

团 体 标 准

T/CVMA 319—2025

牦牛弓形虫病诊断技术

Diagnostic techniques for the yak toxoplasmosis

2025 - 11 - 17 发布

2025 - 11 - 17 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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。

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。

本文件由四川农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：四川农业大学、浙江海正动物保健品有限公司、成都师范学院、成都达硕实验动物有限公司、成都辉跃中科生物科技有限公司。

本文件主要起草人：谢跃、冀伟、谢等龙、左之才、王辉、周璇、王利丹、张馨慧、钟秉洋、王蕊曦、王朝、朱鹏辰、韦国山、范新艺、李赵睿羿、黄家利、马晓平、郭红瑞、杨炳雄、周汝学、钟浩、李亚丽。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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）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。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- NY/T 541 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

下列缩略语适用于本文件。

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

5 临床诊断

5.1 临床特征

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 2 d~6 d 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、腹水或妊娠母牛羊水等体液 0.5 mL~1 mL 或脑、胎盘、心、肺、骨骼肌等组织 2 g~5 g。为防止可能的布鲁氏菌病混合感染，样品的采集和处理应按照 NY/T 541 有关规定进行。

6.2 样品的保存

样品采集后置于样品保存袋中，封口后，每份样品置于 2℃~8℃ 冰箱内保存。

6.3 样品的运输

采集样品应在 24 h 内送往相关实验室进行检测，按照 NY/T 541 规定进行样品的存放与运输。

6.4 生物安全要求

样品的采集和处理的生物安全措施按照 GB 19489 进行。

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

吉姆萨染液（见附录A的A.1）、PBS（附录A.2）、甲醇。

7.2 操作方法

淋巴结穿刺液、腹水或羊水等体液经 1500 r/min 离心 10 min，取沉淀涂片，干燥、固定和吉姆萨染色，光镜下观察；脑、胎盘、心、肺、骨骼肌等组织涂片或触片经吉姆萨染色，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或包囊和缓殖子则判定为病原学阳性。

8 PCR 检测

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

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682 中相关规定。

全血/组织/细胞基因组DNA提取试剂盒、2×Taq MasterMix、DL 2000 DNA Marker、1×TAE缓冲液（附录A.3）、1%琼脂糖凝胶（附录A.4）、Goldview核酸染料、ddH₂O等。

8.1.3 引物

以弓形虫 529 bp 重复序列为靶基因（见附录 B）。

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，提取脑、胎盘、心、肺、骨骼肌等样品组织基因组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ddH₂O。

8.2.2 PCR 扩增和检测

PCR为20 μL反应体系，包括上下游引物（10 mmol/L）各1 μL，2×Taq MasterMix 10 μL，待检样品DNA 2 μL，ddH₂O补足体积至20 μL。涡旋混匀后，按如下反应参数进行扩增：95℃预变性 3 min，95℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，35个循环，72℃延伸 10 min，4℃保存。取5 μL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500 bp左右出现条带，判定为阳性（见附录C）；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、8道移液器及吸头。

9.2 试剂和材料

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

9.3 操作方法

9.3.1 样品处理

取无菌采集的牦牛血液约1 mL，斜放于4 °C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 °C冷冻保存待检。

9.3.2 ELISA 检测

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 0.2 μg/mL，每孔 100 μL，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 200 μL，震荡 3 min 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 100 μL，置于 37 °C孵育 1 h。

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 100 μL，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 1 h~1.5 h。

9.3.2.5 酶标抗体

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

9.3.2.6 显色

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

9.3.2.7 终止反应

加入终止液，每孔 100 μL，混匀。

9.3.2.8 读数

将反应板放入酶标仪中，450 nm 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 $OD_{450nm} < 0.15$ 、阳性血清对照孔 $OD_{450nm} \geq 0.4$ 时，按如下条件进行结果判定：

被检血清孔 OD_{450nm} 平均值 ≥ 0.2 ，且被检血清孔 OD_{450nm} 平均值/标准阴性血清孔 OD_{450nm} 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。

附 录 A
(规范性)
试剂及其配制方法

A.1 吉姆萨染液

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

A.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)

NaCl 8.5 g, Na₂HPO₄ 1.1 g, NaH₂PO₄·H₂O 0.3 g, 加蒸馏水定容至1000 mL。

A.3 电泳缓冲液 (TAE)

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

A.4 1%琼脂糖凝胶

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

A.5 包被缓冲液

Na₂CO₃ 1.59 g, NaHCO₃ 2.93 g, 加蒸馏水定容至1000 mL。

A.6 PBST 洗涤液

取Tween-20 0.5 mL加入1000 mL PBS, 混匀, 4 °C保存。

A.7 封闭液

1% BSA的PBS。

A.8 终止液

2 mol/L硫酸。

A.9 包涵体裂解缓冲液

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

附录 B
(资料性)
弓形虫 PCR 产物参考核苷酸序列

弓形虫重复原件 (RE) 参考核苷酸序列 (GenBank Accession No. AF146527.1)

