



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3488—2013

猪劳森氏胞内菌荧光 PCR 检疫技术规范

Quarantine protocol for real-time PCR of *Lawsonia intracellularis*

2013-03-01 发布

2013-09-16 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国四川出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈世界、杨苗、田绿波、林华、严玉宝、胡娟、薛昌华、余华、郭杨。

猪劳森氏胞内菌荧光 PCR 检疫技术规范

1 范围

本标准规定了猪劳森氏胞内菌荧光 PCR 检疫的技术要求。

本标准适用于猪劳森氏胞内菌的检测。

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

SN/T 2123 出入境动物检疫实验样品采集、运输和保存规范

3 仪器和试剂

3.1 主要仪器

荧光定量 PCR 仪、高速冷冻离心机、旋涡混匀器、恒温循环水浴槽、低温冰箱、可调单头微量移液器(0.1 μL ~2.5 μL 、0.5 μL ~10.0 μL 、10 μL ~100 μL 、20 μL ~200 μL)。

3.2 主要试剂

Qiagen 动物粪便 DNA 提取试剂盒¹⁾;Qiagen 动物血液与组织 DNA 提取试剂盒¹⁾;ABI 或者 Bio-Rad 荧光定量 PCR 反应预混液¹⁾;除非特别指定,本标准试验用水均为满足 GB/T 6682 的三级水。

荧光 PCR 扩增所用的引物和探针的序列见表 1。

表 1 引物和 TaqMan 探针

引物和探针	序列	长度/bp	T _m 值/℃	GC 含量/%
上游引物	5'-GAGCACGATTACAAATTGCTTCA-3'	23	51.7	39
下游引物	5'-TGCTATCTCTGCTGCATGTAATGA-3'	24	54	42
TaqMan 探针	5'-FAM-TCCCTGCACCTCCTTGAATACAATCCACA-TAMRA-3'	29	61.5	48

4 样品的采集、运输和保存

4.1 粪便样品的采集及保存

采集的样品最好是在动物使用抗菌药物之前,从直肠内采集的新鲜粪便。少量采集时,以灭菌的棉

1) 本标准中列出商品名,是 Qiagen、ABI 或 Bio-Rad 公司提供的适合的市售产品的实例,给出这些信息是为了方便本标准的使用者,并不代表对这些产品的认可。

拭子从直肠深处蘸取粪便,并立即投入灭菌的试管内密封,或在试管内加入少量样品保存液(pH=7.4的磷酸缓冲液)后密封。采集较多量的粪便时,可将动物肛门周围消毒后,用带上胶手套的手伸入直肠内取粪便,也可用压舌板插入直肠,轻轻用力下压,刺激排粪,收集粪便。所收集的粪便装入灭菌的容器内,密封并贴上标签。样品采集后于4℃冷藏保存,然后立即运送至实验室(夏季不超过24 h,冬季不超过2 d)。短时间不能送达的样品应于-20℃冷冻保存。样品运送时应保持冷冻状态,并防止倾倒。送达实验室后,若暂时不进行处理,则应冷冻(以-70℃或以下为宜)保存,不应反复冻融。

4.2 肛拭子采集

每个灭菌离心管中加入1 mL样品保存液(pH=7.4的磷酸缓冲液)。用灭菌的棉拭子插入肛门,转动至少3圈,蘸取粪便。之后立即将拭子浸入样品保存液中,剪去露出部分,盖紧离心管,贴上标签,密封低温保存。

4.3 病变肠组织样品的采集

采集增生、出血的病变小肠肠管约6 cm长。已死亡的动物应尽快采集(夏天不应超过2 h,冬天不超过6 h),采集的动物病料必须新鲜,尽可能减少污染。样品组织应置于样品袋中,贴上标签,4℃冷藏保存和运输。如病料不能立即进行检验,或须寄送到外地检验时,应加入适量的样品保存剂(饱和盐水或30%甘油缓冲液),容器加塞封固。

4.4 其他采样技术

病变样品的采集参见附录A。本标准未界定的采样、运输及保存技术按照SN/T 2123。

5 DNA提取

使用商品化试剂盒提取相应样品的DNA。

6 实时荧光PCR检测方法

6.1 对照设立

6.1.1 阳性对照

用已知猪劳森氏胞内菌阳性组织制备的DNA模板。

6.1.2 阴性对照

用已知猪劳森氏胞内菌阴性组织制备的DNA模板。

6.1.3 空白对照

用等体积的水代替DNA模板。

6.2 扩增反应体系

实时荧光PCR扩增反应体系见表2。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	每管加入量/ μL
$2\times$ 荧光定量 PCR 反应预混液	$1\times$	12.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.6 $\mu\text{mol/L}$	1.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.6 $\mu\text{mol/L}$	1.5
10 $\mu\text{mol/L}$ TaqMan 探针	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
待测样品 DNA 模板	—	1
灭菌超纯水	—	7.5
反应总体积	—	25

