



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4826—2017

禽螺旋体病检疫技术规范

Quarantine protocol for Avian Spirochaetosis

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。
本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。
本标准起草单位：中华人民共和国重庆出入境检验检疫局。
本标准主要起草人：刘生峰、杨俊、陆丽华、聂福平、王昱、张雷、李贤良、王国民、李应国。

禽螺旋体病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了禽螺旋体病的病原分离与鉴定、聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光 PCR 和酶联免疫吸附试验(ELISA)的检测技术。
本标准适用于禽螺旋体病的检疫或流行病学调查。

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。
SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

3 缩略语

- 下列缩略语适用于本文件。
- AS:禽螺旋体病
 - B.B:伯氏疏螺旋体
 - BSK-H:BSK-H 培养基(Barbour-Stonner-Kelly-H medium)
 - ELISA:酶联免疫吸附试验
 - PBS:磷酸缓冲液
 - HRP:辣根过氧化物酶
 - OD 值:光密度值
 - PCR:聚合酶链式反应
 - BSA:牛血清白蛋白
 - dNTPs:脱氧核苷酸
 - SDS:十二烷基硫酸钠

4 疫病概述

禽螺旋体病(Avian Spirochaetosis, AS)是由伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)引起的,可致多种禽类感染的以发热、精神沉郁、厌食和下痢为其特征的急性败血性传染病。伯氏疏螺旋体属于原核生物界(Kingdom Monera)、螺旋体目(Spirochaetidae)、螺旋体科(Spirochaetaceae)、疏螺旋体属(*Borrelia*)(也称包柔氏螺旋体属)。禽螺旋体病呈世界性分布,我国农业部和质检总局发布的《进境动物检疫疫病名录》,将其列入二类进境动物疫病,欧洲发生较多。我国新疆(1983 年)曾有发生过鸡螺旋体病的报道。其流行病学、临床及病理变化参见附录 A。

5 样本采集

5.1 试剂和材料

5.1.1 主要试剂:BSK-H 培养基(见附录 B)、吉姆萨染液、革兰氏染液、生理盐水、甲醇。

5.1.2 主要仪器设备和器材:无菌剪刀、镊子、平皿、烧杯、玻璃瓶、组织研磨器、注射器、离心机、高压灭菌锅、冰柜、生物安全柜、生物显微镜等。

5.2 病料的采集、保存和运输

病料从发热或发病活禽及濒死禽中采集。对于活禽可用翼静脉采血,分离血清用于抗体的 ELISA 检测,用肝素钠为抗凝剂无菌采集抗凝全血用于病原分离试验。对于病、死禽应无菌采集小肠、脾、肝、肾、心、肺等组织脏器。采样后应立即处理(见 6.1),若暂时不能处理,可于-70℃冰柜中保存。样品的保存和运送按 SN/T 2123 进行操作。

6 病原分离与鉴定

6.1 组织样品的处理

将组织样品 2 g,无菌接种至装有 7 mL BSK-H 培养基的 10mL 具塞试管中,32℃~33℃增殖培养 7 d 后,取菌悬液涂片镜检。血液样品处理:取待凝血经 1 000 r/min 离心 10 min 后,取血清及血细胞交界处淡白色悬液涂片镜检。

6.2 病原显微镜检

取 6.1 的待检悬液数滴到载玻片中央,用接种环将悬液均匀涂布在载玻片上形成液膜,待液膜干燥后,用甲醇固定 2 min~3 min。滴加稀释好吉姆萨染液使全部覆盖玻片,室温染色 15 min~30 min 后,用蒸馏水从玻片一端冲洗,晾干后镜检。也可经革兰氏染色后镜检。

7 PCR

7.1 试剂和材料

7.1.1 主要试剂:液氮、十二烷基硫酸钠(SDS)、蛋白酶 K、苯酚、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、PCR 反应缓冲液、Taq DNA 聚合酶、dNTP、琼脂糖、DNA marker。

7.1.2 主要仪器设备和器材:研钵、PCR 仪、离心机、电流仪、电泳槽、凝胶成像系统、-20℃冰箱。

7.1.3 样品及处置:对脏器组织样品取约 2 g,置入无菌研钵中,加液氮研磨后,取匀浆液 200 μL 置入 1.5 mL 离心管中;对 6.1 中增菌悬液取 200 μL~500 μL 置入 1.5 mL 离心管中;对血液样品,取待凝血经 1 000 r/min 离心 10 min 后,取血清及血细胞交界处淡白色悬液 200 μL~500 μL 置入 1.5 mL 离心管中。对离心管中收集物经 12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,收集沉淀用于提取核酸;同时设立伯氏疏螺旋体标准菌株培养物作为阳性对照;SPF 鸡血为阴性对照。

