

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

# 团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

## 鸡红螨病诊断技术规范

Diagnostic techniques specification for poultry red mite disease

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会  
CVMA

## 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。

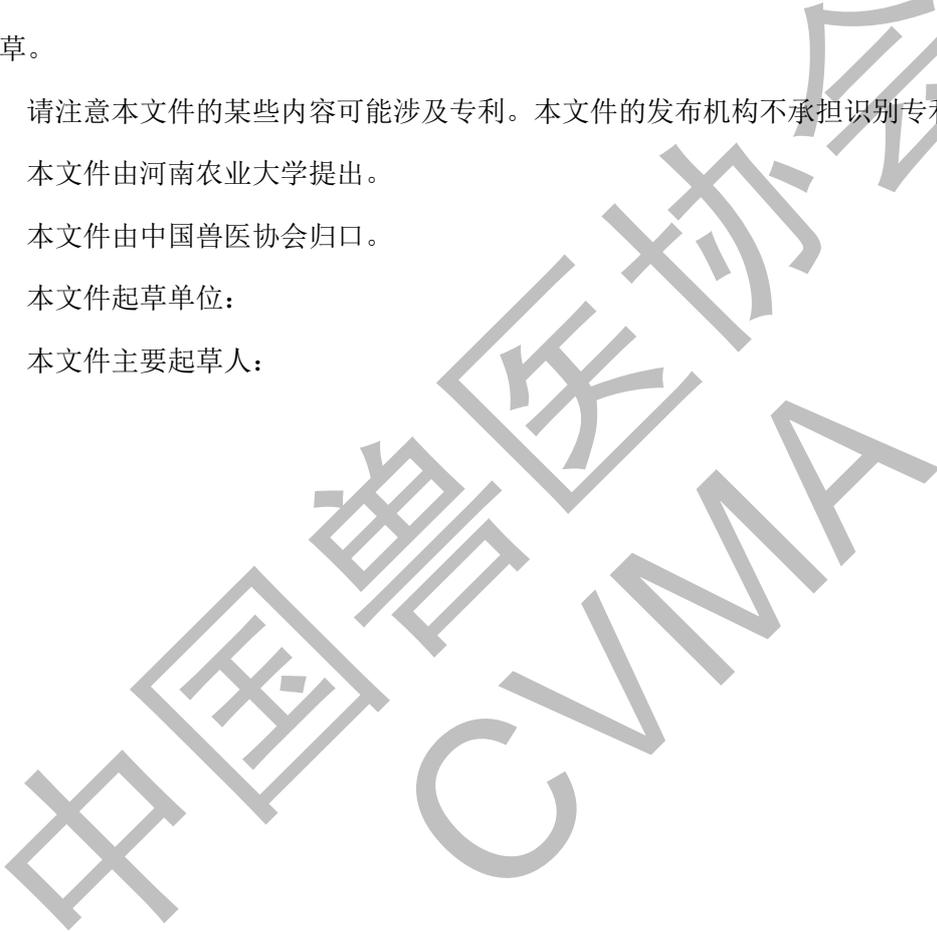
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由河南农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



中国兽医协会  
CVMA

# 鸡红螨病诊断技术规范

## 1 范围

本文件规定了鸡红螨鉴别和鸡红螨病诊断的显微镜观察及 PCR 扩增鉴定要求,描述了相应的样品制备方法和结果判定的规则。

本文件适用鸡红螨病的临床诊断及病原检测。

## 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。

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫。

## 3 术语和定义

### 3.1 鸡红螨 Poultry red mite

鸡皮刺螨 *Dermanyssus gallina*

属节肢动物门(Arthropoda)、蛛形纲(Arachnida)、蜱螨目(Acarina)、皮刺螨科(Dermanyssidae)、皮刺螨属(Dermanyssus)的一种寄生于鸡、鸽等多种禽类的体外吸血寄生虫。

### 3.2 鸡红螨病 Poultry red mite disease

由鸡红螨寄生在鸡舍墙缝,料槽、水线、笼具的缝隙等较为隐蔽黑暗处,通过叮咬引起鸡皮肤红肿、损伤、炎症以及贫血、消瘦生产性能下降为主要症状的体外寄生虫病。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

