



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

订单号: 0100191216052494 防伪编号: 2019-1216-0954-5337-1781 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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。

订单号: 0100191216052494 防伪编号: 2019-1216-0954-5337-1781 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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,放在干净白纸上,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.
-

全国动物卫生标准化技术委员会

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 18640-2017
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052494
防伪号: 2019-1216-0954-5337-1781
时 间: 2019-12-16
定 价: 21元



GB/T 18640-2017

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—2017

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

*

书号: 155066·1-58055

版权专有 侵权必究