

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1949—2010

隐孢子虫卵囊检测技术 改良抗酸染色法

Modified acid-fast staining technique for detection of
Cryptosporidium spp oocysts

2010-09-21 发布

2010-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：南京农业大学、中国农业科学院上海兽医研究所。

本标准起草人：黄克和、陈甫、陈兆国。

隐孢子虫卵囊检测技术 改良抗酸染色法

1 范围

本标准规定了改良抗酸染色法(MAFS)检测隐孢子虫卵囊的操作技术和结果判定要求。

本标准适用于猪、牛、羊、兔、犬、鸡和鸭等动物(新鲜粪便样品或直肠采样)隐孢子虫感染的诊断与流行病学调查。

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 19489 实验室生物安全通用要求

中华人民共和国国务院令 2004年第424号 《病原微生物实验室生物安全管理条例》

农业部公告 2003年第302号 《兽医实验室生物安全管理规范》

3 试剂和器械

3.1 试剂

- 3.1.1 牛血清, -20℃保存。
- 3.1.2 隐孢子虫卵囊, 2.5%重铬酸钾溶液中4℃保存。
- 3.1.3 饱和蔗糖漂浮液或饱和盐水(见附录A)。
- 3.1.4 改良抗酸染色液(见附录A)。
- 3.1.5 0.1 mol/L PBS(见附录A)。
- 3.1.6 5%重铬酸钾溶液(见附录A)。
- 3.1.7 10%硫酸(见附录A)。
- 3.1.8 香柏油、二甲苯。

3.2 器械

- 3.2.1 普通生物显微镜。
- 3.2.2 漩涡混匀器。
- 3.2.3 微量移液器: 5 μL、200 μL、1 000 μL。
- 3.2.4 微量移液器头若干。
- 3.2.5 载玻片及盖玻片若干。
- 3.2.6 离心机(最高转速5 000 r/min, 最大相对离心力3 000 g)与离心管(20 mL、50 mL, 带盖)。

4 卵囊浓集与涂片

4.1 样品的保存和运送(见附录B)

4.2 卵囊浓集法

4.2.1 饱和蔗糖溶液漂浮法

4.2.1.1 穿上防护服, 戴上一一次性手套。取1 g~2 g待检样品(如成形的粪便, 包括粪便表面的和内部的部分; 如粪便是液体, 可以混匀后取1 mL~2 mL加入试管)加40 mL PBS, 研磨后经80目铜筛过滤

后,放入 50 mL 试管中混匀,1 500 g 离心 10 min。沉淀再用 PBS 洗涤一次,弃上清。

4.2.1.2 向沉淀中加入 10 mL 饱和蔗糖溶液,加入 20 mL 试管中,混匀,平衡后静置 10 min,置于离心管,放入离心机中,1 500 g 离心 10 min。

4.2.1.3 离心机停下后,缓慢拿出离心管,小心取出上清液,加入带盖的 50 mL 试管中,再加入 40 mL PBS,混匀,1 500 g 离心 10 min。沉淀再用 PBS 洗涤一次,沉淀加入 20 μ L PBS 混匀,待涂片用(室温)。

4.2.2 饱和盐水漂浮法

4.2.2.1 粪便的过滤、离心同 4.2.1.1。

4.2.2.2 向沉淀中加入 15 mL 饱和盐水,混匀,加入到 20 mL 试管中,平衡后静置 10 min,置于离心管放入离心机中,500 g 离心 10 min。

4.2.2.3 离心机停下后,缓慢拿出离心管,小心取出上清液,加入 100 mL 试管中与 80 mL 蒸馏水混匀,1 500 g 离心 10 min。沉淀加 80 mL 蒸馏水混匀,放入 100 mL 试管中混匀,1 500 g 离心 10 min。沉淀加入 20 μ L PBS 混匀,待涂片用。

4.3 涂片制备

4.3.1 每个载玻片均用铅笔进行标记,每个样品涂 2 个载玻片。在载玻片中心滴加约 3 μ L~5 μ L 牛血清。

4.3.2 取经上述方法获得的浓集液 10 μ L 滴于载玻片上与牛血清混匀,涂成直径大小为 1 cm 的圆,晾干。涂片过程中确保涂片是厚度均一、透明度一致。也可不进行卵囊浓集,用新鲜粪便样品直接涂片。

