

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4646—2025

鹦鹉热诊断技术

Diagnostic specifications for *chlamydia psittaci*

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 临床诊断 1

 4.1 流行病学 1

 4.2 临床症状 1

 4.3 剖检变化 1

 4.4 鉴别诊断 1

 4.5 结果判定 1

5 样品采集与处理 2

 5.1 总则 2

 5.2 组织样品 2

 5.3 拭子样品 2

 5.4 样品运输与保存 2

 5.5 样品处理 2

6 病原分离与鉴定 2

 6.1 生物安全措施 2

 6.2 细胞分离与鉴定 2

 6.3 鸡胚分离与鉴定 3

7 改良吉姆兹染色法 4

 7.1 主要仪器设备 4

 7.2 试剂与材料 4

 7.3 操作步骤 4

 7.4 结果判定 4

8 实时荧光 PCR 方法 4

 8.1 主要仪器设备 4

 8.2 试剂与材料 4

 8.3 样品 5

 8.4 操作步骤 5

 8.5 结果判定 5

9 综合判定 5

附录 A(规范性) 溶液的配制 6

附录 B(资料性) 荧光 PCR 反应体系配制 7

附录 C(资料性) 衣原体细胞染色镜检图例 8

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：广东省动物疫病预防控制中心(广东省动物卫生检疫所)、深圳澳东检验检测科技有限公司、深圳市疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、青岛海关技术中心、深圳市动物疫病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、重庆海关技术中心。

本文件主要起草人：卢受昇、石晓路、邓明俊、曾政、李柏生、张利、张炜、秦天、聂福平、施远国、武婕、彭博、王福广、张险朋、林丽梅、吴立炀、董春霞、翟建新、张议夫、刘荣启、张远龙。



引 言

鸚鵡熱是由鸚鵡熱衣原体感染引起的人畜共患傳染病。該病傳染源主要是被感染的禽類。病原體可通過糞便、尿液、唾液和呼吸等途徑排出，經消化道和呼吸道傳播給易感禽。人多數通過吸入傳染性氣溶膠而發生感染。

鸚鵡熱衣原体屬於衣原体屬。目前，衣原体有 11 個公認的種：流產衣原体(*C. abortus*) (綿羊、山羊和牛)、豚鼠衣原体(*C. caviae*) (豚鼠)、貓衣原体(*C. felis*) (貓)、鼠衣原体(*C. muridarum*) (鼠、倉鼠)、鸚鵡熱衣原体(*C. psittaci*) (鳥類及其他動物)、家畜衣原体(*C. pecorum*) (綿羊、牛)、肺炎衣原体(*C. pneumonia*) (人及其他動物)、豬衣原体(*C. suis*) (豬)、沙眼衣原体(*C. trachomatis*) (人)、禽衣原体(*C. avium*) 和家禽衣原体(*C. gallinacea*)。多數種具有高度的宿主特异性，但鸚鵡熱衣原體的宿主範圍廣泛，主要在鸚鵡及其他禽類中傳播，也可感染人類、牛、羊、豬、馬和其他動物。

鸚鵡熱基於編碼主要外膜蛋白(MOMP)A 基因(*ompA*)，已鑑定了 9 個不同的基因型。其中 7 個基因型主要見於禽類，2 個見於非禽類宿主，基因型 A 見於鸚鵡，基因型 B 見於鴿，基因型 C 見於鴨和鵝，基因型 D 見於火雞，基因型 E 見於鴿、鴨及其他動物，基因型 E/B 見於鴨、火雞和鴿子，基因型 F 見於長尾小鸚鵡，基因型 WC 見於牛，基因型 M65 見於啮齒動物。從人畜共患病例中分離初的衣原体株，鑑定出大部分禽的基因型，尤其是基因型 A、基因型 B 和基因型 E/B 等。

禽類衣原体在禽間感染率很高，且抗體可存在長達數月，大多數禽類衣原体抗體的本底率很高，市售商品化试剂盒未能有效區分禽衣原体、家禽衣原體和鸚鵡熱衣原體抗體，WOAH《陸生動物診斷試驗與疫苗手冊》認為，應用血清學方法對診斷禽類衣原體感染並不特別有用。因此，血清學診斷方法未納入本文件。

