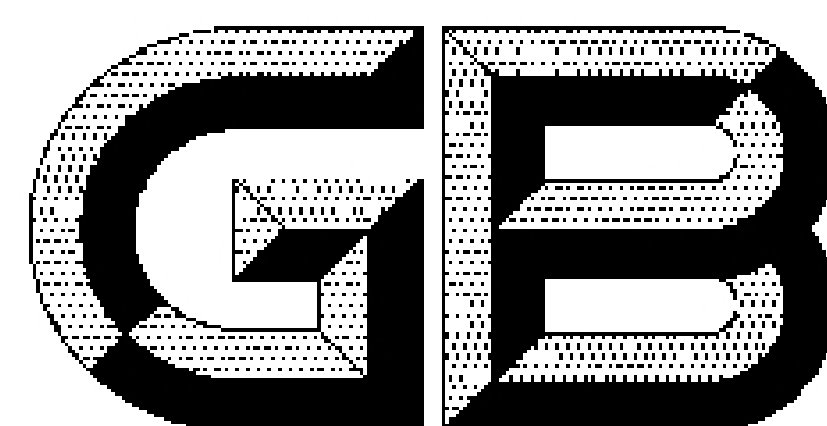




中华人民共和国国家标准

GB/T 18640—2017
代替 GB/T 18640—2002

家畜日本血吸虫病诊断技术

Diagnostic techniques for domestic animal schistosomiasis

2017-11-01 发布

2018-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18640—2002《家畜日本血吸虫病诊断技术》。本标准与 GB/T 18640—2002 相比主要变化如下：

- 增加了日本血吸虫病、中间宿主、疫水等 8 条术语的定义。
- 增加了 IHA 和 SEA 两条缩略语的注解。
- 增加了家畜日本血吸虫病的临床诊断、剖检检查以及诊断结果的综合判定等内容。
- 修订了 GB/T 18640—2002 中粪便毛蚴孵化法，补充了不同种类动物粪样的处理方法，增加了尼龙筛兜直接淘洗法，将孵化温度由 20℃～25℃修订为 20℃～30℃，孵化方法上增加了顶管孵化法。
- 修订了 GB/T 18640—2002 中间接血凝试验(IHA)方法，规定了诊断液和标准血清的基本性质，增加了血样采集方法，规范了操作方法，对判定标注进行了量化。
- 改变了 GB/T 18640—2002 的编写格式，将各单项技术所需材料、试剂、仪器合并介绍，同时将各单项技术的结果判定合并到诊断结果项下进行综合判定。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国农业科学院上海兽医研究所。

本标准起草人：刘金明、林矫矫、石耀军、李浩。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18640—2002。



家畜日本血吸虫病诊断技术

1 范围

本标准规定了家畜(牛、羊、猪、犬和马属动物)日本血吸虫病临床诊断、间接血凝试验(IHA)、病原学诊断的方法和程序。

本标准适用于家畜(牛、羊、猪、犬和马属动物)日本血吸虫病的诊断、检疫、流行病学调查和防治效果评价。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

日本血吸虫病 **schistosomiasis japonica**

由日本血吸虫感染人和动物所引起的疾病。

2.2

中间宿主 **intermediate host**

寄生虫在无性繁殖阶段所寄生的动物。

2.3

疫水 **infected water**

被细菌、病毒等微生物以及寄生虫所污染的,具有传染性的水源。

注:本标准中专指含有日本血吸虫尾蚴的水。

2.4

成虫 **adult worm**

性发育成熟的虫体。

2.5

虫卵 **egg**

雌虫和雄虫交配后产的卵。

2.6

毛蚴 **miracidium**

从吸虫虫卵中孵化出的幼虫。

2.7

毛蚴孵化 **miracidium hatching**

虫卵转变成毛蚴的过程。

2.8

虫卵可溶性抗原 **soluble egg antigen**

虫卵裂解后释放的溶解于生理盐水的抗原分子。

2.9

间接血凝试验 **indirect hemagglutination**

以红细胞作为载体的间接凝集试验。



3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

IHA:间接血凝试验(indirect hemagglutination)

SEA:日本血吸虫虫卵可溶性抗原(soluble egg antigen)

