ICS 11.220
CCS B 41

DB53

云 南 省 地 方 标 准

DB53/T 1064.4—2021

绿孔雀检疫技术 第4部分：消化道线虫实验室检测技术规范

Quarantine technique for *Pavo muticus*
—Part 4:Technical specifications for laboratory examination of nematodes in digestive tract

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　试验原理……1
6　常见线虫形态特征……2
7　试验条件……2
7.1　实验室通用要求……2
7.2　人员要求……2
7.3　生物安全要求……2
8　仪器设备和试剂……2
8.1　主要仪器设备……2
8.2　主要试剂……2
9　样品……3
10　试验步骤……3
10.1　形态学检测……3
10.2　PCR 检测……3
11　试验数据处理……3
11.1　虫卵检测……4
11.2　虫体检测……4
附录 A　（资料性）　消化道线虫的基本形态特征……5
附录 B　（规范性）　粪样的采集和保存方法……6
附录 C　（资料性）　绿孔雀消化道线虫虫卵虫体镜检照片……7

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4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。

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。

本文件起草人：杨建发、黄艳梅、张誉方、吴长江、邹丰才、朱勋程、陈培富、宋海洋、衡昭君、蒙英雯、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4部分：消化道线虫实验室检测技术规范

1 范围

本规范明确了绿孔雀（*Pavo muticus*）检疫技术中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。

本文件适用于绿孔雀检疫技术中消化道线虫实验室检测。

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

线虫 nematodes

线虫动物门为假体腔动物，线虫属通常呈圆柱形，线状或毛发状，某些种类呈鞭状或球状。不分节，两侧对称并具有三胚层假体腔，一般为雌雄异体。虫体大小随种类不同差别较大，雄虫一般较雌虫为小。寄生性线虫最常见寄生于消化道。

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

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 试验原理

绿孔雀消化道线虫的检测可采用形态学观察线虫虫卵或虫体的方法，当镜检发现形态特征明确的线虫虫卵，如毛细线虫，可直接作出判定；对于无法利用形态学鉴定的虫卵或虫体，进一步采用PCR方法进行虫种鉴定。

6 常见线虫形态特征

绿孔雀常见的线虫主要有蛔虫（*Ascaridia*）、异刺线虫（*Heterakis*）和毛细线虫（*Capillaria*）。绿孔雀线虫的基本形态特征参见附录A。

7 试验条件

7.1 实验室通用要求

实验室应满足GB 19489中的要求。

7.2 人员要求

采样和试验人员应具有相应的专业知识。

7.3 生物安全要求

采样及试验过程中做好自身防护，试验结束后的检验器具要进行消毒处理，废弃样品要及时进行无害化集中处理。

8 仪器设备和试剂

8.1 主要仪器设备

8.1.1 正置光学显微镜、体视显微镜。
8.1.2 载玻片及盖玻片若干，漏斗、玻璃棒、烧杯。
8.1.3 金属筛：60 目。
8.1.4 PCR 扩增仪。
8.1.5 高速台式离心机。
8.1.6 电子天平：量程 0.01 mg～10 000 mg。
8.1.7 恒温水浴锅：36 ℃±1 ℃，65 ℃±1 ℃。
8.1.8 超纯水器，高压灭菌锅。
8.1.9 单道移液器（量程 0.5 μL～10 μL、2 μL～20 μL、10 μL～100 μL 和 100 μL～1 000 μL）。
8.1.10 电泳槽、电泳仪、紫外凝胶成像仪、涡旋振荡器。

8.2 主要试剂

8.2.1 饱和食盐水。
8.2.2 2.5%重铬酸钾液，乳酸酚透明液。
8.2.3 基因组 DNA 提取试剂盒。
8.2.4 2×*Taq* PCR Master Mix。
8.2.5 DL 2000 DNA Marker。
8.2.6 无菌水。
8.2.7 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。
8.2.8 核酸染料，用于凝胶成像显示条带。
8.2.9 1%琼脂糖凝胶：1 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，60 ℃时，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。

9 样品

样品从绿孔雀粪便中采集，采样和保存方法见附录B。

10 试验步骤

10.1 形态学检测

10.1.1 虫卵检测

采用饱和食盐水漂浮法，线虫卵富集在饱和液表面。取粪样5 g，加饱和食盐水50 mL，用玻璃棒搅匀，通过60目金属筛或双层纱布过滤到干净烧杯中，静置0.5 h；蘸取表面液膜，点样于载玻片上，盖上盖玻片，进行镜检。

10.1.2 虫体检测

从粪样中分离虫体，用生理盐水清洗干净，放于载玻片，滴加乳酸酚透明液2～3滴，盖上盖玻片，在光学显微镜下观察透明虫体的内部形态构造。对于存疑虫体，结合下述PCR扩增方法对其进行虫种鉴定。

