

团 体 标 准

T/CVMA 320—2025

牦牛片形吸虫病诊断技术

Diagnostic techniques for the yak fascioliasis

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、王利丹、周璇、钟秉洋、张馨慧、王朝、王蕊曦、朱鹏辰、韦国山、范新艺、李赵睿羿、黄家利、郭红瑞、马晓平、钟浩、李亚丽、杨炳雄、周汝学。

中国兽医协会
CVMA
全国团体

牦牛片形吸虫病诊断技术

1 范围

本文件描述了牦牛片形吸虫（肝片形吸虫、大片形吸虫、片形吸虫中间型）病的流行特征、临床症状、病原学检测以及病理检查诊断方法。

本文件适用于牦牛片形吸虫病的诊断、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

牦牛片形吸虫病 yak fascioliasis

由片形科 (Fasciolidae)、片形属 (*Fasciola*) 的肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*)、大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 及片形吸虫中间型 (*Fasciola intermediate*) 单独或混合寄生于牦牛的肝胆管内引起的一种吸虫病。

3.2

肝片形吸虫病 *Fasciola hepatica*

是寄生于牦牛肝胆管内的一种吸虫，虫体背腹扁平，呈叶片状，新鲜虫体呈棕红色，可引起牦牛急性或慢性肝炎和胆管炎，并伴发全身性中毒和营养障碍。

注：肝片形吸虫虫体形态见附录A的图A.1。

3.3

大片形吸虫 *Fasciola gigantica*

是寄生于牦牛肝胆管内的一种大型吸虫，虫体呈叶片状、略透明，可引起牦牛急性或慢性肝炎和胆管炎，对肝脏的损伤比肝片形吸虫严重。

注：大片形吸虫虫体形态见附录A的图A.2。

3.4

片形吸虫中间型 *Fasciola intermediae*

牦牛片形吸虫中间型是寄生于牦牛肝胆管内的一类吸虫,其形态与致病特征均介于肝片形吸虫和大片形吸虫之间,是两类典型片形吸虫之外的过渡型致病虫种。

4 临床诊断

4.1 流行病学

牦牛片形吸虫病在世界各牦牛主产区均有发生。在我国,三种片形吸虫均有分布,其中肝片形吸虫主要分布在我国青海、西藏、四川、甘肃、新疆和云南等6个省和自治区;大片形吸虫流行范围则相对局限,常见于云南地区。本病呈季节性流行,感染季节多在夏、秋两季,秋末及冬季发病较多。

4.2 临床症状

4.2.1 急性型

牦牛体温升高、精神沉郁、绝食,3 d~5 d内因严重贫血出现死亡。

4.2.2 慢性型

牦牛被毛无光泽,伴有脱毛现象;同时食欲减退,眼睑、下颌、胸部和腹下水肿;患严重肝炎或胆管炎时,常发生全身性中毒和营养不良等症。

5 病理学检查

5.1 材料

解剖刀、解剖剪、外科剪、挑针、镊子、搪瓷盆、搪瓷盘、搪瓷缸、太平皿、载玻片。

5.2 病变检测

按一般剖检术式对疑似片形吸虫病感染致死或将要死亡的牦牛进行解剖摘出肝脏,观察肝脏病变情况。

5.3 病理变化

5.3.1 急性期病理变化

急性感染时,可见肝脏肿大,肝包膜下有纤维素沉积,出血,肝实质内有暗红色虫道。引起急性肝炎和内出血,腹腔中有血色液体,有腹膜炎的变化。

5.3.2 慢性期临床症状

慢性病例可见慢性胆管炎、肝炎和贫血现象。表现肝脏肿大、萎缩、硬化及黄疸。小叶间结缔组织增生,胆管扩张、增厚、变粗甚至堵塞。胆管像绳索样凸出于肝表面。

6 病原学检查

6.1 虫卵检查

6.1.1 材料

样品保存袋、记号笔、防水标签纸、300 mL带刻度的三角烧瓶、200 mL玻璃杯、1.6%氢氧化钠溶液（见附录B的B.1）、饱和盐水（见B.2）、60目铜丝筛、胶帽吸管、玻璃棒、10 mL吸管、10 mL离心管、离心机、镊子、载玻片和盖玻片、天平、显微镜等。

