ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 553—2002

禽支原体病诊断技术

Diagnostic techniques for avian mycoplasmosis
(mycoplasma gallisepticum)

2002-08-27 发布　　2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前　言

禽支原体病(avian mycoplasmosis)又称鸡败血支原体(mycoplasm gallisepticum,简称 MG),常引起鸡的慢性呼吸道疾病。MG 也可感染火鸡,引起传染性窦炎。世界动物卫生组织[world Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]将本病例 B 类动物疫病,我国将其列为二类疫病。

本标准规定的方法与 OIE《诊断试验与疫苗标准手册》推荐相应方法一致。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所。

本标准起草人:郭福生、尹燕博、蒋正军、孙淑芳、陆明哲、龚振华。

禽支原体病诊断技术

1 范围

本标准规定了禽支原体(MG)分离鉴定和快速血清凝集试验(RSA)的技术要求。

本标准适用于鸡和火鸡及其产品 MG 的检测。

2 禽支原体的分离和鉴定

2.1 材料准备

2.1.1 培养基制备见附录 A(规范性附录)。

2.1.2 兔抗 MG 阳性血清和抗兔荧光抗体结合物。

2.2 分离

2.2.1 采样

活禽从鼻腔、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。对于鸡胚从卵黄囊内表面、口咽和气囊采样。

2.2.2 样品的处理

采样后应尽快培养。如须运输,小块组织置于支原体培养基中,拭子在培养基中用力搅拌数次,将培养基运回实验室尽快培养。

2.2.3 接种

将样品 0.2 mL 接种于 1.8 mL 支原体液体培养基中,依次 10 倍稀释至 10^{-3},密封,37℃培养。同时将样品接种于支原体固体培养基中,置于含 5%～10%二氧化碳(CO_2)培养箱中培养。

2.2.3.1 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 后接种于固体培养基上培养。

2.2.3.2 固体培养基上若有菌落生长,用低倍显微镜观察菌落,可见中央突起呈荷包蛋样(有时不典型),需进一步作血清学鉴定。

2.3 鉴定

2.3.1 用间接荧光抗体试验(IFA)鉴定 MG。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(S_6 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。

2.3.2 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。

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

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

2.4 结果判定

菌落呈现亮绿色荧光时为阳性反应,若仅有暗淡的菌落轮廓,与背景荧光颜色差别不大为阴性。其他已知支原体菌落、第二块载玻片分离物为阴性;第一块载玻片分离物、与已知 MG 菌落为阳性结果时,证明分离物为鸡毒支原体。

3 快速血清凝集试验(RSA)

3.1 从鸡群采集的血清样品,如不能立即进行试验,应4℃保存,不能冻结。

3.2 试验用染色抗原、阳性及阴性对照血清。

3.3 操作方法:室温中加一滴(20 μL)血清于白瓷板或玻板上,再加等量染色抗原,用棉签或火柴棒将其混合,轻轻摇动玻板使之混合均匀。试验设阳性血清及阴性血清对照。

3.4 结果判定:室温条件下,56℃30 min处理后的鸡血清2 min内,火鸡血清3 min内判定结果。规定时间内,发生完全凝集的,判为阳性。如仅在液滴边缘部分出现凝集,或超过2 min(火鸡3 min)在边缘出现凝集,判为可疑。超过规定时间无凝集者,判为阴性。

附 录 A
（规范性附录）
支原体培养基的制备

A.1 支原体肉汤培养基

A.1.1 新鲜酵母浸出液的制备：称取 250 g 具有活性的鲜酵母，悬浮于 1 000 mL 蒸馏水中，加热至沸点，冷却。3 000 r/min 离心 20 min，倾出上清液，用 0.1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 7.8～8.0。过滤除菌，置 4℃保存备用。

A.1.2 甲液：不含结晶紫的支原体(PPLO)肉汤培养基(Difco)14.7 g，加蒸馏水或去离子水 700 mL。

A.1.3 乙液：猪血清(56℃灭活 30 min)150 mL，质量浓度为 25%新鲜酵母浸出液 100 mL，质量浓度为 10%葡萄糖溶液 10 mL，质量浓度为 5%乙酸铊 10 mL，200 000 IU/mL 青霉素 G5 mL，质量浓度为 0.1%酚红 2 mL。将以上各种成品混合即乙液(也可用犊牛血清或马血清代替猪血清)。

将甲液经 121 kPa 灭菌 15 min，冷却后加入乙液调 pH 值至 7.8，即为支原体肉汤培养基。

A.2 支原体固体培养基

取不含支原体生长抑制物的纯琼脂 10 g，加入到上述甲液中，混合后如前所述高压灭菌，置 56℃水浴中。然后加入乙液，小心混匀，避免产生气泡，然后倒入平皿中厚度约 0.4 cm，冷却后备用。