ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXX—XXXX

牦牛弓形虫病诊断技术

Diagnostic techniques for yak toxoplasmosis

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

目 录

1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 缩略语 1
5 临床诊断 1
6 样品的采集、保存和运输 2
7 病原检查 2
8 PCR 检测 2
9 酶联免疫吸附试验（ELISA） 3
附录 A（资料性） 错误!未定义书签。
附录 B（规范性） 错误!未定义书签。
附录 C（资料性） 错误!未定义书签。
参考文献 11

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由四川农业大学动物医学院提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

牦牛弓形虫病诊断技术

1 范围

本文件规定了牦牛弓形虫病的临床诊断、病原检查、PCR检测和抗体检测（ELISA）的技术要求。本文件适用于牦牛弓形虫病的诊断、流行病学调查及检疫。

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。

NY/T 573-2022 动物弓形虫病诊断技术
GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法
GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求
NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 弓形虫 *Toxoplasma gondii*

是球虫纲、真球虫目、肉孢子虫科、弓形虫属的原虫。动物急性感染弓形虫后，主要表现为发热、腹泻、呼吸困难和中枢神经系统症状等，剖检以肺间质、淋巴结水肿为主要病变特征。

3.2 牦牛弓形虫病 yak toxoplasmosis

由牦牛摄入弓形虫感染性卵囊引起的以发热、腹泻、呼吸困难及流产和中枢神经系统症状为特征的急性或慢性原虫病。

4 缩略语

BSA：牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin）
TMB：3,3',5,5'-四甲基联苯胺（3,3,5,5-Tetramethylbenzidine）
PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）
ELISA：酶联免疫吸附试验（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）
PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-Buffered Saline）

5 临床诊断

5.1 临床特征

中国兽医协会 CVMA

患病牦牛出现神经症状、发热、呼吸困难、极度虚弱；患病妊娠母牛出现早产、流产；患病犊牦牛出现呼吸困难、咳嗽、打喷嚏、鼻有分泌物、口有泡沫、发热、神经症状、高度沉郁、脱水，偶有腹泻，部分 2d~6d 内死亡。

5.2 初步判定

根据临床症状如流产、神经症状、发热、呼吸困难、精神沉郁等特征可做出初步判定。当发现可疑牦牛时，需继续观察或采取病料送实验室进一步检查。

6 样品的采集、保存和运输

6.1 样品的采集

无菌采集疑似患病动物（或死亡动物）的淋巴结穿刺液、血液、腹水或羊水等体液0.5mL~1mL或脑、胎盘、心、肺、骨骼肌等组织2g~5g。为防止可能的布鲁氏菌病混合感染，采样过程须穿好工作服、佩戴好口罩、胶鞋、手套等防护用品。

6.2 样品的保存

样品采集后置于样品保存袋中，封口后，每份样品的包装袋上均要贴上标签，写明采集地点、采集时间、采集部位、牦牛种类、年龄等详细资料，置于2℃ ~8℃冰箱内保存。

6.3 样品的运输

将采集样品在24h内送往实验室进行检测，采样应符合NY/T 541-2016。

7 病原检查

7.1 材料与试剂

7.1.1 器材

离心机、离心管、光学显微镜、剪刀、镊子、载玻片、盖玻片、试管、微量移液器和吸头。

7.1.2 试剂

姬姆萨染液（见附录B.1）、PBS（见附录B.2）、甲醇。

7.2 操作方法

淋巴结穿刺液、腹水或羊水等体液经 350*g*（1500 r/min）离心 10min，取沉淀涂片，干燥、固定和姬姆萨染色，光镜下观察；脑、胎盘、心、肺、骨骼肌等组织涂片或触片经姬姆萨染色，光镜下观察。

7.3 结果判定

淋巴结穿刺液、血液、腹水、羊水等体液在光镜下检测到弓形虫速殖子则判定为病原学阳性；组织涂片或触片，光镜下检测到弓形虫速殖子（见附录A.1）或包囊和缓殖子（见附录A.2）则判定为病原学阳性。

8 PCR 检测

中国兽医协会 CVMA

8.1 设备和器材

8.1.1 器材

PCR仪、离心机、组织破碎仪、核酸电泳仪、核酸电泳槽、凝胶成像分析仪、微量移液器及吸头、PCR管等。

8.1.2 试剂

全血/组织/细胞基因组DNA提取试剂盒、2×Taq MasterMix、DL2000 DNA Marker、1×TAE缓冲液（见附录B.3）、1%琼脂糖凝胶（见附录B.4）、Goldview核酸染料、ddH_2O等。

8.1.3 引物

以弓形虫 529bp 重复序列为靶基因（见附录 C）。

上游引物：5’-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3’
下游引物：5’-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3’

