

ICS 65.020.30  
CCS B 41



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 40256—2021

## 牡蛎马尔太虫病诊断规程 显微镜检查组织法

Code of diagnosis for marteiliosis of oysters—Microscopic methods

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会



## 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、黄健、李清、万晓媛、李晨、辛鲁生、余卫忠。



# 牡蛎马尔太虫病诊断规程

## 显微镜检查组织法

### 1 范围

本文件规定了牡蛎马尔太虫病诊断规程中普遍适用的显微镜检查组织法的要求,针对主要病原折光马尔太虫(*Marteilia refringens*),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折光马尔太虫的普查和初步诊断,以及牡蛎感染折光马尔太虫的流行病学调查及诊断。其他贝类也可参照执行。

### 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。

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 7207.3—2007 牡蛎马尔太虫病诊断规程 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

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。

- 5.1 苏木素。
- 5.2 碘酸钠。
- 5.3 钾明矾。
- 5.4 柠檬酸。
- 5.5 水合三氯乙醛。
- 5.6 伊红 Y(水溶性)。
- 5.7 焰红 B(水溶性)。
- 5.8 石蜡(熔点 52 ℃~54 ℃):切片级。
- 5.9 中性树胶:生物染色用。
- 5.10 甲醇。

- 5.11 二甲苯。
- 5.12 无水乙醇。
- 5.13 95%乙醇。
- 5.14 甲醛(37%)。
- 5.15 冰醋酸。
- 5.16 吉姆萨(Gimesa)染液。
- 5.17 过滤海水:经纱网( $\geq 200$  目)过滤的海水。
- 5.18 DAFA 固定液:按附录 A 的 A.1 配制。
- 5.19 迈尔-班尼特苏木精(Mayer-Bennett Hematoxylin)染色液:按 A.2 配制。
- 5.20 伊红-焰红染色液:按 A.3 配制。
- 5.21 85%乙醇:按 A.4 配制。
- 5.22 80%乙醇:按 A.5 配制。
- 5.23 75%乙醇:按 A.6 配制。
- 5.24 70%乙醇:按 A.7 配制。
- 5.25 50%乙醇:按 A.8 配制。

## 6 仪器设备

- 6.1 显微镜:配备高倍镜( $40\times$ )和油镜( $100\times$ )。
- 6.2 石蜡切片机:满足  $4\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$  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。海水温度高于  $17\ ^\circ\text{C}$  时为采样的最佳时期。

### 7.3 样品的采集

稚贝(附着后 $\sim 2\ \text{mm}$ )和幼贝( $2\ \text{mm}\sim 30\ \text{mm}$ )取内脏团;成贝( $> 30\ \text{mm}$ )取胃、肠道、消化腺和闭壳肌。

## 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,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。

### 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,放大 400 或 1 000 倍观察孢子和孢囊特征。马尔太虫胞体细胞质为嗜碱性,细胞核为嗜酸性(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  $\mu$ m。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  $^{\circ}$ C 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

(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,观察组织坏死和血细胞浸润情况;放大 400 倍或 1 000 倍观察孢子和孢囊特征(参见附录 B)。

## 9 结果判定

### 9.1 组织印片检测法

9.1.1 在折光马尔太虫病流行区域的易感宿主中(参见附录 C),观察到发育早期(大小  $4\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m}$ )和孢囊形成期( $20\ \mu\text{m}\sim 40\ \mu\text{m}$ )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,判定为折光马尔太虫感染。

9.1.2 在其他种类宿主中,或者在折光马尔太虫病流行区域以外,组织印片检测结果为阳性,则判定为疑似折光马尔太虫感染。

### 9.2 组织病理检测法

9.2.1 在折光马尔太虫病流行区域的易感宿主中(参见附录 C),在胃、肠和消化道的上皮细胞观察到发育早期(大小  $4\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m}$ )的虫体;同时在消化道的上皮细胞中观察到孢子形成期(大小  $20\ \mu\text{m}\sim 40\ \mu\text{m}$ )虫体(参见附录 B),则组织病理检测结果为阳性,判定为折光马尔太虫感染。

9.2.2 在其他种类宿主中,或者在折光马尔太虫病流行区域以外,组织病理检测结果为阳性,则判定为疑似折光马尔太虫感染。

### 9.3 疑似折光马尔太虫感染的确诊

在其他种类宿主中,或者在折光马尔太虫病流行区域以外(参见附录 C),组织印片检测法或组织病理检测法检测结果为阳性,PCR 检测结果阳性且 PCR 产物序列与折光马尔太虫一致,同时按 SC/T 7207.3—2007 透射电镜诊断法检测结果阳性,则判定为折光马尔太虫感染。



