



中华人民共和国国家标准

GB/T 26618—2011

派琴虫病诊断操作规程

Protocol of diagnosis for Perkinsosis

2011-06-16 发布

2011-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 和附录 C 为资料性附录。

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归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、福建出入境检验检疫局、黄岛出入境检验检疫局、国家海洋环境监测中心、深圳出入境检验检疫局、上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吴绍强、林祥梅、刘建、郑腾、李西峰、梁玉波、刘荏、李建、韩雪清、贾广乐、梅琳。

引 言

派琴虫病是影响世界贝类养殖业发展的主要寄生虫病,为国际兽医局(OIE)规定的必报水生动物疫病之一。本病 1946 年首次报道,当时,引起美国路易斯安那州的墨西哥海湾的大批牡蛎(*Crassostrea virginica*)死亡。迄今为止,已发现派琴虫存在于美洲、欧洲、澳洲、亚洲和非洲五大洲的许多贝类体内,包括牡蛎、鲍鱼、蛤子、扇贝、珍珠牡蛎、鸟蛤和贻贝等体内,并在许多地区造成了严重的危害,死亡率高达 95%。

1997 年,我国在栉孔扇贝、虾夷扇贝、皱纹盘鲍、菲律宾蛤仔体内检测到派琴虫。美国 2005 年也从中国广西北海进口牡蛎中检出派琴虫。目前,派琴虫已经成为影响我国贝类养殖业发展的主要病原之一。据对黄海北部三个海域的菲律宾蛤仔的派琴虫感染状况进行调查的结果表明,除 3 月份和 6 月份的感染率分别为 95%和 90%之外,其他月份感染率均为 100%。

目前,派琴虫感染的诊断通常依靠 OIE 推荐的组织切片法、FTM 组织培养法以及 PCR 方法。组织学方法可以通过显微镜下直接观察虫体或观察组织损伤来监测感染的分布情况。FTM 培养派琴虫休眠孢子的方法是将派琴虫滋养体进行培养,培养后,虫体体积增大、细胞壁增厚,而且不繁殖,是一种传统有效的定量检测派琴虫的方法。实时荧光 PCR 检测贝类派琴虫的方法敏感度较高,而且特异性强,检测可在一天之内完成,定量准确、全封闭反应等优点。

派琴虫病诊断操作规程

1 范围

本标准规定了派琴虫病诊断时的样品采集,虫体培养及显微镜检查,PCR 以及荧光 PCR 检测操作规程。

本标准适用于蛤仔、牡蛎等水生动物及其产品中携带海洋派琴虫(*Perkinsus marinus*)、奥尔森派琴虫(*Perkinsus olseni*)等派琴虫的诊断,也可用于派琴虫病的监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

派琴虫病 Perkinsosis

帕金森病

由海洋派琴虫(*P. marinus*)、奥尔森派琴虫(*P. olseni*)等在宿主血细胞内寄生或者游离在结缔组织、鳃、内脏或套膜上皮中而引起的水生动物的一种严重的寄生虫病。

注:除 *P. marinus*、*P. olseni* 之外,病原还包括 *P. qugwadi*、*P. chesapeaki*、*P. andrewwi* 和 *P. mediterraneus*。

3.2

Ct 值 cycle threshold

荧光 PCR 反应中,荧光信号到达设定的阈值所经历的循环数。

4 材料

除另有规定外,所用化学试剂均为分析纯。

试验用水要求达到 GB/T 6682 中一级水的要求。

- 4.1 液体巯基乙酸盐培养基(fluid thioglycollate media,FTM):具体配制方法见附录 A。
- 4.2 卢戈氏碘液(Lugol's iodine):配制方法见附录 A。
- 4.3 2.5% 氯霉素:配制方法见附录 A。
- 4.4 1% 制霉菌素:配制方法见附录 A。
- 4.5 酚-三氯甲烷抽提法所需要的相关试剂或其他 DNA 抽提试剂盒,见附录 A。
- 4.6 10×PCR buffer,25 mmol/L MgCl₂、dNTP(2.5 mmol/L 或 10 mmol/L)、5 U/μL rTaq DNA 聚合酶等,均为商品化试剂盒中成分。
- 4.7 琼脂糖。
- 4.8 电泳缓冲液:配制方法见附录 A。
- 4.9 引物及探针:包括 PCR 引物及荧光 PCR 引物和探针。

