



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3485—2013

牛焦虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for bovine babesiosis and theileriosis

2013-03-01 发布

2013-09-16 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考了 OIE 发布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2010 年版)中 2.4.2 牛巴贝斯虫病的血虫体检查、聚合酶链式反应(PCR)、间接免疫荧光试验与微量补体结合试验,并细化了血虫体检查的结果判定、PCR 方法的实验操作与结果判定及补体结合试验的预备试验等内容。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国宁夏出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准的主要起草人:石建平、孟日增、郝俊虎、宋战昀、孟庆峰、刘阳、鱼海琼、刘金华、王伟利。

牛焦虫病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了牛焦虫血虫体检查、聚合酶链式反应(PCR)、间接荧光抗体试验和补体结合试验等实验室检疫技术。

本标准适用于进出境牛焦虫病的诊断与检疫。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

SN/T 1678 梨形虫病病原鉴定方法

SN/T 2685 泰勒氏焦虫检疫规范

3 疾病概述

焦虫病是由焦虫纲焦虫目的原虫所引起的家畜各种疾病的总称。牛焦虫病主要包括牛巴贝斯虫病和泰勒氏焦虫病,牛巴贝斯虫病参见附录 A,泰勒氏焦虫病参见附录 B。

4 诊断技术

4.1 病原学检查

4.1.1 血虫体检查

4.1.1.1 样品采集

4.1.1.1.1 血液样品

无菌采集耳尖或尾尖采血样,也可颈静脉无菌采集用 EDTA(1 mg/mL)作抗凝剂的抗凝血,4℃保存。

4.1.1.1.2 组织标本

无菌穿刺,采集待检动物肩前淋巴结或腹股沟淋巴结组织、肝脏或脾脏制成组织涂片。

4.1.1.1.3 动物尸体

死亡动物应在其死亡后 24 h 内完成采样工作。病死牛样品除做血涂片外,还可采取大脑皮层、肾、肝、肺和骨髓等组织做涂片进行检查。

4.1.1.2 血涂片的制备

用洁净的载玻片端边缘蘸一小滴血,再用另一端边缘光滑的载玻片做推片,将推片的一端置于血滴

之前,待血液沿推片端缘扩散后,均匀推成薄血膜,也可取一小滴血液(约 50 μ L)滴在干净的载玻片上,自然风干形成厚血片。

4.1.1.3 组织涂片的制备

脏器涂片的制作可用一块洁净的载玻片轻触脏器的新鲜切面或以两块洁净的玻片轻夹一小块组织,沿玻片的纵向推压,使两玻片上都留下一层组织。涂片风干后,无水甲醇固定 5 min,再用 10%姬姆萨(配制参见附录 C 的 C.1)染色 20 min~30 min。

4.1.1.4 血涂片或组织涂片的染色

涂片待其自然风干后,无水甲醇固定 1 min,10%姬姆萨染色 20 min~30 min;厚血片与组织涂片风干后,80 $^{\circ}$ C 烘箱固定 5 min,10%姬姆萨染色 15 min~20 min。

4.1.1.5 病原鉴定

按 SN/T 1678 中规定的方法进行实验和结果判定。

4.1.2 牛巴贝斯焦虫聚合酶链式反应

4.1.2.1 试剂与材料

4.1.2.1.1 牛巴贝斯焦虫参考虫株:由指定单位提供。

4.1.2.1.2 *rTaq* 酶:5 U/ μ L,保存于-20 $^{\circ}$ C,避免反复冻融或温度剧烈变化,随用随取。

4.1.2.1.3 10 倍 PCR 缓冲液:含 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.5),2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.001%明胶。

4.1.2.1.4 10 mmol/L dNTP 混合液:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 4 种脱氧核苷酸。

4.1.2.1.5 蛋白酶 K:浓度为 10 mg/mL。

4.1.2.1.6 引物

本试验选用 SSrRNA 基因序列作为 PCR 扩增区,设计两条引物 P1、P2,引物位置和序列如下:

P1(428~457)5'-TTGGCATGGGGGCGACCTTCACCCTCGCCC-3'

P2(699~670)5'-CCAAAGTCAACCAACGGTACGACAGGGTCA-3'