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

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）。

dNTP：脱氧核糖核苷三磷酸（Deoxy-ribonucleoside Driphosphate）。

ITS：内转录间隔区（Internal Transcribed Spacer）。

TAE：Tris-乙酸电泳缓冲液（Tris Acetate-EDTA Buffer）。

BLAST：基础比对工具（Basic Local Alignment Search Tool）。

## 5 试剂、耗材和设备

### 5.1 试剂

除特别规定外，在检测中使用的试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 的要求。

香柏油。

丙酮。

1%乙酸。

KOD-plusPCR 扩增试剂盒，包含 DNA 聚合酶、缓冲液和 2.5 mM 的 dNTP 混合物。

Loading Buffer。

4%戊二醛。

PBS 缓冲液。

DL 2000 DNA Marker。

1×TAE（见附录 A1）。

1% 琼脂糖（电泳级）（见附录 A2）。

不同浓度乙醇。

5%氢氧化钠（见附录 A3）。

绿如蓝®DNA Green 核酸染料。

加拿大树胶。

DNA 提取试剂盒。

鸡红螨阳性对照（使用经显微镜形态学检测确认为鸡红螨的虫体提取的基因组 DNA）。

## 5.2 耗材载玻片。

1.5mL、2mL 离心管。

针管。

200 $\mu$ L PCR 管。

## 5.3 设备

光学显微镜（含 100 $\times$ 物镜）。

扫描电子显微镜。

PCR 扩增仪。

核酸电泳系统。

凝胶成像仪。

## 6 生物安全要求：

### 6.1 样品的采集

应按照“GB/T27401 实验室质量控制规范 动物检疫”的要求进行采样。具有掌握相关专业知识和操作技能的工作人员操作，操作时应戴上手套、口罩、工作服，身上喷洒驱蚊胺或植物源驱避剂；使用大号毛笔将样品从鸡体或螨类聚集堆直接扫进自封袋中，防止螨虫逃逸扩散。

### 6.2 样品鉴定

应按照 GB 19489 要求，在生物安全1级（biosafety level BSL）实验室中进行检测工作，检测后的样品应按照 GB/T27401 中“实验试剂和废弃物管理”规定执行。

## 7 临床诊断

### 7.1 临床症状：

- 1) 患病鸡只出现大量羽毛脱落、啄毛。感染严重时，鸡群开始躁动不安，容易惊群，夜间有鸡惊叫；
- 2) 鸡皮肤有红疹和损伤，患鸡出现贫血、消瘦、精神不振、采食量及产蛋量下降；

- 3) 鸡皮刺螨白天寄生在鸡舍的墙缝之类的缝隙中，夜间才出来吸血，感染严重时才会在鸡体表和鸡蛋上见迅速移动的小黑点，鸡舍内水线、料槽、笼具可见多处的螨类聚集堆；
- 4) 感染严重时，鸡舍内水线、料槽、笼具上也可见快速移动的虫体，鸡场工作人员被叮咬后出现皮肤瘙痒、丘疹和皮炎等症状。

## 7.2 病理变化

无。

## 7.3 流行病学：

- 5) 呈世界性分布，广泛流行于亚热带和温带地区的蛋鸡场；
- 6) 每年5月开始见到虫体，7-9月高温潮湿季节感染严重，11月后逐渐消失，笼养鸡全年可能发生；
- 7) 更容易在蛋鸡场传播爆发；
- 8) 能感染鸡，麻雀，鸽，也能感染人。

## 7.4 结果判定

鸡或鸡群只出现7.1典型临床症状，并符合7.3流行特点，可判为疑似鸡红螨病。

## 8 显微镜检查

### 8.1 体视显微镜玻片标本制备：

- 1) 用加热约70℃的70%-80%乙醇固定活螨，使螨体附肢伸直；用蒸馏水清洗经过固定的鸡红螨样品，用5%的氢氧化钠浸泡数小时至鸡红螨的体色呈黄色为止，用蒸馏水洗2-3次，充分洗净表面附着的氢氧化钠；
- 2) 取1张洁净载玻片，滴2-3滴加拿大树胶封固液，将鸡红螨放入封固液中，在体视显微镜下，用昆虫针轻轻清除螨体上的杂物；
- 3) 再取1张载玻片，滴几滴加拿大树胶封固液，然后将上一步中的鸡红螨移入封固液中；

4) 用昆虫针拨动，使鸡红螨沉底，摆正姿势，头朝前，腹面向上，各足伸展，再放 1 只鸡红螨面朝上；

5) 轻轻盖上盖玻片，在酒精灯上稍稍加热使螨体伸展，然后倒转玻片，使螨头朝上，贴上标签；放入 45°C 的烘箱内烘干即可。

## 8.2 扫描电镜样本制备：

1) 将清洗好的鸡红螨放置在含有 4% 戊二醛的 1.5 mL 离心管中，使螨虫沉入管底，在 4°C 冰箱过夜；

2) 将离心管中戊二醛使用针管抽走，加入 PBS 浸泡清洗 10 分钟，并重复该过程 2-3 次，充分除去虫体附着的戊二醛；用 1% 锇酸固定 1.5 小时后使用针管抽吸锇酸，再次使用 PBS 清洗，充分除去虫体附着的锇酸；

3) 使用 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇，各脱水置换 15 分钟；再用 100% 乙醇脱水置换 2 次，每次应少于 20 分钟；再用 100% 丙醇脱水置换 2 次，每次应少于 20 分钟；

4) 使用丙酮：树脂（1：1）浸透鸡红螨 1.5 小时；再次使用丙酮：树脂（1：2）浸透过夜；再将鸡红螨浸入醇树脂中放入硅胶板内过夜；

5) 将硅胶板内的被树脂固定后的虫体进行聚合程序：37°C 12 小时，45°C 12 小时，60°C 24 小时；然后用切片机切成 70 nm 超薄切片，用 200 目的带膜铜网捞片；片子使用 2% 双氧醋酸铀染色 20min，用流动纯水将片子清洗干净；再用 2% 柠檬酸铅染色 10 分钟，充分清洗并备用。

