉姆萨(Gimesa)染液。

5.18 过滤海水:经纱网(≥200目)过滤的海水。

5.19 DAFA固定液:按附录A的A.1配制。

5.20 迈尔-班尼特苏木精(Mayer-Bennett Hematoxylin)染色液:按A.2配制。

5.21 伊红-焰红染色液:按A.3配制。

5.22 85%乙醇:按A.4配制。

5.23 80%乙醇:按A.5配制。

5.24 75%乙醇:按A.6配制。

5.25 70%乙醇:按A.7配制。

5.26 50%乙醇:按A.8配制。

6 仪器设备

6.1 显微镜:配备高倍镜(40×)和油镜(100×)。

6.2 石蜡切片机:满足4 μm~7 μm厚度的石蜡连续切片要求。

6.3 展片水浴锅。

6.4 烘片机。

6.5 恒温箱。

7 样品

7.1 采样对象

牡蛎、扇贝和蛤等易感双壳贝类。

7.2 采样数量、方法和保存运输

采样数量、方法和保存运输应符合SC/T 7205.1—2007附录B的要求。海水温度低于10 ℃时为采样的最佳时期。

7.3 样品的采集

稚贝(附着后~2 mm)和幼贝(2 mm~30 mm)取内脏团;成贝(>30 mm)取闭壳肌和外套膜。

8 试验步骤

8.1 组织印片检测法

8.1.1 印片制作

用解剖刀将样本剖开,用吸水纸轻轻吸去剖面过多的黏液,随后将剖面在载玻片上印迹,制成印片,自然干燥后滴加甲醇覆盖印片部分,固定5 min~7 min。空气干燥。

库七七 www.kqqw.com 标准下载

8.1.2 染色

8.1.2.1 将干燥的印片移入吉姆萨染液中染色，染色时间约30 min。

8.1.2.2 用缓慢的自来水流或洗瓶冲洗，去除多余染液。

8.1.2.3 室温晾干。

8.1.3 封片

滴加2滴中性树胶，封片。

8.1.4 观察

用显微镜低倍镜搜索适合观察的视野，油镜下观察虫体特征。马可尼小胞虫呈卵圆形，直径2 μm～4 μm(参见附录B)。

8.2 组织病理检测法

8.2.1 切片制作

8.2.1.1 脱水

将组织块依次浸入盛有不同浓度乙醇溶液的烧杯中，流程如下：75%乙醇(1 h 45 min)→85%乙醇(1 h 45 min)→85%乙醇(1 h 45 min)→95%乙醇(45 min)→95%乙醇(45 min)→无水乙醇(45 min)→无水乙醇(45 min)。

8.2.1.2 透明

脱水后的组织块依次浸入盛有无水乙醇:二甲苯(1∶1)混合液和二甲苯溶液的烧杯中，流程如下：无水乙醇∶二甲苯(1∶1)(25 min)→二甲苯(20 min)→二甲苯(20 min)。

8.2.1.3 浸蜡

恒温箱温度调节至高于石蜡熔点，流程如下：透明后的组织块依次浸入两个盛有融化石蜡的烧杯中各80 min。

8.2.1.4 包埋

在恒温箱(温度调节至高于石蜡熔点)中熔蜡，将熔蜡倒入包埋盒与包埋模具(也可用折叠纸盒)，用预温的镊子迅速夹取组织块，切面朝下平放在模具底部；轻轻提起模具，置于冰上使其冷却凝固。

8.2.1.5 切片

用蜡铲或刀片将包埋块四周修平，使上下两面修成平行面，保留组织周围附着宽2 mm～3 mm的石蜡。用石蜡切片机切片，厚度5 μm。对每个石蜡包埋块至少切取两张不连续的切片。

8.2.1.6 展片

将切片平放于展片机或水浴锅水面上，待伸展平整后，用载玻片捞出，置于烘片机上或烘箱内，45 ℃烘片2 h。

8.2.2 染色

将切片放在玻片架上，依次浸入盛有不同溶液的烧杯中，流程如下：二甲苯(5 min)→二甲苯

库七七 www.kqqw.com 标准下载

(5 min)→无水乙醇(2 min)→无水乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→80%乙醇(2 min)→80%乙醇(2 min)→50%乙醇(2 min)→蒸馏水(2 min)→蒸馏水(2 min)→蒸馏水(2 min)→迈尔-班尼特苏木精染色液(5 min)→缓慢流动的自来水(6 min)→伊红-焰红染色液(2 min)→95%乙醇(1 min 20 s)→95%乙醇(2 min)→无水乙醇(2 min)→无水乙醇(2 min)→二甲苯(2 min 30 s)→二甲苯(2 min 30 s)→二甲苯(2 min 30 s)。