7.2 引物和序列

引物和序列如下:

——P1:5'-CTTCTCAAGGCGGAGTTAA-3';

——P2:5'-CCTCATCTGTCATTGTAGCA-3'。

扩增目的片段为 225 bp。

7.3 核酸提取

7.3.1 向 5.1.3 收集的沉淀中,加入 500 μL 抽提缓冲液(100 mmol/L 氯化钠,10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0,25 mmol/L EDTA pH 8.0,终浓度 10 g/L SDS 和终浓度 0.1 g/L 蛋白酶 K)悬浮后,55℃水浴

中反应 2 h,同时设立伯氏疏螺旋体标准菌株培养物作为阳性对照;SPF 鸡血为阴性对照。

7.3.2 加入等体积的苯酚:三氯甲烷:异戊醇(苯酚:三氯甲烷:异戊醇比例为 25:24:1)反复 12 000 r/min 离心 10 min,将上层液体转移至另一个 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积 3 mol/L 的乙酸钠和 2 倍体积无水乙醇,−20 ℃ 放置 2 h(或更长时间)。

7.3.3 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。加入 500 μL 70%冷乙醇洗涤一次,尽量弃去上清。

7.3.4 待离心管中液体自然干燥后,加入 50 μL 双蒸水溶解沉淀,即为 DNA 模板。

7.3.5 核酸提取可使用等效的商品化细菌核酸提取试剂盒。

7.4 PCR 检测

7.4.1 反应体系

10×PCR 缓冲液	2.5 μL
10 μmol/L P1(P1)	1 μL
10 μmol/L P2(P2)	1 μL
dNTPs	2 μL
DNA 模板	5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.5 μL
水	13 μL
总体积	25 μL

7.4.2 反应程序

反应程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

7.5 琼脂糖凝胶电泳分析

用 1×TBE 电泳缓冲液配制 2%琼脂糖凝胶平板(见附录 B),将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。取 8 μL PCR 产物和 2 μL 样品缓冲液混匀后加入样品孔,同时在凝胶的另一孔加入 DNA 分子量标准物质(DNA marker)。调节电压为约 5 V/cm 电泳约 25 min。在紫外灯下观察是否出现大小约为 225 bp 的基因片段。

7.6 结果判定

在阴性对照、空白对照未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带条件下,如待测样本未出现相应大小的扩增条带,则判定该样本的 PCR 检测结果为阴性;如待测样本出现预期大小扩增条带则应测序验证,参考序列参见附录 C。

8 实时荧光 PCR

8.1 试剂和材料

8.1.1 主要试剂:液氮、十二烷基硫酸钠(SDS)、蛋白酶 K、苯酚、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、PCR 反应缓冲液、Taq DNA 聚合酶、dNTPs。

8.1.2 主要仪器设备和器材:研钵、荧光 PCR 仪、离心机、−20 ℃ 冰箱。

8.1.3 样品及处置:对脏器组织样品取约 2 g,置入无菌研钵中,加液氮研磨后,取匀浆液 200 μL 置入 1.5 mL 离心管中;对 6.1 中增菌悬液取 200 μL~500 μL 置入 1.5 mL 离心管中;对血液样品,取待凝血经 1 000 r/min 离心 10 min 后,取血清及血细胞交界处淡白色悬液 200 μL~500 μL 置入 1.5 mL 离心

管中。对离心管中收集物经 12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,收集沉淀用于提取核酸;同时设立伯氏疏螺旋体标准菌株培养物作为阳性对照;SPF 鸡血为阴性对照。

8.2 引物和探针序列

- 引物和探针序列如下:
- RP1:5'-GCTCAAATAAAAGATGCTACA-3';
 - RP2:5'-GCAGATTGTGTTAAAATACTATTAG-3';
 - 探针:5'-FAM-TGCTGCTACAACCTCATCTGTCA-TAMRA-3'。

