

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3993—2014

箭毒蛙壶菌感染检疫技术规范

Quarantine protocol for infection with *batrachochytrium dendrobatidis*

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准非等效部分采用世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疾病诊断手册》(2012 版)第 2.1.1 章等有关章节。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:谢明星、彭小莉、石建平、刘棠、王群力、陈双雅、陈伟玲、许秋贝、孙福泉、王景明。

箭毒蛙壶菌感染检疫技术规范

1 范围

本标准规定了箭毒蛙壶菌感染的临床诊断、实时荧光聚合酶链式反应检测方法。
本标准适用于箭毒蛙壶菌感染的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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 出入境动物检疫采样

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- bp:碱基对(base pair)
- DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
- dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)
- FAM:荧光报告基团(Carboxyfluorescein)
- MGB:荧光淬灭基团(Minor groove binder)
- Real-time PCR:实时荧光聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction)
- Taq:水生热栖菌(*Thermus aquaticu*)

4 仪器和试剂

4.1 仪器

- 4.1.1 冷冻离心机。
- 4.1.2 -20℃低温冰箱。
- 4.1.3 组织匀浆器。
- 4.1.4 实时荧光 PCR 反应管。
- 4.1.5 实时荧光 PCR 仪。
- 4.1.6 高压灭菌器。
- 4.1.7 紫外分光光度计。

4.2 试剂

- 4.2.1 水应符合 GB/T 6682 中一级水规定。
- 4.2.2 含有箭毒蛙壶菌的 DNA 或含有扩增区域序列的质粒。
- 4.2.3 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix(含 dNTP、Taq 聚合酶和 PCR 反应缓冲液等)。

4.2.4 蛋白酶 K、酚/三氯甲烷/异戊醇混合液(25 : 24 : 1)、三氯甲烷/异戊醇混合液(24 : 1)、75%乙醇和 TE 缓冲液(见 A.1)

5 临床诊断

一般认为所有的两栖类均可感染,包括无尾目(青蛙和蟾蜍)、有尾目(蝾螈、水螈、鳗螈)和蚓螈目(真蚓)所有成员。目前发现有 14 科 250 种以上两栖动物感染箭毒蛙壶菌感染。箭毒蛙壶菌感染在大多数情况下没有明显的临床症状,只有那些快要死亡的动物表现明显。患病的成体蛙类腹部、髁部、腿部皮肤出现弥散性红肿、局部轻度增厚和变色症状,后肢抽搐、身上积聚脱下的皮、脚部及其他部分的浅表皮脱落、皮肤出现轻微粗化及细小的溃疡或出血。患者行为上表现无力、厌食、精神沉郁、不能找到遮蔽处、不能逃跑、失去正常的反射作用及出现不正常姿势等神经症状。蝌蚪的口器变形和角质化可作为箭毒蛙壶菌感染的检测依据。

6 实时荧光 PCR 反应

6.1 采样

根据 GB/T 18088 的要求采集成年蛙的脚趾和腹部的皮肤、蝌蚪的口器、成年蛙腹部的皮肤和蝌蚪口器的棉拭子或蛙和蝌蚪浸泡液(见 A.2)等。将感染的蛙放入含有浸泡液的容器中浸泡 15 min 用于检测。在进行大规模的流行病学调查时可将不超过 5 条蛙病料混合在一起作为一个检样进行检测。最佳的器官和组织是成年蛙的腹部皮肤和脚趾,蝌蚪的口器。

6.2 核酸提取

用经典的酚三氯甲烷萃取法(见附录 B)或商业化 DNA 提取试剂盒。

6.3 引物和探针

引物序列:

ITS1-3: 5'-CCT-TGA-TAT-AAT-ACA-GTG-TGC-CAT-ATG-TC-3'

5.8S: 5'-AGC-CAA-GAG-ATC-CGT-TGT-CAA-A-3'

探针序列:

5'-FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGB-3'

6.4 PCR 扩增体系

PCR 扩增在标准的 25 μL 的反应体系中进行,每个反应体系应设置三个平行反应。包括:

TaqMan Fast Universal PCR Master Mix(2 \times)	12.5 μL
ITS1-3 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
5.8S 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
DNA 模板(20 ng/L~100 ng/L)	2.5 μL
补水至 25 μL 。	

