

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1224—2012
代替 SN/T 1224—2003

禽支原体病检疫技术规范

Quarantine protocol for avian mycoplasmosis

2012-12-12 发布

2013-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局



前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准与 OIE《Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals》(2010 版)第 2.3.5 节《禽支原体病诊断标准》的一致性为非等效。

本标准代替 SN/T 1224—2003《鸡败血支原体感染抗体检测方法快速血清凝集试验》。

本标准与 SN/T 1224—2003 相比,主要技术变化如下:

——增补了该病的临床病理诊断内容;

——在实验室诊断方法上增加了病原分离及间接免疫荧光(IFA)、PCR 鉴定方法,免疫胶体金快速检测、血凝抑制试验和酶联免疫吸附试验方法。

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:中华人民共和国湖北出入境检验检疫局、华中农业大学、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:陈建军、肖运才、李东、冯汉利、叶奕优、曾宪东、杨武、毕丁仁、郭明星。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1224—2003。

禽支原体病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了禽支原体病的临床诊断、血清学诊断及禽败血支原体(MG)分离培养和鉴定方法。本标准适用于禽支原体病的检疫诊断。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AM:禽支原体病(avian mycoplasmosis)

CRD:慢性呼吸道疾病(chronic respiratory disease)

MG:禽败血支原体(禽败血霉形体)(mycoplasma gallisepticum)

MS:滑液支原体(mycoplasma synoviae)

4 疫病概述

禽感染各类致病性支原体引起的疾病都统称为禽支原体病(AM),其中由 MG 感染所致的 AM 最为常见,又称鸡慢性呼吸道病(CRD),其病原学、流行病学、临床症状及病理变化参见附录 A。

5 实验室诊断

5.1 MG 的分离培养

5.1.1 材料准备

5.1.1.1 检验设备、器材:生物显微镜、入射式荧光显微镜、二氧化碳培养箱、灭菌棉拭子、载玻片、pH 精密试纸。

5.1.1.2 试剂:MG 液体培养基、MG 固体培养基、磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH7.2 PBS)(见附录 B)。

5.1.2 病料的采取和保存

病料从活禽及新鲜的死禽中采集,对于活禽,可从鼻腔、口咽部、眼部、食管、气管、泄殖腔和交合器中取样。死禽从鼻腔、眶下窦、气管或气囊采样,也可吸取眶下窦和关节渗出物或结膜囊内冲洗物。鸡胚从卵黄囊内表面、口咽和气囊采样。小块组织置于 MG 液体培养基中,拭子在培养基中用力搅拌数次,样品尽快培养。所有实验操作应符合中 GB 19489 实验室生物安全通用要求的规定。

5.1.3 分离培养

5.1.3.1 将样品 0.2 mL 接种于 1.8 mL LMG 液体培养基中,依次 10 倍稀释至 10^{-3} ,密封,37 °C 培养。同时将样品接种于 MG 固体培养基中,置于含 5%~10% 二氧化碳培养箱中培养。

5.1.3.2 每天检查液体培养基酸碱度,一旦发现 pH 值变化,立即接种于 MG 固体培养基中培养。若培养基酸碱度没有变化,每隔 3 d~5 d 盲传一代,共传 3 代,培养 10 d 后接种于 MG 固体培养基上培养。

5.1.3.3 MG 固体培养基上若有菌落生长,用低倍显微镜观察,可见中央突起呈荷包蛋样典型菌落(参见附录 C.1),可初步判断为 MG,菌落形态不典型时,需进一步作血清学、分子生物学鉴定。

5.1.4 纯化

将液体培养物稀释至 10^{-4} ~ 10^{-5} ,然后接种 MG 固体培养基,待典型菌落长成时,挑取单个菌落接种 MG 液体培养基,重复三次培养纯化支原体株。

5.1.5 生化特征

MG 和 MS 可发酵葡萄糖,但不能水解精氨酸。

5.2 病原鉴定

5.2.1 间接免疫荧光抗体试验

5.2.1.1 取 1.0 cm~1.5 cm 的琼脂块,菌落面朝上置于载玻片上,第一块载玻片上放一块待检分离物、一块已知 MG 菌落(S6 或 R 株)、一块已知其他支原体菌落,第二块载玻片上放一块待检分离物。