8.2 操作方法

8.2.1 样品处理

根据全血/组织/细胞基因组DNA提取试剂盒说明书，提取样品组织基因组DNA作为PCR反应的模板。阳性对照为弓形虫速殖子DNA，阴性对照为双蒸水。

8.2.2 PCR 扩增和检测

PCR为20μL反应体系，包括上下游引物（10mmol/L）各1μL，2×Taq MasterMix 10μL，待检样品DNA 2μL，ddH_2O补足体积至20μL。涡旋混匀后，按如下反应参数进行扩增：95°C预变性3min，95°C变性30 s，56°C退火30s，72°C延伸30s，35个循环，72°C延伸10min，4°C保存。取5μL反应产物在1%琼脂糖凝胶中电泳，随后在凝胶成像系统中观察结果。

8.2.3 结果判定

待检样品与阳性对照一样，在500bp左右出现条带，判定为阳性（见附录D）；待检样品与阴性对照一样，未出现条带，则判定为阴性。

9 酶联免疫吸附试验（ELISA）

9.1 设备和器材

酶标仪、酶标板、试剂槽、单道和8道移液器及吸头。

9.2 试剂和材料

弓形虫重组SAG1抗原（见附录E），弓形虫阴性、阳性血清，酶标抗体，包被缓冲液（见附录B.5）、PBST洗涤液（见附录B.6）、封闭液（见附录B.7）、TMB显色液、终止液（见附录B.8）等。

9.3 操作方法

9.3.1 样品处理

中国兽医协会 CVMA

取无菌采集的牦牛血液约1 mL，斜放于4 ℃静置5 h后，置室温待血清析出，1000 g离心10 min分离收集血清，-80 ℃冷冻保存待检。

9.3.2 ELISA

9.3.2.1 抗原包被

将弓形虫重组SAG1抗原用包被缓冲液稀释至终浓度0.2μg/mL，每孔100μL，加入酶标板中，置于4°C冰箱中过夜。

9.3.2.2 洗涤

取出包被的反应板，弃去孔内溶液，加入洗涤液200μL，震荡3min后弃掉，在吸水纸上拍干，洗涤3次。

9.3.2.3 封闭

加入封闭液，每孔100μL，置于37°C孵育1h。

9.3.2.4 待检血清

洗涤3次。将待检血清用样品稀释液作1:20稀释后，每孔100μL，同时做阴性、阳性血清和空白对照，各设2孔，混匀后置于37°C孵育lh~1.5h。

9.3.2.5 酶标抗体

洗涤3次。加酶标抗体，每孔100μL，混匀后置于37°C孵育1h~1.5h。

9.3.2.6 显色

加入TMB显色液，每孔100μL，混匀，置于室温避光显色10min~15min。

9.3.2.7 终止反应

加入终止液，每孔100μL，混匀。

9.3.2.8 读数

将反应板放入酶标仪中，450nm波长处读数并判定结果。

9.3.3 结果判定

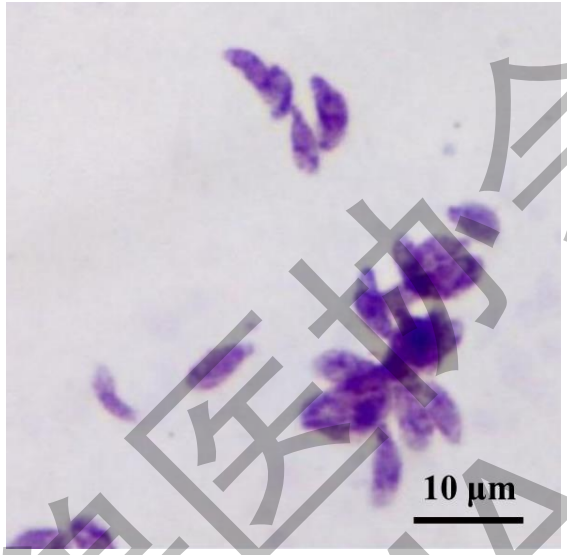
在阴性血清对照孔和空白对照孔OD<0.15、阳性血清对照孔OD≥0.4时，按如下条件进行结果判定:

被检血清孔OD平均值≥0.2，且被检血清孔OD平均值/标准阴性血清孔OD平均值(P/N值)≥2.1，判为阳性，否则为阴性，如有其中一条低于判定标准，为可疑，应复检。