鹦鹉热诊断技术

1 范围

本文件规定了禽类鹦鹉热的临床诊断、样品采集与处理、病原分离与鉴定、改良吉姆兹染色法和实时荧光 PCR 方法的操作技术要求。

本文件规定的流行病学、临床症状、剖检变化、鉴别诊断适用于禽类鹦鹉热的临床诊断；改良吉姆兹染色法适用于鹦鹉热衣原体的初步诊断；病原分离与鉴定、实时荧光 PCR 方法适用于鹦鹉热衣原体的病原学确诊。

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 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 临床诊断

4.1 流行病学

鹦鹉热衣原体宿主范围广泛，可感染禽类、人类、牛、羊、猪、马和其他动物。

禽类中，幼禽比成年禽易感，其中火鸡最易感；主要通过呼吸道和粪口途径进行水平传播，也可垂直传播；一年四季均可发病，潜伏期 3 d~10 d，死亡率可达 30%。候鸟与家禽接触，易发生交叉感染。

4.2 临床症状

4.2.1 因禽种、年龄及衣原体菌株的毒力不同差异很大，大多表现为呼吸窘迫等呼吸道症状。

4.2.2 羽毛蓬松，精神沉郁，嗜睡，头翅下垂；发热；食欲不振；体重减轻；产蛋量下降。

4.2.3 眼部和鼻腔流出浆液性或脓性分泌物。

4.2.4 腹泻，排出淡绿色到黄绿色粪便。

4.2.5 雏禽症状表现更为严重；大龄鹦鹉和鸡的症状通常不明显，火鸡以呼吸道症状为主，鸭等水禽通常出现水样腹泻。

4.3 剖检变化

4.3.1 肺充血、水肿，支气管性肺炎。

4.3.2 气囊、心包、腹膜等纤维素性渗出。

4.3.3 肝、脾肿大，严重病例可出现坏死灶。

4.3.4 鼻腔和气管中有大量黄色黏性分泌物。

4.4 鉴别诊断

鹦鹉热临床症状和剖检变化不具有特异性，临床上应注意与支原体感染、大肠杆菌病、禽流感、鸡传染性支气管炎等疫病进行鉴别诊断。

4.5 结果判定

符合 4.1 中描述的流行病学特征,且出现 4.2 中 3 种及以上的临床症状,同时可观察到 4.3 中描述的 3 种及以上眼观病理变化,可以判为疑似感染鸚鵡热衣原体。确诊应采集有临床症状的病死禽组织进行实验室诊断。

5 样品采集与处理

5.1 总则

样品采集、保存、运输和处理应符合 GB 19489 和 NY/T 541 的要求,无菌采样,避免交叉污染。

病死禽采集病变器官内外的炎性或纤维性渗出物,眼和鼻渗出物,全血、肾、肺、脾、心包和肝等组织样品;活禽采集咽拭子、眼鼻周拭子、泄殖腔拭子和结膜刮取物;有腹泻症状的禽类可采集结肠内容物、泄殖腔拭子和新鲜粪便。

5.2 组织样品

采集发病禽全血、肾、肺、脾、心包和肝等组织样品,装入无菌采样袋或其他已灭菌容器中,编号并填写采样单。

5.3 拭子样品

采集眼鼻周拭子时,用拭子在眼周和鼻周旋转擦拭,沾取分泌物;采集咽喉拭子时,将拭子探入喉头来回刮 2 次~3 次并旋转,沾取分泌物;采集泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔至少旋转 3 圈并沾取少量粪便。

将采样后的拭子放入预装 SPG 溶液(配制方法按照附录 A 中 A.1 的规定执行)的容器中,编号并填写采样单。

5.4 样品运输与保存

样品采集后应置于低温冷藏箱中,加入预冷冰袋,密封,宜 24 h 内送至实验室。样品需尽快处理,于 4 ℃ 条件暂存不超过 4 d,在 -70 ℃ 条件下可长期保存,避免反复冻融。

5.5 样品处理

5.5.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施按照 GB 19489 和 NY/T 1948 的规定执行。

5.5.2 组织样品

按 1 g 组织加 10 mL PBS(配制方法按照 A.2 的规定执行,含 100 μg/mL 链霉素、100 μg/mL 万古霉素和 50 μg/mL~200 μg/mL 庆大霉素)的比例将组织样品制成匀浆,4 ℃ 放置 24 h 后,取上清液备用。为防止酵母和真菌生长,可在 PBS 加入 50 μg/mL 两性霉素 B 或制霉菌素。

