



中华人民共和国国家标准

GB/T 26618—2011

派琴虫病诊断操作规程

Protocol of diagnosis for Perkinsosis

2011-06-16 发布

2011-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、福建出入境检验检疫局、黄岛出入境检验检疫局、国家海洋环境监测中心、深圳出入境检验检疫局、上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吴绍强、林祥梅、刘建、郑腾、李西峰、梁玉波、刘荭、李建、韩雪清、贾广乐、梅琳。

引 言

派琴虫病是影响世界贝类养殖业发展的主要寄生虫病,为国际兽医局(OIE)规定的必报水生动物疫病之一。本病 1946 年首次报道,当时,引起美国路易斯安那州的墨西哥海湾的大批牡蛎(*Crassostrea virginica*)死亡。迄今为止,已发现派琴虫存在于美洲、欧洲、澳洲、亚洲和非洲五大洲的许多贝类体内,包括牡蛎、鲍鱼、蛤子、扇贝、珍珠牡蛎、乌蛤和贻贝等体内,并在许多地区造成了严重的危害,死亡率高达 95%。

1997 年,我国在栉孔扇贝、虾夷扇贝、皱纹盘鲍、菲律宾蛤仔体内检测到派琴虫。美国 2005 年也从中国广西北海进口牡蛎中检出派琴虫。目前,派琴虫已经成为影响我国贝类养殖业发展的主要病原之一。据对黄海北部三个海域的菲律宾蛤仔的派琴虫感染状况进行调查的结果表明,除 3 月份和 6 月份的感染率分别为 95%和 90%之外,其他月份感染率均为 100%。

目前,派琴虫感染的诊断通常依靠 OIE 推荐的组织切片法、FTM 组织培养法以及 PCR 方法。组织学方法可以通过显微镜下直接观察虫体或观察组织损伤来监测感染的分布情况。FTM 培养派琴虫休眠孢子的方法是将派琴虫滋养体进行培养,培养后,虫体体积增大、细胞壁增厚,而且不繁殖,是一种传统有效的定量检测派琴虫的方法。实时荧光 PCR 检测贝类派琴虫的方法敏感度较高,而且特异性强,检测可在一天之内完成,定量准确、全封闭反应等优点。

派琴虫病诊断操作规程

1 范围

本标准规定了派琴虫病诊断时的样品采集,虫体培养及显微镜检查,PCR 以及荧光 PCR 检测操作规程。

本标准适用于蛤仔、牡蛎等水生动物及其产品中携带海洋派琴虫(*Perkinsus marinus*)、奥尔森派琴虫(*Perkinsus olseni*)等派琴虫的诊断,也可用于派琴虫病的监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

派琴虫病 Perkinsosis

帕金虫病

由海洋派琴虫(*P. marinus*)、奥尔森派琴虫(*P. olseni*)等在宿主血细胞内寄生或者游离在结缔组织、鳃、内脏或套膜上皮中而引起的水生动物的一种严重的寄生虫病。

注:除 *P. marinus*、*P. olseni* 之外,病原还包括 *P. qugwadi*、*P. chesa peaki*、*P. andrewsi* 和 *P. mediterraneus*。

3.2

Ct 值 cycle threshold

荧光 PCR 反应中,荧光信号到达设定的阈值所经历的循环数。

4 材料

除另有规定外,所用化学试剂均为分析纯。

试验用水要求达到 GB/T 6682 中一级水的要求。

- 4.1 液体巯基乙酸盐培养基(fluid thioglycollate media,FTM):具体配制方法见附录 A。
- 4.2 卢戈氏碘液(Lugol's iodine):配制方法见附录 A。
- 4.3 2.5%氯霉素:配制方法见附录 A。
- 4.4 1%制霉菌素:配制方法见附录 A。
- 4.5 酚-三氯甲烷抽提法所需要的相关试剂或其他 DNA 抽提试剂盒,见附录 A。
- 4.6 10×PCR buffer、25 mmol/L MgCl₂、dNTP(2.5 mmol/L 或 10 mmol/L)、5 U/μL rTaq DNA 聚合酶等,均为商品化试剂盒中成分。
- 4.7 琼脂糖。
- 4.8 电泳缓冲液:配制方法见附录 A。
- 4.9 引物及探针:包括 PCR 引物及荧光 PCR 引物和探针。