6.1.2 样品采集、保存和运输

6.1.2.1 粪便的采集

若是群体采样，采集牦牛新鲜粪便：成年牛群不少于300 g，幼年（3岁以内）牛群不少于100 g；若是个体采样，牦牛个体数应在20头及以上，采集量成年牛不少于100 g，幼年牛不少于50 g。

6.1.2.2 粪便的保存

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

6.1.2.3 样品的运输

所采集样品应在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。

6.1.3 操作

6.1.3.1 定性检查——沉淀法

取新鲜粪便10 g放入玻璃杯中，加10 mL水搅成糊状，然后再加20倍体积水进行均匀混合，用60目铜丝筛网滤入另一玻璃杯中，把滤过的粪便混悬液静置沉淀30 min后，倒掉上清液，再继续加水混合，静置沉淀。静置的时间可逐渐缩短，但至少也要10 min。这样反复进行，直到上清液透明为止。最后吸取沉淀物放在载玻片上，加盖玻片在显微镜下作定性检查。

6.1.3.2 定性检查结果判定

肝片形吸虫虫卵较大，呈长椭圆形，黄色或黄褐色，前端较窄，后端较钝，一端有盖，卵盖不明显，卵壳薄而光滑，半透明，分2层，卵内充满卵黄细胞和1个胚细胞。虫卵大小为（100 μm~158 μm）×（70 μm~90 μm）。大片形吸虫虫卵形态与肝片形吸虫虫卵相似，但比肝片形吸虫虫卵大，呈深黄色，大小为（144 μm~208 μm）×（70 μm~109 μm），胚细胞位于卵盖一端。

注：肝片形吸虫虫卵形态见附录A的图A.3，大片形吸虫虫卵形态见附录A的图A.4。

6.1.3.3 定量检查——虫卵定量计数法

称取牦牛粪便30 g，放入300 mL容量的三角烧瓶中，加入50 mL 1.6%浓度的氢氧化钠溶液，静置过夜。次日，将粪块搅碎，再加入1.6%的氢氧化钠溶液到300 mL刻度处。再充分摇匀，立即用吸管吸取粪液5 mL注入离心管内，放离心机内以150 g，离心2 min，倾去上层液体，换加饱和盐水，再次离心后，再倾去上层液体，再换加饱和盐水，如此反复操作，直到上层液体完全清澈为止。倾去上层液体后，加清水洗涤，沉淀后弃上清，将沉渣全部分滴于数张载玻片上，用低倍显微镜检查所制的载玻片，统计片形吸虫虫卵总数，以总数乘以2，即为每克粪便中的片形吸虫虫卵数（EPG）。

6.1.3.4 定量检查结果判定

在片形吸虫病诊断中，当牦牛每克粪便中的虫卵数达到100枚~200枚时，即应考虑其致病性。

6.2 虫体检查

6.2.1 材料

解剖刀、解剖剪、外科剪、挑针、镊子、搪瓷盆、搪瓷盘、搪瓷缸、大平皿、载玻片、薄荷脑液（见附录B的B.3）、盐酸卡红溶液（见B.4）、醋酒精溶液（见B.5）。

6.2.2 虫体采集

6.2.2.1 按一般剖检术式摘出肝脏，再剪断胆管与十二指肠连接部位，要注意观察断端有无虫体流出。

6.2.2.2 将肝脏放搪瓷盘中。分离胆囊，放在平皿中，剪开囊壁，将胆汁用清水稀释，等自然沉淀后，检查沉淀物中是否有虫体。检查肝脏时，先看肝表面有无病变结节，发现后用剪刀剪取，放在载玻片中间做压片检查。

6.2.2.3 沿大胆管及其分支剪开，如发现虫体取出放在盛有清水的平皿中。再沿着与胆管垂直的方向将肝组织切成数大块，注意断面有无虫体或病灶。用手压挤，看是否有虫体被压出。