## 8.3 显微镜检查

在体视显微镜和扫描电子显微镜下观察记录玻片标本中螨虫样品的躯体，螯肢、须肢、胸板、生殖腹板、肛板、腹肛板、刚毛、肛门、前后背毛等各个形态结构特点，依照 8.4 中各项进行形态学鉴定。

## 8.4 结果判定

鸡红螨虫体较小，非饱血状态下的虫体呈褐色或棕黑色或淡黄色（参见附录 B1），体长 0.45 mm-1.45 mm；饱食的虫体偏红呈红黑色（参见附录 B1），吸饱血后可达 1.5 mm；在显微镜下根据比例尺测算虫体大小是否符合鸡红螨特征；

在体视显微镜下，鸡红螨呈偏长椭圆形，前端有长的口器，后部宽于前驱，虫体体表布满短绒毛；腹面有4对长足（幼虫三对），在虫体的前半部分。螯肢呈细针状，短而小，适宜叮刺吸血（参见附录B1及B2）；

在扫描电镜下，虫体假头长呈细长针状，螯肢细而长，口器呈鞭状且垂直，内向外；背面有一块背板，前部较宽，后缘平直；刚毛约15对；侧膜上批文清晰，侧毛16对左右。胸板前缘呈弓形，后缘浅凹，板上刚毛2对；生殖板和腹板愈合为生殖腹板，生殖腹板呈舌状，后缘钝圆，有刚毛一对；肛板圆三角形，3个刚毛，肛孔位于肛板后部，具有鸡红螨的形态特征，可确诊（参见附录B3）。

## 9 PCR 扩增鉴定

### 9.1 DNA 制备

将置于2 mL的离心管中的鸡红螨虫体，利用NDA提取试剂盒在室温（15°C-25°C）下提取虫体DNA，提取好的虫体DNA立即进行PCR扩增或者放置于-20°C保存备用。

### 9.2 PCR 扩增

#### 反应体系

应按照附录C1反应体系，用引物18SrRNA-ITS-28SrRNA-F / 18SrRNA-ITS-28SrRNA-R 和CoxI-F / CoxI-R（见附录C2）组合配制PCR反应体系，反应体系为50μL。鸡红螨阳性对照模板为5.1.18所列鸡红螨DNA 2μL，阴性对照不加阳性DNA模板及待检样品DNA。反应程序见附录C3。

#### 电泳分析及成像

用1×TAE缓冲溶液配制1.5%琼脂糖凝胶，取PCR产物10 μL在1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳，凝胶成像分析系统观察结果并拍照。

#### 质控标准

鸡红螨阳性对照出现519 bp（18S rRNA /ITS /28S rRNA）或453 bp（CoxI），阴性对照无扩增条带时，判为实验有效。

### 9.3 结果判定

#### 阳性

与DNA标准分子量比对，阳性对照以及检测样品同时出现大小为519 bp（18S-28S rRNA）或453 bp（CoxI）扩增片段，并且阴性对照无扩增条带时，判定为鸡红螨阳性（见附录D，见附录E）。

## 阴性

与DNA标准分子量比对，阳性对照出现大小为519 bp（18S-28S rRNA）或453 bp（CoxI）扩增片段，并且阴性对照以及检测样品无扩增条带时，判定为鸡红螨阳性（见附录D，见附录E）。

