

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

鸽毛滴虫病诊断技术规范

Technical Specifications for Diagnosis of Trichomoniasis in Pigeon

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
征求意见稿

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	1
5.1 病原学	1
5.2 流行病学	1
5.3 临床症状	2
5.4 病理变化	2
5.5 结果判定	2
6 样品采集、保存与运输	2
6.1 样品采集	2
6.2 样品贮运	2
7 鸽毛滴虫形态学判断	2
7.1 压滴样本检查法	2
7.2 结果判定	2
8 鸽毛滴虫 PCR 检测	3
8.1 样品处理	3
8.2 DNA 提取	3
8.3 PCR 扩增	3
8.4 PCR 产物检测	3
8.5 结果判定	3
9 鸽毛滴虫荧光定量 PCR 检测	3
9.1 样品处理	3
9.2 DNA 提取	3
9.3 荧光定量 PCR 扩增	3
9.4 结果判定	4
10 综合判定	4
附 录 A (资料性) 溶液配制	1
A.1 TF 培养液	1
A.2 TF 完全培养液	1
附 录 B (资料性) 鸽毛滴虫电镜形态	2

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。

本文件由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提出。

本文件由中国兽医协会归口归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
征求意见稿

鸽毛滴虫病诊断技术规范

1 范围

本标准规定了鸽毛滴虫病的流行病学、临床症状、剖检变化等临床诊断，以及形态学、PCR、荧光定量PCR等实验室诊断的技术要求和操作规范。

本标准适用于鸽毛滴虫病的诊断。

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/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401-2008 实验室质量控制规范动物检疫

NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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。

T. gallinae: 鸽毛滴虫 (*Trichomonas gallinae*)

FBS: 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

Taq 酶: Taq DNA 聚合酶 (Taq DNA Polymerase)

5 临床诊断

5.1 病原学

鸽毛滴虫 (*Trichomonas gallinae*, *T. gallinae*) 又称鸽瘡，是真核生物中的一种微小的带鞭毛的单细胞寄生性原生动物，属原生动物门、鞭毛虫纲、动鞭毛亚纲、多鞭毛目、毛滴虫科、毛滴虫属。生活史仅有滋养体时期，一般寄生于消化道，以纵二分裂的方式进行无性繁殖。鸽毛滴虫呈梨形或纺锤形，大小为 (5~19 μm) × (4~9 μm)，鞭毛是主要的运动器官，可使其做快速螺旋式运动。

5.2 流行病学

鸽是毛滴虫的易感动物，任何品种、年龄及性别的鸽都能感染。一般成年鸽不表现出明显的临床症状，但幼鸽临床症状比较严重，死亡率较高。鸽子的口腔、咽喉、食道和嗉囊中经常有虫体的存在。接触传播是鸽毛滴虫病的主要传播方式，患病鸽和带虫鸽都是感染源，虫体通过污染的饮水、饲料、伤口及未愈合的脐带口等传播至易感鸽。成年鸽可通过互啄把虫子传染给同伴，乳鸽因吞食成年鸽嗉囊中的鸽乳被传染，并保持终身带虫。粘膜损伤、感染其他疾病、应激因素、饲养管理不良和免疫力下降等都可诱发鸽子感染毛滴虫。鸽毛滴虫病一年四季均可发生，梅雨季和高湿天气时更易发。鸽毛滴虫病在肉鸽养殖生产中较为常见，感染率为22%~74%，西欧、南欧、英国、加拿大、澳大利亚、西班牙、伊朗、伊拉克等均有鸽毛滴虫的相关报道。

5.3 临床症状

根据虫体感染部位，鸽毛滴虫病有咽型、泄殖腔型、脐型和内脏型4种表现类型。

5.3.1 咽型病例

咽型最为常见，也是危害最大的致病型。病鸽口中有青绿色的涎水流出，作伸颈吞咽姿势。肉眼可见浅黄色分泌物或黄豆大小干酪样物质沉积在鸽的咽喉部，导致病鸽采食、饮水和呼吸困难，通常病鸽会连续张口甩头，会从口腔中甩出浅红色黏膜块或黄色黏膜块。