6.2.2.4 将肝块浸入盛有多量水的搪瓷盆中，用手撕成小块，再挤压每个小肝块，洗净后取出。向搪瓷盆内再加水进行反复水洗沉淀，检查沉淀物，用平头镊子挑出虫体。

6.2.2.5 挑出的虫体用生理盐水洗净，再放在常温水内或薄荷脑液中使虫体松弛。有些虫体的肠管内含有大量食物，可在生理盐水中放置过夜，待其食物消化或排出。

6.2.3 虫体固定

将挑拣好的虫体进行固定、盐酸卡红染色、脱色脱水、透明封片后进行鉴定（见附录C）。

6.2.4 结果判定

6.2.4.1 肝片形吸虫检查结果判定

虫体呈背腹扁平的叶片状，活体为棕红色。虫体长度是宽度的两倍，前部宽于后部，口吸盘位于前端，口孔经咽通向食道和肠管，肠管分出无数分支。腹吸盘位于虫体腹面。两个睾丸呈树枝状分支，一个卵巢呈鹿角状分支。

注：肝片形吸虫染色标本虫体形态见附录A中图A.5。

6.2.4.2 大片形吸虫检查结果判定

虫体形态与肝片形吸虫形态极为近似。虫体大型、叶片状、略透明，长33 mm~76 mm，宽5 mm~12 mm，头椎不明显，虫体窄长，长度超过宽度的两倍以上，两侧近于平行，后端钝圆。肠管的外侧枝与肝片形吸虫的相同，但内侧枝发达，且有再分枝，睾丸偏于虫体的前半部，约占整个虫体的1/2。

注1：大片形吸虫染色标本的虫体形态见附录A中图A.6。

注2：大片形吸虫与肝片形吸虫的虫体形态区别参见附录A。

6.2.4.3 片形吸虫中间型检查结果判定

虫体形态均介于肝片形吸虫和大片形吸虫之间。

7 PCR 检测方法

7.1 设备和试剂

7.1.1 设备和器材

PCR 扩增仪、台式低温高速离心机、核酸浓度检测仪、水平电泳槽、稳压稳流电泳仪、凝胶成像分析仪或紫外检测仪、微量可调移液器、与微量可调移液器匹配的吸头、无核酸酶的离心管。

7.1.2 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。

2×PCR 预混缓冲液（含带染料与不带染料两种选择）、粪便 DNA 提取试剂盒、组织 DNA 提取试剂盒、无核酸酶水、6×DNA 上样缓冲液，以及条带由大到小依次为 2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp 和 100 bp 的 DNA 分子量标志物（DNA Marker）；DNA 电泳缓冲液为 50×TAE 贮存液（配制方法见附录 B 的 B.6），使用时需稀释为 1×TAE 工作液（配制方法见 B.7），DNA 电泳凝胶为 1.2% 琼脂糖凝胶（配制方法见 B.8）。

7.1.3 特异性引物

大片形吸虫与肝片形吸虫 ITS1 基因参考序列见附录 D 中 D.1，片形吸虫中间型 COX1 基因参考序列见附录 D.2，引物序列见附录 D.3。引物工作液需配制成 10 μmol/L 浓度（配制方法见附录 B 的 B.9）。

7.2 待检样品

7.2.1 粪便样品

取粪便样品约 200 mg，使用粪便基因组提取试剂盒，按照试剂盒说明书提取样品 DNA 后，立即进行 PCR 检测或 -20 °C 保存。

7.2.2 组织样品

急性型病畜，取肝病组织或肝内童虫约 100 mg，使用商品化组织 DNA 提取试剂盒，按照试剂盒说明书提取样品 DNA 后，立即进行 PCR 检测或 -20 °C 保存。

7.3 PCR 操作程序

7.3.1 PCR 反应体系

PCR 扩增反应体系见附录 D.3。

7.3.2 PCR 扩增程序

PCR 扩增程序见附录 D.4。

7.4 扩增产物电泳检测

7.4.1 加样

取 5 μL PCR 扩增产物（不带染料）与 2 μL 6×DNA 上样缓冲液混匀后，加入 1.2% 琼脂糖凝胶的加样孔；若为带染料 PCR 扩增产物，直接取 5 μL 加入孔内；同时设标准 DNA Marker、空白对照、阴性对照和阳性对照。