## 10 综合判定

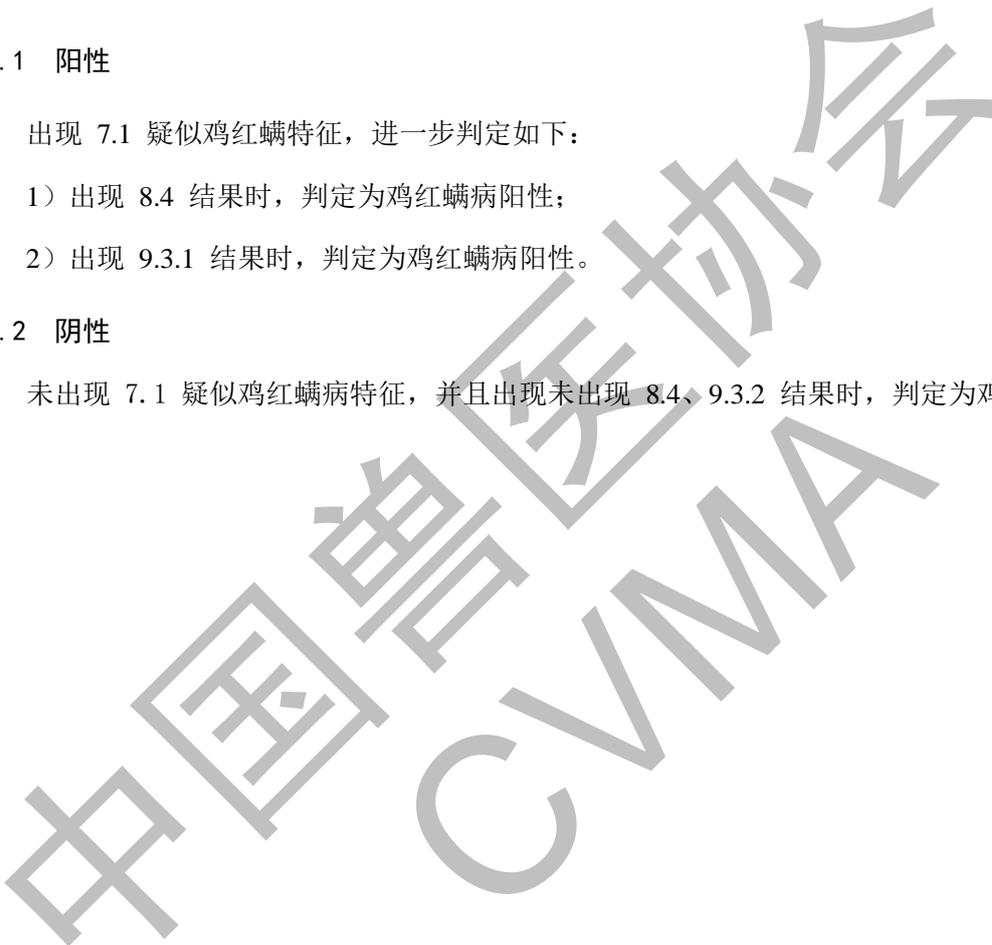
### 10.1 阳性

出现 7.1 疑似鸡红螨特征，进一步判定如下：

- 1) 出现 8.4 结果时，判定为鸡红螨病阳性；
- 2) 出现 9.3.1 结果时，判定为鸡红螨病阳性。

### 10.2 阴性

未出现 7.1 疑似鸡红螨病特征，并且出现未出现 8.4、9.3.2 结果时，判定为鸡红螨病阴性。



附录 A  
(规范性)  
标准中涉及的试剂配置方法

A.1 电泳缓冲液 (TAE) 的配制

A.1.1 50×TAE贮存液:

Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37.2 g
冰醋酸	57.1 mL
Tris-Base	24.2 g