5 设备

- 5.1 低温培养箱:能够进行 22 ℃~24 ℃培养。
- 5.2 生物显微镜。
- 5.3 -20 ℃普通冰箱、-70 ℃的超低温冰箱、4 ℃冰箱。
- 5.4 组织研磨器。
- 5.5 高速冷冻离心机。
- 5.6 PCR 扩增仪。
- 5.7 荧光 PCR 扩增仪。
- 5.8 电泳仪。
- 5.9 凝胶成像仪或紫外透射仪。
- 5.10 水浴锅。

6 派琴虫的检测方法

6.1 采样

6.1.1 采样点的选择

按照 GB/T 18088 规定方法进行。应根据实际情况,一个区域的一个种群至少选取 3 个采样点,大范围的几块不连续地区或者养殖易感品种的区域,应增加采样点。

6.1.2 采样技术要求

6.1.2.1 有临床症状的贝类

牡蛎感染派琴虫的症状表现为消化腺发白,贝壳不能闭合,套膜收缩,性腺发育受到抑制、偶尔也会出现脓肿,身体严重衰弱,生长迟缓等。采样时,至少挑选 10 条濒死的或可疑的个体。采样时贝类应当是活的,贝类应当在活体或杀死后分别包装放在冷藏的容器中送到实验室。所采集的贝类样品应避免冰冻。主要采集贝类的鳃、套膜、消化腺、闭合肌等。

6.1.2.2 无临床症状的贝类

当养殖场的个体有怀卵时,应每年在产卵期采集一次精液或卵液。如怀卵群体由不同年龄的贝类个体组成,应选取两岁龄的贝类采样。样品应包括该地所有的易感品种。每次采样的贝类数量要以感染率等于或大于 2% 时检出的概率进行抽样。通常情况是至少采集 150 个贝类。

对无临床症状的贝类,取其鳃、套膜、消化腺、闭合肌等。

6.1.2.3 监测目的的采样

监测时间应选在一年中最能观察到临床症状并能检测到该虫的季节。采样数量参见 6.1.2.2。

6.1.2.4 样品保存及运送

采取的样品应在取样后 24 h 内,冷藏送入实验室,要附有标签,清楚标明采样地点、来源和养殖历史,实验室内冷藏保存备检。

6.2 虫体培养

6.2.1 样品的选择

选取垂死的新鲜贝类样品。

6.2.2 样品前处理

将贝壳弃掉,置于灭菌的研钵,剪刀剪至 1 mm~3 mm 大小。

6.2.3 样品的培养

将样品分别置于含 5 mL FTM 培养基的灭菌试管中,加 250 μL 2.5% 的氯霉素摇匀,用 1 mL 1% 制霉菌素覆盖在液面,盖好盖子,22 ℃~24 ℃低温培养箱中暗室培养 4 d~7 d。

6.2.4 样品的纯化

将培养后的样品 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加 6 mL 2 mol/L NaOH, 涡旋混匀后置于 60 °C 烘箱内消化过夜。4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加 2 mL ddH₂O 洗涤, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重复上述步骤 2 次~4 次。

6.2.5 染色镜检

将纯化的样品置于 2 mL ddH₂O 中摇匀, 加入 80 μL 卢戈氏碘液染色后, 取 40 μL 于载玻片上, 盖上盖玻片后, 在显微镜(10×10)下顺序观察。

6.2.6 结果判断

显微镜下, 经过 FTM 培养后, 派琴虫发育为休眠孢子, 呈圆形, 蓝黑色, 直径大多在 30 μm~80 μm。形态参见附录 B。

6.3 PCR 检测

6.3.1 材料

选取活的或刚死的贝类的鳃组织, 也可采用乙醇或者低温保存的贝类鳃组织样品。

6.3.2 操作步骤

6.3.2.1 DNA 的提取

取 25 mg 样品, 剪碎后见附录 A 中提取组织 DNA 的方法提取基因组 DNA, 也可采用商品化的组织基因组 DNA 提取试剂盒进行。除检测样品外, 需要设立如下对照:

