**团体标准《虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法》**

**（征求意见稿）编制说明**

**一、任务来源和起草单位**

根据《广西标准化协会关于下达2021年第三十八批团体标准制修订项目计划的通知》（桂标协〔2021〕99号）文件精神，由广西水产科学研究院提出申报的团体标准《虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法》（项目编号2021-3802）已获立项。该团体标准由广西水产科学研究院提出、由广西水产技术推广站和广西水产科学研究院共同起草。

**二、标准制定的目的和意义**

虾肝肠胞虫(Enterocytozoon hepatopenaei，EHP)属于肠胞虫科、肠胞虫属的一种专性细胞内寄生的微孢子虫，在2004年最早发现于泰国养殖的斑节对虾并于2009年首次被分离和正式命名报道，主要感染凡纳滨对虾和斑节对虾等重要养殖虾类，是近10年危害养殖对虾的主要病原之一。EHP感染主要导致养殖对虾生长缓慢甚至停滞，表现为对虾消瘦、大小不均、重量离散；还可导致患病虾肝胰腺遭到破坏，免疫力降低，更容易被其他病原所侵染而死亡。目前，EHP已对全球对虾产业构成严重威胁，印度、委内瑞拉、中国、泰国、越南、马来西亚以及文莱等国家均有该病原检出并造成严重经济损失的报道。鉴于EHP引起的虾肝肠胞虫病（EHPD）的严重危害性，我国从2017年起已将EHPD纳入《国家水生动物疫病监测计划》，且规定阳性场处置参照一类疫病处置措施实施；近几年监测结果显示，我国沿海多省市的监测样品检出EHP阳性，检出品种包括凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、克氏原螯虾和青虾等我国主要养殖虾品种，表明EHP已成为我国虾类养殖业面临的重要威胁。EHP的危害与其感染数量密切相关，轻度感染基本上不影响对虾的生长发育，中度感染影响对虾的营养吸收，严重感染损坏对虾免疫系统。因此，非常必要建立一种快速且准确的EHP定量检测方法用于虾苗检疫、亲虾筛选、以及成虾养殖疫情监测过程中根据其定量数据及对虾养殖模式制定相应措施。

迄今为止国际(OIE)和国内均没有TaqMan-MGB荧光定量PCR检测虾肝肠胞虫的相关标准发布。荧光定量PCR(Real-time PCR)是在PCR反应体系中加入荧光标记物，通过仪器检测荧光信号强度对整个PCR反应扩增过程进行实时监测，在荧光信号指数扩增阶段PCR产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系，利用已知起始拷贝数的标准品绘制标准曲线，最后通过标准曲线对未知核酸模板进行定量分析的方法，具有速度快、灵敏度高、特异性强、自动化程度高、能定量检测病原体感染的强弱等优点，被认为是实验室检测病原体最理想的方法；而TaqMan-MGB探针则是荧光定量PCR使用的一种荧光探针，其3′端的淬灭基团为不发光的MGB(Minor Groove Binder)结合物，可实现高Tm值的探针长度缩短易于与模板退火而利于提高方法的灵敏度，且探针3′端不发光的淬灭基团与5′端报告基团在空间的位置更接近，使荧光本底降低、实验结果分辨率更高，因此TaqMan-MGB探针凭借其技术优势已广泛应用于人及动植物各种病原体的定量检测。目前，检测EHP国内使用的方法为套氏PCR，相比较荧光定量PCR，其操作更繁琐，需要电泳步骤，增大交叉污染风险。就EHP的监测工作，建立敏感性高、特异性强、操作更简便的TaqMan-MGB荧光定量PCR方法并制定标准用于病原检测，对有效防控由EHP引起的虾病害具有重要意义。

**三、标准的编制过程**

1、成立编制工作组。团体标准《虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法》项目任务下达后，广西水产科学研究院会同广西水产技术推广站成立了此标准编制工作组，制订了编制总体工作方案及进度安排，确定了标准中主要内容草案，明确了任务分工及工作技术路线。