5.2.1.2 第一块载玻片上每块琼脂块上加一滴适当稀释的兔抗 MG 血清,第二块载玻片上琼脂块上加一滴正常兔血清。

5.2.1.3 琼脂块在湿盒中室温条件下反应 30 min 后,分别放到含有 pH7.2 PBS 磷酸盐缓冲液的不同器皿中,冲洗 10 min,冲洗 2 次。

5.2.1.4 将琼脂块放回原玻片上,吸水纸吸取过多的水分,每块琼脂加上稀释好的兔抗荧光抗体结合物,反应、洗涤同 5.2.1.3,最后将琼脂块放回玻片上吸干多余水分后于入射式荧光显微镜下检查结果。

5.2.1.5 结果判定:菌落呈现强阳性荧光时为阳性反应,若仅有暗淡的菌落轮廓,与背景荧光颜色差别不大为阴性。当其他已知支原体菌落和第二块载玻片分离物为阴性反应,已知 MG 菌落为阳性结果时,试验成立。若第一块载玻片分离物呈阳性反应证明该分离物为鸡败血支原体。

5.2.2 PCR 鉴定

5.2.2.1 材料准备

5.2.2.1.1 仪器设备

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、高速冷冻离心机、水浴锅、移液器、核酸蛋白分析仪。

5.2.2.1.2 试剂材料

除另有规定外,所有实验使用的试剂等级应为不含 DNA 和 DNase 的分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 一级水的规格,去离子水电阻应达到 $18.2 \text{ M}\Omega$ 。

5.2.2.1.2.1 PCR 试剂:10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、dNTP 溶液(2.5 mmol/L)、Taq 酶(5 U/ μL)、双蒸水、琼脂糖、溴化乙锭、TBE 缓冲液、上样缓冲液、相对分子质量 Marker(DL-2000⁺⁺)。

5.2.2.1.2.2 MG 扩增引物：

上游引物(MG-F): 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

下游引物(MG-R): 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

MS 扩增引物：

上游引物(MS-F): 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

下游引物(MS-R): 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

5.2.2.2 样品 DNA 的提取

将样品直接 10 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取沉淀以 PBS 洗涤数次, 于沸水中裂解 10 min, 再 10 000 r/min 4 °C 离心 10 min。

5.2.2.3 PCR 扩增

检测过程应同时做阳性和阴性及空白对照。

PCR 反应体系：

10×PCR 缓冲液	5.0 μL
dNTP(10 mmol/L)	1.0 μL
MgCl ₂ (50 mmol/L)	2.0 μL
上游引物(20 pmol/μL)	0.5 μL
下游引物(20 pmol/μL)	0.5 μL
Taq 酶(5 U/μL)	0.25 μL

模板 DNA 5.0 μL

加超纯水至 50 μL

PCR 扩增参数：95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

5.2.2.4 PCR 扩增产物电泳检测

用 TBE 缓冲液制备 1.5% 琼脂糖凝胶, 加入 EB 至终浓度为 0.5 μg/mL(也可在电泳后进行染色)。取 5 μL PCR 扩增产物与 2 μL 上样缓冲液混合后加入点样孔进行电泳, 电压 5 V/cm~9 V/cm, 20 min~30 min。用凝胶成像仪观察分析电泳结果。

5.2.2.5 结果判定

当 MG 阳性对照扩增出 186 bp, MS 阳性对照扩增出 211 bp, 阴性空白对照孔未见有 PCR 扩增条带, 表明试验成立, 否则应重做。

样品用 MG 扩增引物扩增如发现有 186 bp 大小的条带, 则判定检样中含有 MG, 用 MS 扩增引物扩增发现有 211 bp 大小的扩增条带, 则判定检样中含有 MS, 否则判为阴性; 对该扩增产物作进一步的酶切鉴定或测序鉴定进行确认。

5.2.2.6 产物鉴定

PCR 扩增若产生约 186 bp 或 211 bp 的基因片段, 可利用胶回收试剂盒回收扩增产物, 并采用 *Ava*I 限制性内切酶进行酶切或直接进行测序, MG 扩增片段酶切产物大小分别为 110 bp 和 76 bp, MS 扩增片段酶切产物大小分别为 124 bp 和 77 bp, 扩增片段核酸序列参见 C.2。

5.3 血清学诊断

5.3.1 快速血清凝集试验

- 5.3.1.1 从鸡群采集的血清样品,4℃保存,于72 h内在室温下进行试验。
- 5.3.1.2 在干燥洁净的白瓷反应板或载玻片上滴加一滴(20 μL)待检血清,再滴加等量的染色抗原在待检血清上,转动反应板使血清与抗原混合均匀。鸡血清或火鸡血清在2 min内出现凝集。
- 5.3.1.3 设立阳性血清和阴性血清作对照试验。
- 5.3.1.4 结果判定:当待检血清在2 min内发生凝集反应的则判为阳性,阴性、阳性结果参见C.3。