8.2.3 封片

滴加 2 滴中性树胶,封片。

8.2.4 观察

用显微镜低倍镜搜索不同的视野,油镜下放大 1 000 倍,在泡状结缔组织和闭壳肌血细胞浸润区及其周围观察虫体特征(参见附录 B)。

9 结果判定

9.1 组织印片检测法

在油镜下观察到球形或卵圆形,直径 2 μm～4 μm 的虫体(参见附录 B),细胞质呈蓝色或浅蓝色,细胞核呈红色(因使用商品化染色产品不同,显色略有差异),则组织印片检测结果为阳性,判定为疑似小胞虫感染。

9.2 组织病理检测法

9.2.1 在马可尼小胞虫病流行区域的已知易感宿主中(参见附录 C),油镜下在泡状结缔组织细胞和/或肌纤维细胞细胞质中观察到球形或卵圆形、直径 2 μm～4 μm 的胞体(参见附录 B),则组织病理检测结果为阳性,判定为马可尼小胞虫感染。

9.2.2 在其他种类宿主中,或者在马可尼小胞虫病流行区域以外,组织病理检测结果为阳性,则判定为疑似马可尼小胞虫感染。

9.3 疑似马可尼小胞虫感染的确诊

组织印片检测法或组织病理检测法检测结果为阳性,同时原位杂交检测或按 SC/T 7209.3—2007 透射电镜诊断法检测结果阳性,则判定为马可尼小胞虫感染。

库七七 www.kqqw.com 标准下载

附 录 A
（规范性）
试剂配方

A.1 DAFA 固定液

95％乙醇	330 mL
甲醛(37％)	220 mL
冰醋酸	115 mL
过滤海水	335 mL

混匀，室温密封贮存。

A.2 迈尔-班尼特苏木精染色液

水(50 ℃～60 ℃)	1 000 mL
苏木素	1.0 g
碘酸钠	0.2 g
钾明矾	90.0 g
柠檬酸	1.0 g
水合三氯乙醛	50.0 g

按上述顺序混合，溶解后即可使用，室温贮存。

A.3 伊红-焰红染色液

伊红 Y(水溶性)	1 g
焰红 B(水溶性)	0.1 g
95％乙醇	780 mL
冰醋酸	4 mL

混匀后即可使用，室温贮存。

A.4 85％乙醇

95％乙醇	850 mL
加水定容至	950 mL

混匀，室温贮存。

A.5 80％乙醇

95％乙醇	800 mL
加水定容至	950 mL

混匀，室温贮存。

库七七 www.kqqw.com 标准下载

A.6　75%乙醇

95%乙醇	750 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温贮存。

A.7　70%乙醇

95%乙醇	700 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温贮存。

A.8　50%乙醇

95%乙醇	500 mL
加水定容至	950 mL