2、资料收集、方法建立。确定编制工作小组后即展开调查研究，收集资料，包括国内、区内已颁布的相关标准、国内公开发表的相关技术性资料。查阅是否有相关的荧光定量PCR方法应用于虾肝肠胞虫1的检测，经综合分析研判，编制人员根据分工，采购试剂、设计引物探针、结合项目组开展的相关科研和检测工作基础，收集已保存的虾虾肝肠胞虫病原，开展反复试验，进行标准品制备、敏感性、特异性、稳定性测试，初步建立虾肝肠胞虫TaqMan-MGB探针荧光定量PCR方法。

3、优化方法，形成征求意见稿。标准起草组成员在前期研究工作以及初步建立的方法上，将试剂浓度、各反应条件进行优化、改进，筛选最佳反应程序，建立标准的TaqMan-MGB探针荧光定量PCR方法，制定荧光定量PCR检测技术的操作规程，标准起草小组根据国家标准化相关法律、法规要求，参考国内相关文献资料以及技术标准资料进行编写起草标准文稿。经两家起草单位工作人员讨论修改，完成《虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法》团体标准的征求意见稿。

**四、标准编制原则**

1、实用性原则

本文件是在充分查阅和收集相关资料文献，在国家标准、行业标准和地方标准尚未有TaqMan-MGB荧光定量PCR法检测虾肝肠胞虫的情况下制定的，TaqMan-MGB荧光定量PCR方法在病原检测中应用广泛成熟。本标准已经过反复试验研究，对于样品的检测，特异性、敏感性、操作简便性优于普通的PCR方法，广西是对虾养殖大区，近几年来受虾肝肠胞虫感染致病导致的损失巨大，因此，制定虾肝肠胞虫的TaqMan-MGB荧光定量PCR检测标准非常必要和实用，是广西虾养殖业疫病防控和可持续发展的需要。

2、协调性原则

本文件在编写过程中注意了与虾肝肠胞虫检测相关法律法规、标准的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。

3、规范性原则

本文件严格按照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》的要求和规定编写本文件的内容，保证标准的编写质量。

4、前瞻性原则

本文件在兼顾TaqMan-MGB荧光定量PCR检测虾肝肠胞虫的同时，还考虑到了检测方法发展的趋势和需要，在标准中体现了个别特色性、前瞻性和先进性条款，作为该病原检测技术发展的指导。

**五、标准主要内容及依据**

团体标准《虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法》主要章节内容包括：试剂与材料、仪器设备、操作方法及结果判定；主要依据来源为长期从事的病原分子生物学技术检验及参照的相关技术标准。

**1. 试剂与材料**

试剂和材料是本标准中试验必备品，根据所使用的试剂和材料详细列出使用到的试剂、主要仪器设备和耗材。

1.1 一般要求

所用试剂如无特殊说明均为分析纯试剂；试验用水应符合GB/T 6682-2008 一级水的要求。

此条款针对试剂纯度级别、试验用水达到国家标准中一级水要求。

1.2 引物与TaqMan-MGB探针

上游引物EHP-qF、下游引物EHP-qR、TaqMan-MGB探针EHP-qP根据寡核苷酸序列人工合成，扩增66bp的目的片段。使用浓度均为10 μmol/L。使用前按本标准要求先用灭菌DEPC水稀释，稀释后分装成小量置于-20℃保存备用，避免反复冻融。

引物序列是PCR检测的核心，其使用浓度决定扩增效率，此条款给出引物序列及使用配制浓度、保存方法。

1.3 DNA抽提试剂及荧光定量PCR试剂

商品化DNA抽提试剂盒、异丙醇等多种DNA提取的相关试剂；荧光定量PCR所用到的2×*Premix Ex Taq*™ (Probe qPCR)、ROX Reference Dye矫正液等。