4.3.3 在室温下晾干干燥,火焰固定,置入乙醚中 3 min 去脂,晾干,置入甲醇中固定 3 min(甲醇固定的涂片在室温下晾干后可存放 6 个月)。

注:采用密度较大的液体,将卵囊漂浮在液体的上层而将卵囊集中起来,进而将卵囊从液体表面分离出来的方法称为卵囊浓集。因为卵囊的形态对于诊断具有重要意义,所以漂浮液不能仅仅具有密度大的特点,还必须保证卵囊在其中不会变形(涨大或皱缩)。饱和蔗糖溶液和饱和盐水都适合浓集隐孢子虫卵囊。

5 染色

5.1 用改良抗酸染色甲液染 2 min~5 min,蒸馏水或自来水冲洗后甩干。

5.2 在 10%硫酸中脱色 30 s~60 s,蒸馏水或自来水冲洗,再脱色,反复至涂片不再返色。

5.3 用改良抗酸染色乙液染 5 min,蒸馏水或自来水冲洗,自然干燥。

6 结果判定

用高倍显微镜(400 \times)观察涂片,隐孢子虫卵囊在黄绿至蓝绿色背景下为粉红色至紫红色的球形或卵圆形虫体。发现疑似卵囊后,应该在油镜(1 000 \times)下确诊。油镜下,卵囊呈鲜艳玫瑰红色,外周有一层发亮的卵囊壁;内有 4 个月牙形或逗点状结构即孢子,还有一团暗黑色颗粒状的残体,有的着色深,内部结构明显;有的着色淡,内部结构不够明显。检测效果(见附录 C 中图 C.1~图 C.5)。每张涂片连续观察 20 个视野,发现卵囊即为阳性。每个样品观察 2 张涂片。感染以每张涂片 20 个视野中(400 \times)的卵囊数表示。未发现卵囊者为阴性“—”。

在涂片上常见到与隐孢子虫卵囊大小相似的酵母,应注意区别。酵母通常呈长椭圆形,没有一层发亮的外壁,无结构,在较大的母细胞上生长着较小的子细胞,两者间呈藕节状连接。

7 注意事项

7.1 实验室应该易于清洁,表面要防渗水和耐化学药品。

7.2 实验室的生物安全管理应符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《兽医实验室生物安全管理规范》、GB 19489 的相关要求。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A. 1 磷酸盐缓冲液(PBS)配方

以下所用试剂均为分析纯。

A. 1.1 液(A液)

0.2 mol/L 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)溶液:称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

A. 1.2 液(B液)

0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g,(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g)加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A. 1.3 液

0.01 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲液的配制:0.2 mol/L A 液 14 mL,0.2 mol/L B 液 36 mL,NaCl 8.5 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

A. 2 5%重铬酸钾溶液(w/v)的配制

重铬酸钾 5.0 g,加蒸馏水定容至 100 mL。

A. 3 饱和蔗糖漂浮液

500 g 蔗糖加入 320 mL 蒸馏水,慢慢加热($<60^\circ\text{C}$),不断搅拌,直到蔗糖完全溶解。加入苯酚 6.7 mL 混合均匀,放在冰块或冰箱内直至其温度降到 4°C 。冷蔗糖溶液转移到一个玻璃瓶中,盖上盖子,贴好标签,标签上注明日期,并贮存于 4°C 直至使用。

A. 4 饱和盐水漂浮液

在烧杯中加入 20 g 氯化钠、200 mL 水,慢慢加热($<60^\circ\text{C}$),不断搅拌。待溶解后再加入少量的氯化钠(约 10 g),10 min 加一次,直到溶液变饱和。冷却后转入 500 mL 玻璃瓶中,盖上盖子,贴好标签,注明日期,并在 10°C 以上保存直至使用。

A. 5 脱色液——10%硫酸溶液的配制

浓硫酸 10 mL 缓慢加入蒸馏水 90 mL 中,混匀,冷却。

A. 6 改良抗酸染色液配制

甲液:石炭酸复红 4 g,95%乙醇 20 mL,苯酚 8 g,双蒸水 100 mL。

乙液:孔雀绿 0.2 g,蒸馏水 100 mL。

附 录 B
(规范性附录)
样本的保存和运送

B.1 取样工具

需要下列取样工具:棉拭子、封口袋和一次性手套。

B.2 采样方法

粪便样品直接从动物直肠用棉拭子采集;或采集新鲜粪便,装入封口袋。采样过程中样本间不得交叉污染,采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。每件样品必须标记清楚编号、样品名称、动物来源、采样时间、单位名称。标签纸要防水,字迹不易褪色。