- 取已知感染派琴虫的贝类组织作为阳性对照;
- 取未患病的贝类组织作为阴性对照;
- 空白对照。

6.3.2.2 引物

上游引物: 5'-CCGCTTTGTTTGGMTCCC-3'

下游引物: 5'-ACATCAGGCCTTCTAATGATG-3'

PCR 预期扩增派琴虫属的 ITS 区域片段长度为 666 bp~672 bp(具体序列参见附录 C), 引物合成后均采用灭菌 ddH₂O 均稀释为 10 μmol/L, -20 °C 保存备用。

6.3.2.3 反应体系

在 PCR 管内, 加入 10×PCR buffer 2.5 μL、5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL、10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、模板 DNA 10 μL、补充 ddH₂O 至 25 μL。

PCR 操作时, 取等体积的 ddH₂O 代替 DNA 模板作为空白对照。

6.3.2.4 扩增程序

95 °C 预变性 4 min; 之后 95 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 65 °C 延伸 3 min, 共 40 个循环; 最后 65 °C 补充延伸 5 min。

6.3.2.5 琼脂糖电泳

取 5 μL PCR 扩增产物, 在 1×电泳缓冲液内进行 1%~2% 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后, 用紫外灯或凝胶成像仪观察是否扩增出预期大小的特异性 DNA 片段。

6.3.3 结果判定

6.3.3.1 试验成立的条件

阳性对照有预期大小的扩增条带, 阴性对照及空白对照没有相应片段的 PCR 产物。否则试验无效。

6.3.3.2 样品检测结果

在阳性对照、阴性对照、空白对照都成立的前提下, 若检测样品有预期大小的条带, 则 PCR 结果阳性, 若检测样品无预期大小的条带, 则 PCR 结果阴性。

6.4 实时荧光 PCR 检测

6.4.1 实验材料与 DNA 提取

材料与 DNA 的提取以及阴、阳性对照及空白对照的设置同 PCR 操作部分。

6.4.2 操作步骤

6.4.2.1 引物与探针设计

上游引物: 5'-CAAACCTCTCAACGATGGATGCC-3'

下游引物: 5'-TGCAAATCGCAGTGCTTATCG-3'

TaqMan 荧光探针: 5'-FAM-ACTTCGCTGCGTCCTTCATCGATTCTCG-ECLIPSE-3'

引物和探针合成后均采用灭菌 ddH₂O 稀释为 10 μmol/L。扩增片段长度为 78 bp(具体序列参见附录 C)。

6.4.2.2 反应体系

取 10 μL 组织基因组 DNA 作为模板, 加入按照表 1 配制的荧光 PCR 反应液中:

表 1 荧光 PCR 反应液配制

试 剂	体积/μL
10×PCR 缓冲液(Mg ²⁺ Free)	2.5
25 mmol/L MgCl ₂	5.0
2.5 mmol dNTP	2
上、下游引物及探针(均为 10 μmol/L)等体积混合液	1.5
5U/μL Taq DNA 聚合酶	0.5
灭菌 ddH ₂ O	3.5

6.4.2.3 扩增程序

95 °C 预变性 3 min; 然后按照如下程序进行反应: 95 °C 变性 15 s, 57 °C 退火 1 min, 45 个循环, 每个循环结束后采集 FAM 通道数据。

6.4.3 结果判定

6.4.3.1 试验成立判定

反应结束后, 仪器将自动给出每个样品的 Ct 值。记录 Ct 值, 分析检测结果。

只有阳性对照有扩增曲线, 而且 Ct ≤ 35; 同时阴性对照无扩增曲线或者扩增曲线 Ct > 40 的, 才可判定本次试验成立, 否则本次试验无效。

6.4.3.2 阳性判定

如果样品的 PCR 扩增曲线 Ct ≤ 35, 则荧光 PCR 检测阳性。

6.4.3.3 阴性判定

如果样品无扩增曲线或者扩增曲线 Ct ≥ 40, 则荧光 PCR 检测阴性。

6.4.3.4 可疑判定

如果 35 < Ct < 40, 判为可疑。此时可对样品重复进行荧光 PCR 检测, 如果样品重复检测的 PCR 扩增曲线 Ct ≤ 35, 则判为荧光 PCR 检测阳性; 如果样品重复检测时无扩增曲线或者扩增曲线 Ct ≥ 40, 则判为荧光 PCR 检测阴性。

