



中华人民共和国国家标准

GB/T 18640—2002

家畜日本血吸虫病诊断技术

Diagnostic techniques for domestic
animals schistosomiasis Japonicum

2002-02-19 发布

2002-05-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

日本血吸虫病(schistosomiasis Japonicum)是牛、马、猪、羊、犬、猫等几十种哺乳动物和人的一种共患寄生虫病,流行于亚洲部分国家,在我国发生于淮河以南有钉螺生长的地区,是人的主要寄生虫病之一,家畜中主要发生于牛,其次是猪、羊。本病的病原是日本分体吸虫(schistosoma Japonicum),亦称日本血吸虫,简称血吸虫。诊断本病的方法有检查粪便中虫卵、粪便毛蚴孵化、环卵沉淀试验、间接血凝试验、乳胶凝集试验、酶联免疫吸附试验、斑点酶标记等。

改进的粪便毛蚴孵化法和间接血凝试验可作为该病首选检疫技术。前者是病原检查诸法中检出率较高的方法,后者属血清学诊断,操作简便、省时、敏感性高、结果判定容易。两法均可用于家畜血吸虫病检疫、诊断和流行病学调查,后者还可用于血吸虫病基本消灭和消灭地区的监测。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所。

本标准主要起草人:沈杰、钱承贵。

中华人民共和国国家标准

家畜日本血吸虫病诊断技术

GB/T 18640—2002

Diagnostic techniques for domestic
animals schistosomiasis Japonicum

1 范围

本标准规定了粪便毛蚴孵化法和间接血凝试验技术。

本标准适用于家畜日本血吸虫病的诊断、检疫、流行病学调查,间接血凝试验还可用于基本消灭和消灭地区血吸虫病的监测。

2 粪便毛蚴孵化法

2.1 材料准备

2.1.1 水:pH值6.8~7.2,无水虫和化学物质污染(包括氯气)的澄清水,否则需先分别作如下处理。

2.1.1.1 有氯气的自来水应在盛具中存放8 h以上。

2.1.1.2 河水、池水、井水、雨水等混有水虫的水加温至60℃,冷后再用。或在每5万 mL水中加含30%有效氯漂白粉0.35 g,搅匀,存放20 h,待氯气逸尽;也可在放漂白粉后加入硫代硫酸钠0.2 g~0.4 g脱氯,0.5 h后用。

2.1.1.3 对浑浊的水,于每5万 mL水中加明矾3 g~5 g,充分搅拌待水澄清后用。

2.1.2 器材、试剂:竹筷、40~80孔的铜筛滤杯、260孔的尼龙筛兜、500 mL量杯、粪桶、放大镜、显微镜、吸管、载玻片、盖玻片、炉、水温计、盆、水缸、水桶、剪刀、闹钟、天平、200 mL~250 mL三角烧瓶、500 mL~1 000 mL长颈平底烧瓶、脱脂棉、食盐。

2.1.3 送粪卡:包括村名、组名、饲养员或畜主姓名、畜别、畜名或畜号、性别、年龄、有无孕、采粪日期。

2.1.4 孵育室(箱)。室温低于20℃时需有保持20℃~25℃的环境条件,如温箱或有取暖设备的房间。

2.2 操作方法

2.2.1 采粪和送检:采粪季节宜于春、秋两季,其次是夏季,不宜于冬季。采粪时间最好于清晨从家畜直肠中采取,或新排出的粪便。采粪量:牛、马粪200 g,猪粪100 g,羊和狗粪(农家)40 g。每份粪样需附上填好的送粪卡,于采粪当天送到检验室。

2.2.2 洗粪和孵化:将每头家畜的粪便分三份,每份粪量牛、马50 g,猪20 g,羊、犬10 g。然后根据实际情况选用下列一种方法进一步操作。

2.2.2.1 尼龙筛淘洗孵化(25℃)后,放在铜筛中淘洗,弃去滤杯,滤液倒入尼龙筛兜中用水淘洗干净,最后将洗粪渣倒入三角烧瓶或平底长颈烧瓶中加满25℃左右清水。为便于观察毛蚴,在瓶颈下二分之一处加一块2 cm~3 cm厚的脱脂棉,再加满水。