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。	

**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	

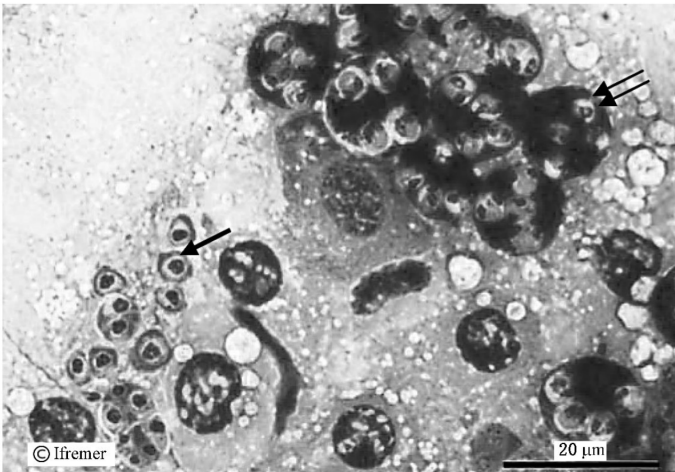
附 录 B

(资料性)

显微镜检查组织法观察折光马尔太虫形态图

B.1 组织印片检测法

组织印片检测法示例见图 B.1。

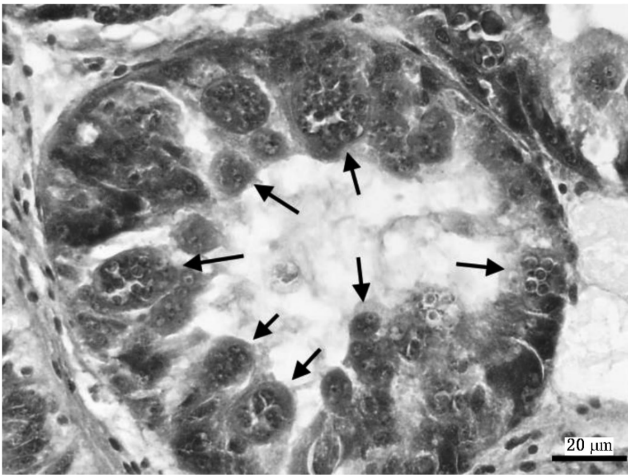


说明：  
单箭头表示幼体期(直径 4 μm~8 μm)，双箭头表示孢囊期(直径 20 μm~40 μm)。

图 B.1 马尔太虫感染地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)消化腺

B.2 组织病理检测法

组织病理检测法示例见图 B.2。



说明：  
箭头表示孢子形成期马尔太虫(直径 20 μm~40 μm)。

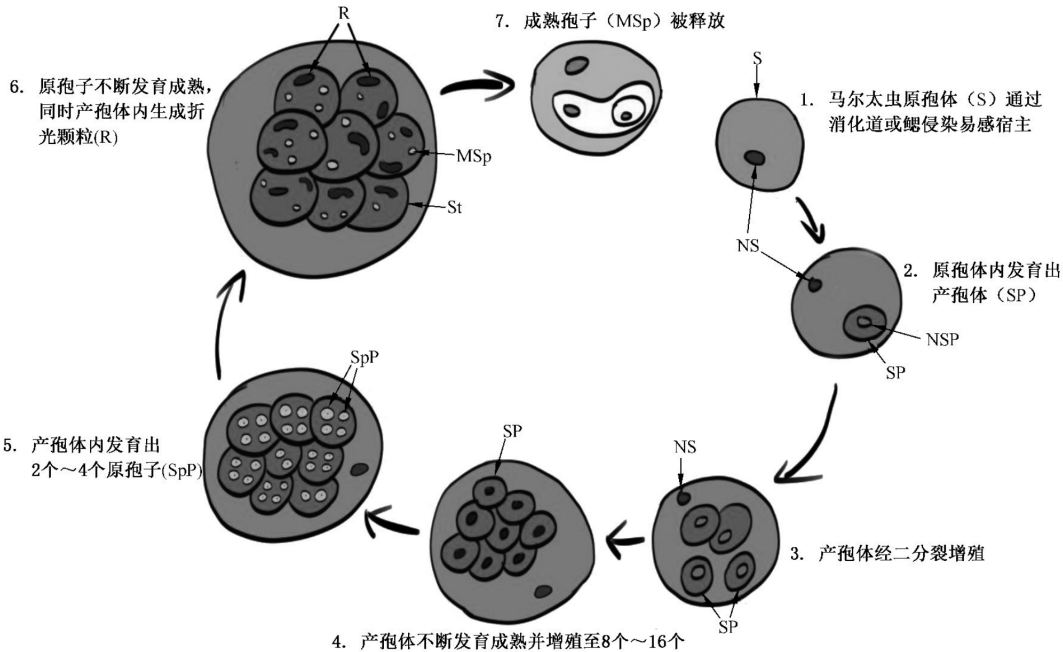
图 B.2 马尔太虫感染欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)消化腺