6.5 PCR 反应条件

实时荧光定量 PCR 反应包括以下步骤:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环 45 次。

6.6 对照的设置

6.6.1 阳性对照:含有箭毒蛙壶菌的 DNA 或含有扩增区域序列的质粒。

6.6.2 阴性对照:不含有 DNA 模板样品的 PCR 反应扩增体系。

6.7 结果判定

6.7.1 阴性对照:无扩增曲线,无荧光增幅现象。

6.7.2 阳性对照:有扩增曲线,Ct 值小于或等于 30。

6.7.3 在阳性对照、阴性对照均成立的条件下,三个平行测试样品一致时,Ct 值小于或等于 39 判定为箭毒蛙壶菌实时荧光 PCR 检测阳性;Ct 值大于或等于 42 判定为箭毒蛙壶菌实时荧光 PCR 检测阴性;测试样品 Ct 值介于 $40 \leq Ct \leq 41$ 之间,应调整模板浓度,重新进行实时荧光 PCR,再次扩增后 Ct 值小于 42 判定为箭毒蛙壶菌实时荧光 PCR 检测阳性;若三个平行测试样品不一致时,需重新进行检测。

7 综合判定

临床诊断仅作为疑似箭毒蛙壶菌感染,本病的确证仍需进行实时荧光 PCR 检测,根据实时荧光 PCR 检测结果综合判定。

SN/T 3993—2014

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 TE(Tris-HCl、EDTA)缓冲液

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	10.0 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	2.0 mL

加水溶解至 1 000.0 mL,分装后高压灭菌备用。

A.2 浸泡液

储存液 A:

KH_2PO_4	136.0 g
--------------------------	---------

K_2HPO_4	174.2 g
--------------------------	---------

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	132.1 g
-------------------------------	---------

加水溶解至 1 000.0 mL

储存液 B:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.8 g
---	--------

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	50.8 mg
---	---------

加水溶解至 500.0 mL,用 KOH 调 pH 至 7.0。

现用时取 0.5 mL 储存液 A 和 0.1 mL 储存液 B,加水至 1 000.0 mL。

A.3 CTAB 裂解液

聚乙烯吡咯烷酮(K30)(PVP)	20.0 g
-------------------	--------

二乙胺基二硫代甲酸钠(DIECA)	1.0 g
-------------------	-------

NaCl	81.7 g
------	--------

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	100.0 mL
--------------------------	----------

0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	4.0 mL
------------------------	--------

加水溶解至 1 000.0 mL,分装后高压灭菌,4℃保存备用。使用时加入 0.2%(体积分数)的β-巯基乙醇。

附 录 B
(规范性附录)
DNA 提取方法

B.1 样品处理

采集成年蛙的脚趾和腹部的皮肤、蝌蚪的口器或成年蛙腹部的皮肤等,置于匀浆研磨器中并加入液氮,进行手工充分研磨至粉末状。

B.2 DNA 的抽提

B.2.1 按照 0.2 g 样品加入 1 mL 的比例加入 55 ℃ 预热的 2% CTAB 裂解液(见 A.3),加 20 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),上下颠倒混匀。

B.2.2 混合液置于 55 ℃ 水浴,水浴 2.5 h,期间可适当每 10 min 摇匀一次。

B.2.3 向匀浆液中按 1 : 1 比例加酚/三氯甲烷/异戊醇混合液(25 : 24 : 1),轻轻振荡混匀 5 min,12 000 g 离心 5 min。

B.2.4 吸上层水相 800 μL 于灭菌离心管中,加入等体积三氯甲烷/异戊醇混合液(24 : 1),轻轻振荡混匀 5 min,12 000 g 离心 5 min。

B.2.5 吸上层水相 500 μL 于灭菌离心管中,加入两倍体积的无水乙醇,−20 ℃ 放置 2 h 或液氮中放置 5 min。

B.2.6 12 000 g 离心 5 min,沉淀 DNA,倾去上清液。

B.2.7 于沉淀中加入 75%乙醇溶液 500 μL,轻轻混匀后 12 000 g 离心 5 min,倾去上清液,室温晾干。向 DNA 沉淀中加 200 μL TE 缓冲液溶解。采用紫外分光光度法测定 DNA 浓度,OD 值的范围应该在 0.05~1 之间,且所用 DNA 溶液的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.7~2.0。