7.4.2 电泳

100 V 恒压电泳 15 min ~ 20 min，取出凝胶置于凝胶成像分析仪或紫外检测仪下观察结果并拍照。

7.5 试验成立条件

空白对照和阴性对照均未扩增出条带，肝片形吸虫或大片形吸虫阳性对照扩增出一条 463 bp 目的条带，中间型扩增出 607 bp 则结果有效。

7.6 结果判定

待检样品扩增出 463 bp 单一条带，可判定该虫种为肝片形吸虫或大片形吸虫；待检样品扩增出 607 bp 单一条带，可判定该虫种为片形吸虫中间型（见附录 D 中的图 D.1）。

8 综合结果判定

8.1 疑似

凡出现第4章的临床症状或符合5.3的病变特征，可判为片形吸虫病疑似病例。

8.2 确诊

凡符合5.3的病变特征，并满足6.2.4或7.6中检查结果鉴定为片形吸虫病感染。粪便检查结果满足6.1.3.2、6.1.3.4或7.6时，可判为片形吸虫病病例。

9 生物安全相关处理

9.1 人员防护

生物安全措施按照GB 19489进行。采样及后续处理全程需做好个人防护，避免直接接触或吸入病原。实验人员需佩戴基础防护装备，如手套、实验服、鞋套等。在操作过程中禁止进食、饮水、触摸口鼻等。操作后洗手，避免交叉污染。

9.2 采样工具

采使用后的采样工具应进行高压灭菌处理，然后作为医疗废弃物处理。重复使用的采样工具应进行彻底清洗和消毒，确保无残留病原体。

9.3 环境消毒

使用含氯消毒剂、75%酒精及紫外等方式进行全场景清洁，避免病原扩散。

附 录 A
(资料性)
牦牛片形吸虫成虫及虫卵形态

A.1 肝片形吸虫 *Fasciola hepatica*

肝片形吸虫虫体背腹扁平，呈叶片状；新鲜虫体呈棕红色（图A.1），固定后呈灰白色。虫体大小为（20 mm～30 mm）×（5 mm～13 mm），长度是宽度的两倍。虫体前部宽于后部，前端呈圆锥状突出，称为头锥，其底部较宽似“肩”。从肩往后逐渐变窄，体表生有许多小刺。口吸盘位于前端，底部为口孔，口孔经咽通向食道和肠管，肠管分为两支终于盲端，每个肠支又分出无数分支。腹吸盘位于虫体腹面，肩的水平线下。两个睾丸呈树枝状分支，前后排列于虫体的中后部，每个睾丸发出一条输出管，汇总于输精管而进入雄茎囊，其内有储精囊、前列腺和雄茎。生殖孔开口于腹吸盘之前。卵巢一个，呈鹿角状分支，位于睾丸的右上方。子宫位于卵模与腹吸盘之间，孕卵子宫呈褐色菊花状。卵黄腺甚发达，满布于虫体的两侧和睾丸之后；左右两侧的卵黄管汇合为卵黄总管，横于虫体的前1/3与中1/3的交界处，在其中央形成卵黄囊，再与卵模相通。



图A.1 肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*) 成虫

A.2 大片形吸虫 *Fasciola gigantica*

大片形吸虫虫体呈叶片状、略透明，大小为（33 mm～76 mm）×（5 mm～12 mm），头锥不明显，虫体窄长，长度超过宽度的两倍以上，两侧近于平行，后端钝圆（见图A.2）。肠管的外侧枝与肝片形吸虫相同，但内侧枝发达，且有再分枝，睾丸偏于虫体的前半部，约占整个虫体的1/2。



图A.2 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 成虫

A.3 片形吸虫中间型 *Fasciola intermediate*

片形吸虫中间型虫体形态介于肝片形吸虫和大片形吸虫之间。

A.4 肝片形吸虫虫卵

肝片形吸虫虫卵长 $100\ \mu\text{m} \sim 158\ \mu\text{m}$ ，宽 $70\ \mu\text{m} \sim 90\ \mu\text{m}$ ，呈黄褐色，椭圆形，前段较窄，后端较钝，前端有一个模糊的卵盖，在虫卵的内部有大量的卵黄细胞和一个靠近前端的卵胚细胞（见图A.3）。