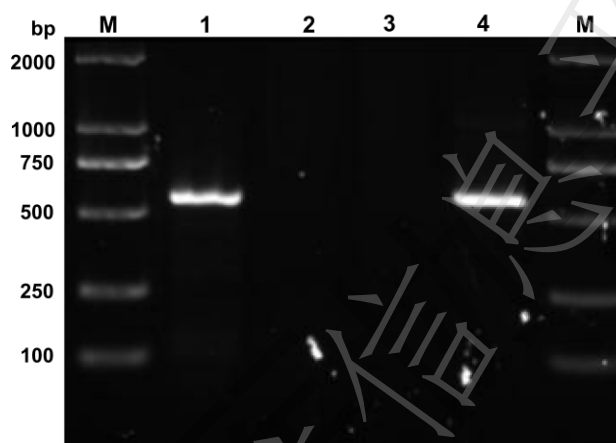
5'-**CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTTTATTTTTTTTTCTTTTTGTTTTTCTGATTTTTGTT**
TTTTTACTCGGGCCCAGCTGCGTCTGTCGGGATGAGACCGCGGAGCCGAAGTGCGTTTTCTTTTTT
GACTTTTTTTTGTTTTTTACAGGCAAGCTCGCCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTCGAA
GGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTCCAGCCGTCTTGGAGGAGAGATATCAGGACTGTAGATGAA
GGCGAGGGTGAGGATGAGGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGACGAGAGTCCGAGAGGGAGAAGATGT
TTCCGGCTTGGCTGCTTTTCTGGAGGGTGGAAAAAGAGACACCGGAATGCGATCCAGACGAGACGA
CGCTTTCCTCGTGGTGTATGGCGGAGAGAATTGAAGAGTGGAGAAGAGGGCGAGGGAGACAGAGTCGG
AGGCTTGGACGAAGGGAGGAGGGGTAGGAGAGGA**AATCCAGATGCACTGTGTCTGCAG**-3'

注：粗体是检测的上游引物序列，下划线加粗部分的反向互补序列是检测的下游引物。

附录 C
(规范性)

弓形虫重复原件 (RE) PCR 扩增结果

弓形虫重复原件 (RE) 的 PCR 扩增结果示意图见图 C.1。



标引序号说明:

M —— DL2000 DNA 分子质量标准;

1 —— 阳性样品;

2 —— 阴性样品;

3 —— 阴性对照;

4 —— 阳性对照。

图C.1 弓形虫重复原件 (RE) 的PCR扩增产物电泳结果示意图

附录 D

(规范性)

弓形虫 SAG 1 重组抗原的制备

D.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。

D.2 材料

引物ExpSAG1-F/ExpSAG1-R (10 μ M)、*EcoR* 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DH5 α 、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 μ m)、蛋白浓缩管。

D.3 引物序列

弓形虫 SAG 1 重组抗原的引物序列见表 D.1。

表D.1 弓形虫SAG 1基因表达片段的扩增引物序列

目的基因	引物名称	引物序列	酶切位点	片段大小
SAG 1	ExpSAG1-F	5'-CGgaattcTCGGATCCCCCTCTGTGCCAATC-3'	<i>EcoR</i> I	792bp
	ExpSAG1-R	5'-CCGctcgagTTAAGCCGATTTTGCTGACCCTG-3'	<i>Xho</i> I	

D.4 表达载体的构建与鉴定

D.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 μ L，包括2 μ L模板DNA (100 ng)、25 μ L 2 \times HiFi SuperMIX I、2 μ L ExpSAG1-F、2 μ L ExpSAG1-R、19 μ L ddH₂O；反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性10 min，94 $^{\circ}$ C变性30 s，58 $^{\circ}$ C退火30 s，72 $^{\circ}$ C延伸90 s，共30个循环；72 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C储存备用。

D.4.2 双酶切

使用20 μ L酶切体系：10 μ L弓形虫SAG 1基因PCR产物或pET-28a质粒、2 μ L 10 \times 酶切缓冲液、1 μ L *EcoR* I、1 μ L *Xho* I、6 μ L ddH₂O、37 $^{\circ}$ C酶切30 min ~ 60 min。胶回收酶切产物。

D.4.3 重组质粒的构建与转化

使用10 μ L连接体系：4.5 μ L双酶切弓形虫SAG 1基因片段、1.5 μ L双酶切pET-28a质粒片段、T4 DNA连接酶0.5 μ L、10 \times 连接缓冲液1 μ L、ddH₂O 2.5 μ L。25 $^{\circ}$ C水浴连接40 min。将连接产物转化到感受态大肠杆菌DH5 α ，操作步骤根据说明书进行。

D.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。

D.5 蛋白表达和纯化

- D. 5.1 取阳性表达菌 *Transseta*, 按 1:100 的比例接种到含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 振荡培养至菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 0.4~0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 3 h。
- D. 5.2 将诱导培养的菌液分装到离心管中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 8000 rpm 离心 10 min, 弃上清液。
- D. 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中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 1000 bar 压力破碎仪上破碎 3~5 次。
- D. 5.4 将破碎菌体裂解物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12000 r/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 h~2 h, 其间不断振荡; 4 $^{\circ}\text{C}$ 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进行纯化。
- D. 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 $^{\circ}\text{C}$ 透析 4 h~5 h, 重复该透析步骤 3 次。
- D. 5.6 将透析后的蛋白转入蛋白浓缩管, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 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。
- D. 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

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] Yu H, Huang B, Zhuo X, et al. Evaluation of a real-time PCR assay based on the single-copy SAG1 gene for the detection of Toxoplasma gondii[J]. Vet Parasitol, 2013, 197(3-4):670-673.
- [5] Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol, 2000, 30(1):69-75.
- [6] 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.
- [7] NY/T 573-2022 动物弓形虫病诊断技术