此条款在于说明DNA提取及荧光定量PCR所用到的关键试剂，能达到同等效果的试剂或试剂盒均可选择，依据的是试剂或试剂盒说明书、多次试验结果。

1.4 仪器设备

定量PCR仪、组织匀浆机、冰箱、高压灭菌锅、离心机等仪器设备。

此条款列出所必备的仪器设备，可用不同品牌，但须满足试验需要。

1.5 耗材

微量移液器枪头、离心管、0.2mL PCR 管、塑料或乳胶手套等。

此条款列出所必备的耗材，均为一次性使用，避免交叉污染，接触到样品的容器或移液枪头高压灭菌后使用，可用不同品牌耗材，但须满足试验需要。

**2.操作方法**

具体规定了采样、样品前处理、对照样品的处理、DNA提取、荧光定量PCR加样体系。

2.1 采样

样品采集按SC/T 7103-2008（水生动物产地检疫采样技术规范）的规定执行。

采样数量和方法与检测结果得可靠性相关，此条款确定采样按照国标规定，减少漏检和假阴性可能。

2.2 样品前处理

虾样按不同规格取不同组织。其中，受精卵、幼体、仔虾采集整条虾作为样品，3cm以下幼虾采集除虾眼外整条虾作为样品，3cm以上虾采集鳃、肝胰腺作为样品。采集的样品用组织匀浆机匀浆，立即进行DNA提取操作或–80℃超低温冰箱保存。

此条款考虑到样品的处理方式影响最终检测结果，比如虾眼含有PCR抑制物，需去除；成虾的鳃和肝胰腺组织中病毒含量最高，选择含毒量高的组织检测，降低漏检风险，该条款根据其他标准中虾样品处理方法及文献报道确定。

2.3 对照样品的处理

阳性对照样品和阴性对照样品的采集和取样参照检测样品同时进行，将采集的虾组织样品匀浆后小量（30mg）分装于1.5 mL离心管后置于–80℃超低温冰箱保存备用。每次检测前各取出1管阳性对照和阴性对照样品，与待检样品进行后续操作。

此条款规定必须设置阳性、阴性对照同时进行TaqMan-MGB荧光定量PCR检测，以评价试验有效性。

2.4 DNA的提取

取30mg样品，按照商品化动物组织基因组DNA快速提取试剂盒说明书提取总DNA，最后加60μL洗脱缓冲液溶解DNA，置于–20℃保存备用。

此条款确定取样量及DNA抽提方法，推荐采用试剂盒提取DNA，长期实验研究结果表明，试剂盒提取DNA操作更简便、DNA损失少、纯度更高。

2.5 TaqMan–MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立（此章节为补充方法种各指标的支撑数据、图和表）

2.5.1 引物与TaqMan-MGB探针的设计与合成

采用Primer Express 3.0 软件按荧光定量PCR引物和MGB探针的设计原则，在SSU rDNA基因(KF362129)保守区域设计特异性的扩增引物和TaqMan-MGB探针，其中探针的5′端标记荧光染料FAM、3′端标记MGB基团。

根据编码核糖体小亚基的基因序列区（SSU rDNA）包含保守区和高变区，其中保守区序列进化缓慢且相对保守，常被用作寄生虫检测的靶基因；有研究也表明，EHP的SSU rDNA比SWP（孢子壁蛋白）基因更适合在对灵敏度要求更高时作为检测EHP的靶基因。该条款，参考叶键等发表的研究论文《3种虾肝肠胞虫 PCR检测方法的应用比较分析》。

2.5.2 重组质粒标准品的制备

以EHP DNA为模板，灭菌水为空白对照，进行荧光定量PCR反应。参考试剂及仪器使用说明，在20 µL反应体系中加入2×Probe qPCR Premix *Ex Taq™* 10 µL，ROX Reference Dye Ⅱ 0.2 μL，上下游引物EHP-qF66/qR66 (10 μmol/L) 0.4μL，探针EHP-qP66 (10 μmol/L)为0.4μL，模板DNA 2μL，用灭菌水补足至20μL。反应条件为：95℃预变性30s；95℃变性5s，60℃退火并延伸35s，扩增40个循环；在60℃结束时收集荧光信号。PCR产物经琼脂糖凝胶回收纯化后与pMD18-T连接，转化DH5α，制备重组质粒pMD18-T-SSUEHP，并进行PCR及测序鉴定。提取重组质粒pMD18-T-SSUEHP，用核酸蛋白分析仪测定其浓度并转换为拷贝数，并以10倍梯度稀释至1.0×100～1.0×109拷贝/μL作为标准品，–20℃保存备用。

