

ICS 11.220
B 41

DB51

四川省地方标准

DB51/T 2389—2017

大熊猫检疫技术—隐孢子虫检测技术规程

2017-07-13 发布

2017-10-01 实施

四川省质量技术监督局

发布

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 隐孢子虫卵囊的检测	1
5 PCR 检测.....	2
6 综合判定	3
附录 A（规范性附录） 试剂的配制.....	4
附录 B（资料性附录） 隐孢子虫卵囊.....	5
附录 C（资料性附录） 安氏隐孢子虫 PCR 产物参考序列.....	6
参考文献	7

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由四川出入境检验检疫局提出并归口。

本标准由四川省质量技术监督局批准发布。

本标准起草单位：四川出入境检验检疫局、四川农业大学、四川省中安检测有限公司、四川傲势科技有限公司、中国大熊猫保护研究中心。

本标准主要起草人：余华、杨光友、林华、王成华、胡江涛、谭智、严玉宝、姜后珊、刘洋、郭亮、谢跃、王凝、崔鹏博、李德生、贺平、周长军。

大熊猫检疫技术—隐孢子虫检测技术规程

1 范围

本标准规定了大熊猫隐孢子虫卵囊的检测与PCR检测。
本标准适用于大熊猫隐孢子虫的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088-2000 出入境动物检疫采样

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

SN/T 1193 基因检验实验室建设要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

隐孢子虫 *Cryptosporidium*

孢子虫纲、真球虫目、隐孢子虫科、隐孢子虫属的原虫，寄生于动物消化道和呼吸道上皮细胞的刷状缘或细胞表面膜下，可引起动物的腹泻和渐进性消瘦等，严重者甚至导致死亡。目前报道寄生于人和动物的隐孢子虫有26种，其中安氏隐孢子虫可感染和危害牛、羊、大熊猫及小熊猫等动物。

4 隐孢子虫卵囊的检测

4.1 设备和器材

普通离心机、光学显微镜、载玻片、盖玻片、滤粪网（或金属筛）、离心管、铝盅（烧杯或塑料杯）、滤粪网（或金属筛，40~60孔）。

4.2 试剂和材料

饱和蔗糖溶液（配制见附录A.1）、抗酸染色液（配制见附录A.2）、甲醇。

4.3 蔗糖离心漂浮法

取被检粪便5 g左右，放在铝盅（烧杯或塑料杯）内。先加少量清水搅拌均匀，再加入20倍量的清水充分混合后，用滤粪网（或金属筛，40~60孔）滤入另一个铝盅（烧杯或塑料杯）内。加水至满，静置30 min后，倒去上层粪液，留下沉淀，再加水至满，沉淀15~20 min，又倒去上层粪液，这样反复进

行，直到上层液变清亮为止，最后倒去上清液，吸取沉渣约1mL加入离心管中，并加满清水，2000 r/min离心5 min，吸弃上清液，在沉渣中加入饱和蔗糖溶液，调匀后再加饱和蔗糖溶液至距管口约1cm处，3000 r/min离心21 min。离心后再加满饱和蔗糖溶液，使液面凸出管口后加盖玻片，静置2~5 min后镜检（高倍或油镜）。隐孢子虫卵囊形态特征：卵囊透明无色，囊壁光滑，内有一小暗点和呈淡黄色的子孢子。卵囊形态，参见附录B。采样参照GB/T 18088-2000、NY/T 541的规定执行。

4.4 改良抗酸染色法

取经沉淀后的粪样沉淀物涂于载玻片上，面积适当要大且均匀，置于空气中干燥；甲醇固定3 min；滴加抗酸染色液第一液在粪膜上，染色5 min，清水冲洗；滴加抗酸染色液第二液，脱色5~10 min，清水冲洗；滴加抗酸染色液第三液，复染1 min再冲洗，待干；置油镜下观察。经染色后，隐孢子虫卵囊为玫瑰红色，子孢子呈月牙形，共4个。卵囊形态，参见附录B。采样参照GB/T 18088-2000、NY/T 541的规定执行。

5 PCR 检测

5.1 设备和器材

移液器（10 μ L、200 μ L、1000 μ L各一支）、PCR仪、水平电泳槽、pH计、冷冻离心机、凝胶成像分析仪、电泳仪。

5.2 试剂和材料

5.2.1 市售 DNA 抽提试剂盒

——引物（两步法巢式 PCR：第 1 步 5-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3，5-CCCATTCCTTCGAAACAGGA-3；第 2 步 5-GGAAGGTTGTATTT-ATTAGATAAAG-3，5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3）。

——市售 PCR 缓冲液（含镁离子、Taq 聚合酶等）。

——DL2000 DNA Marker。

——阳性对照品（隐孢子虫阳性粪样）。

——阴性对照品（隐孢子虫阴性粪样）。

5.3 操作方法

5.3.1 DNA 抽提

采集疑似病猫的粪样，取0.2 g用总DNA抽提试剂盒抽提粪样中的DNA，操作步骤按照试剂盒说明书。DNA溶解于20 μ L灭菌水中备用。

5.3.2 扩增和检测

——反应体系均为 25 μ L：2 \times Taq Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 8 μ L、BSA 0.5 μ L、模板 DNA 2 μ L、上下游引物各 1 μ L。取 5 μ L 扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳，Gold-view 染色，凝胶成像系统观察结果。

