

团体标准

T/ NAIA×××-××××

规模化养殖场隐孢子虫病诊断与防治
技术规程

Technical rules for diagnosis and control of cryptosporidiosis in
large-scale farms

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农林科学院动物科学研究所、宁夏回族自治区畜牧工作站、宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：赵正伟、郭亚男、王建东、李知新、梁小军。

本文件为首次发布。

规模化养殖场隐孢子虫病诊断与防治技术规程

1 范围

本文件规定了规模化肉牛肉羊场隐孢子虫病诊断与防治技术的术语和定义、诊断、预防和治疗。

本文件适用于规模肉牛肉羊场隐孢子虫病的防治。其他肉牛肉羊场参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

DB13T2038-2014 动物隐孢子虫病防治技术规程
DB64T1726-2020 牛羊隐孢子虫病防治技术规范
GBT35942-2018 隐孢子虫套式PCR检测方法
NY/T 1949 隐孢子虫卵囊检测技术 改良抗酸染色法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 隐孢子虫病 Cryptosporidiosis

由隐孢子虫寄生于动物胃肠道或呼吸道黏膜上皮细胞内，引起哺乳动物（尤其是反刍动物）的严重腹泻，禽类腹泻及呼吸道卡他性炎症为主要特征的一种人畜共患原虫病。

4 诊断

4.1 病原

4.1.1 寄生于牛的隐孢子虫主要为微小隐孢子虫（*C. parvum*）和安氏隐孢子虫（*C. andersoni*）；寄生于羊的隐孢子虫主要为微小隐孢子虫。

4.1.2 隐孢子虫的发育包括裂体生殖、配子生殖和孢子生殖三个阶段，在发育过程中先后经历卵囊、子孢子、裂殖体、裂殖子、滋养体、配子体和配子，各阶段的发育均在宿主上皮细胞刷状缘的带虫空泡内进行。

4.2 流行病学特点

4.2.1 传染源

患病动物和隐性感染动物是隐孢子虫病的主要传染源。

4.2.2 传播途径

牛羊主要通过采食被卵囊污染的饲料或饮水经消化道发生感染，隐孢子虫在发育过程中，因产生薄壁卵囊而发生自身感染。

4.2.3 易感动物和日龄

各种动物均可感染隐孢子虫，反刍动物易感。幼年的动物易被感染而发病，家畜中以犊牛、羔羊的发病较为严重。成年牛羊常表现为无症状隐性感染。

4.3 临床症状

4.3.1 家畜隐孢子虫病症状表现为：

- a) 腹泻、粪便带有大量纤维素状物，有时含有血液；
- b) 精神沉郁、厌食、生长发育停滞，极度消瘦。

4.4 病理剖检变化

4.4.1 家畜隐孢子虫病的变化：

- a) 消瘦，脱水，肛门附近、尾部、会阴部、大腿及附关节处附有稀粪或粪痂；
- b) 牛的病变主要在回肠和结肠，羊的病变主要在空肠后段和回肠；
- c) 肠道卡他性及纤维素性炎症，可见出血点。

4.5 组织学变化

4.5.1 家畜隐孢子虫病的变化：

- a) 肠黏膜上皮细胞脱落，肠绒毛萎缩，隐窝变浅，黏膜固有层有炎性细胞浸润；
- b) 在肠黏膜的微绒毛缘和李氏腺隐窝内可观察到隐孢子虫寄生，寄生部位的微绒毛脱落或缺失。

4.6 病原学诊断

4.6.1 饱和蔗糖溶液漂浮法

4.6.1.1 粪样采集与保存

犊牛和羔羊可采集排出的新鲜粪便，每只集 6g~10g；成年牛羊可进行直肠采粪，每头 10g~20g。装入洁净塑料袋中或样品瓶中，采集的样品在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24h。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，4℃保存。

4.6.1.2 粪便的过滤、离心、涂片制备与镜检

粪便样本过滤、离心、涂片制备按照 NY/T 1949 的规定执行。用高倍显微镜观察涂片，可见黄绿至蓝绿背景下为粉红色至紫红色的圆形或椭圆形虫体，油镜下，可见深玫瑰红色的卵囊，呈圆形或椭圆形，内含 4 个呈月牙形的子孢子和呈黑色沉积的残余体。