以EHP DNA为模板进行荧光定量PCR扩增，获得与预期目的片段大小一致的特异性条带(图1)；重组质粒pMD18-T-SSUEHP经PCR、测序鉴定，所得目的片段序列与GenBank上公布的EHP-SSU rDNA基因在本研究上下游引物之间序列的同源性为100%，说明目的基因片段正确连接入pMD18-T载体，即重组质粒pMD18-T-SSUEHP构建成功(图1)。

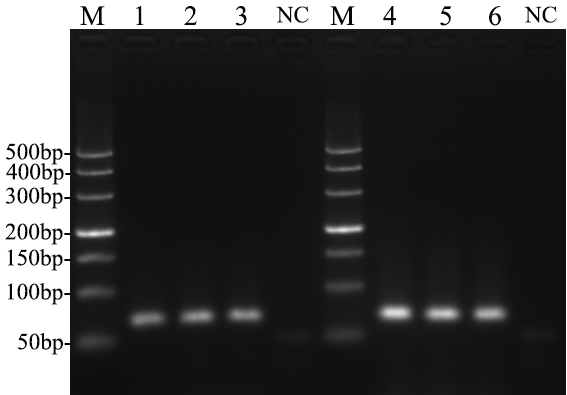


图1 EHP-SSU rDNA基因的PCR扩增及pMD18-T-SSUEHP的PCR鉴定结果

M: DL500 DNA Marker; 1-3: EHP-SSU rDNA基因; 4-6: pMD18-T-SSUEHP; NC:阴性对照

2.5.3 荧光定量PCR反应体系的优化

以3个梯度(1.0×109、1.0×106、1.0×103拷贝/μL)的标准品DNA为模板，反应体系中其他成分浓度不变，将上下游引物浓度以 0.1 μmol/L递增设置为 0.1～0.8 μmol/L，根据扩增反应的循环阈值(Cycle threshold value，Ct值)和扩增曲线的荧光信号强度(ΔRn)选择最优引物浓度。

结果显示，随着引物浓度增大，ΔRn增大、Ct值减小，但引物终浓度在0.6～0.8μmol/L时的效果（Ct值和ΔRn）相差不大（其中以1.0×106 拷贝/μL的标准品为模板的结果见图2A）。经3次重复实验，为保证引物的扩增效率又不浪费实验材料，本研究最终确定0.6 μmol/L为最佳引物终浓度。

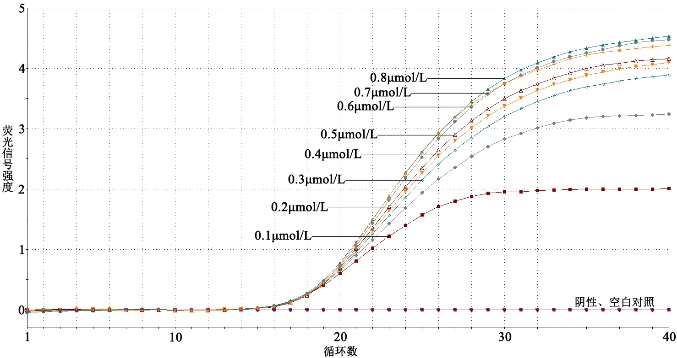
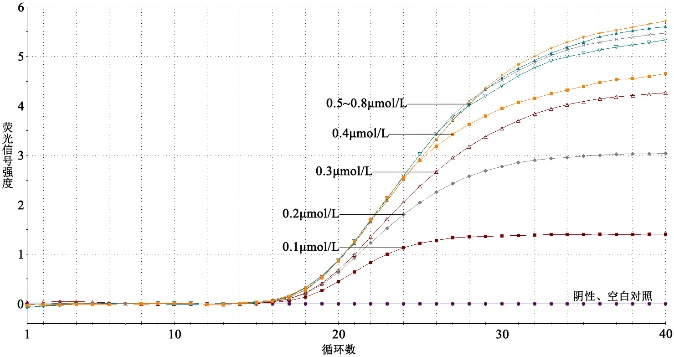
 