10.2 PCR 检测

10.2.1 DNA 的提取和保存

取粪样，用商品化DNA提取试剂盒进行DNA提取，步骤按照DNA提取试剂盒说明书进行。1周内使用到的DNA，保存于4 ℃冰箱中；需要长期保存的DNA，保存于-20 ℃冰箱中。

10.2.2 PCR 扩增

10.2.2.1 PCR 扩增引物

针对线虫ITS基因的部分片段设计引物，此引物灵敏度和特异性较高。上下游引物序列如下：BD1：5′-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3′；BD2：5′-ATGCTTAAATTCAGCGGGT-3′ 。

10.2.2.2 PCR 扩增体系

PCR扩增体系为50 μL，包括2×*Taq* PCR Master Mix 25.0 μL，无菌水19.0 μL，引物BD1和BD2各2.0 μL，DNA模板2.0 μL。

10.2.2.3 PCR 扩增程序

用PCR扩增仪设置反应程序，94 ℃预变性5min；94 ℃变性 30s，50 ℃退火30s，72 ℃延伸30s，设置30个循环反应，最后72 ℃延伸5min，16 ℃结束反应，同时设阴性对照和阳性对照。

10.2.2.4 PCR 产物检测

PCR扩增完成后，取PCR产物5 μL，加入1%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。将凝胶取出放入紫外凝胶成像仪中观察并拍照。若出现预期的1 000 bp左右的条带，扩增条带进行测序后验证。

11 试验数据处理

11.1 虫卵检测

经饱和食盐水漂浮法镜检发现如附录C中图C.1或图C.2所示的虫卵，直接判定为绿孔雀消化道线虫感染阳性。若发现存疑虫卵，对其进行PCR检测后，将PCR产物测序结果与NCBI GenBank中的序列进行BLAST在线比对，判定是否为绿孔雀消化道线虫感染阳性。

11.2 虫体检测

对虫体进行镜检观察到如附录C中图C.3或图C.4所示的虫体，直接判定为绿孔雀消化道线虫感染阳性。若发现存疑虫体，对其进行PCR检测后，将PCR产物测序结果与NCBI GenBank中的序列进行BLAST在线比对，判定是否为绿孔雀消化道线虫感染阳性。

附　录　A
（资料性）
消化道线虫的基本形态特征

寄生于孔雀体内的线虫主要为蛔虫（*Ascaridia*）、异刺线虫（*Heterakis*）和毛细线虫（*Capillaria*）：

——蛔虫（*Ascaridia*）呈黄白色，圆柱状，雄虫长 2.6 cm～7 cm；雌虫长 6.5 cm～11 cm。虫卵呈椭圆形，深灰色，卵壳光滑，大小为（70～90）μm×（47～51）μm；

——异刺线虫（*Heterakis*）属于异刺科异刺属线虫，寄生于孔雀等禽类的盲肠。虫体呈细线状，淡黄色。雄虫长 7 mm～13 mm；雌虫长 10 mm～15 mm。虫卵呈椭圆形，浅灰色，大小为（65～80）μm×（35～46）μm；

——毛细线虫（*Capillaria*）成虫呈乳白色。前端细长，毛发状，虫体后端由细变粗，形状呈鞭子样。雄虫长 23.7 mm～54.4 mm，尾部卷曲；雌虫长 39.4 mm～53.0 mm，尾部稍有弯曲。虫卵呈腰鼓形，黄褐色，卵壳较厚，两端有卵塞，大小（65～80）μm×（35～46）μm。

附　录　B
（规范性）
粪样的采集和保存方法

B.1　采样工具

一次性PE手套、自封袋、样品管、照相机等。

B.2　粪样的选取原则

B.2.1　采集绿孔雀新鲜粪样，同一堆粪样只采集一份样品。
B.2.2　如遇到绿孔雀母幼粪样，分开采集；依据母绿孔雀和幼绿孔雀的粪样大小有明显差异作出判断，并在备注栏记录。

B.3　样品采集方法

B.3.1　在采集用于消化道线虫研究的粪样时，采集较为新鲜、无污染的粪便样品，并佩戴一次性PE手套。每次采样时应更换新的PE手套，以避免样品间的交叉污染。
B.3.2　采集时，直接剥取分离新鲜粪样的表层部分和内部部分，分别放入样品管中，贴上样品标签纸，写上样品编号和采集地经纬度、海拔，将样品管放入自封袋，并再次写上样品编号。
B.3.3　同一堆粪样应尽量多取样品。

