

# DB13

## 河北省地方标准

DB 13/T 5374—2021

---

### 禽烟曲霉菌病综合诊断技术规程

2021 - 04 - 26 发布

2021 - 05 - 26 实施

---

河北省市场监督管理局 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：标准化文件的结构与起草规则》的规定起草。

本文件由河北工程大学提出。

本文件起草单位：河北工程大学。

本文件主要起草人：刘建钊、柳焕章、刘会恰、张鹤平、刘利强、刘艳莉、张良、崔国林、刘彦威、刘娜、李想、李晶晶、娄路平、李夫宏。



# 禽烟曲霉菌病综合诊断技术规程

## 1 范围

本文件规定了禽烟曲霉菌病综合诊断技术的临床诊断、实验室诊断和综合判定。  
本文件适用于鸡、鸭、鹅、鸽子、鹌鹑等禽类烟曲霉菌病的诊断及其烟曲霉菌病原的检测。

## 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。

GB 19489-2008 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。

GMA-Grocott：六胺银染色；

PCR：聚合酶链式反应；

PDA：马铃薯葡萄糖琼脂培养基；

PAS：过碘酸雪夫氏染色；

SYBR Green I：DNA荧光染料；

TTC：红四氮唑显色培养基；

TSA：胰蛋白胨大豆琼脂培养基；

YEPD：酵母浸出粉胨葡萄糖培养基。

## 4 临床诊断

当禽出现以下部分或全部情形时，可作为初步诊断的依据。

### 4.1 临床症状

各日龄禽均可感染，雏禽易感。病禽眼神呆滞、眯眼、呼吸困难等症状。

### 4.2 剖检病变

肺脏发生不同程度坏死、气囊增厚、出现黄色菌斑并偶而伴有肝脏出血斑或颜色暗红。

## 5 实验室诊断

包括常规检测和定量PCR检测技术。参照GB 19489-2008实验室生物安全通用要求的相关条款。

## 5.1 常规检测

### 5.1.1 样品的采集

取病禽肺、肝脏、肾等病料，放入无菌的平皿中；其他器官用无菌剪刀各取小块组织两份，用灭菌水充分冲洗后，一份接种于YEPD平板上（1% 酵母膏，2% 蛋白胨，2%葡萄糖，2%琼脂粉），一份放入40 g/L甲醛固定液中待用。

### 5.1.2 病原菌的分离纯化与形态观察

将接种病料的平板放入培养箱，28℃恒温培养，每天观察菌落生长情况；3 d后用接种环挑取平板上的疑似菌落，划线接种于YEPD平板培养基继续分离培养，3 d后将疑似单菌落进行涂片、染色和镜检，取疑似菌落菌体进一步接种于PDA试管斜面，28℃培养3 d后保存备用。

对照烟曲霉菌典型菌落形态和菌体形态特征进行初步鉴别（参见附录A）。

### 5.1.3 组织切片检查

将40 g/L甲醛固定液中样本固定24 h后取出，经修块、脱水、透明、浸蜡包埋、切片、HE染色、PAS、GMA和CFW染色，显微镜观察组织病理和病原生长情况（参见附录A）。

以病料中检查到菌丝或孢子为阳性结果，病料中连续两次检查不到菌丝和孢子为阴性。

### 5.1.4 不同染色方法检查

分离株（经形态学和分子生物学鉴定），进行鸡体攻毒试验。并对HE、PAS、GMS、CFW四种染色方法进行了组织学对比观察（参见附录A）。

### 5.1.5 CSP 基因分型

分离株（经形态学和分子生物学鉴定），进行CSP基因分型，已确定感染烟曲霉菌的基因型（参见附录A）。

## 5.2 定量 PCR 检测

### 5.2.1 样品采集

选择有典型症状的病禽，无菌采血或病变组织（肺），放入1.5 mL灭菌EP管中，将EP管编号，记录样本信息，-20℃保存备用。

### 5.2.2 基因组 DNA 提取

取组织样本0.2 g放在研钵中，加入适量液氮，待液氮即将挥发殆尽时迅速研磨成粉末状，收集样本0.05 g~0.1 g于1.5 mL EP管中，加入500 μL裂解液（400 mM Tris-HCl [pH 8.0]，60 mM EDTA [pH 8.0]，150 mM NaCl，1% sodium dodecyl sulfate），室温放置10 min；加150 μL乙酸钾（pH 4.8），漩涡震荡，离心12000 g，1 min，取上清液放入新试管，加入等体积异丙醇；DNA团块用70%乙醇清洗，干燥后，溶解在50 μL TE（10 mM Tris，1 mM EDTA）中保存。