P1、P2 引物扩增片段为 272 bp。

4.1.2.2 其他试剂

实验用水按 GB/T 6682 中规定准备,Tris 碱、EDTA、SDS、苯酚、NaCl、HCl、乙醚和乙醇等均为市售分析纯。

4.1.2.3 器材和设备

PCR 扩增仪、电泳仪、微量移液器及吸头、凝胶成像分析仪、恒温培养箱、普通冰箱、低温冰箱、组织匀浆器或研磨器、灭菌离心管、离心机等。

4.1.2.4 操作方法

4.1.2.4.1 样品采集与处理

4.1.2.4.1.1 样品采集

取发病或可疑动物外周 EDTA 抗凝血 20 mL。

4.1.2.4.1.2 样品处理

血液样品需离心取沉淀以去掉血浆蛋白,再用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 充分洗涤、离心,血球泥大约 2 mL,快速冻融 3 次,虫体与细胞碎片用 TE 缓冲液洗涤两次,于 12 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀备用。

4.1.2.4.2 对照样品制备

4.1.2.4.2.1 阳性样品:经培养增殖的参考虫体。

4.1.2.4.2.2 阴性样品:无虫体感染的正常牛红细胞。

4.1.2.4.3 基因组 DNA 抽提

4.1.2.4.3.1 新鲜抗凝血,离心弃去上清液。

4.1.2.4.3.2 取出 4℃ 冰箱预冷的红细胞裂解液(ELS),按 1:6~1:10 的比例向细胞沉淀中加入 ELS 裂解液(配制见 C.2)(1 mL 细胞压积加入 6 mL~10 mL 裂解液),轻轻吹打混匀。

4.1.2.4.3.3 1 500 r/min 离心 5 min~8 min,离心弃去上层红色清液。

4.1.2.4.3.4 红细胞裂解完全后收集沉淀部分,加入 0.5 mL TE 离心,若裂解不完全可重复步骤 4.1.2.4.3.2 和 4.1.2.4.3.3。

4.1.2.4.3.5 加 20% SDS,蛋白酶 K(10 mg/mL)至终浓度 100 μ g/mL,用一玻璃棒温和地将酶混入黏滞的细胞裂解液中。

4.1.2.4.3.6 将细胞裂解液置于 60℃ 水浴 3 h,不时旋转黏滞溶液。

4.1.2.4.3.7 将溶液冷却至室温,加等体积饱和酚至上述样品处理液中,温和颠转混匀 3 min。

4.1.2.4.3.8 室温 6 000 r/min 离心 15 min,取上层水相到另一 1.5 mL 离心管中。

4.1.2.4.3.9 加等体积饱和酚,混匀,6 000 r/min 离心 15 min,取上层水相到另一离心管中。

4.1.2.4.3.10 加等体积酚/三氯甲烷,轻轻混匀,6 000 r/min 离心 15 min,取上层水相到另一离心管中。如水相仍不澄清,可重复此步骤数次。

4.1.2.4.3.11 加等体积三氯甲烷,轻轻混匀,6 000 r/min 离心 15 min,吸取上层水相到另一离心管中。

4.1.2.4.3.12 加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,轻轻倒置混匀。

4.1.2.4.3.13 待絮状物出现后,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。

4.1.2.4.3.14 沉淀用 75%乙醇洗涤,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。

4.1.2.4.3.15 室温下挥发或瞬时离心吸弃乙醇后,按 0.1 mL 细胞加入 1 mL 的比例加入 TE 缓冲液。将其置于摇床平台上,4℃ 温和振荡过夜,直至 DNA 完全溶解,储存备用。

也可用等效的商品化 DNA 提取试剂盒制备 DNA 样品,操作按说明书进行。

4.1.2.4.4 PCR 扩增 DNA

4.1.2.4.4.1 PCR 反应系统

PCR 反应液组分见表 1。

SN/T 3485—2013

表 1 PCR 反应液组分

成分	用量
10×浓缩缓冲液	5 μL
dNTP	4 μL
引物 P1(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
引物 P2(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
rTaq 酶(5 U/ μL)	0.25 μL
DNA 模板	3 μL
ddH ₂ O	35.75 μL

总体积为 50 μL , 瞬时离心。

4.1.2.4.4.2 PCR 反应程序

95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 预变性; 92 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 60 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min; 扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.1.2.4.4.3 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