5.3.2 泄殖腔型病例

泄殖腔型多发生在刚开产的青年母鸽或难产的母鸽的泄殖腔，临床表现为排泄困难，甚至粪便堆积于泄殖腔。粪便中有时带血和有恶臭味，肛门周围羽毛被玷污，翅下垂，缩颈呆立，尾羽拖地，呈企鹅状，最后身体消瘦衰竭死亡。

5.3.3 脐型病例

病鸽脐部皮下形成炎症，有时出现干酪样或溃疡性病变肿块，呈前轻后重姿势，行走困难，鸣声微弱，饮水采食困难，有的发育不良，病重的会导致死亡。

5.3.4 内脏型病例

病鸽体重下降，异常消瘦、精神沉郁，拉黄色带泡沫黏性水样稀便，食欲减退但饮水增加、随着病程发展，嗦囊和食管会出现白色小结节，内有干酪样物，嗦囊有积液。

5.4 病理变化

病死鸽嗦囊空虚，泄殖腔腔道狭窄，口腔、咽喉、食管的黏膜出现局灶性或弥漫性的易剥离的黄白色、疏松状干酪样物，干酪样物剥离后未见出血。剖检可见病死鸽的口腔和嗦囊黏膜表面附着黄色斑块或凸起的干酪样渗出物或坏死组织，嗦囊黏膜粗糙不平、坏死、溃疡。肝脏淤血、肿胀，散见小米粒至黄豆大的黄白色圆球形病灶，肝小叶出现局灶性坏死性肿胀。腹腔内可见黄色胶冻状渗出物。

5.5 结果判定

出现5.3、5.4中的情况，初步判定为鸽毛滴虫病临床疑似病例，需要进一步开展实验室诊断。

6 样品采集、保存与运输

6.1 样品采集

将棉拭子用生理盐水或TF完全培养基（配制方法见附录A）润湿，再深入病鸽口腔，在咽喉部来回擦拭2次~3次并旋转，取分泌物；将采样后的拭子放入含有1 mL TF完全培养基的采样管中，编号备用。

6.2 样品贮运

样品采集后，应立即镜检或置于无菌密闭容器内37℃ 24 h内送实验室检测。

7 鸽毛滴虫形态学判断

7.1 压滴样本检查法

将采集样品的采样管利用涡旋震荡器混匀后，取待检样品1滴置于载玻片上，盖上盖玻片，在100倍或以上倍率的显微镜下观察。

7.2 结果判定

在显微镜下观察鸽毛滴虫的形态特征：虫体呈梨形或纺锤形，长5~19 μm，宽4~9 μm，有4根前鞭毛和1根后鞭毛（附录B），呈活泼的蛇形运动或快速螺旋式运动。

观察到鸽毛滴虫即判为病原镜检阳性，未观察到鸽毛滴虫判为病原镜检阴性。

8 鸽毛滴虫 PCR 检测

8.1 样品处理

将装有棉拭子的离心管中的液体混匀，将拭子取出，3000 r/min 离心5 min，弃掉上清，用200 μ L 的无菌生理盐水重悬沉淀，备用。

8.2 DNA 提取

宜选用商品化的DNA提取试剂盒，也可采用其他等效的DNA提取方法。

8.3 PCR 扩增

根据鸽毛滴虫18S rDNA保守区域（GenBank: MH733821.1）设计引物序列（引物F：5'-TGCTTCAGCTCAGCGGGTCTTCC-3'；引物R：5'-CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG-3'），配置反应体系（2 \times Taq酶预混剂：10 μ l；引物F：0.5 μ mol/L 1 μ l；引物R：0.5 μ mol/L 1 μ l；DNA模板：2 μ l；ddH₂O补齐至20 μ l），以提取的阳性样品或鸽毛滴虫的DNA作为阳性对照，以加ddH₂O的样品作为阴性对照，反应管放入PCR检测仪内，记录反应管摆放顺序。

反应程序：

- a) 95 $^{\circ}$ C预变性3 min；
- b) 95 $^{\circ}$ C变性10 s；
- c) 56 $^{\circ}$ C退火15 s；
- d) 72 $^{\circ}$ C延伸25 s；
- e) 步骤b)到d)重复30次个循环；
- f) 72 $^{\circ}$ C终延伸5 min。