附 录 C

(资料性)

牡蛎马尔太虫病及其病原简介

牡蛎马尔太虫病也称 Aber 病(由 *Marteilia refringens* 引起)或 QX 病(由悉尼马尔太虫, *M. sydneyi* 引起),该病由丝足虫门(Cercozoa)无孔目(Paramyxida)马尔太虫属的原生动物感染双壳贝类引起,病变主要发生在双壳贝类的消化系统,可引起生理功能紊乱和死亡。马尔太虫早期感染发生在胃、消化管和鳃的上皮细胞(图 C.1),发病个体表现出体征不健康、瘦弱、能量(糖原)耗竭、消化腺变色、生长停滞和死亡等一系列症状,死亡与寄生虫孢子形成相关。



标引序号说明:

MSp:成熟孢子(mature spore);

NS:原孢子体核(nucleus of sporangiosorus);

NSP:产孢子体核(nucleus of sporangial primordium);

R:折光颗粒(refringent bodies);

S:原孢子体(sporangiosorus);

SP:产孢子体(sporangial primordium);

SpP:原孢子(spore primordium)。

图 C.1 马尔太虫不同发育阶段及其在牡蛎体内分布模式图

该病全年都可能会发生,给贝类养殖业造成较大经济损失。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——折光马尔太虫(*M. refringens*)列为需通报的贝类动物病原。折光马尔太虫分为 O 型和 M 型,其易感宿主种类广泛,包括:欧洲牡蛎(*Ostrea edulis*)、普罗旺斯牡蛎(*O. stentina*)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)、地中海贻贝(*M. galloprovincialis*)、沟纹竹蛏(*Solen marginatus*)和黑贻贝(*Xenostrobus securis*)。其他马尔太虫(*Marteilia* spp.)还可感染智利牡蛎(*O. chilensis*)、阿根廷牡蛎(*O. puelchana*)和密鳞牡蛎(*O. denselamellosa*),但感染这些牡蛎的马尔太虫未被鉴定到种。在欧洲鸟尾蛤(*Cerastoderma edule*)、沟纹帘蛤(*Ruditapes decussatus*)、菲律宾蛤

仔(*R. philippinarum*)和美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)等双壳贝类中,曾观察到包括成熟期在内不同发育阶段的类马尔太虫寄生虫。此外,一种桡足类小型节肢动物(*Paracartia grani*)也显示出对折光马尔太虫的易感性,且被认为在该寄生虫的水平传播过程中起作用。

目前已知的折光马尔太虫地理分布主要集中在地中海和北大西洋沿岸,包括:阿尔巴尼亚、克罗地亚、法国、希腊、意大利、摩洛哥、葡萄牙、西班牙、突尼斯和英国。受季节、养殖方式等因素的影响,折光马尔太虫的感染率变化很大,在欧洲牡蛎群体中可高达 98%。牡蛎感染该寄生虫后,在夏季和秋季温度较高的季节,死亡率较高,一般在 50%~90%,死亡发生和寄生虫孢子形成过程密切相关。贻贝对寄生虫的敏感性比牡蛎低,死亡率达 40%。有研究报道初次接触该病原的贻贝,在疫区养殖 6 个月后,死亡率达 100%。

目前我国仅有一例有关折光马尔太虫感染养殖贝类的报道,且仅为 PCR 扩增的阳性结果,并未引起贝类死亡。使用组织病理和 PCR 检测方法,已在我国养殖紫贻贝中检测到马尔太虫样寄生虫,其 18S rRNA 基因与折光马尔太虫的基因相似度为 88%。虽然目前我国尚无折光马尔太虫感染导致贝类死亡的报道,但随着近年来我国从折光马尔太虫病疫区国家进口鲜活贝类贸易活动的日益增多,该类寄生虫对我国贝类养殖业构成潜在威胁。

---





中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
牡蛎马尔太虫病诊断规程  
显微镜检查组织法  
GB/T 40256—2021

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: [www.spc.org.cn](http://www.spc.org.cn)

服务热线: 400-168-0010

2021年5月第一版

\*

书号: 155066 · 1-66410

版权专有 侵权必究



GB/T 40256-2021