用新鲜的 1×TBE 电泳缓冲液配制 1.5% 琼脂糖凝胶 (EB 浓度 1 $\mu\text{g/mL}$) 并制板。将琼脂糖凝胶板水平放入电泳槽, 使 1×TBE 电泳缓冲液刚好没过胶面。将 5 μL PCR 产物和 1 μL 上样缓冲液 (6×Loading Buffer) 混匀后加入样品孔。同时加入 DNA 标准分子量对照品 (DL 2000), 5 V/cm 电泳 30 min, 当溴酚蓝接近底部时终止电泳。

紫外灯下观察核酸带并判断结果, 或用凝胶成像分析仪分析结果。

4.1.2.5 结果判定标准

4.1.2.5.1 阳性对照只出现一条约 272 bp 的 DNA 条带, 阴性对照和空白对照没有核酸条带, 试验成立。

4.1.2.5.2 若待检样品经电泳出现约 272 bp 的 DNA 条带可判为阳性; 若待检样品扩增经电泳未出现 DNA 条带, 或者出现的条带不是 272 bp 判为阴性; 出现其他条带, 应判为非特异性扩增, 应重做试验。

4.2 血清学检测

4.2.1 牛巴贝斯焦虫间接免疫荧光试验 (IFA)

4.2.1.1 血涂片的制备

采颈静脉血制备血涂片。采血时加入适当的抗凝剂 (柠檬酸钠或 EDTA), 用 5 倍~10 倍体积 PBS 至少洗涤 3 次, 除去血浆蛋白与免疫球蛋白。洗涤后, 将感染红细胞重悬于 2 倍体积 PBS 中, 加入 1% 牛血清白蛋白 (BSA)。取一滴血液滴在干净的玻片上, 或采用手工推片法制成均匀的单层血涂片或将其置于细胞离心机旋转制得血涂片。血涂片自然风干后, 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱固定 5 min, 用铝箔或棕色胶带纸密封, 置于一 70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用 (最多可保存 5 年)。

4.2.1.2 血涂片区格划分与感作

用油性笔将抗原涂片划成 8~10 个疏水小区, 并在每小格内加上一块滤纸垫。用移液器在每小格

内滤纸垫上加入 5 μL ~10 μL 稀释的阳性血清,将玻片放入湿盒内置 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 30 min。在每张玻片上设弱阳性血清,阴性血清对照。

4.2.1.3 血涂片的洗涤和染色

孵育后,轻轻地用 PBS 将玻片上的滤纸垫冲掉,再用 PBS 和水先后浸泡 10 min,每次浸泡时均使用磁力搅拌器使 PBS 和水处于流动状态。

在每小格内加入用异硫氰酸荧光素标记的抗牛 IgG 抗体。每批新结合物都应标定,其工作浓度通常为(1:400)~(1:1 200),加二抗的玻片置于室温孵育 30 min。

4.2.1.4 血涂片的洗涤和封固

孵育后,用 PBS 洗玻片 1 次,再用 PBS 和水依次各浸洗一次,每次 10 min。

在湿片上滴加 1:1 甘油和 PBS,盖玻片封片,置于标准的荧光显微镜下检查。

4.2.1.5 结果判定

结果判定如下:

- a) (一)无荧光;
- b) (±)极弱的可疑荧光;
- c) (+)荧光较弱,但清楚可见;
- d) (++)荧光明亮;
- e) (+++或++++)荧光闪亮。

待检标本特异性荧光染色强度达“+”以上,而各种对照均成立,即可判定为阳性。

4.2.2 牛泰勒焦虫间接免疫荧光试验

见 SN/T 2685。

4.2.3 微量补体结合试验

4.2.3.1 标准试剂

4.2.3.1.1 抗原:按附录 C 中方法自行制备,或由指定单位提供。

4.2.3.1.2 溶血素:效价大于 1:1 000。

4.2.3.1.3 补体:取 3 只豚鼠新鲜血清混合而成,或由指定单位提供。

4.2.3.1.4 1%绵羊红细胞:无菌采集健康绵羊肝素抗凝全血,加入 2.5 倍的阿氏液,可于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 个月。用时取适量红细胞悬液加 5~10 倍生理盐水,充分混匀,以 2 000 r/min 离心 15 min,弃上清和白细胞层,再加 5~10 倍生理盐水悬浮红细胞,充分混匀,以 2 000 r/min 离心 15 min,如此洗涤 3 次。最后将红细胞合并于一管以 2 500 r/min 水平转子离心 15 min,沉淀的红细胞用生理盐水配成 1% 悬液。