8.4 PCR 产物检测

反应结束后，用1.5%的琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳检测，110V恒压电泳30 min，在凝胶成像系统中观察结果，以DNA分子质量标准为参照判断条带大小。

8.5 结果判定

阳性对照PCR产物343 bp位置出现特异性条带，阴性对照没有出现此条带，实验有效。否则，此次实验视为无效。待检样品在343 bp位置出现DNA条带，判为阳性，否则为阴性。

9 鸽毛滴虫荧光定量 PCR 检测

9.1 样品处理

将装有棉拭子的离心管中的液体混匀，将拭子取出，3000 r/min 离心5 min，弃掉上清，用200 μ L 的无菌生理盐水重悬沉淀，备用。

9.2 DNA 提取

宜选用商品化的DNA提取试剂盒，也可采用其他等效的DNA提取方法。

9.3 荧光定量 PCR 扩增

根据鸽毛滴虫18S rDNA保守区域（GenBank: MH733821.1）设计引物序列（引物F：5'-GGTGGAGCCTGTGGCTTAAT-3'；引物R：5'-CCATGCACCACCAAAGCAA-3'），配制扩增反应液，设实时荧光 PCR 反应数为n，其中n为待检样品数+阳性管数+阴性管数，每个样本检测反应体系（SYBR 2 \times qPCR Master Mix：12 μ l；引物F：0.2 μ mol/L 0.2 μ l；引物R：0.2 μ mol/L 0.2 μ l；DNA模板：1 μ l；ddH₂O补齐至24 μ l），向每个荧光 PCR 管或孔中分装 24 μ L 的反应体系。

扩增反应条件为：

- a) 95℃ 预变性 3 min;
 - b) 95℃ 变性 15 s,
 - c) 55℃ 退火 60 s,
- 步骤 b) 到 c) 40 个循环。

荧光信号收集设置在每次循环的退火延伸时进行；在扩增反应结束后，分析熔解曲线。

9.4 结果判定

9.4.1 阈值设定

检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值直接读取检测结果，Ct 值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

9.4.2 质控标准

阴性对照无 Ct 值，且无典型扩增曲线；或阴性对照 Ct 值 > 38.0，出现扩增曲线，但熔解曲线于 88℃ 左右未出现明显的峰值。

阳性对照 Ct 值 ≤ 30.0，并出现典型的扩增曲线，熔解曲线于 88℃ 左右出现明显的峰值，否则，此次试验视为无效。

9.4.3 结果描述

阴性：无 Ct 值并且无典型的扩增曲线；或阴性对照 Ct 值 > 38.0，出现扩增曲线，但熔解曲线于 88℃ 左右未出现明显的峰值，表示样品中无毛滴虫核酸。

阳性：Ct 值 ≤ 30.0，出现典型的扩增曲线，且熔解曲线于 88℃ 左右出现明显的峰值，表示样品中存在毛滴虫核酸。

可疑：35.0 ≤ Ct 值 ≤ 38.0，且出现扩增曲线的样本判定为可疑。可疑样本进行双孔重复试验，若任一孔或两孔重复试验结果为阳性则判为阳性，否则为阴性。

10 综合判定

临床诊断疑似病例，经实验室形态学诊断、PCR检测或荧光定量PCR检测任一检测方法为阳性的，则为阳性病例；形态学诊断、PCR检测或荧光定量PCR检测三种检测方法均为阴性的为阴性病例。

附录 A
(资料性)
溶液配制

A.1 TF 培养液

胰蛋白胨	20.0 g
酵母粉	10.0 g
麦芽糖	5.0 g
抗坏血酸	1.0 g
KCl	1.0 g
KHCO ₃	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.1 g

加入950 mL去离子水, 调节pH 6.8~7.0, 最后定容至1000 mL, 121 °C 高压蒸汽灭菌15 min, 4°C~8°C 条件下保存备用。

A.2 TF 完全培养液

在无菌条件下, 取 45 mL TF培养基用0.22 μm 的细菌滤器过滤, 加入5 mL FBS, 按10000 U/mL加入青霉素和链霉素, 4°C~8°C 保存备用。

附录 B
(资料性)
鸽毛滴虫电镜形态