6.3 反应程序

实时荧光 PCR 反应程序见表 3。

表 3 实时荧光 PCR 反应程序

反应步骤	时间/s	温度/ $^{\circ}\text{C}$
第一步	120	50
第二步	600	95
第三步 (40 个循环)	15	95
	60	60(收集荧光信号)

7 结果判定

7.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定的原则是根据检测时的噪音情况进行调整。通常以 3 个~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,阈值线原则上以大于样本的荧光背景值和阴性对照的荧光最高值为准。不同仪器应根据厂商提供的设定程序进行调整。

7.2 质控标准

7.2.1 阴性对照

无 Ct 值并且无扩增曲线。

7.2.2 阳性对照

Ct 值应 ≤ 35.0 ,并出现特定的扩增曲线。

7.2.3 有效原则

如阴性对照和阳性对照不满足以上条件,此次试验视为无效。

SN/T 3488—2013

7.3 结果描述及判定

7.3.1 阴性

无 Ct 值并且无扩增曲线,表明样品中无劳森氏胞内菌病原。

7.3.2 阳性

Ct 值 ≤ 35.0 ,且出现特定的扩增曲线,表示样本中存在劳森氏胞内菌病原。

7.3.3 可疑

Ct 值 > 35.0 的样本建议重做。重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。



附录 A

(资料性附录)

猪增生性肠病相关资料

A.1 疾病概述

A.1.1 猪增生性肠病

猪增生性肠病(Porcine Proliferative Enteropathy;PPE),又称猪增生性肠炎(Porcine Proliferative Enteritis)、猪回肠炎(Porcine Ileitis)、猪增生性肠道病(Porcine Bowl Disease)、猪肠腺瘤样病(Porcine Intestinal Adenomatosis)、猪增生性出血性肠炎(Porcine Proliferate Haemorrhage Enteritis,PHE)等,该病病原是一种由专性劳森氏胞内菌(*Lawsonia intracellularis*)引起的猪小肠粘膜腺窝内未成熟的上皮细胞发生腺瘤样增生为特征的猪的接触性肠道传染病。该病是猪的一种接触性肠道传染病,是由于大量胞内劳森菌定居于未成熟的肠上皮细胞中,导致细胞大量增生。Guedes 等研究显示,急性感染母猪血清抗体可持续 12 周,亚临床感染育肥猪血清抗体可持续 2 周~3 周。1931 年美国首次报道该病,至今已呈现全球性流行。世界许多国家和地区,如澳大利亚、墨西哥、加拿大、意大利、丹麦、比利时、巴西、阿根廷、韩国等均有发病报道。虽然猪增生性肠病死亡率不高,但因严重影响病猪生长,延迟上市时间,是一种对经济效益有危害的重要世界性疾病。我国也已证明有该病存在。

A.1.2 病原

劳森氏胞内菌(*Lawsonia intracellularis*;LI),又称劳氏胞内菌、胞内劳森菌、胞内罗索尼菌等,是一种专性胞内寄生细菌,主要寄生在病猪肠粘膜细胞内,菌体杆状,两端尖或圆钝,多呈弯曲形、逗点形、S 形或直形。大小($1.25\ \mu\text{m}\sim 1.75\ \mu\text{m}$) \times ($0.25\ \mu\text{m}\sim 0.43\ \mu\text{m}$),具有波状的 3 层膜作外壁。革兰氏染色阴性,抗酸染色阳性,能被 Levaditi Silver 或 Warthin-Starry 镀银染色法着色,用 Modified Ziehl-Neelsen 染色法细菌被染成红色。未发现鞭毛、柔毛,无运动性。该菌不分布在细胞膜或空泡,主要分布在刷状缘下方的胞浆顶部,不集结成团或形成包涵体;该菌能在回肠上皮细胞的胞浆内自由地进行二分分裂复制。目前,该菌在细菌学上的分类尚无定论。16 s rRNA 系统发生分析,显示该菌与脱硫弧菌属的 26 株细菌的相似性均超过 86%,特别是与脱硫弧菌 ATCC27774 株有 91%的相似性,但该菌的脱硫能力尚未得到证明。

该细菌能通过 $0.65\ \mu\text{m}$ 滤膜,在 $5\ ^\circ\text{C}\sim 15\ ^\circ\text{C}$ 环境中至少能存活 1 周~2 周,细菌培养物对季铵盐消毒剂和含碘消毒剂敏感,在感染动物中,胞内劳森菌主要存在于肠细胞的原生质内,也可见于粪便中,该菌又称之为弯曲菌样微生物(CLO),但是其外膜蛋白(OMP)及 DNA 酶切图谱与弯曲菌不同,其相对分子质量为 $2\ 500\sim 27\ 000$ 的 OMP 条带有种特异性。用纯培养的 108 个本菌经口感染断奶猪,13 周后可在增生的肠粘膜内发现大量菌体存在于胞浆内。