5.3.2 免疫胶体金检测方法

5.3.2.1 样品制备:鸡血清样品的制备,取5 μL待检血清于酶标板孔内,用8%生理盐水稀释至100 μL;或者将血清样品用8%生理盐水稀释20倍后,取100 μL置于酶标板孔内。

5.3.2.2 操作方法:取出试剂盒,室温平衡20 min,打开包装袋,取出试纸条,将试纸条的样品垫端浸入制备好的样品中,10 min内判定结果。

5.3.2.3 结果判定:

当阳性对照血清试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线和检测线,阴性对照血清试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线而没有出现肉眼可见的紫红色检测线,表明试验成立;否则,应重新试验,如仍不产生质控线,表明试纸条失效,应废弃。

试样试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线,同时也出现肉眼可见的紫红色检测线,结果判定为阳性,记为“+”;反之,如试纸条只出现质控线,而没有出现检测线,则结果判定为阴性,记为“-”;检测线颜色越深说明被检血清抗体水平越高。

5.3.3 血凝抑制试验

5.3.3.1 血凝试验

- 5.3.3.1.1 于90°V型微量血凝板的每孔中滴加PBS稀释液各50 μL,共加四排。
- 5.3.3.1.2 吸取MG抗原滴加于第一列孔,每孔50 μL,然后由左至右顺序倍比稀释至第11列孔,再从第11列孔各吸取50 μL弃之。最后一列不加抗原作对照。
- 5.3.3.1.3 于上述各孔中加入0.5%红细胞悬液50 μL。
- 5.3.3.1.4 置微型振荡器上振荡1 min,或手持血凝板绕圆圈混匀。
- 5.3.3.1.5 放室温下(18℃~25℃)50 min,根据血凝图像判定结果。以出现完全凝集的抗原最大稀释度为该抗原的血凝滴度。每次四排重复,以几何均值表示结果。
- 5.3.3.1.6 抗原稀释倍数的确定:根据最终血凝滴度,则含4个HA单位的即为抗原稀释倍数。

5.3.3.2 血凝抑制试验

- 5.3.3.2.1 每一被检血清需要一列八孔,向微量血凝板每列第1孔中加入50 μL PBS。
- 5.3.3.2.2 向每一列第2孔加入50 μL 8个HA单位的抗原,向每一列第3孔至第8孔各加入50 μL 4个HA单位的抗原。
- 5.3.3.2.3 取50 μL已经制备好的1:5稀释的被检血清加入到第1孔中,混匀后吸50 μL到第2孔,依次倍比稀释至第8孔,从最后一孔中移取50 μL弃去。第1孔为血清对照孔。
- 5.3.3.2.4 每次测定都应使用标准阳性血清和阴性血清作对照,操作方法同5.3.3.2.3。
- 5.3.3.2.5 抗原对照需要做六孔,向第二孔至第六孔各加入50 μL PBS,向第一孔和第二孔中各加入50 μL 8个HA单位的抗原,混匀,取第二孔中的内容物50 μL转移到第三孔,依次稀释至第六孔,从最

后一孔中移取 50 μL 弃去。

5.3.3.2.6 红细胞对照需做两孔平行,向每一孔中加入 50 μL PBS。

5.3.3.2.7 向上述每一孔中加入 50 μL 0.5% 红细胞悬液(鸡血清用鸡 RBCs, 火鸡血清用火鸡 RBCs),振荡混合后,室温下静置约 50 min,判定结果,或者当抗原滴度为 4 个 HA 单位时进行判读。

5.3.3.2.8 判读结果时,应将血凝板倾斜,只有那些孔与红细胞对照孔中的 RBCs 以相同的速率流动的,才被认为是血凝被完全抑制。此时,血清对照孔应显示出清晰的 RBCs 机状物,而其他对照孔都出现预期的反应。

5.3.4 ELISA 试验

由于市售的禽支原体病 ELISA 诊断试剂盒制备工艺及质控方法不尽相同,从而操作方法也会不同,实际检测操作应依照产品说明书进行。

6 综合判定

6.1 初步诊断

对 MG 感染的初步判定可依靠流行病学、宿主临床症状及病理剖检结果。

6.2 确诊

对 MG 感染的最终确诊依赖于病原分离培养、生化鉴定及病原学或血清学鉴定,病原学鉴定包括间接免疫荧光法或 PCR 鉴定,血清学鉴定包括快速血清凝集试验、血凝抑制试验或 ELISA 试验。