8.3 核酸提取

- 8.3.1 向 8.1.3 收集的沉淀中,加入 500 μ L 抽提缓冲液(100 mmol/L 氯化钠,10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0,25 mmol/L EDTA pH 8.0,终浓度 10 g/L SDS 和终浓度 0.1 g/L 蛋白酶 K)悬浮后,55 $^{\circ}$ C 水浴中反应 2 h,同时设立阳性和阴性对照。
- 8.3.2 加入等体积的苯酚:三氯甲烷:异戊醇(苯酚:三氯甲烷:异戊醇比例为 25:24:1)反复 12 000 r/min 离心 10 min,将上层液体转移至另一个 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积 3 mol/L 的乙酸钠和 2 倍体积无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 2 h(或更长时间)。
- 8.3.3 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。加入 500 μ L 70%冷乙醇洗涤一次,尽量弃去上清。
- 8.3.4 待离心管中液体自然干燥后,加入 50 μ L 双蒸水溶解沉淀,即为 DNA 模板。
- 8.3.5 核酸提取可使用等效的商品化细菌核酸提取试剂盒。

8.4 荧光 PCR 检测

8.4.1 反应体系

2 \times PCR 缓反应 MIX	12.5 μ L
10 μ mol/L RP1	1 μ L
10 μ mol/L RP2	1 μ L
10 μ mol/L 探针	1 μ L
DNA 模板	2 μ L
Taq DNA 聚合酶	0.5 μ L
水	7 μ L
总体积	25 μ L

8.4.2 反应程序

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s;45 个循环,每个循环结束后采集 FAM 通道数据。

8.5 结果判定

8.5.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点,结果显示阴性为准。或可根据仪器噪音情况进行调整。

8.5.2 质控标准

阴性对照无 Ct 值且无扩增曲线;阳性对照 Ct 值小于 28.0,并出现典型的扩增曲线。否则,此次实

验视为无效。

8.5.3 结果描述及判定

8.5.3.1 阴性:无 Ct 值并且无扩增曲线,表示样品中无伯氏疏螺旋体。

8.5.3.2 阳性:Ct 值小于或等于 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样本中存在伯氏疏螺旋体。

8.5.3.3 有效原则:Ct 值大于 30.0 的样本须重做,重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。

9 酶联免疫吸附试验

9.1 试剂和材料

9.1.1 包被抗原:纯化的伯氏疏螺旋体重组抗原,由指定单位提供。

9.1.2 阳性血清:鸡抗伯氏疏螺旋体阳性血清,由指定单位提供。

9.1.3 阴性血清:SPF 鸡血清。

9.1.4 酶标记抗体:辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgG。

9.1.5 检测样品:鸡血清样品,检测前需 56 °C 处理 30 min。

9.1.6 ELISA 包被液、封闭液、稀释液、洗涤液(PBST)、底物液、终止液见附录 B。

9.1.7 主要设备和器材:酶标仪、37 °C 恒温箱、4 °C 冰箱、ELISA 洗板机。

9.2 试验操作

9.2.1 包被酶标板:用包被液稀释纯化的伯氏疏螺旋体抗原至终浓度为 10 mg/L,包被 96 孔 ELISA 板,50 μ L/孔,置 4 °C 冰箱过夜。

9.2.2 封闭:弃去包被液,加入 1% BSA 溶液,200 μ L/孔,37 °C 放置 1 h,弃去封闭液,用 PBST 洗 3 遍。

9.2.3 加样:分别在阴、阳性对照孔中加入阴性对照、阳性对照 50 μ L。然后在待测样品孔先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L。加样时应将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,轻轻敲打酶标板边缘,使孔内反应液均匀铺满孔底。置于 37 °C 反应 1 h,弃去反应物,用 PBST 洗 3 遍。

9.2.4 加入用稀释液稀释的酶标记抗体(1:3 000 或按相关说明书进行稀释),轻轻敲打酶标板边缘,50 μ L/孔,使孔内反应液均匀铺满孔底。置于 37 °C 反应 30 min,弃去反应物,用 PBST 洗 3 遍。

9.2.5 加入底物液,50 μ L/孔,轻轻敲打酶标板边缘,使孔内反应液均匀铺满孔底。室温避光反应 10 min。

9.2.6 加入终止液,50 μ L/孔。

9.2.7 用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

9.3 结果判定

9.3.1 试验有效性判定条件:阳性对照孔平均值 \geq 1.00;阴性对照孔平均值 \leq 0.10。

9.3.2 结果判定:

临界值(CUT OFF)计算:临界值=阴性对照孔平均值+0.15;

阴性判定:样品 OD 值<临界值(CUT OFF)者为禽螺旋体抗体阴性;

阳性判定:样品 OD 值 \geq 临界值(CUT OFF)者为禽螺旋体抗体阳性。

注:可使用等效的商品化 ELISA 试剂盒检测禽螺旋体抗体。

10 结果判定与报告

- 10.1 病原分离鉴定、PCR 或实时荧光 PCR 检测任一检测结果阳性，则直接报告禽螺旋体病阳性，否则报告为禽螺旋体病阴性。
- 10.2 ELISA 试验阳性同时符合试验有效性判定条件，报告为禽螺旋体抗体阳性；ELISA 试验阴性同时符合试验有效性判定条件，则报告为禽螺旋体抗体阴性。

附 录 A
(资料性附录)
禽螺旋体病

A.1 流行病学

鸡、鹅、鸭、火鸡和雉都易感,年龄较大的禽类有较大的抵抗力,容易自然恢复。禽疏螺旋体病是自然疫源性疾病,本病主要发生在能保持其中间宿主——蜱繁息的地区,因此,病的流行季节与蜱的活动有密切关系。自然条件下,由于蜱的叮咬或摄食了有感染性的血液和蜱卵而发生感染,潜伏期一般为3 d~12 d。家庭鸡舍中捕捉到的蜱,其传染性高于商业鸡舍中的蜱,雄蜱的传染性高于雌蜱。这些蜱可经卵巢把病原传染给后代或叮咬禽后引起禽感染。在波斯锐缘蜱体内,禽疏螺旋体完整结构在1个~4个月后便可消失,但这些蜱仍有1年以上的传染性。鸡螨、鸡虱以及库蚊也是该病的传染性媒介,食入污染的粪便、异嗜病尸以及皮肤损伤也可被感染。

A.2 临床症状

禽感染螺旋体多见急性症状:急性病例常突然出现体温升高、感染鸡体温升高到42.9℃~43.6℃以上,肉冠、肉髯肉冠、肉髯蜡样透红、严重发绀或苍白,精神不振、食欲减退或不食、呆立不动,头下垂等症状,并排出含有胆汁和尿酸盐的绿色稀粪。随后鸡冠苍白松弛,贫血症状,步态不稳,严重者腿翅麻痹,重症鸡出现轻瘫、麻痹、嗜睡,最后抽搐死亡。有的雏鸡出现腿、翅膀无力,一侧或双侧翅膀麻痹,经常呈犬坐式。由于螺旋体在病禽体内大量繁殖,血液中红细胞被大量破坏,细胞碎片阻塞毛细血管,以致出现明显的贫血和黄疸,这是本病最典型的特征性症状。急性病程一般为4 d~6 d。慢性病例较少见,症状与急性者相似而较轻缓,一般经2周左右可以完全康复。

A.3 病理变化

剖检病鸡可见尸体消瘦,严重脱水,被毛粗乱,肉髯、肉冠发绀或苍白,肛周被绿色粪便污染。尸体血液稀薄如水,呈咖啡色,血清呈黄绿色。脾脏有特征性病变,脾脏比正常体积大5倍~6倍,呈紫红色或棕红色,被膜下有暗红色斑点状出血与灰白色坏死灶,使脾脏呈斑驳状外观。肝脏肿大、柔软,呈暗红色,偶见被膜下出血。病程稍长者,肝脏肿胀不明显,可见到针尖大至1 mm~2 mm大小的灰白色坏死点,有时偶见梗死。病死鹅的肝脏,坏死面积较大而不规则。病禽皮下组织、心外膜、腹腔脂肪、消化道浆膜以及内脏器官的点状或斑点状出血,有时可见黄疸。尸体嗦囊空虚,仅见少量水样液体。肠内容物呈暗绿色,黏膜表面被覆卡他性渗出物或出血性卡他性渗出物。肾肿大,呈苍白或棕红色,有时可见到坏死灶。肺脏高度淤血、水肿,部分区域出血。心肌实质变性,心外膜被覆一层纤维素性渗出物,产蛋禽常见卵黄破裂,常有出血性肠炎。