4 材料与试剂

4.1 材料

竹筷、40目~80目的铜筛滤杯、260目的尼龙筛兜、500 mL量杯、粪桶、放大镜、显微镜、吸管、载玻片、盖玻片、取暖炉、水温计、盆、水缸、水桶、剪刀、闹钟、天平、脱脂棉、300 mL~500 mL长颈平底烧瓶或带顶管的塑料杯(500 mL~1 000 mL)或500 mL盐水瓶及与瓶口相配的10 mL试管、家畜解剖刀具、手术剪、止血钳、内径5 mm~10 mm的铜管或玻璃管以及与此相匹配的橡皮管、96孔V型微孔血凝板(孔底角90°)、移液器及吸头、定性滤纸等。

4.2 孵化用水

自来水、河水、池水、井水等,pH值6.8~7.2。处理方法如下:自来水,在盛器中存放8 h以上;河水、池水、井水等,加温至60℃以上,冷却;混浊的水,每50 L水加明矾3 g~5 g,充分搅拌,澄清。

4.3 试剂

日本血吸虫病IHA诊断液为日本血吸虫虫卵可溶性抗原SEA致敏绵羊红细胞或人“O”型红细胞,效价 ≥ 64 。标准阴性血清,IHA效价 ≤ 4 ,标准阳性血清,IHA效价 $\geq 1\ 280$ 。生理盐水。市售或由指定单位提供。

5 仪器

5.1 组织捣碎机(或高速分散均质机)。

5.2 显微镜。

5.3 解剖镜。

6 临床诊断

6.1.1 诊断原则

根据血吸虫病流行病学特点和临床症状进行诊断。

6.1.2 流行特点

容易感染日本血吸虫的家畜主要有牛、羊、猪、犬以及马属动物。中间宿主为钉螺。流行区主要分布于有钉螺孳生的长江以南十二个省(市、自治区);家畜因接触疫水而感染,大多数疫区的感染季节为3月~11月。

6.1.3 临床症状

6.1.3.1 黄牛和奶牛主要临床症状

黄牛和奶牛主要临床症状如下:

- 急性型症状:多见于重度感染小牛,偶见于成年黄牛。典型症状为体温升高达 40 ℃ 以上,消瘦,被毛粗乱,拉稀,便血,生长停滞,黄牛使役力下降,奶牛产奶量下降,母畜不孕或流产。特别严重者肛门括约肌松弛,直肠外翻、疼痛,食欲不振,步态摇摆、久卧不起,呼吸缓慢,最后衰竭而死亡。
- 慢性型症状:消瘦,畏寒,被毛粗乱,拉稀,偶有便血,精神不振。轻度感染者可无症状。

6.1.3.2 绵羊和山羊主要临床症状

食欲减退,消瘦,腹泻,下痢,贫血,精神不振。严重者至衰竭而死亡。

6.1.3.3 水牛、马属动物、猪和犬主要临床症状

一般没有明显临床症状。重度感染者有腹泻,下痢,贫血,消瘦,被毛粗乱等症状。

7 间接血凝试验(IHA)

7.1 血样采集

- 7.1.1 血清:颈静脉或耳缘静脉采血 1 mL~2 mL,静置自然析出血清或待血液凝固后 3 000 r/min~5 000 r/min 离心 10 min,分离血清,4 ℃ 保存。
- 7.1.2 血纸:在耳缘静脉采血 5 滴~10 滴,滴于定性滤纸,于阴凉处晾干,放在干净白纸中,2 d 内检测。也可保存于 4 ℃ 冰箱 1 个月内检测。

7.2 操作方法

- 7.2.1 剪下 1 cm×1.2 cm 血纸,加 200 μL 生理盐水,浸泡 10 min,为血纸浸泡液。取 100 μL 用生理盐水作 1:2 稀释。
- 7.2.2 血清稀释:用生理盐水将血清作 1:10 和 1:20 稀释。
- 7.2.3 加样:取 1:10 和 1:20 稀释的血清或血纸浸泡液及 1:2 稀释的血纸浸泡液样品各 25 μL,加入 96 孔 V 型微孔血凝板样品孔,每个稀释度样品加 2 孔。每块血凝板需设标准阳性血清、标准阴性血清和生理盐水对照。
- 7.2.4 加诊断液:每孔加 25 μL 诊断液,震荡混匀。
- 7.2.5 孵育:室温孵育 1 h~2 h,然后观察并判定结果。

7.3 判定

7.3.1 判定方法

- 判定方法如下:
- 红细胞完全不凝集,即全部下沉到孔底中央,形成周缘整齐、紧密红色圆点,为阴性(—);
 - 红细胞 25% 以下凝集,即 75% 以上沉于孔底中央,形成较阴性小的红色圆点,周围有少量凝集红细胞,为弱阳性(+);
 - 红细胞约 50% 凝集,即约半数沉于孔底中央,形成更小红色圆点,周围有一层淡红色凝集红细胞,为阳性(++);
 - 红细胞全部凝集,均匀地分散于孔底,形成淡红色薄层,为强阳性(+++).