图A.3 肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*) 虫卵

A.5 大片形吸虫虫卵

大片形吸虫虫卵较肝片形吸虫虫卵更大，呈长椭圆形或椭圆形，长 $144\ \mu\text{m} \sim 208\ \mu\text{m}$ ，宽 $70\ \mu\text{m} \sim 109\ \mu\text{m}$ ，前端有一个卵盖，卵内充满许多卵黄细胞，卵细胞再近卵盖一侧（见图A.4）。



图A.4 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 虫卵

A.6 虫体染色标本

肝片形吸虫虫体染色标本及大片形吸虫虫体染色标本见图A.5、图A.6。

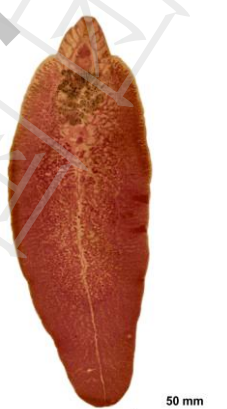


图 A.5 肝片形吸虫成虫 (*Fasciola hepatica*)
染色标本



图 A.6 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*)
染色标本

A.7 片形吸虫形态区别

大片形吸虫与肝片形吸虫形态区别要点见表A.1。片形吸虫中间型虫体形态介于肝片形吸虫和大片形吸虫之间。

表A.1 大片形吸虫与肝片形吸虫的区别要点

虫体部位/特征	区别（大片形吸虫对比肝片形吸虫）
长度	较窄长，长与宽之比约为 5:1
肩部	不明显，两侧缘近于平行
吸盘	腹吸盘较口吸盘约大 1.5 倍
咽/食道	咽长于食道
肠管	内侧支数目很多，并有明显的小支
睾丸	位置较前，睾丸以后的部分延伸较长
尾端	钝圆，呈 U 字形

附录 B
(资料性)
试剂及其配制方法

B.1 1.6 %氢氧化钠溶液的配制

氢氧化钠0.8 g，加入蒸馏水定容至50 mL，溶解后即成。

B.2 饱和盐水的配制

将食盐加入热水内，不断搅拌，直到食盐不再溶解为止（200 mL约需75 g食盐，浓度约为37.5%，比重约为1:20）。

B.3 薄荷脑液的配制

取薄荷脑12 g，溶于95 %酒精5 mL中，制成薄荷脑饱和酒精溶液，使用时将此液半滴，加入50 mL蒸馏水中即可。

B.4 盐酸卡红的配制

取蒸馏水30 mL加盐酸4 mL，煮沸。趁热加入卡红染粉8 g，再加入85 %酒精180 mL，再滴加浓氨水2滴 ~4滴以中和。待出现沉淀，放冷，过滤，其滤液即为盐酸卡红染液。

B.5 酸酒精的配制

70 %酒精50 mL，加浓盐酸1 mL。

B.6 50×TAE 贮存液的配制

取三羟甲基氨基甲烷（Tris碱）242 g、二水合乙二胺四乙酸二钠（ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）37.2 g，加入适量去离子水进行初步溶解，接着加入57.1 mL冰乙酸，随后继续补加去离子水直至溶液总体积定容至1000 mL，充分搅拌使所有成分完全溶解后，将该溶液置于室温下保存即可。

B.7 1×TAE 电泳缓冲液的配制

量取50×TAE贮存液20 mL，再向其中加入980 mL去离子水，充分混合均匀后即可得到可用于DNA电泳的1×TAE工作液。

B.8 1.2 %琼脂糖凝胶的配制

称取1.2 g琼脂糖，加入100 mL 1×TAE缓冲液，将混合物加热至琼脂糖完全融化后，加入5 μL 浓度为10 mg/mL的EB，充分混匀后倒入凝胶盘中；随后置于室温下待凝胶自然凝固，凝固后移去梳子，再将凝胶放入水平电泳槽内，向槽中加入1×TAE缓冲液，使缓冲液没过胶面约2 mm，凝胶即可备用。

B.9 PCR 引物工作液的配制

先将装有上、下游引物的离心管置12 000 g离心1 min，慢慢打开管盖；分别按照管壁标记量加入无核酸酶水，充分混匀，使上、下游引物终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ ，置于-20 °C冻存。