用约800 mL灭菌去离子水溶解,充分混匀后用灭菌去离子水补齐至1000 mL,常温保存备用。

A.1.2 1×TAE使用液

50×TAE贮存液	10 mL
去离子水	490 mL

混匀,常温保存备用。

A.2 1.0%的琼脂糖凝胶

琼脂糖干粉	1.0 g
1×TAE使用液	100 mL

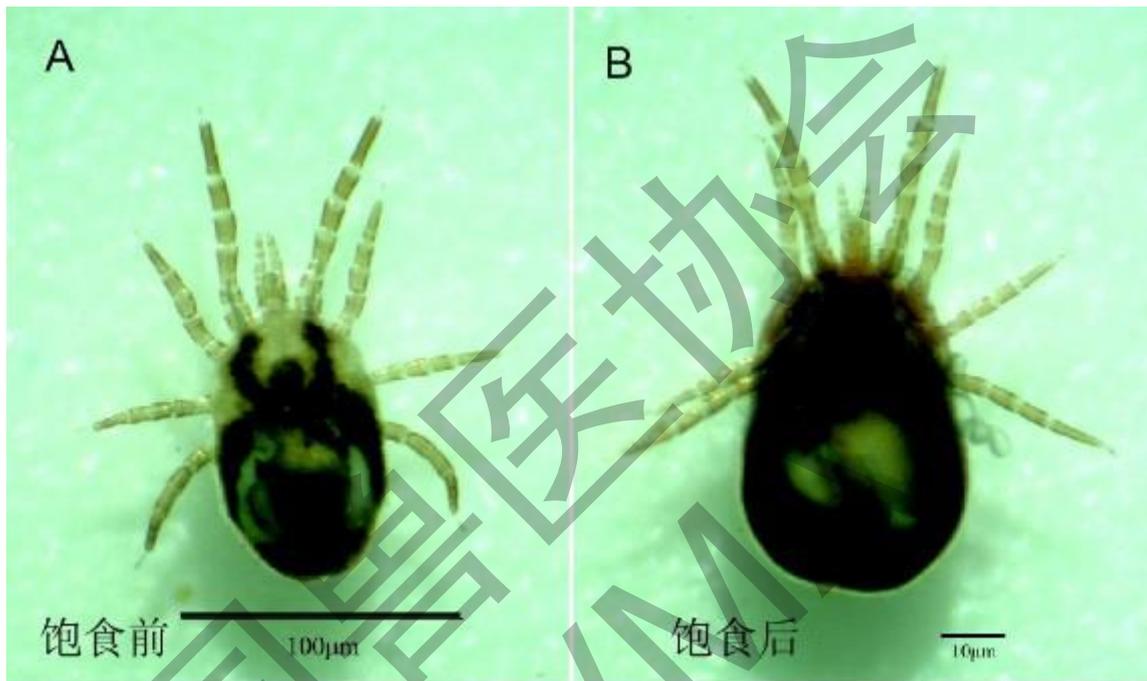
微波炉加热至琼脂糖熔化,待稍冷却后加入终浓度绿如蓝核酸染料,摇匀。

A.3 5%氢氧化钠

