ICS 11.220
CCS B 41

DB53

云 南 省 地 方 标 准

DB53/T 1064.3—2021

绿孔雀检疫技术 第3部分：羽虱实验室检测技术规范

Quarantine technique for *Pavo muticus*
—Part 3:Technical specifications for laboratory examination of chewing lice

2021－09－30发布 2021－10－14实施

云南省市场监督管理局 发布

目　　次

前言……III
引言……V
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　原理……1
6　试验条件……2
6.1　实验室通用要求……2
6.2　人员要求……2
7　仪器设备和试剂……2
7.1　仪器设备……2
7.2　试剂……2
8　样品……2
8.1　样品采集……2
8.2　样本保存……3
8.3　样品运输……3
8.4　生物安全要求……3
9　试验步骤……3
9.1　形态学检查……3
9.2　PCR 检测……3
10　试验数据处理……4
10.1　形态学结果判定……4
10.2　PCR 结果判定……4
附录 A　（规范性）　羽虱形态……5
附录 B　（规范性）　PCR 反应……6

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。

本文件是DB53/T 1064《绿孔雀检疫技术》的第3部分。DB53/T 1064已经发布了以下部分：

——第 1 部分：禽副黏病毒实验室检测技术规范；

——第 2 部分：禽流感病毒实验室检测技术规范；

——第 3 部分：羽虱实验室检测技术规范；

——第 4 部分：消化道线虫实验室检测技术规范。

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专利的责任。

本文件由云南省林业与草原局、云南省市场监督管理局共同提出。

本文件由云南省林业标准化技术委员会（YNTC02）归口。

本文件主要起草单位：云南农业大学、云南省标准化研究院、云南省动物卫生监督所、昆明动物园。

本文件主要起草人：邹丰才、黄艳梅、宋海洋、朱勋程、杨建发、李杰、陈培富、蒙英雯、衡昭君、张誉方、朱尤帅、李云乔。

引　言

绿孔雀（*Pavo muticus*）在我国仅分布于云南，是国家Ⅰ级重点保护野生动物，也是全球濒危物种，并已列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)和《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》。为切实贯彻《中华人民共和国野生动物保护法》和《中华人民共和国动物防疫法》，编制并发布DB53/T 1064《绿孔雀检疫技术》地方标准，可让从事绿孔雀保护的相关人员按标准化和规范化程序开展绿孔雀病原学诊断，从而采取必要的防治措施，以提高染疫绿孔雀的成活率，维护绿孔雀种群健康和地区生态平衡，提升生物多样性保护成效。

本文件已发布4个部分：

——第 1 部分：禽副黏病毒实验室检测技术规范。本部分从禽副黏病毒实验室检测技术的总则、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 2 部分：禽流感病毒实验室检测技术规范。本部分从禽流感病毒实验室检测技术的总则、禽流感病毒毒株的毒力划分和血清亚型、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 3 部分：羽虱实验室检测技术规范。本部分从羽虱实验室检测的原理、试验条件、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 4 部分：消化道线虫实验室检测技术规范。本部分从消化道线虫实验室检测技术的试验原理、常见线虫形态特征、试验条件、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范。

绿孔雀检疫技术
第3部分：羽虱实验室检测技术规范

1 范围

本文件规定了绿孔雀（*Pavo muticus*）检疫技术中羽虱实验室检测技术的原理、试验条件、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理。

本文件适用于绿孔雀检疫技术中羽虱实验室检测。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

羽虱 chewing lice

羽虱是主要寄生在鸟类体表和少数寄生于哺乳动物的永久性体表寄生虫，隶属于昆虫纲（*Insecta*）、有翅亚纲（*Pterygota*）、虱目（*Phthiraptera*）、长角羽虱科（*Philopteridae*）。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BLAST：基于局部序列比对算法的搜索工具 Basic Local Alignment Search Tool

bp：碱基对 Base Pair

ddH_2O：双蒸水 Double Distilled Water

DNA：脱氧核糖核酸 Deoxyribonucleic Acid

NCBI：美国国家生物技术信息中心 National Center for Biotechnology Information

PCR：聚合酶链式反应 Polymerase Chain Reaction

TAE：Tris-乙酸电泳缓冲液 Tris Acetate-EDTA Buffer

5 原理

根据羽虱的形态特征，采用显微镜镜检方法，判定是否有羽虱感染，对于虫卵、若虫、存疑虫体及残破虫体无法确定其种类，可进行PCR鉴定。

6 试验条件

6.1 实验室通用要求

实验室满足GB 19489中生物安全实验室的要求。

6.2 人员要求

采样和试验人员应具有相应的专业知识。

7 仪器设备和试剂

7.1 仪器设备

7.1.1 体视显微镜。
7.2.2 载玻片、培养皿、离心管、样品管。
7.2.3 PCR仪。
7.2.4 微量移液器：单道可调，量程0.5 μL～10 μL、2 μL～20 μL、10 μL～100 μL和100 μL～1 000 μL。
7.2.5 电子天平：量程0.01 mg～10 000 mg。
7.2.6 恒温水浴锅：36 ℃±1 ℃，65 ℃±1 ℃。
7.2.7 高速离心机：转速可达12 000 r/min。
7.2.8 电泳系统。
7.2.9 微波炉。
7.2.10 凝胶成像系统。