附录 A
(资料性附录)
疫病概述

A.1 病原

MG 是一种原核生物,属于柔膜体纲,支原体科,支原体属。其外围仅有柔软的胞浆膜,而无细胞壁。常见形态有:球形、椭圆形、丝状和棒状等不规则形态。MG 的液体培养物革兰氏染色呈弱阴性,但从核苷酸序列来看,其 tRNA 与革兰氏阳性细菌比较接近,而与阴性细菌有较大差异。光学显微镜下菌体通常呈球形,直径 $0.25 \mu\text{m} \sim 0.5 \mu\text{m}$;电镜下, MG 细胞呈丝状或烧瓶样形态,此时具有的特殊顶端结构。

MG 的核糖体与其他原核生物的核糖体相似,沉降系数为 70S,其 RNA:蛋白质 $\approx 60:40$ 。 MG 的培养要求条件苛刻,目前最常用的是修改的 FM-4 培养基,固体培养基即是在液体培养基的基础上加入 1.2% 的优良琼脂(如 Difco NOBLE AGAR),通常培养基的 pH 值为 7.6~7.8,培养温度为 37 °C ~ 38 °C,在固体培养基中培养 3 d ~ 7 d,在 40× 显微镜下可观察到特征性菌落,具体表现为中心生长点颜色较暗,周围是较亮的周边生长区,呈现典型的“油煎蛋”状, MG 菌落的中心生长点大小占整个菌落的比例较小,而有些种的霉形体中心生长点较大,这可能与种特异性有一定的关系。

MG 的基因组呈双链环状 DNA(dsC-DNA),基因组大小约为 $5 \times 10^8 \text{ bp}$;其复制形式是半保留复制,DNA 在细胞生长期不断的合成,在细胞分裂时合成停止。 MG 的模式株为 PG31。

MG 能发酵葡萄糖,产酸不产气,不发酵乳糖、卫茅醇或水杨甙,不水解精氨酸,可还原四氮唑(变红)和四唑蓝(变蓝),对毛地黄皂甙敏感。 MG 对理化因素的抵抗力不强,对紫外线敏感,阳光直射便迅速丧失活力,50 °C 作用 20 min 即可将其灭活;一般常用的化学消毒剂均能迅速将其杀死;液体培养物在 4 °C 保存不超过 1 个月,在 -30 °C 中可保存 1 年 ~ 2 年,在 -60 °C 中可生存 10 多年。

A.2 流行病学

A.2.1 CRD 是禽类感染 MG 而导致的一种慢性呼吸道疾病,在自然流行中只发生于鸡和火鸡,各种年龄、品种、性别的鸡和火鸡皆可发病,但以 3~8 周龄的鸡最为易感,特别是在呼吸道病多发的冬春季节多发。

A.2.2 本病广泛分布于世界上所有养禽的国家,而且可通过垂直和水平两种方式传播。该病传播迅速,一旦该病进入鸡场,则在鸡场中长期蔓延,广泛分布在环境中而很难清除。由于许多大型的养殖场饲养不同日龄的商品鸡,所以出现一定的地方流行性,小型庭院鸡呈现亚临床感染,成为商品鸡的传染来源。

A.2.3 本病的流行病学特征主要有以下几点;MG 只有一种抗原类型;毒力具有变异性;亲嗜性;病原离开宿主暴露到野外环境,仅能存活几天时间;MG 抵抗力较弱,一般的消毒剂即能将其杀灭,但近来出现对某些抗生素的耐药株;带菌时间较长,可超过 10 个月,个别禽只可能终身带菌。

A.2.4 MG 单独感染时,症状轻微,与新城疫病毒、传染性支气管炎病毒协同感染时,病情加重;但对于有些病原则起到抑制作用,如可减缓马立克氏病的临床症状等,并且感染过 MS 的禽只可以降低 MG 感染的严重程度。

A.3 临床症状

A.3.1 潜伏期1周~3周不等,单独感染后一般不出现明显的临床症状,或仅有轻微的前驱症状,但一旦与其他病原协同感染或有其他致病因子存在时,即可表现出典型的呼吸道症状,损伤程度也会加剧,病程延长。