氢氧化钠	5 g
双蒸水	100 mL

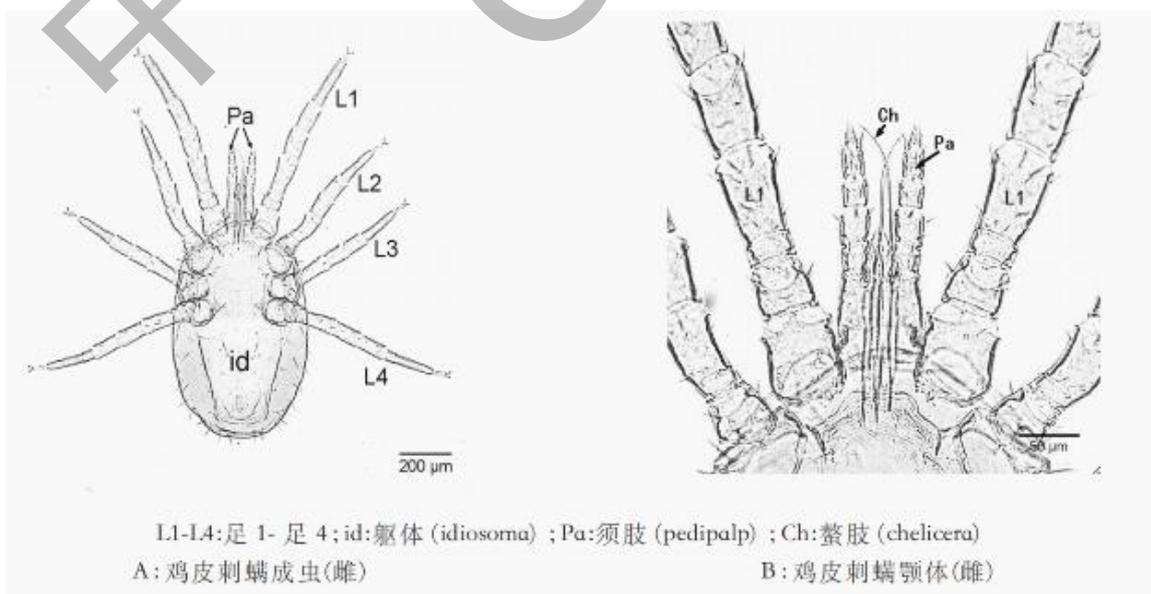
附录 B  
(资料性)  
鸡红螨显微镜及手绘图片

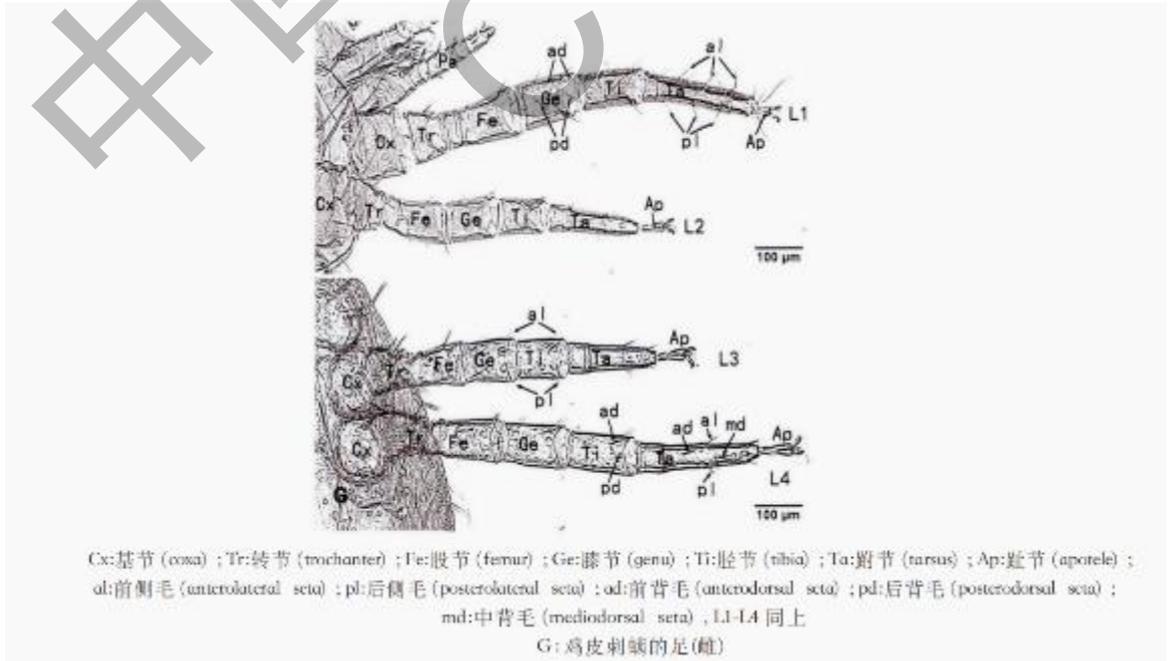
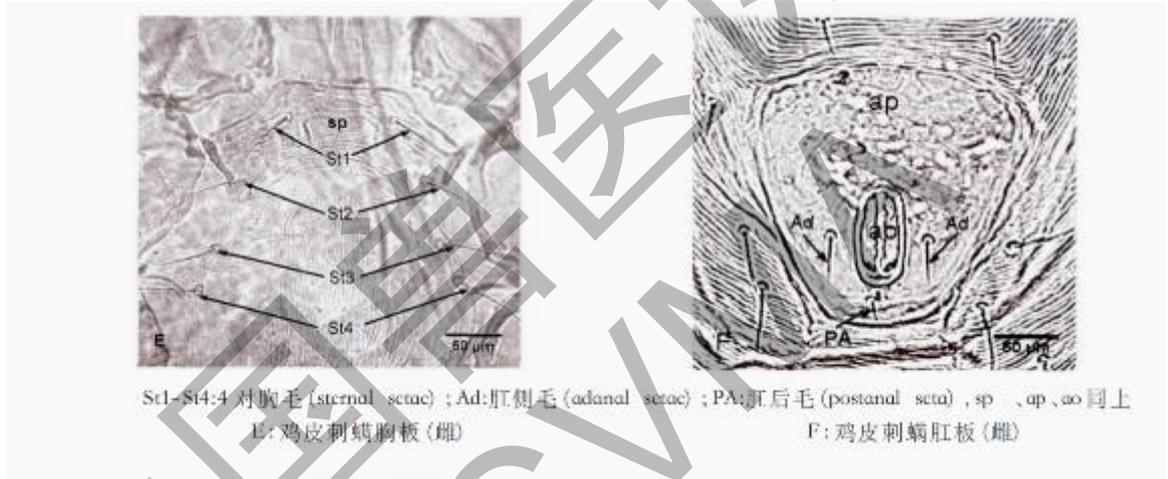
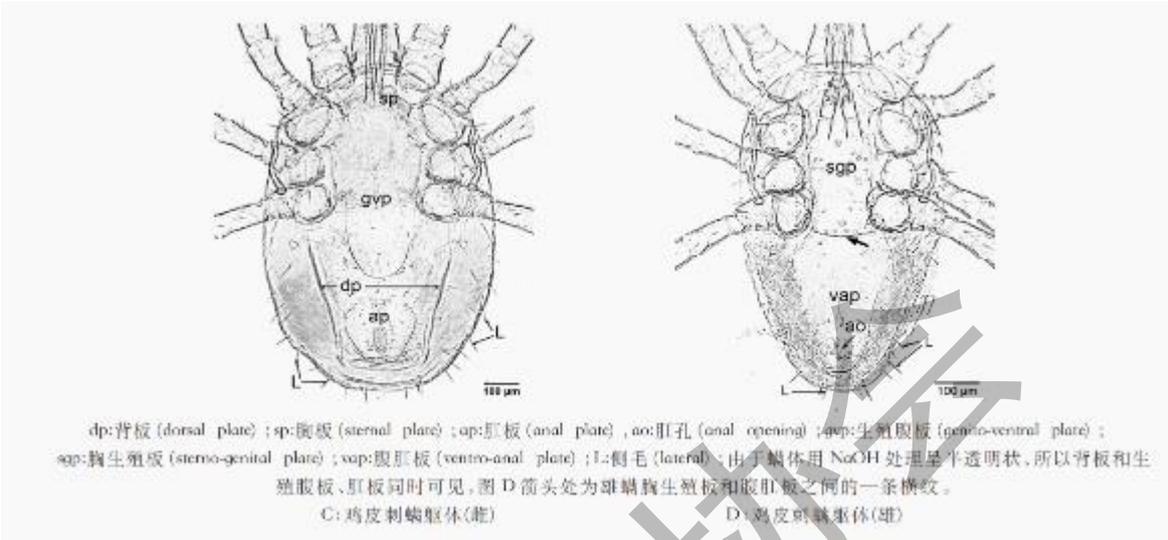
B.1 体视显微镜下吸血前（饱食前）和吸血后（饱食后）的鸡红螨