### 5.2.3 引物合成

参照GenBank中烟曲霉benAfum基因间转录间隔区序列（AFUA\_1G10910），使用Primer Express 5.0软件设计特异性引物（预期扩增片段大小152bp）：

上游引物F：5'-TAA TAG CTA CAA TGG CTC CT-3'

下游引物R: 5'-ACG AGG AAC ATA TTT GTC A-3'

#### 5.2.4 定量 PCR 反应体系和反应程序

采用25  $\mu$  L的反应体系: SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 12.5  $\mu$  L, 上、下游引物各0.5  $\mu$  L, DNA模板1.0  $\mu$  L, 用双蒸水补足至25  $\mu$  L。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C预变性3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 进行35个循环, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min, 于4  $^{\circ}$ C终止反应。

#### 5.2.5 标准曲线和熔解曲线

从烟曲霉菌 $10^6$ - $10^0$  copies/ $\mu$ L一系列模板特异性克隆的SYBR Green I qPCR反应荧光曲线可见, 在 $10^6$ - $10^1$ copies/ $\mu$ L浓度范围内荧光曲线呈“S”形。以线性范围内6个浓度 ( $10^6$ - $10^1$ copies/ $\mu$ L) 的特异性克隆为模板在同样条件下进行SYBR Green qPCR反应, 得到标准曲线和熔解曲线。

#### 5.2.6 结果判断

当待测样品实时荧光定量PCR检测结果有“S”型扩增曲线, Ct值 $\leq$ 36.5, 且 $T_m$ 值为85  $^{\circ}$ C时, 判定待测样品中含有烟曲霉菌, 而且可通过Ct值大小判断感染的程度 (参见附录A)。未出现“S”型扩增曲线和 $T_m$ 值, 则判断样品中不含烟曲霉菌。

### 6 综合判定

结合临床诊断、实验室检测结果, 可确诊禽烟曲霉菌病。

## 附录 A

(资料性)

### 菌落形态和菌丝及孢子形态特征

#### A.1 镜检

将每个取样 EP管封盖，瞬时振荡，用无菌棉签沾取悬液于YEPD庆大霉素培养基平板涂划接种，于28℃恒温培养36 h~48 h；将疑似单菌落取菌体经革兰氏染色和棉蓝染色镜检，将霉菌样细胞的相应菌落取菌体分别接种于沙保弱培养基平板，于28℃恒温、保湿培养3 d~4 d，观察平板菌落特征并直接镜检载片培养物形态特征。

#### A.2 判断

沙保弱培养基平板上可见中央为蓝绿色，周围为白色的菌落，但蓝绿色占比多于周围白色面积，菌落背面，周边为黄绿色，中央为蓝绿色。第四天菌落正面分为三种颜色，由内向外分别为墨绿、蓝绿、白色，而菌落周边仍为白色。显微镜下观察发现菌丝呈棉花样，分生孢子头的顶囊为倒立烧瓶状。孢子梗为单层小梗，小梗排列成木栅状，小梗覆盖顶囊表面的3/4。小梗的顶端分散着链状的分生孢子，分生孢子呈球形，成绿色或深绿色。

#### A.3 不同染色方法检查

HE染色：血管充血，呼吸毛细管消失，肺房间隔增宽甚至消失，被结缔组织所取代，并有炎性细胞浸润。严重者，可看到孢子染成红色，菌丝染成蓝紫色，周围组成为红色，反差明显；PAS染色：组织结构不清楚，菌丝染成紫色，孢子染成红色，而背景为蓝紫色，真菌与周围组织反差明显。菌丝短而细，且分支分隔，呈红紫色，孢子为圆形，红粉色。GMS染色：菌丝被染成黑褐色，背景为红褐色，反差明显易辨认。菌丝分布与PAS染色相同；CFW染色，孢子和菌丝被染成亮蓝色，背景组织结构染成墨绿色菌丝形态结构清晰。

#### A.4 CSP基因分型

CSP基因分型：对烟曲霉细胞表面蛋白（cell surface protein CSP）编码基因进行扩增测序，通过分析其基因编码的串联重复序列和点突变的多样性进行生物学分型。