A.3.2 自然感染中最常见的临床症状是呼吸道症状,包括咳嗽、鼻炎、打喷嚏、呼吸啰音以及张口呼吸等。鼻炎症状火鸡比鸡更为严重,并伴有一侧或双侧眶下窦肿胀,形成窦炎。严重时眼睑闭合,在火鸡,鼻分泌物更多,羽毛污染,经常摆头,企图甩掉鼻腔内分泌物,鸡和火鸡出现轻度结膜炎,眼中伴有泡沫状分泌物,可成为病情恶化的前驱症状。火鸡出现运动失调,表明脑部受损,鸡的跗关节肿胀,跛行。

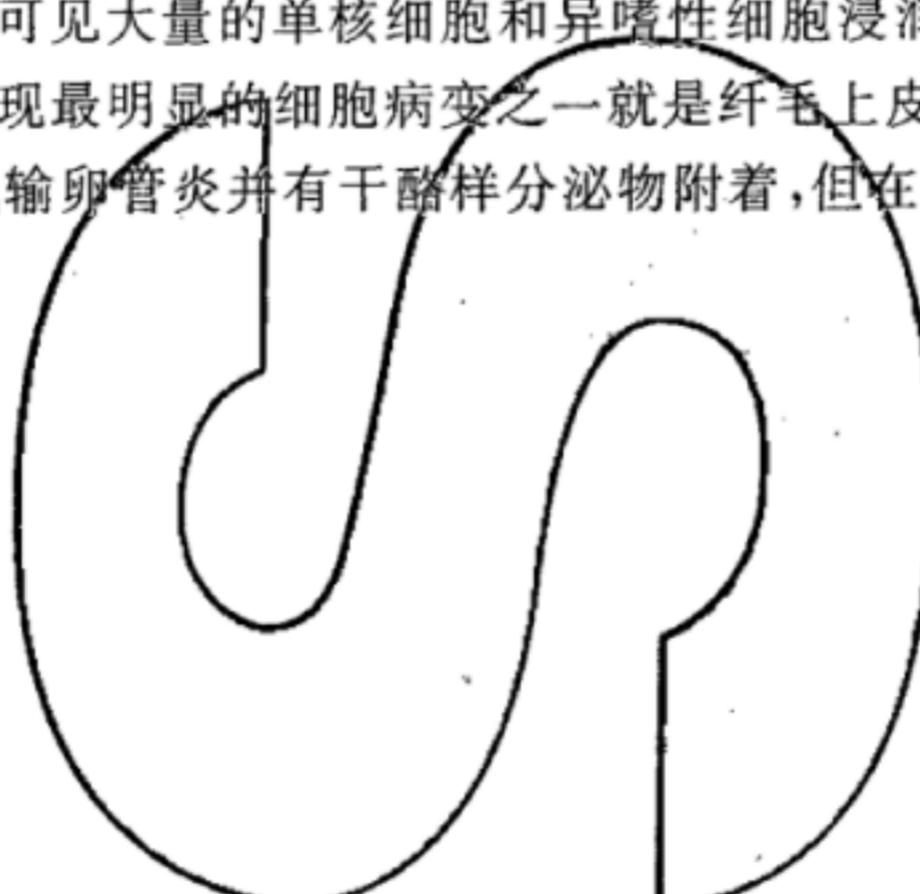
A.3.3 非特异性症状还有产蛋率和生长率降低,此现象在复合感染中更明显。

A.4 病理变化

A.4.1 CRD最常见的病理变化是呼吸道,其次是输卵管,再其次是跗关节。感染发生时,表现为轻度鼻炎和眼窝眶下窦炎,粘膜肥厚和粘液滞留,炎症进一步发展则波及气管、肺和气囊;在鼻腔和眶下窦中有黄白色奶油样或干酪样渗出物,粘膜潮红肿胀,粘液增多;气囊肥厚,有黄白色纤维素样渗出物附着;肺内有时可见灰白色或淡红色细小实变病灶。

A.4.2 呼吸道的组织学损伤表现为鼻腔、气管与支气管粘膜上皮细胞纤毛缺损、上皮细胞坏死脱落,固有膜充血水肿、腺体增生,在气管中呈索状扩散到整个粘膜层;并见淋巴组织反应性增生,淋巴小结生发中心扩大;肺内病变显微镜下可见大量的单核细胞和异嗜性细胞浸润。用扫描电镜观察雏鸡感染鸡毒霉形体后气管粘膜的病变,发现最明显的细胞病变之一就是纤毛上皮退行性脱落。