7 检测结果综合判定

FTM 培养发现虫体, 应采用 PCR 或荧光 PCR 进行确诊。在 PCR 结果可疑的情况下, 取 PCR 产物进行测序即可确诊。

附录 A
(规范性附录)
样品 DNA 抽提及溶液配制

A.1 样品 DNA 的抽提

A.1.1 取新鲜贝类的消化腺上皮、腮、触须等组织 25 mg 置于冰冷的生理盐水中反复冲洗，滤纸吸干表面水分后称重，置于匀浆研磨器中并加入冷的生理盐水，进行手工匀浆研磨。注意整个过程在冰上完成。

A.1.2 将匀浆液倒入 1.5 mL 离心管中，加 20 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL)，再加 SDS 至终浓度为 1%，上下颠倒混匀。

A.1.3 混合液置于 55 $^{\circ}$ C 水浴锅内水浴 2.5 h。

A.1.4 向匀浆液中按 1 : 1 比例加入酚+三氯甲烷+异戊醇混合液(25+24+1)，上下颠倒混匀，12 000 r/min 离心 5 min。

A.1.5 转移上层水相，加入等体积三氯甲烷+异戊醇混合液，上下颠倒混匀，12 000 r/min 离心 5 min。

A.1.6 转移上层水相，加入两倍体积的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 至过夜。

A.1.7 12 000 r/min 离心 5 min，沉淀 DNA，倾去上清液。

A.1.8 于沉淀中加入 75%乙醇溶液 500 μ L，轻轻混匀后 12 000 r/min 离心 5 min，倾去上清液，室温凉干。

A.1.9 用 20 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

组织 DNA 提取也可采用等效的商品化 DNA 提取试剂盒，按照说明书进行操作。

A.2 电泳缓冲液的配制

50 倍 TAE 电泳浓缩缓冲液配制方法为：取 Tris 碱 242 g、冰醋酸 57.1 mL、0.5 mol/L EDTA 10 mL、用 5 mol/L 的 HCl 调制 pH8.0，定容至 1 000 mL。用前采用蒸馏水 50 倍稀释即可。

A.3 液体巯基乙酸盐培养基(FTM)的配制

称取巯基乙酸盐 29.75 g，放入 1 L 蒸馏水，在微波炉中加热，直到变成金黄色透明液为止，冷却后，分装于 10 mL 的培养试管中，每管 5 mL，高压灭菌，冷却后，用锡箔纸包裹，放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

A.4 卢戈氏碘液的配制

取 6 g 碘化钾(KI)溶于 20 mL ddH₂O 中，搅拌到溶解后，加入 4 g 碘，等碘充分溶解，再加入 80 mL 蒸馏水，贮存在棕色试剂瓶内待用。

A.5 2.5%氯霉素配制

2.5 g 氯霉素溶解于 100 mL ddH₂O 中，贮存在试剂瓶内，放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

A.6 1%制霉菌素的配制

1 g 制霉菌素溶解于 100 mL ddH₂O 中，贮存在试剂瓶内，放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

附录 B
(资料性附录)
派琴虫形态

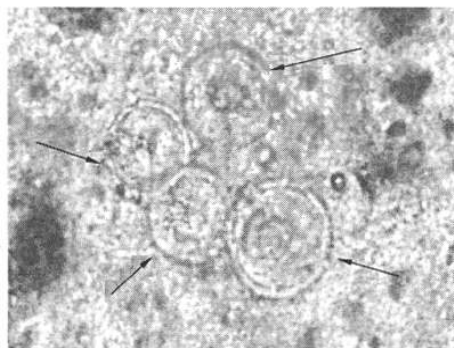


图 B.1 未染色的派琴虫休眠孢子(箭头所指)