B.3 样品保存

采集的样本在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h。长期保存须加入等体积 5%重铬酸钾溶液或 10%福尔马林溶液,装入消毒容器内(可用铝饭盒)4℃保存。阳性样品,发出报告后 15 d 方可无害化处理。

B.4 样本运送

样品运送应放在一个合适的防漏样品容器内,采用保温壶或泡沫箱加冰密封,应选择便利的交通途径,确保标本于 24 h 内到达实验室。所有样本应附有一份说明,其中包括样品提交人、样本来源地、动物种类、与动物有关的病史、测试要求以及联系方式等。

附录 C
(资料性附录)
对照图片和结果说明

C.1 特异性——阳性对照图片

样品经染色后,卵囊为粉红色至玫瑰红色的球形、卵圆形,颜色鲜艳,外周有一层发亮的卵囊壁,界限对比明显,少数卵囊内部有一白色小点。

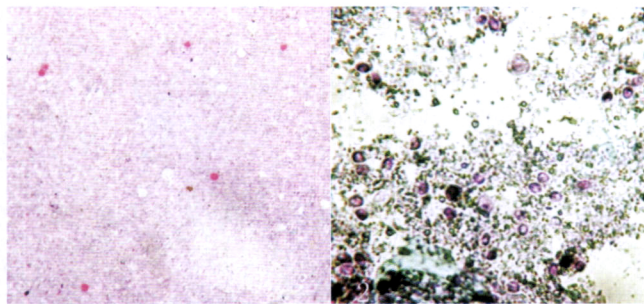


图 C.1

图 C.2

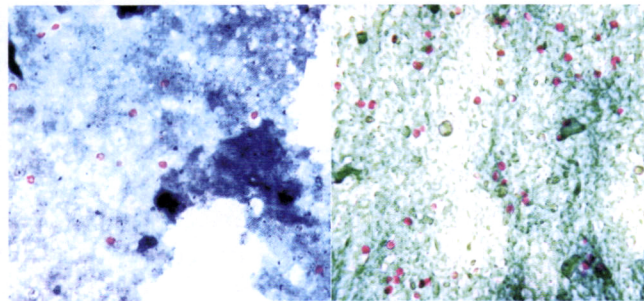


图 C.3

图 C.4

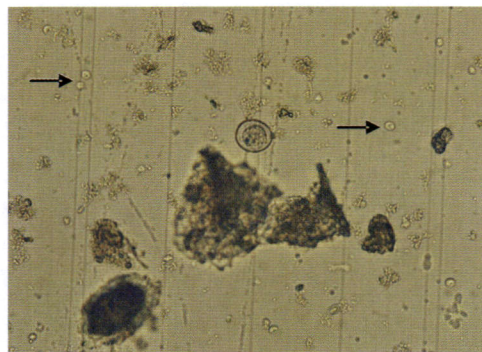


图 C.5

图 C.1: 为抗酸染色。隐孢子虫卵囊经甲液染色脱色后,在棕红色背景下呈玫瑰红色(40×);

图 C.2: 涂片脱色后未冲洗完全,加乙液复染后,隐孢子虫卵囊在淡绿色背景下呈棕红色(100×);

图 C.3: 涂片经 MAFS(孔雀石绿)染色后的隐孢子虫卵囊在蓝绿色背景下呈玫瑰红色(40×);

图 C.4: 经 MAFS(亮绿)染色后的隐孢子虫卵囊在绿色背景下呈玫瑰红色(40×);

图 C.5: 未染色的隐孢子虫卵囊(箭头所示,40×)。

C.2 灵敏度——检测域值

对 20 份鼠粪样品和 33 份奶牛粪样品分别用 MAFS、免疫荧光单克隆抗体(IFA-McAb)和 PCR 检测法进行检测,前两种方法均能检测到每克鼠粪中 2.0×10^3 个卵囊,而 PCR 法能检测到每克鼠粪中 20 个卵囊。但所获得的鼠粪样品、奶牛粪样品的检测阳性率在三种方法之间无显著性差异(见表 C.1)。