A.4.3 实验性地感染鸡可造成输卵管炎并有干酪样分泌物附着,但在野外感染并不多见。



附录 B
(规范性附录)
试剂的配制

B. 1 MG 液体培养基

PPLO 肉汤	700 mL
猪血清(灭活)	150 mL
25%酵母浸出液	100 mL
10%葡萄糖	10 mL
5%醋酸铵	10 mL
青霉素 G	100 万 IU
0.1%酚红	20 mL

PPLO 肉汤于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 4 °C 保存备用, 其他成分用前过滤除菌, 用前调 pH 至 7.6~7.8。

B. 2 MG 固体培养基

向 PPLO 肉汤(灭菌前)中加入 1.2% 的琼脂, 其他成分同 MG 液体培养基, 用前调 pH 值至 7.6~7.8。

B. 3 PBS(0.01 mol/L, pH7.2)缓冲液

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	0.56 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.14 g
氯化钠(NaCl)	8.5 g
去离子水	加至 1 000 mL
100 kPa~110 kPa(121 °C)高压灭菌 15 min 后备用。	

B. 4 TBE 缓冲液

称取 Tris 10.8 g, 硼酸 5.5 g, 并加入 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)4 mL, 定溶至 1 000 mL。

B. 5 0.5%红细胞悬液

采成年鸡(或火鸡)血, 用 20 倍量磷酸缓冲盐水洗涤 3~4 次, 每次以 2 000 r/min 离心 3 min~4 min, 最后一次 5 min, 用磷酸缓冲盐水配成 0.5% 悬液。