上述症状和变化,常难以确诊,采取发热期的血液或各实质脏器涂片,用姬姆萨染色或革兰氏染色后镜检,发现疏状螺旋体即可确诊。

附 录 B
(规范性附录)
培养基和试剂的配制

B.1 BSK-H 完全培养基的配制

羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)	5.64 g
蛋白胨	4.7 g
柠檬酸钠	0.7 g
葡萄糖	5.64 g
NaHCO ₃	2.0 g
TC-酵母自溶物	2.0 g
丙酮酸钠	0.75 g
N-乙酰葡萄糖胺	0.37 g
牛血清白蛋白	47.0 g
CMRL1066,(10X)	100.0 mL
兔血清(热灭活)	60.0 mL
去离子水	840.0 mL

用蒸馏水溶解各配方成分及牛血清白蛋白,用 NaOH 调节至 pH=7.5 并过滤除菌,无菌添加 100 mL CMRL1066 和 60 mL 兔血清,然后混合均匀、无菌分装。

注:也可购置等效的商品化 BSK-H 培养基。

B.2 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)的配制

磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.9 g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄)	0.3 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
蒸馏水	1 000 mL

用氢氧化钠(NaOH)或盐酸(HCl)调至 pH=7.2,灭菌或过滤。

B.3 ELISA 包被液(pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

碳酸氢钠(NaHCO ₃)	2.93 g
碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	1.59 g
蒸馏水	1 000 mL

溶解后置于 4 ℃ 冰箱保存,在一周内使用。

B.4 洗涤液(含 0.1% Tween-20 pH 7.4 PBS,PBST)

氯化钠(NaCl)	8 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.9 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
Tween-20	1 mL
蒸馏水	1 000 mL

溶解后置于 4 ℃ 冰箱备用。

B.5 封闭液

3%BSA 溶液:取 3 g BSA 粉,加入 100 mL 蒸馏水,混匀,置于 4 ℃ 冰箱备用。

B.6 稀释液

含有 1%BSA 的 PBST,用于血清样品、酶标记抗体的稀释。

B.7 底物液

B.7.1 乙酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.0)

A 液:乙酸钠溶液	
乙酸钠	1.64 g
双蒸水	200 mL
B 液:柠檬酸缓冲液	
柠檬酸	2.1 g
蒸馏水	100 mL

配制:取 B 液约 2 mL 至 A 液中,调至 pH=6.0,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

B.7.2 TMB 溶液

TMB 0.35 g
甲醇 100 mL
加温溶解后于暗盒中室温保存。

B.7.3 底物工作液(现用现配)

乙酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.0)	9.7 mL
TMB 溶液	0.3 mL
H_2O_2	7 μL

注:可使用等效商品化底物溶液。

B.8 终止液(2 mol/L H_2SO_4)

浓硫酸(H_2SO_4)	22.2 mL
蒸馏水	177.8 mL

B.9 5×TBE 电泳缓冲液

Tris 碱	54.0 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)	20 mL
蒸馏水定容至 1 000 mL,充分溶解,4 ℃保存。	

B.10 2%琼脂糖凝胶

在 200 mL 三角烧瓶中加入琼脂糖 2 g;1×TBE 缓冲液 100 mL。微波炉中使之完全溶解,加入 2 μL浓度为 10 mg/mL 溴化乙锭溶液(或等效商品化 DNA 染料)2 μL 充分摇匀,备用;待琼脂糖冷却至 60 ℃左右,倒入制胶板并防止气泡产生,使琼脂糖厚度达 3 mm~5 mm,待凝胶完全凝固后去掉梳子,将凝胶托盘放入电泳槽,加入 1×TBE 电泳缓冲液使之高出凝胶 2 mm~3 mm。

B.11 硼酸缓冲液(pH 8.6)

四硼酸钠	8.8 g
硼酸	4.65 g
蒸馏水	1 000 mL

附 录 C
(资料性附录)
参考判定依据

fla 基因参考序列：
CTTCTCAAGGCGGAGTTAATTCTCCTGTTAATGTTACAACACTACAGTTGATGCTAATACATC
ACTTGCTAAAATTGAAAATGCTATTAGAATGATAAGTGATCAAAGGGCAAATTTAGGTGC
TTTCCAAAATAGACTTGAATCTATAAAGAATAGTACTGAGTATGCAATTGAAAATCTAAA
AGCATCTTATGCTCAAATAAAAGATGCTACAATGACAGATGAGG