——第 1 步扩增条件如下：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，94 $^{\circ}$ C 变性 45s，59 $^{\circ}$ C 退火 45s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，循环 35 次，然后 72 $^{\circ}$ C 作用 7 min。

——第 2 步扩增条件如下：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30s，58 $^{\circ}$ C 退火 90s，72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min，循环 40 次，然后 72 $^{\circ}$ C 作用 7 min。

——试验参照 GB/T 6682、SN/T 1193 的规定执行。

5.4 结果分析

若PCR产物出现约832 bp的目的片段，则对目的产物进行测序，序列应与GenBank中安氏隐孢子虫18S基因参考序列匹配率不小于99%。PCR产物参考序列（见附录C）。

6 综合判定

符合以下情形之一，即可做出判定：

- 检出隐孢子虫包囊，且 PCR 检测结果阳性，可判定动物安氏隐孢子虫阳性；
- 其他情况，均判定为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

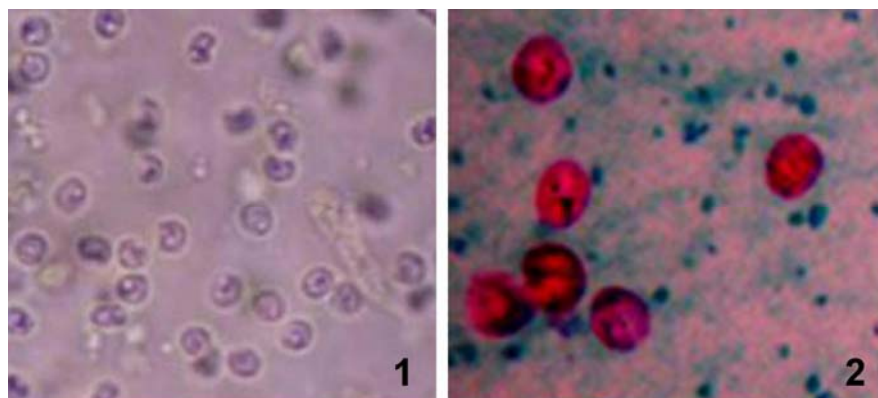
A.1 饱和蔗糖溶液

蔗糖1280 g，蒸馏水1000 mL，5%石炭酸21 mL。

A.2 改良抗酸染液

石炭酸复红染色液（第一液）：碱性复红4 g，95%酒精20 mL，5%石炭酸8 mL，蒸馏水100 mL；
10%硫酸溶液（第二液）：纯硫酸10 mL，蒸馏水90 mL（边搅拌边将硫酸徐徐倾入水中）；
20 g/L孔雀绿液（第三液）：20 g/L孔雀绿原液1mL，蒸馏水10 mL。

附 录 B
(资料性附录)
隐孢子虫卵囊



1. 饱和蔗糖漂浮；2. 改良抗酸染色

附 录 C

(资料性附录)

安氏隐孢子虫 PCR 产物参考序列

GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATGAGCTTGGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGC
ATCTCTGATGCGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACC
GTGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
CACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAG
AAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGT
ATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAA
GTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTTATAATATTACCAAGGTAATTA
TTATATTATCAACATCCTTCCTATTATATTCTAAATATATAGGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
GCTTAAAGCAGGCAACTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGTCTTTCTT
ATTGGTTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACAGCCAGA
GGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTTCATTAA
TCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGC
CGACTAGAGATTGGAGGTTGTTTCCTTACTCCTT

参 考 文 献

- [1]侯卫东, 菅复春. 抗酸染色法对隐孢子卵囊的检查. 河南畜牧兽医, 2006, 27 (11): 6-8.
- [2]林丽君, 严晓岚. 隐孢子虫病实验室诊断与治疗研究进展. 浙江省医学科学院学报, 2007, 9(70): 39-43.
- [3]索宏德. 隐孢子虫病病原的几种检测技术及防治. 青海农牧业, 2010, 3: 47-48.
- [4]郭步平, 连德润. 隐孢子虫卵囊纯化方法的比较研究. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13 (1) : 34-35.
- [5] 杨光友, 张志和. 野生动物寄生虫病学. 北京: 科学出版社, 2013.
- [6]Karanis P, Plutzer J, Halim NA, Igori K, Nagasawa H, Ongerth J, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. Parasitology Research, 2007, 101(6):1575-80.
- [7]Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Waters with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12):5492-8.
- [8]McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Diaz S, Nichols G. Molecular Epidemiological Analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of Genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 Fecal Samples from Humans and 105 Fecal Samples from Livestock Animals. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(11):3984-90.
- [9] Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Experimental parasitology. 2010, 124(1):80-9.
- [10]Adriana Calderaro, Sara Montecchini, Chiara Gorrini. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of *Cryptosporidium* spp. in a low-prevalence setting. Diagnostic Microbiology and Infections Disease, 2011, 70: 72-77.
- [11]Barbara Pichter, Nora Nedorost, Anton Maderner. Detection of *Cryptosporidium* species in feces or gastric contents from snakes and lizards as determined by polymerase chain reaction analysis and partial sequencing of the 18S ribosomal RNA gene. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(3): 430-435.
-