附录 C
(资料性附录)
参考判定依据

C. 1 禽败血支原体菌落形态

见图 C. 1。

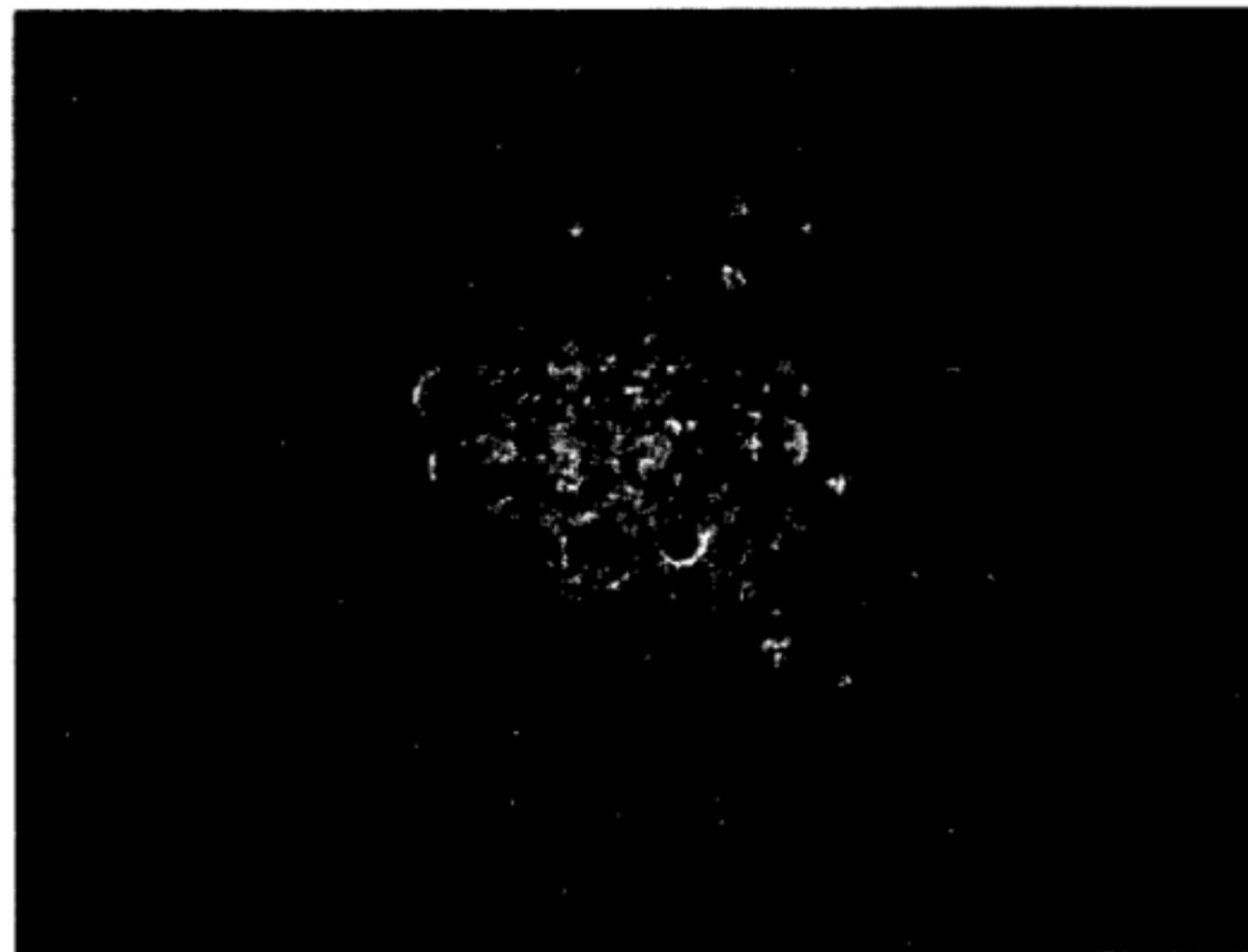


图 C. 1 菌落形态

C. 2 PCR 产物测序结果

C. 2. 1 MG 扩增产物序列

GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTCTCAGTCGGATTGAGGGCTGCAATTGCCCTCATGAA
GTCGGAATCACTAGTAATCGCGAACATCAGCCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTT
GTACACACCGCCCCGTCAAACATATGAGAGCTGGTAATATCTAAAACCGTGGCTAACCG
CAAGGAAGC

C. 2. 2 MS 扩增产物序列

CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAAACCGACTTCGGGCATTACCAGCTCCCATGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGACCCGAGAACGTATTCACCGTAGCGTAGCTGATCTACGATTACTAG
CGATTCCGACTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAC TGAGAACGATTTTG
AGATTGCTTGATATCACTATTTGCTTCTC