4.7 ELISA 检测

利用隐孢子虫检测试剂盒，对纯化抗原包被液检测，酶标仪上读取 OD 值，以 P/N2.1 或 PN+3D 为阳性，阴性对照孔无色或接近无色，阳性对照孔明确显色，直接肉眼观察结果。

4.8 巢式 PCR 诊断

对病原菌全基因组 DNA（DNA 提取试剂见附录 A）进行隐孢子虫基于核糖体小亚基 RNA（SSU rRNA）基因的巢式 PCR 扩增（引物见附录 B）和 gp60 基因位点结合测序，样品 DNA 基于隐孢子虫 SSU rRNA 基因进行 PCR 检测，隐孢子虫的目的条带大小约为 830 bp，可确定为隐孢子虫。

5 防治

5.1 环境卫生

- 5.1.1 每天清扫畜禽舍及运动场上的积粪，粪便堆积发酵处理。
- 5.1.2 定期对养殖区、用具及周围环境用火焰消毒或适当的消毒剂如 5%次氯酸钠、3%过氧化氢等消毒。
- 5.1.3 严禁犬、猫、鸟及其他野生动物进入饲养区。
- 5.1.4 定期投放灭鼠药，控制啮齿类动物。
- 5.1.5 发生本病后，立即隔离，对猪舍、环境用具等进行严格消毒，病死畜禽尸体做无害化处理。

5.2 饲养

- 5.2.1 严格执行全进全出的饲养制度，加强饲养管理，对犊牛和羔羊及时饲喂初乳。
- 5.2.2 根据《中华人民共和国动物防疫法》及其配套法规的要求，结合当地实际情况，做好疫病的预防。

5.3 治疗

- 5.3.1 螺旋霉素、巴龙霉素、拉沙里菌素、阿奇霉素等化学合成药物，大蒜素、苦参合剂等中药有一定疗效。
- 5.3.2 腹泻严重者口服补液盐或静脉输液，补充电解质，纠正酸碱平衡。
- 5.3.3 合并感染或继发感染者，采用适当的抗生素对症治疗。

附录 A
(规范性附录)
反应体系及程序

A1. 隐孢子虫 *SSU* rRNA 基因巢式 PCR 反应体系

试剂 Reagent	第一轮 PCR 体积 (μL) Volume of first round PCR(μL)	试剂 Reagent	第二轮 PCR 体积 (μL) Volume of the second round of PCR(μL)
1	1	Primary PCR Product	2
1.25	1.25	F2 (10 uM)	2.5
1.25	1.25	R2 (10 uM)	2.5
2	2	Mix (2X)	25
25	25	ddH ₂ O	18
19.5	19.5		

A2. 隐孢子虫 *SSU* rRNA 基因巢式 PCR 反应程序

反应顺序 Reaction sequence	第一轮反应 First round reaction	第二轮反应 Second round reaction	循环数 Number of cycles
预变性	94°C, 5min	94°C, 5min	1×
变性	94°C, 45s	94°C, 45s	
退火	55°C, 45s	55°C, 45s	35×
延伸	68°C, 1min	68°C, 1min	
延伸	68°C, 7min	68°C, 7min	1×

A3. 微小隐孢子虫的 *gp60* 基因巢式 PCR 反应程序

反应顺序 Reaction sequence	第一轮反应 First round reaction	第二轮反应 Second round reaction	循环数 Number of cycles
预变性	94°C, 5min	94°C, 5min	1×
变性	94°C, 45s	94°C, 45s	
退火	52°C, 45s	50°C, 45s	35×
延伸	68°C, 1min	68°C, 1min	
延伸	68°C, 7min	68°C, 7min	1×

附录 B
(规范性附录)
引物序列

B1. 巢式 PCR 扩增隐孢子虫 *SSU* rRNA 基因引物

基因 Gene	引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'	退火温度 (°C) Annealing temperature(°C)	目的条带大小 (bp) Target band size (bp)
<i>SSU</i> rRNA	F1: TTCTAGAGCTAATACATGCG	55	1320
	R1: CCCATTTCTTCGAAACAGGA		
	F2: GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	55	830
	R2: CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA		

B2. 微小隐孢子虫的 *gp60* 基因位点引物

引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'	退火温度 (°C) Annealing temperature (°C)	目的条带大小 (bp) Target band size (bp)
F1: TTACTCTCCGTTATA GTCTCC	52	850
R1: GGAAGGAACGATGTATCTGA		
F2: TCCGCTGTATTCTCAGCC	50	800
R2: GCAGAGGAACCAGCATC		