

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1471—2007

牛毛滴虫病诊断技术

Diagnostic techniques for bovine Trichomoniasis

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由农业部市场与经济信息司(农业部质量办公室)提出。

本标准由农业部畜牧兽医局质量标准办公室归口。

本标准起草单位:南京农业大学动物医学院。

本标准主要起草人:李祥瑞、徐立新、李春华、汪志楷、郑增忍。

引 言

毛滴虫病是由胎儿三毛滴虫(*Tritrichomonas foetus*)寄生于牛生殖道引起的疾病。该病呈世界性分布,引起牛,尤其是奶牛生殖器官炎症、死胎、流产和不育,对畜牧业生产造成严重的经济损失。

毛滴虫病被世界动物卫生组织列为 B 类疾病。该病主要通过自然交配传播,以染病动物的精液和污染的器械人工授精也可引起传播。

牛毛滴虫病诊断技术

1 范围

本标准适用于毛滴虫病的诊断。

本标准规定了毛滴虫病的病原鉴定、聚合酶链反应(PCR)扩增虫体 DNA 的检测方法和结果判定标准。

2 原理

2.1 胎儿三毛滴虫可在显微镜下直接观察,也可经姬姆萨染色法染色后观察。

2.2 以胎儿三毛滴虫虫体 DNA 作模板,应用特异性的引物进行 PCR 反应,能扩增出特异性的条带。

3 主要材料和试剂

3.1 显微镜

3.2 载玻片

3.3 染色皿

3.4 姬姆萨(Giemsa)染色液

3.5 姬姆萨染色液稀释液

3.6 PCR 仪

3.7 离心机

3.8 PBS(pH 7.2 0.01 mol/L)

3.9 CTAB 抽提液

3.10 CTAB/NaCl 溶液

3.11 高速离心机

3.12 涡旋振荡器

3.13 PCR 引物

引物 TFR3(5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3')

引物 TFR4(5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3')

3.14 热启动 Taq 聚合酶

3.15 1×PCR 反应缓冲液

3.16 400 μM dNTPs

3.17 1.5 mM MgCl₂

3.18 电泳仪

3.19 粉碎机,匀浆器,研钵和研杵,捣碎机

3.20 抗有机溶剂的试管或烧杯

4 检测步骤

4.1 临床观察

根据临床病史,母牛早期流产、多次复配不孕或发情不规则、阴道分泌物增加、子宫蓄脓,公牛包皮

黏膜有结节、分泌大量脓性物 and 不愿交配等病史或症状和体征可做出初步诊断。

4.2 采样

4.2.1 母牛 首先将母牛外生殖器洗涤干净,然后用 40 mL 以上的注射器,将 30 mL~40 mL 的 30℃~35℃灭菌生理盐水急速注入阴道,以洗涤子宫和阴道壁,然后将洗涤液收集于离心管中,以 1 500 r/min~2 000 r/min 离心沉淀 5 min 后,取沉淀物作为待检样品。也可取一长 30 cm、直径 0.9 cm,并在离一端 9 cm 处弯成 150 度角的消毒玻璃管,注入少量的 30~35℃灭菌生理盐水,收集母牛子宫颈黏液作为待检样品。收集待检样的适宜时间为发情过后几天。

4.2.2 公牛 首先将公牛外生殖器洗涤干净,吸取 5~10 mL 的 30~35℃灭菌生理盐水注入包皮腔内,然后以手压紧包皮口,使液体在腔内滞留 3~5 min 后,再将洗涤液收集于离心管中,以 1 500 r/min~2 000 r/min 离心沉淀 5 min 后,取沉淀物作为样品。

4.2.3 精液 取自人工采集或融化的冷冻精液适量,作为待检样品。

4.2.4 产仔牛、流产牛等可取胎盘液;流产胎牛可取胎儿第 4 胃的内容物;病牛可取子宫积液排出物,以 1 500 r/min~2 000 r/min 离心沉淀 5 min 后,取沉淀物作为待检样品。

4.2.5 样品采集后应立即镜检,若用于 PCR 检测可低温冷冻保存。

注:不同情况下毛滴虫的数量有所不同,在流产胎儿、流产后几天和新近感染母牛子宫里均含有大量虫体。在感染后 12~20 天的母牛阴道黏液内也含有大量虫体,在一个发情周期内毛滴虫的数量也有所不同,发情后 3~7 天内毛滴虫的数量最多。这些时段采集的样品可直接进行镜检。

4.3 虫体显微镜检查

4.3.1 压滴标本检查法

将采集的待检样品 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,视野放暗,迅速进行检查。可重复进行 2~3 片。