图2A 荧光定量PCR的引物浓度优化试验 图2B 荧光定量PCR的探针浓度优化试验

分别以1.0×109、1.0×106、1.0×103 拷贝/μL的标准品为模板，探针浓度为0.1～0.8 μmol/L时荧光定量PCR扩增的结果显示，随着探针浓度增大，ΔRn增大、Ct值减小，但探针终浓度在0.5～0.8μmol/L时的效果（Ct值和ΔRn）相差不大（其中以1.0×106 拷贝/μL的标准品为模板的结果见图2B）。经3次重复实验，为保证探针的效率又不浪费实验材料，选定0.6μmol/L为最佳探针浓度。

通过引物浓度和探针浓度优化后，确定荧光定量PCR的最佳反应体系为：2×Probe qPCR Premix *Ex Taq™* (2×) 10μL，ROX Reference Dye Ⅱ 0.2 μL，上下游引物EHP-qF66/qR66(10μmol/L)1.2μL，探针EHP-qP66(10 μmol/L)1.2μL，模板2μL，用灭菌水补足至20μL。

2.5.4 标准曲线的建立及敏感性试验

以10个梯度(1.0×109～1.0×100拷贝/μL)的标准品DNA为模板，采用优化后荧光定量PCR进行检测；利用数据分析软件进行分析，建立起始模板拷贝数(X)的对数与Ct值(Y)之间的标准曲线和标准方程，并根据各标准品DNA的扩增结果来判断该方法的定量范围和敏感性。结果显示(图3A)，各梯度标准品扩增曲线重复性好、荧光强度增量明显，高浓度标准品(1.0×109～1.0×103拷贝/μL)的扩增曲线呈现典型的“S”型，低浓度标准品(1.0×102～1.0×100拷贝/μL)的扩增曲线因未达扩增平台期呈半“S”型，阴性对照和空白对照没有出现任何扩增。经数据分析建立标准曲线 (图3B)，起始模板拷贝数为2.0×109～2.0×100拷贝/μL时，模板浓度的对数与Ct值之间呈良好的线性关系，标准曲线方程为Y=-3.232\*LOG(X)+39.51，Eff.(扩增效率)和RSq(相关系数方值)分别为103.9%和1.000；标准品DNA为20拷贝/反应时，3个重复的Ct值分别为34.81、34.88、34.91，仍有明显的扩增曲线(图3A)，且重复性好；标准品DNA为2拷贝/反应时，3个重复的Ct值分别为37.84、38.28、38.71，重复性差。因此，为保证检测结果的准确性，建议在实际检测工作中以Ct值35为界限，若检测样品的Ct值小于或等于35，且有扩增曲线，则判为EHP阳性；Ct值大于35，且有扩增曲线，则重复1次，如结果一致，判为EHP阳性；Ct值大于35，重复结果未出现扩增曲线，判为EHP阴性。上述结果表明，本研究建立的EHP荧光定量PCR检测方法对标准品具有很高的扩增效率，标准品起始模板为2.0×109～2.0×101拷贝/反应时，建立的标准曲线能够准确地反映目的产物的扩增，可用于EHP的定量分析，灵敏度约为20个拷贝/反应。

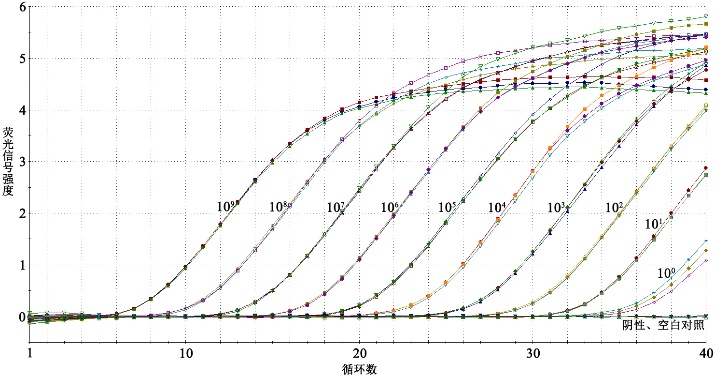
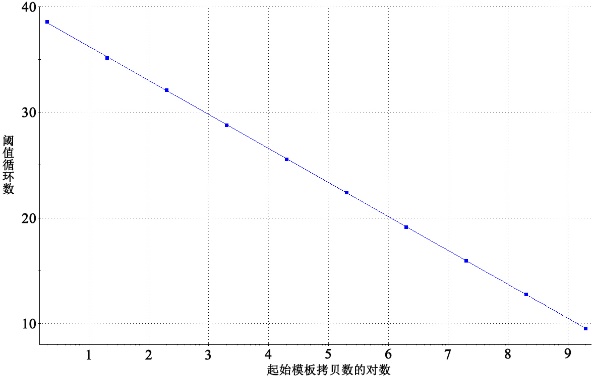
 