附录 C

(资料性)

肝片吸虫虫体的固定、染色和封片

C.1 固定

将挑拣出的虫体放在吸水纸上吸干水分，再放在清洁的载玻片上，载玻片两端铺上单层滤纸，盖上另一载玻片，稍加压力将虫体压薄后，用橡皮筋或线绳扎紧，投入70%酒精内固定。注意投入时，应以一端慢慢浸入，便于将两载玻片之间的空气赶出，固定时间应达24 h以上。

C.2 染色（盐酸卡红染色法）

C.2.1 染色

将在70%酒精内固定好的虫体标本取出，投到盐酸卡红染色液中，染色24 h以上。尽可能将虫体深染，使虫体的内部器官充分着色。

C.2.2 脱色

将虫体自染色液中取出放入酸酒精中脱色，脱色时间一般为1 h。要随时观察，至颜色深浅分明，即虫体外层呈淡红色、内部构造呈深红色时取出，放于70%酒精中中和30 min ~ 60 min。

C.2.3 脱水

将脱色好的虫体分别移入80%、90%、95%、100%酒精中各脱水30 min ~ 60 min。

C.2.4 透明

将虫体先经1:1的100%酒精和二甲苯混合液中透明30 min，再取出放入纯二甲苯中，待虫体下沉后即可取出封片。用二甲苯透明时，时间不宜过长，否则虫体变硬而脆，不便封片。最好随时透明，随时封片。

C.3 封片

将透明的虫体放于载玻片上，滴加适量的加拿大树胶（将加拿大树胶用少量二甲苯稀释后再用，这样便于操作），用盖玻片封固，封固时切忌留有气泡在内。待干后直立装入标本盒内待检。

附录 D

(资料性)

片形吸虫 PCR 引物序列与 PCR 扩增产物电泳结果

D.1 大片形吸虫 ITS1 基因参考序列 (GenBank Accession No. MN970010.1)

5'-**TCGTAACAAGGTTTCCG**TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTGAAAATCTACTCTTAC
ACAAGCGATACACGTGTGACCGTCATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATT
GAGGTCACAGCATATCCGATCACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTATGCTTGCCT
CTCTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGTAAGTCCATGATTGGTAGTGTAGGCTTAAA
GAGGAGATTTGGGCTACGGCCGTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACAATTACACTGTTAAA
GTGGTATTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGGTCCTTGTGGCTGGACTGC
ACGTACGTCGCCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGTTGGACTG**ATAACCTGGTCTTTGACCAT**-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。

D.2 肝片形吸虫 ITS1 基因参考序列 (GenBank Accession No. OL635629.1)

5'-**TCGTAACAAGGTTTCCG**TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTGAAAATCTACTCTCAC
ACAAGCGATACACGTGTGACCGTCATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATT
GAGGTCACAGCATATCCGAACACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTATGCTTGCCT
CTCTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGTAAGTCCATGATTGGTAGTGTAGGCTTAAA
GAGGAGATTTGGGCTACGGCCGTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTACATTTACACTGTTAAA
GTGGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGGTCCTTGTGGCTGGACTGC
ACGTACGTCGCCCCGGCGGTGCCTATCCCGGGTTGGACTG**ATAACCTGGTCTTTGACCAT**-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。

D.3 片形吸虫中间型 COX1 基因参考序列 (GenBank Accession No. MH621335.1)