4.3.2 染色标本检查法

将采集的待检样品少量置于载玻片一端,立即推制成均匀的薄膜,在室温下干燥,后用甲醇固定 2 min,将固定的抹片浸入足量的姬姆萨染色稀释液的染色皿中,染色 0.5~1 小时,取出水洗,吸干或烘干,镜检。

4.4 PCR 扩增虫体 DNA 检查法

4.4.1 虫体 DNA 的制备

将采集的样品与 PBS 混合至总体积 5.0 mL,在涡旋振荡器上混匀,取出 1 mL 移入 1.5 mL 微量离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,在沉淀物中加入 2 mL TE(10 mmol/L),转入另一 5 mL 离心管,再加入 100 μ L 的 10% SDS 和 50 μ L 的 5 mg/mL 的蛋白酶 K,再加 10 μ L 的 RNA 酶,混匀,于 37℃ 温育 1h~2 h;加入 300 μ L 的 5 mol/L NaCl 充分混匀;再加入 240 μ L CTAB/NaCl 溶液,混匀;于 65℃ 温育 15 min;加入等体积的酚/氯仿,混匀,10 000 r/min 离心 4 min~5 min;上清转入新管中,加入等体积的酚/氯仿混匀,10 000 r/min 离心 5 min;上清转入另一新管中,加入 0.6 体积异丙醇,轻摇混匀,15 000 r/min 4℃ 离心 10 min~15 min,弃上清;沉淀 DNA 用 70%乙醇 10 000 r/min 离心洗涤,弃上清,重复洗涤一次;干燥。用尽可能少的 TE 缓冲液重悬,立即使用或-20℃冰箱冻存备用。

也可将采集的待检样品用 DNA 提取试剂盒进行虫体 DNA 的制备。

4.4.2 PCR 扩增

采用 50 μ L 标准反应体系:引物 TFR3(5'-CGGGTCTTCCTATATGAGACAGAACC-3')和 TFR4(5'-CCTGCCGTTGGATCAGTTTCGTTAA-3')各 1.0 μ M;1 \times PCR 反应缓冲液;400 μ M dNTPs;1.5 mM MgCl₂;2U 热启动 Taq 聚合酶;5 μ l 待检样品 DNA 溶液,用双蒸水补足体积至 50 μ l。首先在 95℃ 预热 10 min 以活化热启动 Taq 聚合酶,扩增条件为 94℃ 变性 30 s,67℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,35 个循环,然后 72℃ 延伸 15 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

5 结果判定

5.1 在显微镜下观察到胎儿三毛滴虫即可判为阳性。

胎儿三毛滴虫呈纺锤形、梨形。体长 $8\ \mu\text{m}\sim 18\ \mu\text{m}$ 、宽 $4\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m}$ ，呈活泼的蛇形运动。虫体的鞭毛及波动膜运动时，才可察知其存在。活动的虫体不易看出鞭毛，运动减弱时可见鞭毛。

在姬姆萨染色液染色后的涂片中，虫体前半部有核，有一个不易观察到的胞质体和副基体。有鞭毛 4 根，3 根向前游离，与体长相等；1 根向后沿波动膜向虫体后端延伸，并延伸出虫体后部成游离鞭毛。波动膜有 3 个~6 个弯曲。虫体中央有一条纵走的轴柱，起始于虫体前端，沿体中线向后延伸，其末端突出于体后端。虫体前端与波动膜相对的一侧有半月状胞口。

5.2 PCR 扩增虫体 DNA 时，若样品能扩增出 347 bp 的特异性条带，可判定为阳性。

5.3 若显微镜检查为阴性，则选择 PCR 扩增虫体 DNA 进一步检查，仍为阴性时，结果判为阴性。

6 结果报告

根据结果判定，做出报告。

附录 A
(资料性附录)
标准中涉及的试剂配制方法

A.1 姬姆萨染色液

姬姆萨染料	0.5 g
甘油(中性)	25 mL
甲醇	25 mL

A.2 姬姆萨染色液稀释液

姬姆萨染色液 1 份加入 19 份新煮过的中性蒸馏水或 pH 7.2 的 PBS 中配成。

A.3 PBS(pH 7.2 0.01 mol/L)

NaCl	8.5 g
Na ₂ HPO ₄	1.1 g 或 Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 4.77 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.3 g 或 NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 0.34 g

加蒸馏水至 1 000 mL

A.4 CTAB 抽提液

2%(w/v)CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)
100 mmol/L Tris · Cl, pH 8.0
20 mmol/L EDTA, pH 8.0
1.4 mol/L NaCl
于室温保存(可在几年内保持稳定)。

A.5 CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB/0.7 mol/L NaCl)

在 80 mL 水中溶解 4.1 g NaCl, 缓慢加入 10 g CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)同时加热并搅拌。如果需要, 可加热至 65℃ 溶解。定容终体积至 100 mL。