5.5.3 拭子样品

对轻度污染样品,用 PBS(配制方法同 5.5.2)进行混匀,500 g 离心 20 min,除去表层和底层,离心后取上清液备用。

对严重污染样品(如粪便),经上述处理后,再用孔径 450 μm~800 μm 的过滤器过滤,收集滤液备用。

6 病原分离与鉴定

6.1 生物安全措施

病原分离与鉴定应在二级及以上的生物安全实验室中进行操作,并按照 GB 19489 的规定执行。

6.2 细胞分离与鉴定

6.2.1 主要仪器设备

6.2.1.1 生物安全柜。

6.2.1.2 台式水平离心机。

6.2.1.3 二氧化碳培养箱。

6.2.1.4 荧光倒置显微镜。

6.2.1.5 高压灭菌锅。

6.2.2 试剂与材料

6.2.2.1 Vero、BGM、McCOy、HeLa 或 L929 细胞。

6.2.2.2 DMEM 培养基。

6.2.2.3 胎牛血清(无衣原体抗体)。

6.2.2.4 万古霉素、链霉素、庆大霉素和两性霉素 B。

6.2.2.5 放线菌酮。

6.2.2.6 细胞瓶及细胞培养板。

6.2.3 样品

按 5.5 规定处理的样品。

6.2.4 单层细胞准备

用含 5%~10% 胎牛血清和抗生素(抗生素种类和浓度参照 5.5.2)的 DMEM 培养液,使用 24 孔板将细胞培养成单层。

6.2.5 样本接种

将 6.2.4 培养的单层细胞表面的培养液吸去,将接种物接种到单层细胞上,每孔接种 0.1 mL 预先处理好的样品(接种量可依据使用的细胞板和细胞瓶进行调整),并设置空白对照,接种后进行 37 °C 条件下 2 000 g~3 500 g 离心 30 min~90 min 处理可增进衣原体吸附细胞。置于 5% CO₂ 培养箱,37 °C 孵育 2 h~3 h,孵育期间每 30 min 轻微摇晃一次接种板,促使病原体吸附于细胞。吸去细胞表面的接种物,每孔加入 0.2 mL 含 0.5 μg/mL~2.0 μg/mL 放线菌酮的细胞培养液,置于 5% CO₂ 培养箱,在 37 °C~39 °C 条件下连续培养 5 d~6 d。期间观察细胞生长状态,适时更换细胞培养液。

6.2.6 病原鉴定

6.2.6.1 细胞接种第 2 d~3 d 及第 4 d~5 d 后,采用第 7 章的方法进行镜检。未观察到衣原体染色颗粒或包涵体的,收集培养物再盲传一次,接种 2 d~5 d 后,再次采用第 7 章的方法进行镜检。

6.2.6.2 培养物按第 8 章的方法进行荧光 PCR 检测。

6.2.7 结果判定

通过 6.2.6.1 观察到包涵体及衣原体染色颗粒的,判为衣原体分离阳性。通过 6.2.6.2 检测结果为核酸阳性的,判为鹦鹉热衣原体分离阳性。

6.3 鸡胚分离与鉴定

6.3.1 主要仪器设备

6.3.1.1 倒置显微镜。

6.3.1.2 生物安全柜。

6.3.1.3 孵化箱(孵卵器)。

6.3.1.4 照蛋设备。

6.3.2 试剂与材料

鸡胚、鸡胚气室开孔器、蛋托、注射器、碘酊、镊子、剪刀、封蜡(固体石蜡加 1/4 凡士林,溶化)、灭菌培养皿和灭菌盖玻片。

6.3.3 样品

按 5.5 规定处理的样品。

6.3.4 鸡胚要求

6 日龄~7 日龄鸡胚(SPF 或来自无衣原体抗体且未使用过抗生素的健康鸡群)。

6.3.5 鸡胚接种传代

6.3.5.1 气室部位开孔,接种深度为 1.5 cm~2.0 cm。每个鸡胚接种 0.5 mL 样品于卵黄囊内,置于

39℃湿润环境中培养,接种时要求无菌操作。

6.3.5.2 继续传代时,将收集的鸡胚卵黄囊膜研磨破碎,加入生理盐水稀释(1个卵黄囊膜加入4 mL PBS)后,3 000 r/min 离心 20 min,在 4℃中稳定 4 h 后,接种 7 日龄鸡胚进行传代。

6.3.6 病原鉴定

6.3.6.1 弃去接种后 72 h 内死亡的鸡胚,收集接种后 3 d~10 d 内死亡鸡胚的卵黄囊膜,按第 7 章的规定进行镜检。对接种后 10 d 内未死亡的鸡胚,收集卵黄囊膜,继续传代 2 次,鸡胚出现死亡则按第 7 章的规定进行镜检。