注：图片来自本项目组

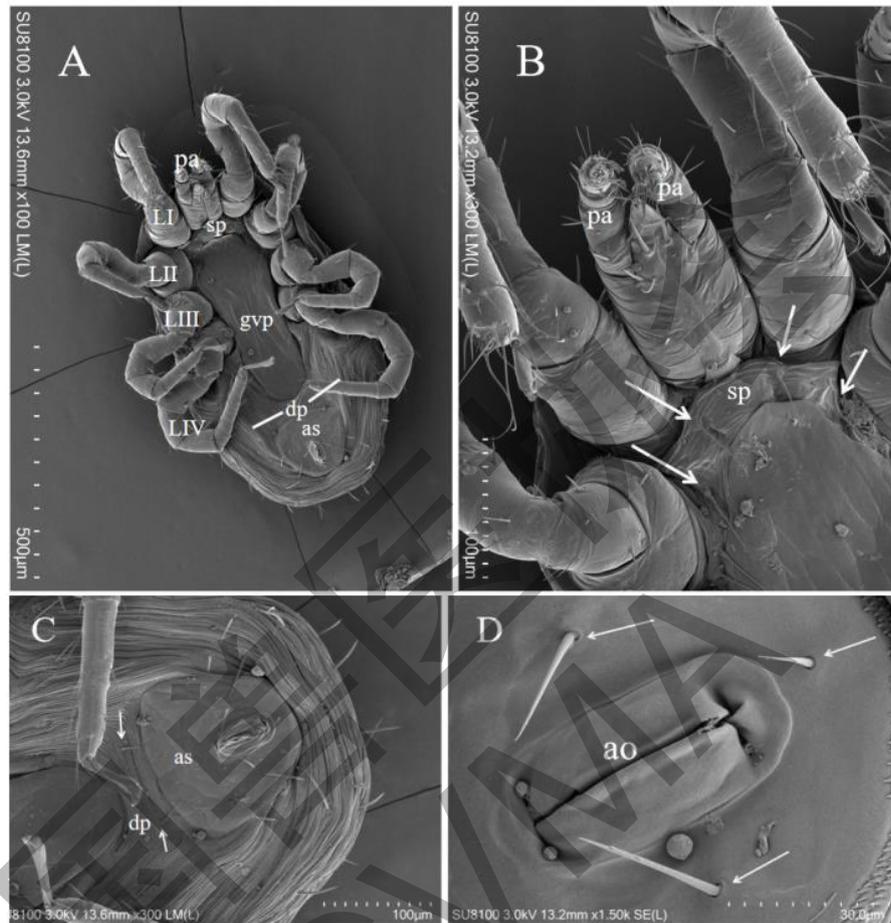
B.2 鸡红螨手绘形态学鉴定





注: 图片来自本项目组。

B.3 电镜下的鸡红螨（雌性）



注：数据来自本项目组

A: 鸡红螨腹面视图; B: 胸板细节图, 箭头表示两对胸板刚毛的位置; C: 腹板图, 箭头指向刚毛1对; D: 肛门图, 箭头指向3个刚毛。as:肛板; ao: 肛孔; dp: 背板; gvp: 生殖腹板; Pa: 须肢; sp: 胸板; LI-LIV: 足1-足4。

## 附录 C

(规范性)

## PCR反应体系配制及注意事项

## C.1 鸡红螨PCR检测反应体系

组成成分	浓度	体积 (μL)
KOD-plus Buffer	10×	5.0
dNTPs	2μM/μL	5.0
MgSO4	25μM/μL	4.0
上游引物	25μM/μL	1.5
下游引物	25μM/μL	1.5
KOD-plus	1U/μL	2.0
DNA 模板	200ng/μL	2.0
灭菌双蒸水	-	29
总计		50

## C.2 鸡红螨 18SrRNA · ITS · 28SrRNA及线粒体细胞色素C氧化酶亚基 1 (CoxI) 特异性引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度
18SrRNA·ITS·28SrRNA -F	5'-TAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-3'	519 bp
18SrRNA·ITS·28SrRNA -R	5'-AGTTCAGCGGGTCGTCACACTTG -3'	
CoxI-F	5'-TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG-3'	453 bp
CoxI-R	5'-TACAGCTCCTATAGATAAAAC-3'	

注引物来自本项目组已发表文献及相关已公开发表文献

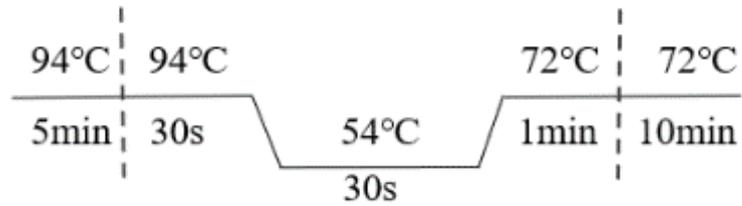
相关文献如下：

菅忆晨等，2023，河南省部分地区蛋鸡场螨虫的种类鉴定。（本项目组已发表文献）

刘成倩等，2020，鸡皮刺螨病的PCR诊断及 18SrRNA·ITS·28SrRNA 基因序列分析

张星星等，2016，新疆石河子地区鸡皮刺螨形态学鉴定及其cox1基因比对分析。（本项目组已发表文献）

## C.3 鸡皮刺螨PCR反应程序



鸡皮刺螨的PCR反应程序，共35个循环

#### C.4 注意事项

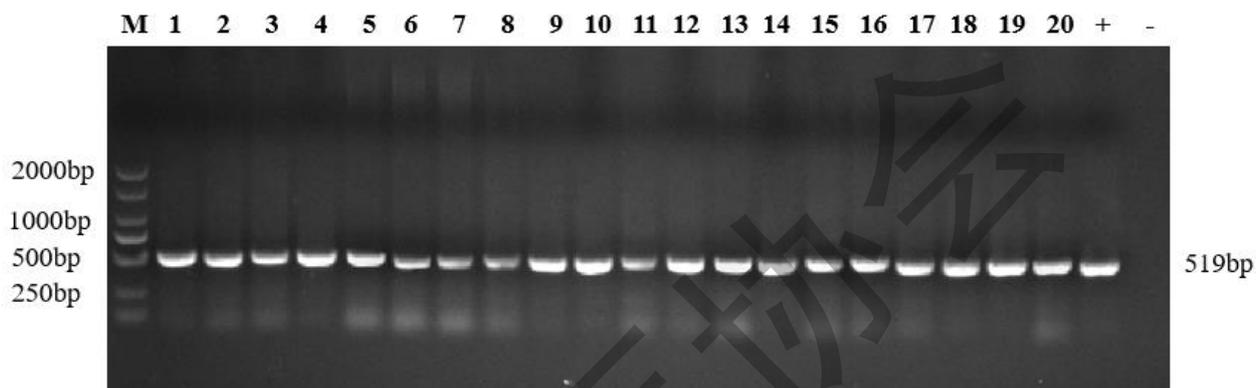
C.4.1 所有试剂应按要求分别在4°C、-20°C条件保存，使用时室温下融化后，放置于冰上。