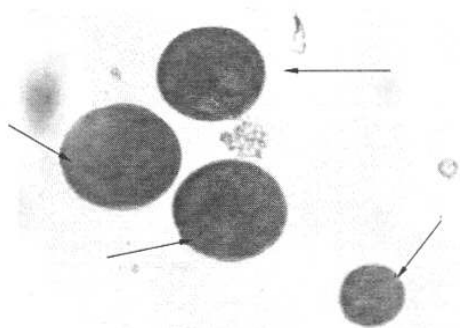


图 B.2 经卢戈氏碘液染色后的派琴虫休眠孢子(箭头所指)

附 录 C
(资料性附录)

派琴虫 PCR 及荧光 PCR 目标扩增序列

C.1 海洋派琴虫 PCR 扩增参考序列

CCGCTTTGTTTGGATCCCCCACCTTAACTTGTTAAGGTGATTAATTCCTATGAACCATTG
TACTAGTCATAGTATCCAAATCCAAATTTGGATTTTGGTATTTCAAAACGAAATTCAAA
CTCTCAACGATGGATGCCTCGGCTCGAGAATCGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAAGC
ACTGCGATTTGCAGAATTCCTGTAACCAGTAGAAATCTCAACGCATACTGCACAAAGGGG
ATCTTTCTCTTTGTACATACATATCAGTGTCTGCTCTTCTTCCCGATACAAACATTTTGTT
GTTAACGCAACTCAATGCTTTGTATCCCGCTTGAACCTACTCTTCGGAGGTGGTTTCGTTAT
GTGCGCTTGTGAAGGCAGGCGTATTAATTTGCAAGGCTATAATCTCGTATTGTAGCCCCTC
CGAAAGGAGGCTTGCGCTGTGAGTATCTCTCGAGGTAAGTTCGAAACTCGACTGTGTTGTG
GTGATATCACGTGTTTCCTTGATCACGCGATTCTTCTCTTCAACGCATTACGTCAAATCTAT
TGATAAATGCAGAGAAGTGTGTTGAATCACGCGTTCAGTCTGGTTCGCGAGATTATTATATA
TCATAACACGCTTGTCGGTTGCACCATGGCAATATGTCATCATTAGAAGGCCTGATGT

C.2 奥尔森派琴虫 PCR 扩增参考序列

CCGCTTTGTT TGGATCCCC CACCTGACCA CTCIAACGAG TCGTGTCAAG TGATTATCTC
CTATGAACCA TTGACTAGT CACAGTATCC AAATCCTTTT GGATTTTGGT ATTTCAAAAC
GAAATTCOA AACTCTCAACG ATGGATGCCT CGGCTCGAGA ATCGATGAAG GACGCAGCGA
AGTGCGATAA GCACTGCGAT TTGCAGAATT CCGTGAACCA GTAGAAATCT CAACGCATAC
TGCACAAAGA GGATCTTTCC TCTTTGTACA TACATATCAG TGTCGCTCTT CTCCCGATA
CAAACATTTT GTTGTAAACG CCACTCAATG CTTTGTATCC CGCTTGAGCT AGCTCTTCGG
AGATAGTTCG TTATGTGCGC TTGTGACGGC AGGCGTATTA AGTTGCAAGG CTATAATCTT
GTATTGTAGC CCTCCGAAA GGAGGATCGC GCCTGTGAGT GTCTGTGGAT GCTCGCAAGT
CCGACTGTGT TGTGGTGATA TCACGTGTTT CTTGATCACG CGATTCTTCT CTTCAACGCA
TTATGTCAAT TCTTGATGAA TGCAGAGAAG TGTGTTGGGTC ACGCGTTCAG TCTGGTTCGG
AGATAGTTAT ATATCATAGC ACGCTTGTCG GTTTGCACCA TGGCAAATTG TCATCATAG
AAGGCCTGAT GT

C.3 荧光 PCR 目标扩增序列

CAAACCTCTCAACGATGGATGCCTCGGCTCGAGAATCGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGAT
AAGCACTGCGATTTGCA