图3A 标准品(1.0×109 ~1.0×100 拷贝/μL)荧光定量PCR扩增曲线 图3B 荧光定量PCR检测EHP的标准曲线

2.5.5 特异性试验

分别以EHP、SIV、WSSV、IHHNV、VpAHPND、V.harveyi、V.vnlnificus的核酸DNA为模板，采用优化后的荧光定量PCR进行检测，评价方法的特异性。 结果为图4，只有EHP出现扩增曲线，Ct值分别为22.07、22.10、22.16，判为阳性；而其他病原及阴性对照、空白对照均未出现扩增曲线，判为阴性。说明本研究建立的荧光定量PCR对EHP的检测具有很强的特异性。

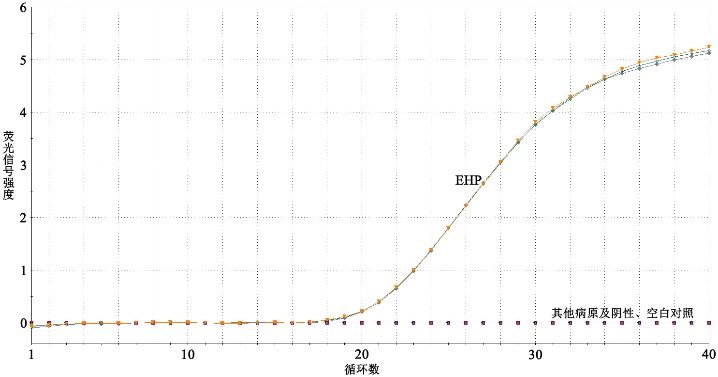


图4荧光定量PCR的特异性检测

2.5.6 重复性试验

选取3个梯度(1.0×107、1.0×105、1.0×103拷贝/μL)的标准品DNA为模板，在间隔第7天和第14天分别进行重复试验，每个梯度做3个平行，记录各次试验的Ct值，分析组内及组间的Ct值变异系数，检测标准品的稳定性及方法的重现性。变异系数(CV)=标准偏差(SD)/平均数(X)。3组标准品在间隔第7天和第14天分别进行重复试验的结果见表2，组内的实验变异系数为0.26%～0.72%，组间实验变异系数为0.56%～0.92%，表明本研究建立的荧光定量PCR方法重现性好，检测结果稳定可靠；同时说明本研究制备的重组质粒DNA稳定性好，可作为标准品和阳性对照使用。

表2 EHP荧光定量PCR重复试验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准品拷贝数 | 组内试验 | | | | | | 组间试验 | |
| 第1天 | | 第7天 | | 第14天 | | Ct±SD | CV(﹪) |
| Ct±SD | CV(﹪) | Ct±SD | CV(﹪) | Ct±SD | CV(﹪) |
| 1×107 | 15.69±0.07 | 0.45 | 15.83±0.09 | 0.59 | 15.98±0.12 | 0.72 | 15.83±0.15 | 0.92 |
| 1×105 | 22.22±0.06 | 0.27 | 22.38±0.09 | 0.38 | 22.52±0.12 | 0.51 | 22.37±0.15 | 0.67 |
| 1×103 | 28.67±0.08 | 0.26 | 28.75±0.11 | 0.37 | 28.98±0.14 | 0.48 | 28.80±0.16 | 0.56 |

**3. 结果判定**

3.1 定性检测

阳性对照Ct值小于35且出现S型扩增曲线，阴性对照和空白对照Ct值不显示且未出现扩增曲线，实验有效；若检测样品的Ct值小于或等于35，且有扩增曲线，则判为EHP DNA阳性；Ct值大于35，且有扩增曲线，则重复1次，如结果一致，判为EHP DNA阳性；Ct值大于35，重复结果未出现扩增曲线，判为EHP DNA阴性。