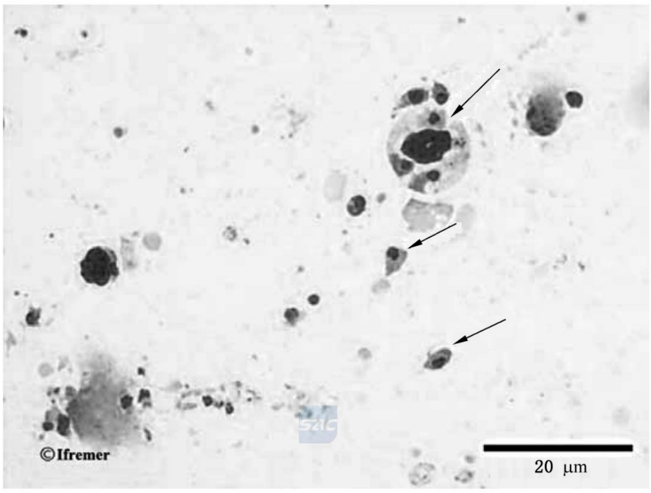
混匀,室温贮存

库七七 www.kqqw.com 标准下载

附　录　B
（资料性）
显微镜检查组织法观察马可尼小胞虫形态图

B.1　组织印片检测法

组织印片检测法示例见图 B.1。



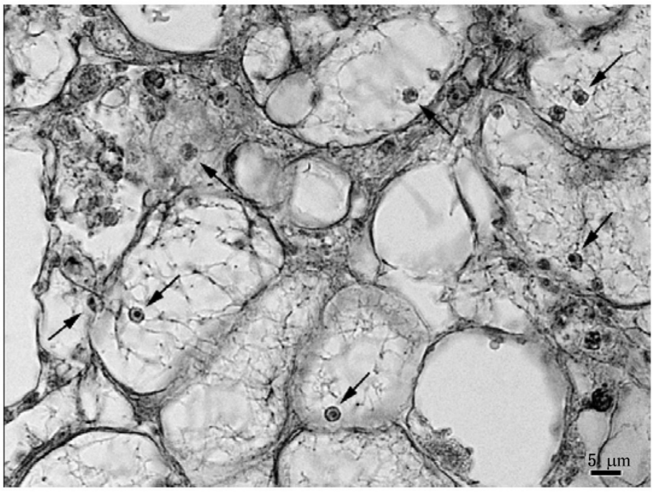
说明：
粗箭头示血细胞内马可尼小胞虫，细箭头示细胞外马可尼小胞虫。

图 B.1　马可尼小胞虫感染长牡蛎(*Crassostrea gigas*)闭壳肌泡状结缔组织

B.2　组织病理检测法

组织病理检测法示例见图 B.2。

库七七 www.kqqw.com 标准下载



说明：
箭头示结缔组织细胞内马可尼小胞虫，直径 2 μm～4 μm。

图 B.2　马可尼小胞虫感染长牡蛎消化腺泡状结缔组织

库七七 www.kqqw.com 标准下载

附　录　C
（资料性）
牡蛎小胞虫病及其病原简介

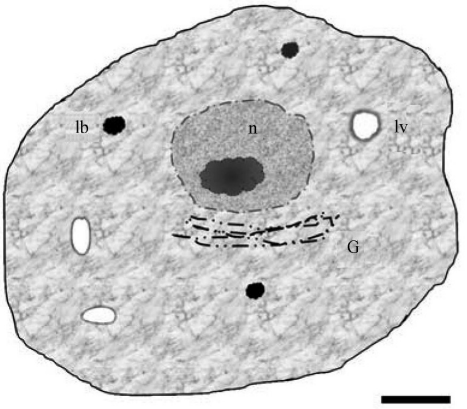
牡蛎小胞虫病主要是由马可尼小胞虫（*Mikrocytos mackini*）感染牡蛎等双壳贝类，引起结缔组织血细胞浸润、组织坏死，进而导致闭壳肌、外套膜等部位的泡状结缔组织产生水泡、脓肿、溃疡和个体死亡的疫病。患病严重的牡蛎（2 年以上成贝）外套膜具有肉眼可见的脓肿和溃疡，脓肿由颗粒细胞和透明细胞组成，并包含有 2 μm～4 μm 的小胞虫体。由于该病最早发现于加拿大的丹名岛（Denman Island），因此通常被称作丹名岛病（Denman Island Disease）。最初发现该寄生虫主要感染长牡蛎（*Crassostrea gigas*），随后在美国加利福尼亚州沿岸的熊本牡蛎（*C. sikamea*）中检测到该寄生虫。20 世纪 60 年代，位于低潮线处较大牡蛎（3 年以上成贝）的死亡率可达 40%左右。温度低于 10 ℃和高盐度可以促使本病暴发。世界动物卫生组织（OIE）水生动物卫生法典（2016 版）将引起该病发生的主要病原（马可尼小胞虫）列为需通报的贝类动物病原。

马可尼小胞虫病主要发生在加拿大的西南海岸，其分布遍及加拿大多个地区。在美国加利福尼亚和华盛顿州也发现有马可尼小胞虫感染案例；自加拿大出口到法国的欧洲牡蛎中曾检测到马可尼小胞虫。从我国黄海北部长牡蛎中检测到一种低感染率的小胞虫未定种（*Mikrocytos* sp.）；该种小胞虫序列与马可尼小胞虫的相似度为 89%。虽然目前我国尚无马可尼小胞虫的感染案例，随着近年来我国从马可尼小胞虫病疫区国家进口鲜活贝类贸易活动的日益增多，该病对我国贝类养殖业构成潜在威胁。