A.1.3 流行病学

劳森氏胞内菌易感动物很多,包括猪、仓鼠、大鼠、兔等杂食动物;雪貂、狐等肉食动物;马、鹿等草食动物以及鸵鸟、鹌鹑等鸟类。有学者认为,鸟类、鼠类在该病的传播过程中发挥着重要的作用。

PPE 主要通过接触传播,健畜接触劳森氏胞内菌或含该菌的肠粘膜而感染,感染后 8 d~10 d 开始出现病理变化,大约 21 d 最典型,表明该病潜伏期较长,大约 2 周~3 周。人工感染断奶仔猪,感染后 2 周~3 周 50%的猪出现中度腹泻。用局部回肠炎病料感染的猪表现为坏死性肠炎或增殖性出血性肠

SN/T 3488—2013

炎。用分离的增殖性出血性肠炎菌株感染的猪则表现为局部回肠炎,偶尔发展为增殖性出血性肠炎。各种年龄的猪均可经口服感染,7~14日龄的新生仔猪和4周~10周龄的断奶仔猪均可出现典型病理变化。

A.1.4 症状

该病病程长的可持续1年。急性病例多发生于4~12月龄的青年猪,临床表现为突然发病,皮肤苍白,严重腹泻,排焦油样黑色粪便或血便,有的未见症状而突然死亡,妊娠母猪发生流产。慢性病例多发生于6~20周龄断奶仔猪,表现为精神沉郁,食欲减退或废绝,粪便变软、变稀,有的腹泻,或间歇性下痢,粪便颜色较深,有的混有血液,或呈焦油状粪便,病猪饲料转化率降低,生长缓慢,消瘦,弓背弯腰,有的站立不稳,病程长的皮肤苍白,有的母猪发情延后。隐性感染表现为贫血,生长缓慢,饲料转化率明显降低,有的轻微下痢。

A.1.5 发病机理和病理变化

PPE的发生是由于大量胞内菌定居于未成熟的上皮细胞中,引起细胞增生。为了在上皮细胞中生存和增殖,劳森氏胞内菌应穿透分隔的腺窝细胞。体外和体内研究已经阐明了细菌与细胞相互作用的早期过程。细菌首先与细胞膜结合,然后通过形成液胞迅速(3 h内)穿透细胞膜进入细胞内,定居后的细菌在细胞浆中游离增殖(不依赖细胞膜)。

在细胞增生的基础上,由于机体的代偿和修复作用,使病变重叠发生,表面纤维化逐渐延伸并向纵深发展,炎症区域凝结坏死,形成坏死性肠炎病变。早期病变含有少量滤过性炎性细胞,随着病变的进一步发展,可能发生主要由单核白细胞特别是CD8⁺细胞所形成的渗出层。有些猪随后可能发生肉芽性组织增生,纤维性组织渗出和肌肉肥大,从而形成局部回肠炎病变。

急性出血性增生性肠病的特征是大量血液进入肠腔,但是往往还伴随着潜伏的慢性增生性肠病的病变。在慢性增生性肠病的病变中,发生肠道出血通常是由于大范围的上皮细胞退化、脱落以及毛细血管床的泻漏所致。

感染猪小肠、回肠、结肠及盲肠的肠管增大、变粗,肠腔内充有液体或血凝块,肠粘膜明显增厚,出现增生性病变,有纵向和横向的深褶,重者类似大脑的脑回,肠粘膜出血,有弥漫性、坏死性炎症,浆膜下和肠系膜水肿,肠系膜淋巴结肿大,颜色变浅,切面多汁,浆膜表面的网状结构清晰可见。急性病猪病变常发生于回肠末端和结肠,有的直肠有血液和粪便混合成的黑色焦油样粪便。慢性病猪病变常发生于小肠末端以及邻近结肠上三分之一处,在病变轻微时,应仔细检查邻近回盲瓣的回肠末端区域,因该部位是常见的感染部位。

A.2 诊断

根据临床症状及剖检病变可作初步诊断。在尸体剖检时,可取病变肠道黏膜制作抹片,用改良的抗酸染色法和姬姆萨染色法以及镀银染色法对黏膜涂片进行检查以证实胞内细菌的存在。对病变肠段进行组织学检查,见到肠黏膜不成熟的细胞明显增生可作初步诊断。另外,还可采取猪粪便和血清,应用聚合酶链式反应(PCR)、核酸探针杂交法、免疫荧光试验(IFA)及酶联免疫吸附试验(ELISA)等方法进行诊断。