表 C.1 不同方法检测鼠粪与奶牛粪样品中隐孢子虫卵囊的检测域值和阳性率

方 法	检测域值,个/g 鼠粪	鼠粪样品的阳性率,%	牛粪样品的阳性率,%
MAFS	2.0×10^3	65.0(13/20)	21.21(7/33)
IFA-McAb	2.0×10^3	70.0(14/20)	18.18(6/33)
PCR	20	85.0(17/20)	27.27(9/33)

C.3 血清对 MAFS 检测效果的影响

卵囊浓集样品经 MAFS 染色表明,涂片时加血清法较不加血清法的检测域值高一个数量积,达到每克粪便中含有 2.0×10^3 个卵囊,而不加血清法的检测域值为每克粪便中含有 2.0×10^4 个卵囊。通过检测模型小鼠鼠粪样品表明,卵囊浓集后加血清涂片与不加血清涂片检测鼠粪样品的阳性率差异显著($P < 0.05$),见表 C.2。

表 C.2 不同涂片方法对 MAFS 检测效果的影响

方 法	检测域值,g	鼠粪样品的阳性率,%
卵囊浓集加血清	2.0×10^3	75(15/20) ^a
卵囊浓集不加血清	2.0×10^4	50(10/20) ^b
粪便直接涂片	—	70(14/20) ^a

注:“—”表示没有检测;同列数字右标字母不同表示差异显著($P > 0.05$)。

C.4 脱色剂对 MAFS 的影响

无论用 10%硫酸还是 3%盐酸酒精进行涂片脱色,均能达到理想的脱色效果。但在脱色的过程中,10%硫酸脱色速度更快,一次只需要 0.5 min,涂片颜色变化快,由紫红色变为淡黄色至白色;盐酸酒精脱色时,速度较慢,第一次需要 1.0 min~2.0 min,但是可以明显地看到紫红色顺着玻片的脱落过程。两者一般经 2 次~3 次反复脱色后均能达到很好的脱色效果。

C.5 固定剂对 MAFS 检测效果的影响

无论应用火焰、甲醇还是甲醛固定,鼠粪和奶牛粪样染色后的检测效率之间差异不显著($P > 0.05$),见表 C.3。

表 C.3 不同固定剂对 MAFS 检测效果的影响

固定方法	鼠粪样品的阳性率,%	奶牛样品的阳性率,%
火焰固定	75(15/20)	21.21(7/33)
甲醇固定	70(14/20)	21.21(7/33)
甲醛固定	75(15/20)	18.18(6/33)

C.6 冲洗时间对 MAFS 染色效果的影响

涂片经甲液染色后冲洗,冲洗时间对脱色效果影响不大;脱色后冲洗时间较短会使涂片背景颜色变淡(见图 C.2),冲洗时间多于 5 min 染色效果较好;而复染后冲洗时间较长也会使涂片的染色较淡,冲洗时间少于 5 min 染色效果较好。

C.7 诊断试验验证

对已经确认的 249 份隐孢子虫卵囊阳性样品和 42 份隐孢子虫卵囊阴性样品用 MAFS 进行了检测,结果见表 C.4。

表 C.4 粪便样品中隐孢子虫卵囊检测试验验证

检测技术		隐孢子虫卵囊		结果统计	
		+	-		
MAFS	+	真阳性(TP) 238	假阳性(FP) 11	检测阳性 TP+FP 249	阳性预测值 $PV+ = TP / (TP+FP)$ $= 238 / (238+11) = 95.6\%$
	-	假阴性(FN) 18	真阴性(TN) 24	检测阴性 FN+TN 42	阴性预测值 $PV- = TN / (FN+TN)$ $= 24 / (18+24) = 57.1\%$
合计		阳性 256	阴性 35	所有样品 TP+FP+FN+TN=291	
		敏感性 DSe=93.0% $TP / (TP+FN)$ 238 / (238+18)	特异性 DSp=68.6% $TN / (FP+TN)$ 24 / (11+24)	预测流行率=88.0% $(TP+FN) / (TP+FP+FN+TN)$ 256 / 291	