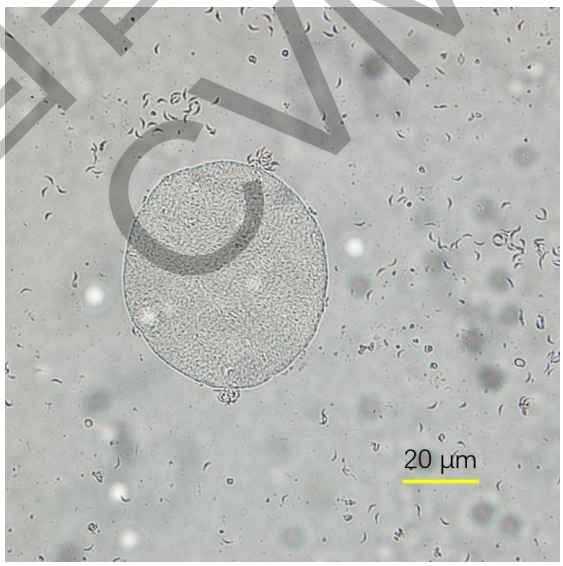
中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（资料性）

弓形虫虫体形态示意图



图A.1 弓形虫速殖子



图A.2 弓形虫包囊

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（规范性）

试剂及其配制方法

B.1　姬姆萨染液

取姬姆萨粉0.5g，甘油25mL混匀，60°C水浴加热2h，其间不断搅拌混匀。冷却至室温后加入甲醇25mL混匀，过滤配成原液避光保存，使用前用PBS作1:15稀释。

B.2　磷酸盐缓冲液（PBS）

NaCl 8.5g，Na_2HPO_4 1.1g，$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.3g，加蒸馏水定容至1000mL。

B.3　电泳缓冲液（TAE）

Tris-Base 121.4g，冰醋酸28.6mL，0.5mol/L EDTA（pH 8.0）50mL，加蒸馏水定容至500mL，配成50×TAE，室温保存，使用前用水作1:50稀释。

B.4　1%琼脂糖凝胶

琼脂糖1g，1×TAE 100mL，加热融化至透明，冷却至60°C加入Goldview 5μL，混匀倒入制胶板中。

B.5　包被缓冲液

Na_2CO_3 1.59g，$NaHCO_3$ 2.93g，加蒸馏水定容至1000mL。

B.6　PBST洗涤液

取Tween-20 0.5mL加入1000mL PBS，混匀，4°C保存。

B.7　封闭液

1% BSA的PBS。

B.8　终止液

2mol/L硫酸。

B.9　包涵体裂解缓冲液

50mM Tris•HCl（pH 8.0），1mM EDTA（pH 8.0），100mM NaCl，0.5% TritonX-100，8M Urea，5mM DTT，去离子水定容至500mL。

中国兽医协会 CVMA

附　录　C
（资料性）

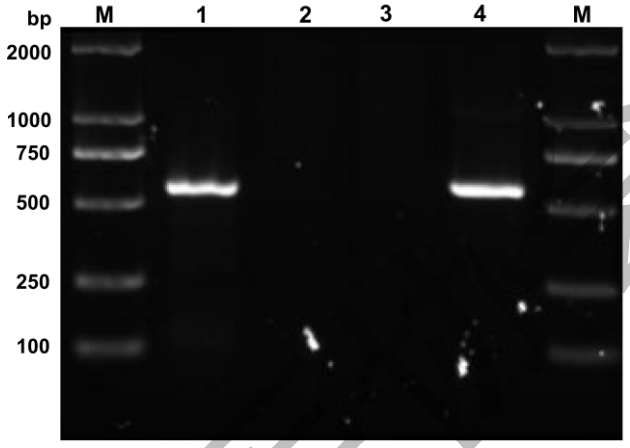
弓形虫PCR产物参考序列

CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTTATTTTTTTTTCTTTTTGTTTTTCTGATTTTTGTTTTT
TTTGACTCGGGCCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGAGACCGCGGAGCCGAAGTGCGTTTTCTTTTTTT
GACTTTTTTTTGTTTTTTCACAGGCAAGCTCGCCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTC
GAAGGGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTCCAGCCGTCTTGGAGGAGAGATATCAGGACTGTA
GATGAAGGCGAGGGTGAGGATGAGGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGACGAGAGTCGGAGAGCG
AGAAGATGTTTCCGGCTTCCCTGCTTTTCCTGGAGGGTGGAAAAAGAGACACCGGAATGCGATCC
AGACGAGACGACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGAAGAGTGGAGAAGAGGGCGA
GGGAGACAGAGTCGGAGGCTTGGACGAAGGGAGGAGGAGGGGTAGGAGAGGAATCCAGATGCA
CTGTGTCTGCAG