6.3.6.2 卵黄囊膜按第 8 章进行荧光 PCR 检测。

6.3.7 结果判定

通过 6.3.6.1 观察到包涵体及衣原体染色颗粒的,判为衣原体分离阳性。通过 6.3.6.2 检测结果为核酸阳性的,判为鹦鹉热衣原体分离阳性。

7 改良吉姆兹染色法

7.1 主要仪器设备

光学显微镜。

7.2 试剂与材料

7.2.1 Na_2HPO_4 。

7.2.2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。

7.2.3 亮绿。

7.2.4 碱性品红。

7.2.5 有机溶剂(柠檬酸、冰乙酸、苯酚、无水乙醇、甲醇、丙酮)。

7.2.6 染色溶液 1~6(配制方法按照 A.3 的规定执行)。

7.2.7 载玻片。

7.3 操作步骤

7.3.1 将病料、细胞培养物、卵黄囊膜于载玻片上压痕涂片。

7.3.2 丙酮和甲醇 1:1(体积比)混合液固定 5 min。

7.3.3 溶液 3 染色 10 min,净水冲洗。

7.3.4 溶液 6 复染 2 min。

7.3.5 净水冲洗,自然晾干。

7.3.6 显微镜检。

7.4 结果判定

镜检观察涂片,可见细胞浆内排列较疏松的包涵体,包涵体内可见许多染成红色的衣原体颗粒(镜检参考图见附录 B),则可判定样品中含有衣原体。

8 实时荧光 PCR 方法

8.1 主要仪器设备

8.1.1 荧光 PCR 仪。

8.1.2 高速冷冻离心机。

8.1.3 微量移液器(规格 100 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 和 1 μL ~10 μL)。

8.2 试剂与材料

8.2.1 PCR 反应预混液

2×含有 UDG 酶/dUTP 体系的全预混 qPCR 反应液(可用其他等效商品化试剂代替)。

8.2.2 引物探针

根据鸚鵡热衣原体编码外膜蛋白的 *ompA* 基因片段,设计特异性引物及 TaqMan 探针,覆盖所有基因型。上、下游引物和荧光探针序列如下:

上游引物 Cps F:5'-GGCATTATTGTTTGGCCGCTAC-3';

下游引物 Cps R:5'-TGAAGCACCTTCCCACATAGTG-3';

探针 Cps Pb:5'-FAM-AAGCCTTGCTGTAGGGAACCCAGCT-BHQ1-3'。

8.2.3 阴阳性对照

阳性对照:用灭活的感染鸚鵡热衣原体的卵黄囊膜或细胞培养物制备。

阴性对照:用 SPF 鸡胚的卵黄囊膜或鸚鵡热衣原体阴性细胞培养物制备。

8.3 样品

组织、分泌物、排泄物、细胞培养物和鸡胚培养物等样品。

8.4 操作步骤

8.4.1 样品 DNA 提取

可选市售商品化 DNA 提取试剂盒,按说明书进行。

8.4.2 荧光 PCR 检测

8.4.2.1 反应组分配制

根据荧光 PCR 仪类型选择适配的反应管,反应总体积为 25 μ L,每个测试反应体系配制见附录 C。

8.4.2.2 反应参数

预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min;变性 95 $^{\circ}$ C 5,退火/延伸 55 $^{\circ}$ C 40,45 个循环。荧光信号采集设定在退火/延伸时。对于多通道荧光 PCR 仪,鸚鵡热衣原体选择荧光素 FAM 为信号采集通道,淬灭基团选 None,染料校正选 None。

8.5 结果判定

8.5.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。基线和阈值设定根据仪器噪声情况进行调整,阈值线设定以刚好处于阳性对照扩增曲线的指数增长期为宜。

8.5.2 实验成立条件

8.5.2.1 阳性对照:扩增曲线呈标准的 S 形曲线,且 C_t 值 $\leq$ 30。

8.5.2.2 阴性对照:无 C_t 值,且无扩增曲线。

8.5.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件,此次试验视为无效。

8.5.3 结果描述及判定

8.5.3.1 阴性:无 C_t 值或 C_t 值 $\geq$ 40.0,表示样品鸚鵡热衣原体核酸阴性。

8.5.3.2 阳性: C_t 值 $\leq$ 37.0,且出现明显的指数增长期,表示样品鸚鵡热衣原体核酸阳性。

8.5.3.3 可疑:样品 C_t 值为 $37.0 < C_t < 40.0$ 时,重复检测 1 次。如果 C_t 值仍小于 40,且曲线有明显的指数增长期,可报告样品鸚鵡热衣原体核酸阳性;否则为阴性。