C. 3 快速血清凝集试验阴性、阳性结果

见图 C. 2。

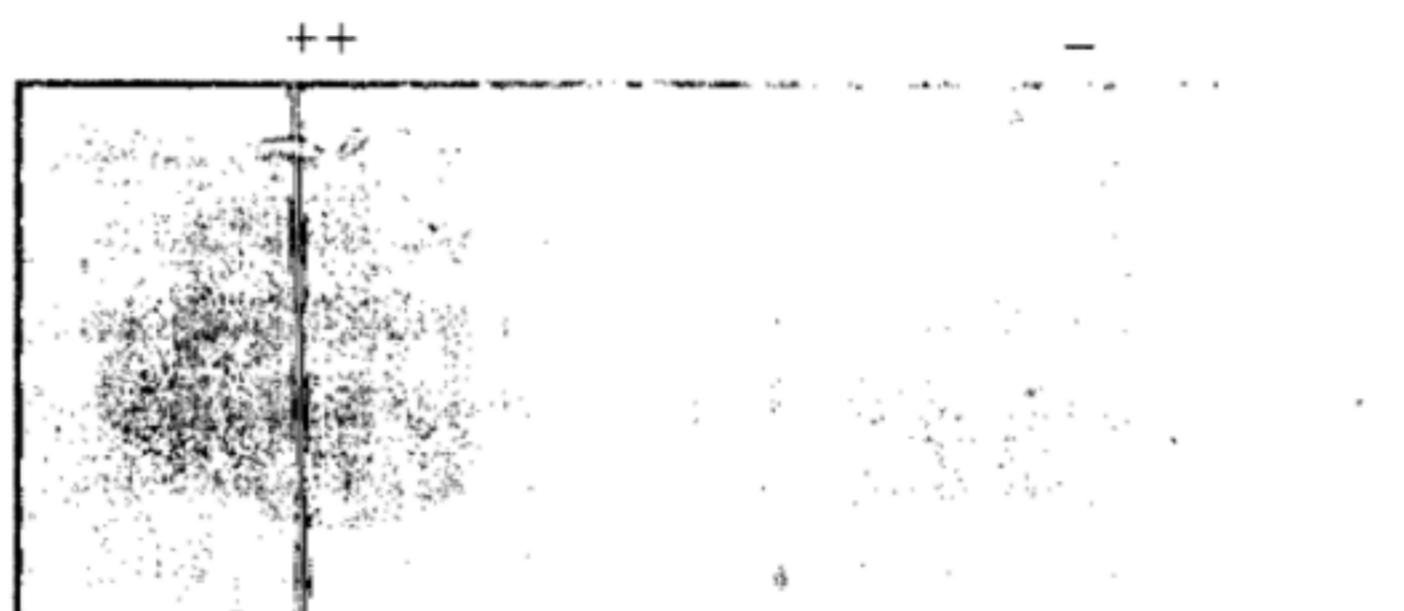


图 C.2 血清凝集试验结果

C.4 胶体金快速检测结果判定

见图 C.3。

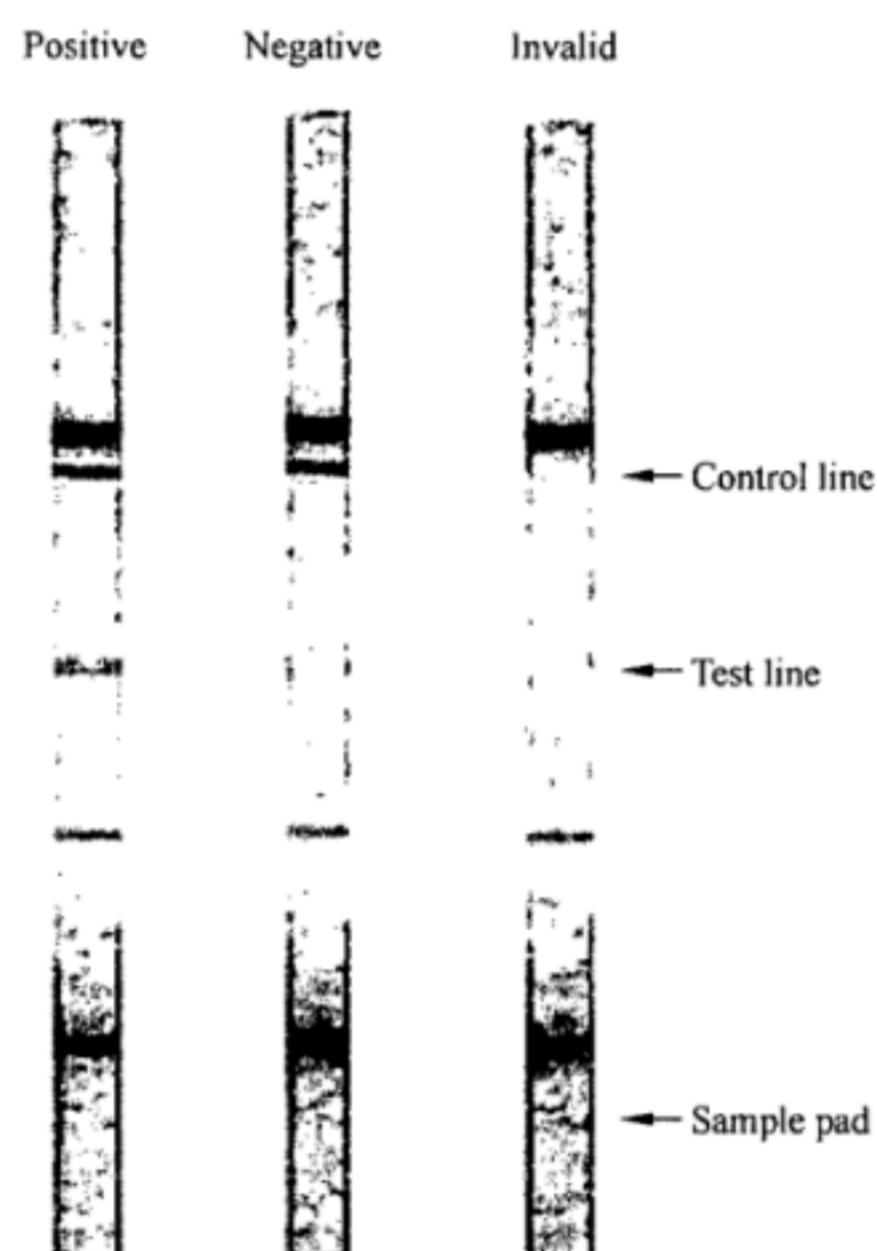


图 C.3 鸡败血支原体免疫胶体金快速检测试纸条结果判定标准

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
禽支原体病检疫技术规范

SN/T 1224—2012

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

总编室:(010)64275323

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2013年7月第一版 2013年7月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066 · 2-25322 定价 18.00 元



SN/T 1224-2012