马可尼小胞虫的宿主范围非常广泛，除天然宿主外，在人工感染条件下，该寄生虫可以感染欧洲牡蛎（*Ostrea edulis*）、奥林匹亚牡蛎（*O. lurida* = *O. conchaphila*）和美洲牡蛎（*C. virginica*）等。目前已知象拔蚌（*Panope abrupta*）和菲律宾蛤仔（*Venerupis philippinarum*）对马可尼小胞虫感染具有抗性。

马可尼小胞虫的生长发育主要包括三个阶段：休眠期（quiescent stage），囊泡期（vesicular stage）和内体期（endosomal stage）。休眠期的小胞虫又称为休眠细胞（quiescent cells，QC），主要分布于囊状结缔组织、血淋巴细胞以及闭壳肌和心肌细胞。QC 有一个细胞核，核内具颗粒状染色质，胞质内有高尔基体和囊泡体（图 C.1）。囊泡期的小胞虫又称为囊泡细胞（vesicular cells，VC），仅在肌细胞内及其周边（细胞外）被观察到。VC 内细胞核增大为一个池腔（cisternal chamber），膜结构的高尔基体消失，胞质内散布大小不等囊泡体（lv）（图 C.2）。内体期小胞虫又称为内体细胞（endosomal cells，EC），分布于血淋巴细胞内或细胞外和囊状结缔组织，但肌细胞内及周边观察不到 EC。EC 整体形状与 QC 非常相似，但 VC 胞质内细胞器更加多样，主要有球状厚壁体（stb），吻合内质网（aER）（图 C.3）。

库七七 www.kqqw.com 标准下载



比例尺：500 nm

标引序号说明：

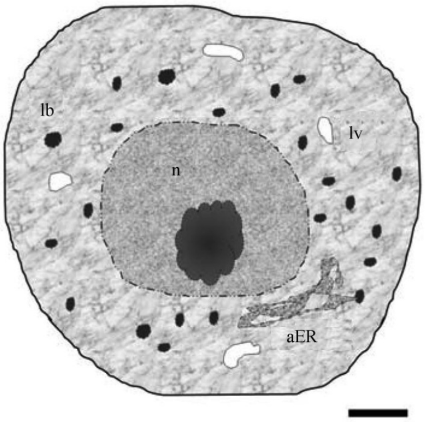
G——类高尔基体(Golgi-like cisternae)；

lb——类溶酶体(lysosome-like body)；

lv——囊泡体(large vesicles)；

n——核(nucleus)。

图 C.1 休眠期小胞虫



比例尺：500 nm

标引序号说明：

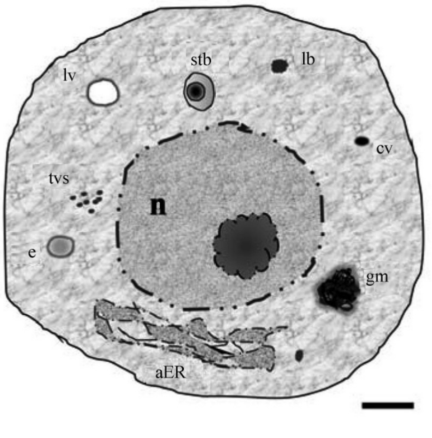
aER——吻合内质网(anastomosing endoplasmic reticulum)；

lb——类溶酶体(lysosome-like body)；

lv——囊泡体(large vesicles)；

n——核(nucleus)。

图 C.2 囊泡期小胞虫



比例尺：500 nm

标引序号说明：

aER——吻合内质网(anastomosing endoplasmic reticulum)；

cv——有被囊泡(coated vesicles)；

e——类内体(endosome-like bodies)；

G——类高尔基体(Golgi-like cisternae)；

gm——颗粒物(granular material)；

lb——类溶酶体(lysosome-like body)；

lv——囊泡体(large vesicles)；

n——核(nucleus)；

stb——球状厚壁体(spherical thick-walled bodies)；

tvs——高尔基体样微管泡结构(Golgi-like tubulovesicular structure)。

图 C.3 内体期小胞虫

库七七 www.kqqw.com 标准下载