9 综合判定

符合第 4 章,经第 7 章检测结果为阳性的,初步判定为鸚鵡热疑似病例;经第 6 章或第 8 章检测结果为阳性的,判定为鸚鵡热确诊病例。

附 录 A (规范性) 溶 液 的 配 制

A.1 SPG 液

配制 SPG 液所需试剂如下：

- 74.6 g 的蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$)；
- 0.512 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)；
- 1.237 g 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)；
- 0.721 g 的 L-谷氨酸；
- 加蒸馏水至 1 000 mL。

按上述成分配制,使用氢氧化钠或盐酸调节 pH 至 7.4~7.6,分装,高压灭菌(115 °C 20 min)或过滤除菌后置于 4 °C 冰箱保存。使用前,在 SPG 液中可加入 10% 胎牛血清,万古霉素、链霉素(25 μ g/mL~100 μ g/mL)、两性霉素 B 和庆大霉素(50 μ g/mL),作为样品运输保存液。

SPG 液体也可作为衣原体样品的稀释剂和冷冻剂。

A.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

- 8.50 g 的氯化钠($NaCl$)；
- 0.20 g 的氯化钾(KCl)；
- 2.90 g 的磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)；
- 0.20 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)；
- 加蒸馏水至 1 000 mL。

按上述成分配制,分装,121 °C 20 min 高压灭菌,置于 4 °C 冰箱保存。

A.3 细胞染色溶液

A.3.1 溶液 1

将蒸馏水 450 mL 和苯酚 5 mL 加入含 2.5 g 碱性品红的 95% 乙醇 50 mL 中,置 37 °C 48 h,过滤后室温保存于暗处。

A.3.2 溶液 2

取 Na_2HPO_4 11.65 g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 2.47 g,加蒸馏水至 1 000 mL,调 pH 为 7.5。

A.3.3 溶液 3

取 20 mL 溶液 1、25 mL 溶液 2,混合后静置 10 min,用普通滤纸过滤后使用。

A.3.4 溶液 4

0.5% 柠檬酸。

A.3.5 溶液 5

亮绿 0.2 g,冰乙酸 0.2 mL,蒸馏水 100 mL。

A.3.6 溶液 6

取 20mL 溶液 5,加入 50mL 蒸馏水混匀。

附 录 B
(资料性)
衣原体细胞染色镜检图例

衣原体细胞染色镜检图例见图 B. 1, 视野中可见红色颗粒, 为衣原体包涵体中网状体(始体)颗粒。

[来源: 引自 D. A. R Vilela 等,《Phylogenetic analyses of Chlamydia psittaci ompA gene sequences from captive Amazona aestiva (Aves: Psittaciformes) with hepatic disease》]

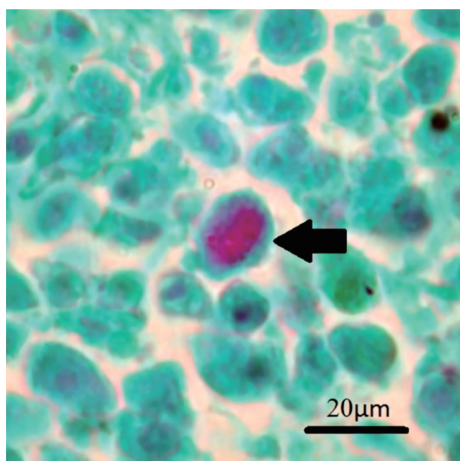


图 B. 1 改良吉姆兹染色法衣原体镜检图

附 录 C
(资料性)
荧光 PCR 反应体系配制

荧光 PCR 反应体系配制见表 C.1。

表 C.1 荧光 PCR 反应体系配制

组分	1 个反应的加入量
2×含有 UDG 酶/dUTP 体系的全预混 qPCR 反应液	12.5 μL
Cps F(10 μmol/L)	1.0 μL
Cps R(10 μmol/L)	1.0 μL
Cps Pb(10 μmol/L)	0.5 μL
DEPC 水	补体积至 20 μL
模板	5 μL
合计	25 μL