2.2.2.2 塑料杯顶管孵化:置粪于铜筛滤杯中,在盛满水的特别塑料杯内充分淘洗后,弃去滤杯,沉淀30 min,倒去三分之二,加25℃水,盖上中间有孔的塑料杯盖,再加满水,再将盛满水的试管口塞一块2 cm~3 cm厚的脱脂棉,倒插入塑料杯的孔中。

2.2.2.3 直孵:将粪置于量杯中加少量水搅匀,再加满水,沉淀30 min左右,倒去三分之一至二分之一,余下的粪水倒入平底长颈烧瓶中,加水至瓶颈下三分之一处,加入2 cm~3 cm脱脂棉球,再加满孵

化用水。

2.2.3 孵育:将装好的三角烧瓶(平底长颈烧瓶或塑料杯)放于 20℃~26℃箱(室)中,在有一定光线的条件下进行孵育。

2.2.4 判定:从孵育开始到 1 h、3 h、5 h 后各观察一次,每个样品每次观察应在 2 min 以上。发现血吸虫毛蚴即判为阳性。血吸虫毛蚴眼观为针尖大小,灰白色、梭形,折光强,和水中其它小虫不同处是近水面作水平或斜向直线运动。当用肉眼观察难与水中的其它小虫相区别时,可用滴管将虫吸出置显微镜下观察,显微镜下可见毛蚴前部宽,中间有个顶突,两侧对称,后渐窄,周身有纤毛。在一个样品中有 1~5 个毛蚴为+,6~10 个毛蚴为++,11~20 个毛蚴为+++,21 个毛蚴以上为++++。

3 间接血凝试验

3.1 材料准备

3.1.1 器材:V 形微孔有机玻璃血凝板(孔底角 90°),25 μL 定量移液器,滴管、可插针头的滴管或 1 mL~2 mL 注射器,12 号针头。

3.1.2 生理盐水、蒸馏水。

3.1.3 诊断液和阴、阳性血清:按说明书处理和保藏。

3.2 操作方法

3.2.1 用滴管滴 4 滴生理盐水于血凝板左边第 1 孔内,用同一滴管加入被检血清 1 滴,使血清成 5 倍稀释。

3.2.2 用带 12 号针头滴管在板左边第 2、3 孔中各加生理盐水 1 滴(μL)。

3.2.3 用移液器将第 1 孔中血清混匀,混匀方法是反复吸吹三次,然后吸 25 μL 已混匀液加入右边邻孔中,此孔血清成 1:10 稀释。

3.2.4 用移液器和 3.2.3 一样混匀第 2 孔血清,吸取 25 μL 加入第 3 孔中,此时该孔血清成 1:20 稀释。

3.2.5 用移液器和 3.2.4 一样混匀第 3 孔血清,吸取 25 μL 丢弃。

3.2.6 每份被检血清和阳、阴性血清按同样方法用 3 个孔,也可不用阴性血清而设生理盐水对照孔,此时另取 2 个孔各加 25 μL 生理盐水作空白对照。

3.2.7 用带 12 号针头的滴管加入 1:10 及 1:20 血清稀释孔及空白对照孔各一滴诊断液,振荡血凝板,使诊断液和血清混匀,置 20℃~37℃条件下 1 h~2 h,等空白或阴性血清对照孔中血球全部沉于孔底中央,呈一圆形红点,且阳性血清两孔中血球没有全部沉入孔底中央即无圆形红点或仅有很小的圆形红点即可判定结果。

3.3 判定

3.3.1 判定标准

a) 红血球全部下沉到孔底中央,形成紧密红色圆点,周缘整齐为阴性(-);

b) 红血球少量沉于孔底中央,形成一较阴性小的红色圆点,周围有少量凝集红血球为弱阳性(+);

c) 红血球约半数沉于孔底中央,形成一更小红色圆点,周围有一层淡红色凝集红血球为阳性(++);

d) 红血球均匀地分散于孔底,形成一淡红色薄层为强阳性(+++)。

3.3.2 结果判定:以血清 10 倍和 20 倍稀释孔出现 3.3.1 中的 b)、c)、d) 凝集现象时,被检血清判为阳性。

3.3.3 如阴性或生理盐水对照孔 2 h 后红血球沉淀图象不标准,说明生理盐水质量不合标准或血凝板孔未洗净,需检查原因,重新操作。