5'-**GTGAATTATATTAGTTGATTGTTT**ACGTTAGATCATAAGCGTGTTGGTTTGAATTTATATGTTGA
TTGGTCTTTGGGGTGGATTTTTTGGTCTTTCTTTGAGTATTTTGGTTCGTTTGAATTATTGGATCCTTAT
TTAATTTGGTGTCCCTGAGGTTTATAATTATGTTGTGACGGGACATGGGGTATTATGATTTTTTTCT
TTTTGATGCCTGTGTTGATTGGGGGGTTTGGTAATTATTTATTCCTTTGCTTTTGGGTATTCTGATTT
GAATTTACCTCGTTTAAATGCTTTGAGTGCTTGGTTGTTGCTTCCTGCTTGTGTTTGGTTCGTTTGGTT
TGATGGGGGGTATGGGTGTTGGTTGGACTTTCTATCCTCCTCTTTCTAGATTGGATTATTCTGGTTGGG
GAGTTGATTTTTTAATGTTTTCTTCTTCAATTTGGCTGGTGTTTCTAGTCTTTTGGGTTCTATTAATTTATT
TGTACTATTTTGGAGGTTATGTTGGGTGAGGGTATTGGTCGTCATAGTATTTTAGTTTGGGCTTATTTGT
TTACTTCTATTTTGGTGTATTGTCT**TTGCCGGTTT**AGCTGCTGCTATTA-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。

D.4 片形吸虫扩增引物

肝片形吸虫和大片形吸虫上下游引物、片形吸虫中间型上下游引物见表 D.1。

表D.1 肝片形吸虫特异性扩增引物序列

虫种	引物名称	引物序列	扩增长度
肝片形吸虫和大	上游引物 FasF	5'-TCGTAACAAGGTTTCCG-3'	463 bp

片形吸虫	下游引物 FasR	5'-ATGGTCAAAGACCAGGTTAT-3'	
片形吸虫中间型	上游引物 FasiF	5'-GTGAATTATATTAGTTGATTG-3	607 bp
	下游引物 FasiR	5'-TAATAGCAGCAGCTAAAACCGCAA-3'	

D.5 PCR反应体系

片形吸虫 PCR 反应体系见表 D.2

表D.2 片形吸虫PCR反应体系 (20 μL)

混合液组分	体积 (μL)	终浓度 (μM)
2× PCR 预混缓冲液	10.0	1×
上游引物 (10 μmol/L)	0.4	1
下游引物 (10 μmol/L)	0.4	1
DNA 模板 (50 ng/μL)	1.0	/
DMSO	0.6	/
无核酸酶水	7.6	/
总体积	20.0	/

注：1.PCR反应中设置阳性对照、阴性对照和空白对照，阳性对照为肝片形吸虫、大片形吸虫或片形吸虫中间型成虫基因组DNA（10 ng ~ 100 ng），阴性对照为未感染片形吸虫的牛肝脏DNA，空白对照为无核酸酶水。2.将混合液充分混合后，最后加入模板，短暂离心，按照下列反应程序进行PCR反应。

D.6 PCR反应程序

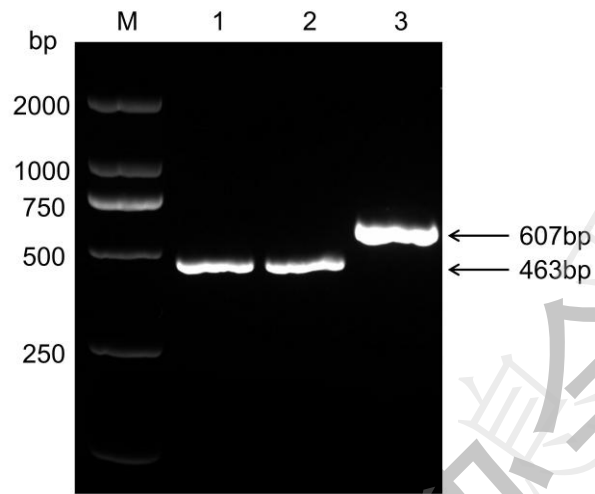
片形吸虫 PCR 扩增反应程序见表 D.3。

表D.3 PCR扩增反应程序

温度	反应时间	循环数
95 °C	5 min	1
95 °C	30 s	30
60 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	7 min	1

D.7 片形吸虫 ITS1 和 COX1 基因片段 PCR 扩增结果

片形吸虫ITS1和COX1基因的PCR扩增产物电泳结果示意图见图D.1。



标引序号说明：

M —— DL2000 DNA 分子质量标准；

1 —— 大片形吸虫 ITS1 扩增序列；

2 —— 肝片形吸虫 ITS1 扩增序列；

3 —— 片形吸虫中间型 COX1 扩增序列；

图D.1 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果示意图

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] 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.
-