中国兽医协会
CVMA

附　录　D
（规范性附录）
PCR 检测结果示意图

PCR产物大小对照见图D.1。



图D.1 PCR产物大小示意图

注：M，DL2000 标准分子量；1，阳性样品扩增结果；2，阴性样品扩增结果；3，阴性对照扩增结果；4，阳性对照扩增结果。

中国兽医学会 CVMA

附　录　E
（规范性附录）
弓形虫 SAG1 重组抗原的制备

E.1　器械与设备

PCR仪、高速冷冻离心机、细胞破碎仪、恒温摇床、核酸、蛋白电泳装置、紫外分光光度计、蛋白浓缩管。

E.2　材料

引物ExpSAG1-F/ExpSAG1-R（10 μM），*Bam*H I和*Xho* I限制性内切酶，T4 DNA连接酶，琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒，克隆载体pETASY™-T1，表达载体pET-28a，感受态大肠杆菌DH5α，感受态大肠杆菌Transseta，卡那霉素（100 mg/mL），氨苄青霉素（Ampicillin），异丙基-β-D硫代吡喃半乳糖苷（IPTG），His标签蛋白纯化试剂盒，LB培养基，一次性针头滤器（孔径0.45 μm），蛋白浓缩管。

E.3　引物序列

表A.1　扩增弓形虫 SAG1 基因表达片段的引物

目的基因	引物	序列	酶切位点
SAG1	ExpSAG1-F	5’-CGgaattcTCGGATCCCCCTCTTGTTGCCAATC-3’	*EcoR* I
	ExpSAG1-R	5’-CCGctcgagTTAAGCCGATTTTGCTGACCCTG-3’	*Xho* I

ExpSAG1-F/ExpSAG1-R引物对扩增弓形虫SAG1表达片段大小为792 bp。

E.4　表达载体的构建与鉴定

E.4.1　弓形虫SAG1表达片段的扩增

引物用ExpSAG1-F/ExpSAG1-R引物，以弓形虫基因组DNA为模板，反应体系为25 μL，包括2 μL模板DNA（100 ng）、25 μL 2×HiFi SuperMIX I、2 μL ExpSAG1-F、2 μL ExpSAG1-R、19 μL ddH_2O；反应条件为94 ℃预变性10 min，94 ℃变性30 sec，58 ℃退火30 sec，72 ℃延伸90 sec，共30个循环；72 ℃延伸10 min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测，使用商品化琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化回收PCR扩增目的片段，-20 ℃储存备用。

E.4.2　双酶切

使用20 μL酶切体系：10 μL弓形虫SAG1基因PCR产物或pET-28a质粒，2 μL 10×酶切缓冲液，1 μL *EcoR* I、1 μL *Xho* I，6 μL ddH_2O，37℃酶切30~60 min。胶回收酶切产物。

E.4.3　重组质粒的构建与转化

使用10 μL连接体系：4.5 μL双酶切弓形虫SAG1基因片段，1.5 μL双酶切pET-28a质粒片段，T4 DNA连接酶0.5 μL，10×连接缓冲液1 μL，ddH_2O 2.5 μL。25 ℃水浴连接40 min。将连接产物转化到感受态大肠杆菌DH5α，操作步骤根据说明书进行。

中国兽医协会 CVMA

E.4.4 阳性菌株的鉴定

对阳性菌液进行测序，提取测序正确菌株表达质粒，转入表达菌Transseta用于重组抗原表达。

E.5 蛋白表达和纯化

E.5.1 取阳性表达菌Transseta，按1:100的比例接种到含50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中，37℃ 180 rpm/min振荡培养至菌液OD_{600}为0.4~0.6，加入终浓度为1 mmol/L的IPTG，37℃振荡培养3 h。

E.5.2 将诱导培养的菌液分装到离心管中，在4℃下8000 rpm离心10 min，弃上清液。

E.5.3 沉淀用His-binding Buffer重悬到50 mL离心管中。将离心管垂直置于碎冰，于4℃，1000 bar压力破碎仪上破碎3-5次。

E.5.4 将破碎菌体裂解物在4℃以12000 rpm/min离心10 min，菌体沉淀加10 mL包涵体裂解缓冲液，室温作用1~2h，其间不断振荡；4 ℃ 10000 rpm离心20 min，收集上清用0.45 μm滤器过滤。滤过液用His标签蛋白纯化试剂盒纯化重组蛋白。

E.5.5 将纯化后的蛋白溶液装入处理好的透析袋中，用PBS（pH 7.5）在4℃透析4 h~5 h，重复该透析步骤3次。

E.5.6 将透析后的蛋白转入蛋白浓缩管，于4℃ 4000 rpm离心，用紫外分光光度计测定蛋白浓度，待浓缩管中蛋白浓度大于1 mg/mL时停止离心。

E.5.7 浓缩的重组蛋白分装于1.5 mL离心管，每支1.0 mL，置于-20℃保存。

中国兽医协会 CVMA

参考文献

[1] Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(2): 264-96.

[2] Hill D, Dubey J P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention[J]. Clin Microbiol Infect, 2002, 8(10):634-640.

[3] Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10):4826-4828.

[4] 李长云，铁富萍，才仁卓玛. 青海海晏县牦牛弓形虫血清抗体检测[J]. 中国兽医杂志, 2018,54(05):52-53.

中国兽医协会
CVMA