C.4.2 由于阳性对照样品中模板浓度相对较高，在PCR反应体系配制过程中，阳性对照DNA与待检样品DNA应在不同区域添加。

C.4.3 PCR反应前，将反应液震荡混匀，离心。随后放置在设定程序后的PCR仪中，开始反应，共35个循环。

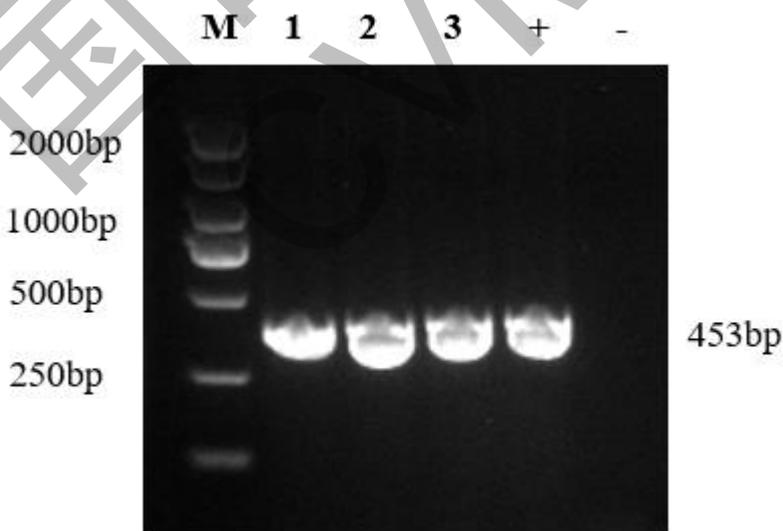
附录 D  
(资料性)  
鸡红螨PCR检测结果判定图

D.1 鸡红螨基于 18SrRNA · ITS · 28SrRNA位点PCR扩增结果



M: DL-2000 DNA 相对分子质量标准; -: 阴性对照; +: 阳性对照; 1~21: 检测样品 PCR 产物  
(数据来自本项目组)

D.2 鸡红螨基于CoxI位点PCR扩增结果



M: DL-2000 DNA 相对分子质量标准; 1-4: 检测样品 PCR 产物  
(图片来自本项目组)

附录 E  
(资料性)  
鸡红螨PCR扩增片段核酸序列  
(来自本项目组)

E. 1 鸡红螨 18SrRNA/ITS/28SrRNA基因序列目的基因片段 (519 bp)

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATCAAAATCCATTCACCTCACTCAGAGAGGATGGTACCTGTATGATGTGCTATCCCACGC  
TGTTGGGAGAGCCATTGCAATGTAATGACATGTATTCTAAATTTGTATCGCGTACTCACTTTACTAAGTTAGTCGCGTGTGCCAGCCA  
TCGGCTGGTTTGACAACAATTTACCAaTTGTGCTaTtgagaTAAAAcAAAAcAAGACTCAATGTGGGGGATCACTTAGTCTTAAA  
TCGATGAAAAACATAGTAATTTGTGGAAAATGATGTGAGTTGTGAAATTTGTGAGCATTGTGTTTTGAATGAAAATTCAGCATGGA  
TGCATGCGTGTCTATGCTGCATTTGTTTCAGTATATATCAATGTCAATTTGTCGTTACTATTGOTTGAAAGCAATAGTATAAACTGTTC  
GCGATCACAAGTGTGATATCGATCTTGCGTTATATGACGTGTATCTGAAATCAAGTGTGACGACCCGCTGAACT

E. 2 鸡红螨CoxI基因序列目的基因片段 (453 bp)

TGATTTTTGGTCACCCAGAAGTTTATATTTTAATTATCCAGGATTTGGAATAATTTCCCACATTGTTTGTATCAAAGTGGAAAAA  
GAAACCTTTTGAAATATTAGAATAATCTATGCAATATTAACAATTGGTATTTTAGGATTTATTGTTTGAGCCCACCATATTTACAA  
TCGGATTGGATATTGATACTCGGGCTTATTTACTGCTGCCACGATAATTATTGCAATTCGACAGGAATTAAGATTTTTTCATGAATT  
TCAACACTCCACGGAGTTAATATCAATTTTAACCCACCGATTCTTTGATCTTTAGGATTTATTTTTTTATTACAATTGGTGGAATTAC  
AGGGATTATTTTAGCCAATCAAGAATTGATATTATTTACATGATACTTACTATGTGGTAGGTCATTTTCATTATGTTTTATCTATAG  
GAGCTGTA