7.3.2 判定标准

- 7.3.2.1 试验成立条件:当阳性对照血清全部为“++”以上阳性、阴性对照血清及生理盐水各孔均为

“—”时,试验成立,否则试验不成立,需检查原因,重新试验。

7.3.2.2 在4个试验孔中有一孔出现“+”以上阳性时,被检血清判为阳性。

8 病原学诊断

8.1 剖检检查

8.1.1 虫体收集与观察

8.1.1.1 家畜剖杀后,从速剥皮,仰卧,剖开胸腔和腹腔,去胸骨。分开左右肺,结扎下腔静脉。

8.1.1.2 找出胸主动脉,沿血管平行方向开口,从离心方向插入带橡皮管的玻璃接管或铜管,并用棉线扎紧固定。橡皮管的另一端接自来水龙头。

8.1.1.3 分离肾脏,将进出肾脏的动、静脉结扎;同时将左右两侧的髂动脉和髂静脉结扎。

8.1.1.4 分离肝门静脉,向肝一端用棉线扎紧,离肝一端沿血管平行方向开口,插入带橡皮管的玻璃接管并固定。橡皮管的另一端接40目铜筛。

8.1.1.5 开启自来水并逐步加大水压。同时翻动肠和肠系膜以利于血管内水的流动。当橡皮管的另一端出水无血色时,关闭龙头。

8.1.1.6 检查铜筛内是否有虫体。如无虫体,应仔细检查肠系膜静脉和直肠痔静脉是否有虫体。

8.1.1.7 将收集到的虫体置于解剖镜下观察。成虫形态特征为:雌雄异体,一般呈合抱状态;口、腹吸盘位于虫体前端;雄虫大小为(10 mm~22 mm)×(0.50 mm~0.55 mm),乳白色,腹吸盘以下虫体由两侧向腹面卷曲,呈圆柱形;雌虫圆柱形,前细后粗,大小为(15 mm~26 mm)×(0.14 mm~0.28 mm),肠管内含较多的红细胞消化后残留的物质而呈灰褐色。

8.1.2 肝脏组织压片检查

8.1.2.1 取出肝脏,肉眼观察。如发现肝脏表面白色结节,用眼科剪剪取结节,置载玻片上。每片可置4个~5个结节。

8.1.2.2 取另一载玻片置结节之上,压紧,用胶布或橡皮筋固定。

8.1.2.3 将压好的载玻片置于低倍显微镜(10倍或40倍物镜)下检查。虫卵形态特征为淡黄色,椭圆形,卵壳均匀,无小卵盖,卵壳一侧有一小棘,大小为(74 μm~106 μm)×(55 μm~80 μm)。

8.1.3 肝脏虫卵毛蚴孵化检查

8.1.3.1 取肝组织10 g~20 g,剪碎,加入20 mL孵化用水,用组织捣碎机(或高速分散均质机)5 000 r/min~10 000 r/min粉碎1 min~2 min。

8.1.3.2 加入100 mL孵化用水,混匀,均匀分成4份,分别进行毛蚴孵化。

8.1.3.3 孵化条件及毛蚴观察同8.2.3和8.2.4。

8.2 粪便毛蚴孵化法

8.2.1 粪样采集

8.2.1.1 采集新排出的粪便或直接从直肠中采取。

8.2.1.2 采粪量:牛、马属动物200 g,猪100 g,羊和犬粪40 g,每份粪样需附上填好的送粪卡,送粪卡记录内容包括:采集地点、饲养员或畜主姓名、畜别、畜名或畜号、性别、年龄、妊娠状况和采粪日期。

8.2.1.3 于采粪当天送到检验室。

8.2.2 粪样处理

8.2.2.1 将每头家畜的粪样分 3 份,进行平行检测。每份检测粪量为:牛和马属动物 50 g,猪 20 g,羊、犬 10 g。

8.2.2.2 牛、猪和马属动物粪样,根据实际情况选用下列方法中的一种处理:

- 将粪样装入尼龙筛兜中,用自来水在搅拌条件下(用竹筷)淘洗至滤液清澈,沥干。
- 将粪样倒入铜筛中,铜筛置量杯上部,加孵化用水,淹没粪样,用竹筷搅拌至稀浆状,捞出铜筛,沥干后再次浸入,搅拌,如此 3 次。将量杯中细渣及粪水一并倒入尼龙兜中,用水冲淘洗至滤液清澈。
- 将粪样倒入铜筛中,铜筛置塑料杯(带顶管塑料杯去盖和顶管)上部,加孵化用水淹没粪样,用竹筷搅拌至稀浆状,捞出铜筛,沥干后再次浸入,搅拌,如此 3 次。将塑料杯中粪样沉淀 15 min 左右,倒去上层清液的三分之二。
- 将粪样置于量杯或带顶管塑料杯中,加少量孵化用水搅匀,再加满孵化用水,沉淀 15 min 左右,倒去上层清液的三分之一至二分之一。

8.2.2.3 羊粪:无需处理。

8.2.2.4 犬粪:将粪样置于铜筛滤杯,铜筛滤杯置于尼龙筛兜之上,用自来水冲淋并用竹筷搅拌至滤液清澈。

8.2.3 孵化

选用下列方法之一进行孵化,孵化条件为 20 ℃~30 ℃、光照(日光或灯光):

- 长颈平底烧瓶孵化法:将上述处理后粪样装入长颈平底烧瓶,加 25 ℃左右孵化用水至瓶口下 4 cm~5 cm 处,在水面加 1 cm~2 cm 厚的松软脱脂棉,补加孵化用水至高出脱脂棉约 3 cm。
- 塑料杯顶管孵化法:将上述处理后粪样装入专用塑料杯,加孵化用水至杯口。盖上中间有孔的塑料盖,加满孵化用水。将顶管注孵化用水至管口 1 cm~2 cm,管口蒙一层薄薄的脱脂棉,倒插入塑料盖孔中。
- 顶管孵化法:将上述处理后粪样装入 500 mL 盐水瓶,加满 25 ℃左右孵化用水,将试管开口端外围缠绕一定胶布(能插入盐水瓶瓶口且不漏水),试管内加孵化用水至管口 1 cm~2 cm,管口蒙一层薄薄的脱脂棉,迅速倒插入盐水瓶瓶口。

8.2.4 毛蚴观察

8.2.4.1 分别在孵育 1 h、3 h 和 5 h,进行观察。观察时,将孵化杯(瓶)向着光源并衬以黑色背景。每个样品每次连续观察 2 min 以上。如有怀疑,可用滴管将毛蚴吸出,置显微镜进一步观察。

8.2.4.2 血吸虫毛蚴肉眼观察特征:为针尖大小、灰白色、梭形、折光性强,在近水面作水平或斜向直线折返运动。

8.2.4.3 血吸虫毛蚴显微观察特征:前部宽,中间有个顶突,两侧对称,后渐窄,周身有纤毛。

9 诊断结果

9.1 疑似

有流行病学接触史的动物,出现 6.1.2 所述临床症状或间接血凝试验(IHA)呈阳性。

9.2 确诊

活畜:粪便毛蚴孵化发现 8.2.4.2 和 8.2.4.3 所述特征的毛蚴。依据观察到的毛蚴数判定感染强度,

1 个~5 个毛蚴为+, 6 个~10 个毛蚴为++, 11 个~20 个毛蚴为+++, 21 个以上毛蚴为++++。

剖检:发现 8.1.1.7 所述特征的虫体,或肝组织压片发现 8.1.2.3 所述特征的虫卵,或肝脏虫卵毛蚴孵化发现 8.2.4.2 和 8.2.4.3 所述特征的毛蚴。

9.3 阴性

活畜:粪便毛蚴孵化未发现 8.2.4.2 和 8.2.4.3 所述特征的毛蚴。

剖检:未发现 8.1.1.7 所述特征的虫体,肝组织压片未发现 8.1.2.3 所述特征的虫卵,肝脏虫卵毛蚴孵化未发现 8.2.4.2 和 8.2.4.3 所述特征的毛蚴。

参 考 文 献

[1] 冯静兰,徐百万,等.动物血吸虫病防治手册[M].北京:中国农业科技出版社,1998.

[2] 徐百万,林娇娇,等. 农业综合治理防控血吸虫病技术导则[M].北京:中国农业科技出版社,2007.

[3] 韩明毅. 环卵沉淀反应血纸法诊断耕牛日本血吸虫病的试验[J].中国兽医杂志,1989,15(03):29-31.