7.2 试剂

7.2.1 50×TAE缓冲液：Tris碱242 g和57.1 mL冰醋酸，用双蒸水定容到1 L。
7.2.2 核酸染料，用于凝胶成像显示条带。
7.2.3 2×*Taq* PCR Mix。
7.2.4 引物（基于COI基因设计引物）。
7.2.5 霍氏液。
7.2.6 乙酸乙酯。
7.2.7 70%乙醇。
7.2.8 商品化DNA提取试剂盒。
7.2.9 DL 2000 DNA Marker。
7.2.10 琼脂糖。1.5%琼脂糖凝胶：1.5 g琼脂糖与100 mL 1×TAE缓冲液，加热融化均匀，加入10 μL核酸染料，倒入胶槽，插上样品梳。室温下待凝胶凝固后，垂直向上拔出固定在凝胶中的样品梳。

8 样品

8.1 样品采集

在体表皮肤、毛根、羽毛处找到淡黄色或暗灰色的虱体或虫卵，收集放入样品管中，做好记录。刚死亡绿孔雀可将其放入有乙酸乙酯的密闭容器中，熏蒸5min后，用手逆向拨动羽毛，羽虱掉落,将羽虱收集放入样品管。

8.2 样本保存

将羽虱样本保存于70%乙醇内，拧紧盖子后上下摇晃使虱体充分浸泡在70%乙醇中，并检查是否有液体渗漏。低温或置于4 ℃冰箱储存。

8.3 样品运输

样品采集完成后运输到实验室进行检测。70%的乙醇属于危险化学品，运输过程中要确保容器不泄漏、不损坏。不应与酸类、易燃物、自燃物品等并车混运。

8.4 生物安全要求

样品采集及试验过程中做好自身防护，同时注意对绿孔雀的生活环境进行清扫、环境消毒。生物安全要求按照GB/T 27401的规定进行。

9 试验步骤

9.1 形态学检查

9.1.1 直接观察法

按下列区域顺序对绿孔雀进行检查：翅(下侧)、腹侧、腹部、臀部(下侧)、胸部、翅(上侧)、背部、臀部(上侧)、颈部、头部。观察是否有羽虱。

9.1.2 显微镜检查

将样品管内保存的羽虱放在透明培养皿或载玻片上，用清水清洗干净虫体，滴加霍氏液固定，盖上盖玻片。对比附录A中的图A.1，用体视显微镜进行形态学观察。

9.2 PCR 检测

9.2.1 样品 DNA 提取与保存

将8.1收集的羽虱样品用商品化DNA提取试剂盒进行试验。DNA提取具体操作步骤按照试剂盒说明书进行，将提好的DNA保存于4 ℃冰箱中。

9.2.2 PCR 扩增

9.2.2.1 PCR 扩增引物

PCR扩增引物见附录B中的B.1。

9.2.2.2 PCR 扩增体系

PCR扩增体系见附录B中的B.2。

9.2.2.3 PCR 扩增程序

样品DNA在PCR仪上进行PCR扩增的反应程序为95 ℃预变性3min，95 ℃变性1min，50 ℃退火45s，72 ℃延伸1.5min，30个循环后，72 ℃延伸10min。

9.2.3 PCR 产物检测

PCR扩增完成后，取PCR产物5 μL，加入1.5%琼脂糖凝胶电泳孔中，以DL 2000 DNA Marker作为参照，110 V电压电泳30min后，将凝胶置于紫外凝胶成像分析系统中进行观察拍照，若出现预期的475 bp左右的条带，扩增条带进行测序后验证。

10 试验数据处理

10.1 形态学结果判定

羽虱体型较小，长 0.5 mm～10 mm，头部形状多变，类似于三角形或卵圆形，头端的宽度大于胸部，触角一对，口器位于头腹面，咀嚼式。胸部三节，无翅，三对足分别位于前、中、后胸。腹部圆形至长卵圆形，体型宽短或细长，呈淡黄色或灰色。

用显微镜对标本进行观察，发现形态符合附录 A 中图 A.1 羽虱形态特征，则鉴定为绿孔雀羽虱。

10.2 PCR 结果判定

将 PCR 产物测序结果与 NCBI GenBank 中的序列进行 BLAST 在线比对，与羽虱相应序列匹配率不小于 90%时即可判定绿孔雀羽虱感染阳性。

附　录　A
（规范性）
羽虱形态

体视显微镜下羽虱形态如图A.1所示。

图 A.1 羽虱镜检图（×40）

附　录　B
（规范性）
PCR 反应

B.1　PCR扩增引物序列

根据COI基因设计PCR扩增引物，引物序列如下表B.1所示。

表 B.1　PCR 扩增引物序列

引物名称	序列（5’-3’）
上游引物	CCGGATCCTTYTGRTTYTTYGGNCAYCC
下游引物	CCGGATCCACNACRTARTANGTRTCRTG

B.2　PCR扩增体系

PCR扩增体系见表B.2。

表 B.2　PCR 扩增体系

组分	用量（μL）
模板 DNA（>20 ng/μL）	3.0
上游引物（10 μM）	1.0
下游引物（10 μM）	1.0
2×*Taq* PCR Mix	12.5
无菌水	7.5
合计	25