此条款针对于只判定阳性或阴性结果的样品，无须对样品病原含量进行定量。

3.2 定量检测

标准曲线的相关系数小于或等于-0.970，阳性对照Ct值小于35且出现S型扩增曲线，阴性对照和空白对照Ct值不显示且未出现扩增曲线，实验有效；检测样本中1×103拷贝/mg ≤ EHP DNA ≤ 1×108拷贝/mg，测定结果有效，可直接报告阳性及相应的拷贝量；检测样本中EHP DNA＞1×108拷贝/mg，即可直接报告为＞1×108拷贝/mg，也可用灭菌DEPC水10 倍梯度做相应稀释，使其拷贝量落在1×105～1×107拷贝/mg范围内再重新测定，测定结果应以稀释倍数进行校正；检测样本EHP DNA的拷贝量为1×101～1×103拷贝/mg时，建议对该样本进行双份重试，如双份样本重试结果仍在1×101～1×103拷贝/mg，则按实际值计算；如双份或一份重试结果＜1×101拷贝/mg，则判为阴性；Ct值不显示时或EHP DNA的拷贝量＜1×101拷贝/mg，该样本判为EHP DNA阴性。

此条款将样品中可能检出的病原含量列出，以做出准确判定，依据多次试验结果所作规定，前期进行了重复性、稳定性、敏感性等试验，方法稳定、可靠、敏感性高，相对普通PCR操作更简便，交叉污染风险更小。结果判定中注明EHP DNA为阳性或阴性，EHP DNA阳性存在两种情况，一是EHP感染中；一是曾受EHP感染，体内含有检测片段的DNA，但不一定还存在活的EHP，因此，此处结果判定为DNA核酸阳性或阴性，并非EHP病阳性或阴性。此条款中结果判定参考了《SC/T 7229-219 鲤浮肿病诊断规程》、《SC/T 1151.4-2011 虾黄头病毒检疫技术规范》等病原检测结果判定标准规定。

**六 国内外同类标准制修订情况**

目前，关于EHP的检测标准已发布的有杭州市地方标准《[DB3301/T 1096-2018  南美白对虾肝肠胞虫聚合酶链式反应检测方法](http://std.samr.gov.cn/db/search/stdDBDetailed?id=B5389BD2DBAC31CFE05397BE0A0AE3F0)》、江苏省地方标准《[DB32/T 3802-2020  南美白对虾肝肠胞虫巢式聚合酶链式反应(PCR)检测方法](http://std.samr.gov.cn/db/search/stdDBDetailed?id=B23FD9330EB8E01AE05397BE0A0A4913)》，此两个地方标准检测方法均为普通PCR，相比较荧光定量PCR，操作上多了开管进行电泳步骤，增加污染风险。2020年发布实施的水产行业标准《SC/T 7232-2020 虾肝肠胞虫病诊断规程》方法为套氏PCR和TaqMan探针法荧光定量PCR。EHP感染前期无明显病症，需采用组织学方法或分子生物学方法等实验室手段检测才能确诊。鉴于此，EHP检测方法发展迅速，目前已有多种快速检测方法应用于实际检测，如套式PCR、荧光定量PCR和环介导等温扩增(LAMP)等，但在实际检测工作中，套式PCR虽敏感性高，但需两轮PCR及电泳，操作繁琐、检测时间长且多次开盖容易交叉污染；TaqMan探针定量PCR由于探针长度较长，敏感性不够理想；LAMP灵敏、快速，但容易出现假阳性。鉴于上述现有EHP检测方法在实际检测工作中存在的不足及TaqMan-MGB探针应用于定量PCR的优势，将TaqMan-MGB探针应用于EHP的检测，必将有助于虾肝肠胞虫病的快速诊断及有效防控。但迄今为止国际(OIE)和国内尚未有检测EHP的TaqMan-MGB探针法荧光定量PCR相关标准发布。

**七 重大分歧意见的处理经过和依据**

本标准研制过程中无重大分歧意见。

**八、自我承诺**

本标准内容与各项指标不低于强制性标准要求。

团体标准《虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法》

标准起草组

2022年10月15日