B.4　样品记录与编号

在采集粪样时，应填写《绿孔雀粪样采集记录表》（见表B.1）。记录采样包括样品编号，采集管数，采集地名称，采集地经纬度、海拔，采集日期，采集人等信息。

表 B.1　绿孔雀粪样采集记录表

样品编号	采集管数	采集地名称	采集地经纬度、海拔	采集日期	采集人

B.5　样品的临时保存

野外样品采回后，仔细检查核对标签和记录。有条件时在4 ℃冷藏保存，直到样品送到相关实验室。

B.6　样品的运输和实验室保存

野外样品采集完成后应于48 h内送到相关分子生物学实验室，并尽快进行DNA提取工作。运输过程中应注意保持低温，可将粪样静置于冰袋上，用泡沫箱进行保温。

B.7　样品的采集、运输和处理过程中的生物安全

粪样的采集、运输和处理过程中的生物安全要求应符合GB/T 27401 实验室质量控制规范的要求。

附　录　C
（资料性）
绿孔雀消化道线虫虫卵虫体镜检照片

绿孔雀消化道毛细线虫虫卵镜检照片如图C.1所示，蛔虫虫卵镜检照片如图C.2所示，毛细线虫虫体镜检照片如图C.3所示，异刺线虫虫体镜检照片如图C.4所示。

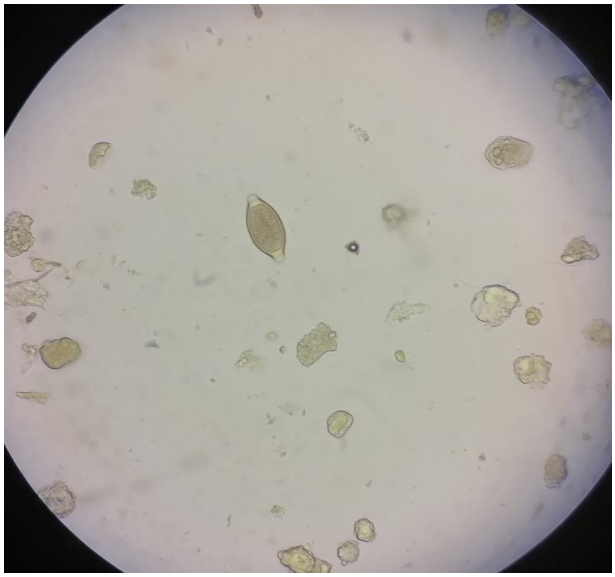

图 C.1　毛细线虫虫卵光学显微镜镜检照片（×100）

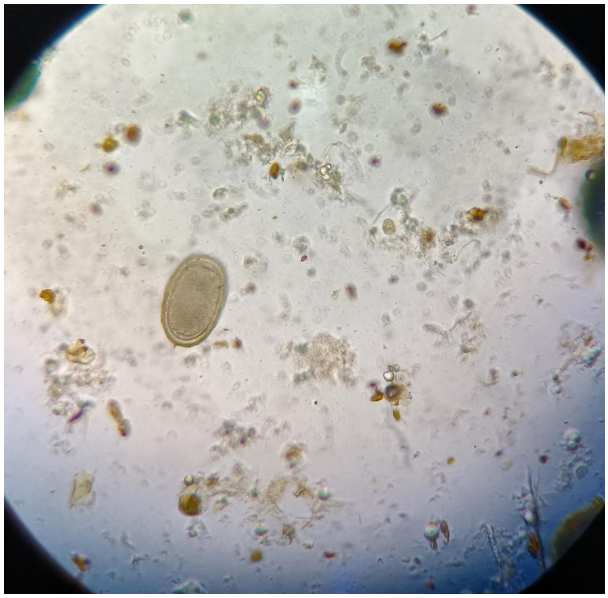

图 C.2　蛔虫虫卵光学显微镜镜检照片（×100）

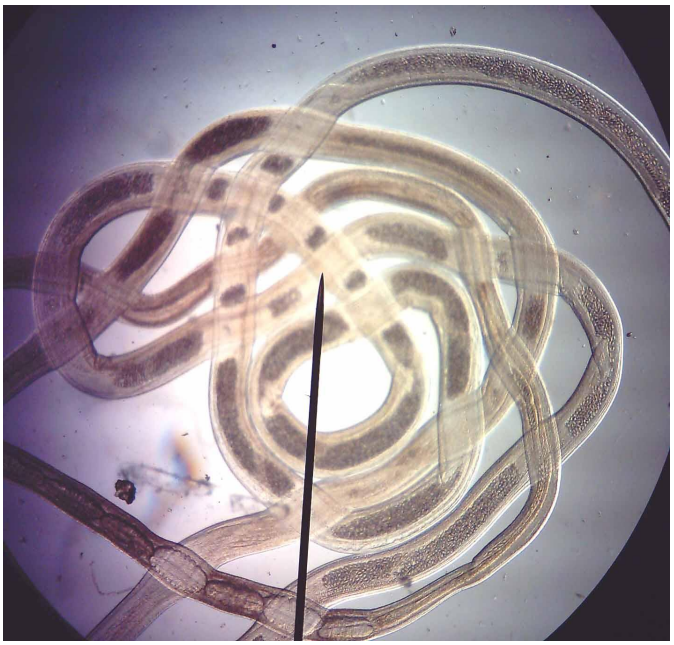

图 C.3　毛细线虫虫体体视显微镜镜检照片（×20）

图 C.4　异刺线虫虫体体视显微镜镜检照片（×20）