4.2.3.1.5 对照血清:标准阳性血清与标准阴性血清均由指定单位提供。

4.2.3.2 材料与设备

96 孔 U 型微量板、水浴锅、离心机和可调加样器等。

4.2.3.3 样品

4.2.3.3.1 被检血清:常规方法采集样品,分离血清 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

SN/T 3485—2013

4.2.3.3.2 灭活处理:使用前,将阳性血清、阴性血清、待检血清置 58 ℃(±2 ℃)水浴 30 min 灭活,用巴比妥缓冲液按 1:5~1:320 稀释。

4.2.3.4 预备试验

4.2.3.4.1 溶血素效价的测定

- 4.2.3.4.1.1 先将溶血素稀释成 1:500、1:600、1:700。
- 4.2.3.4.1.2 再将 1:500、1:600、1:700 3 个滴度进行倍比稀释,使每个滴度孔中含有 25 μL。
- 4.2.3.4.1.3 加入等量的 1%绵羊红细胞 25 μL,于 37 ℃水浴 30 min,制备成致敏红细胞。
- 4.2.3.4.1.4 将补体原液进行 1:50 稀释,根据表 2 按量滴加于 96 孔 U 型板中。

表 2 溶血素效价测定

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释液/μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
补体(1:50) /μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
致敏红细胞	1:500	1:600	1:700	1:1 000	1:1 200	1:1 400	1:2 000	1:2 400	1:2 800	1:4 000	1:4 800	1:8 000
感作	37 ℃振荡 30 min											

- 4.2.3.4.1.5 将 4.2.3.4.1.3 中制备的致敏红细胞按表 2 中指示加入各孔。
- 4.2.3.4.1.6 确定 100%溶血时溶血素的最高稀释倍数为其效价;正式试验时使用 2 个单位溶血素制备致敏红细胞。

4.2.3.4.2 补体效价的测定

4.2.3.4.2.1 致敏红细胞悬液配制

绵羊红细胞吸附了溶血素后即成为致敏红细胞,本标准配制方法是,取等量的 1%绵羊红细胞加 2 单位溶血素,混合后置 37 ℃水浴箱内感作 30 min。4 ℃保存,2 d 内可用。

4.2.3.4.2.2 补体的配制:取几瓶冻干补体用蒸馏水溶解,或几只豚鼠血清混合。用稀释液作 1:50 稀释。

4.2.3.4.2.3 取 96 孔板加入不同体积的补体(1:50),然后用稀释液补加至 75 μL,如表 3 所示。

表 3 补体效价测定

孔号	1	2	3	4	5	6
补体(1:50)/μL	5	10	15	20	25	50
稀释液/μL	70	65	60	55	50	25
	37 ℃水浴感作 30 min					
致敏红细胞/μL	50	50	50	50	50	50
溶血度/%	—	—	—	—	—	—

- 4.2.3.4.2.4 置 37 ℃水浴感作 30 min。
- 4.2.3.4.2.5 每孔均加入致敏红细胞 50 μL。
- 4.2.3.4.2.6 置 37 ℃水浴感作 30 min。

4.2.3.4.2.7 判定结果,能使标准量红细胞全部溶血的最小补体量为 100%溶血(CH100)单位。能使 50%红细胞溶血的补体量称为 50%溶血(CH50)单位。将 96 孔 U 型板置 500g 离心 5 min,置酶标仪 535 nm 处测定 OD 值,与标准比色孔进行比较,确定 50%红细胞溶血的补体最高稀释倍数,即该反应体系下的 1 个补体标准单位。5 单位的补体为工作效价。

4.2.3.4.3 抗原效价测定

- 4.2.3.4.3.1 分别将灭活的标准阳性血清、标准阴性血清按 1 : 5~1 : 320 稀释,每孔滴加 25 μ L。
- 4.2.3.4.3.2 阴性对照血清不做稀释,每孔滴加 25 μ L。
- 4.2.3.4.3.3 将抗原作 10 倍连续系列稀释后,于每“行”孔中均加入 25 μ L,见表 4。

表 4 抗原效价测定

抗原稀释倍数	阳性血清稀释倍数						对照设置		
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	阴性血清	红细胞对照	补体对照
1 : 10	25	25	25	25	25	25	25	0	0
1 : 20	25	25	25	25	25	25	25	0	0
1 : 40	25	25	25	25	25	25	25	0	0
1 : 80	25	25	25	25	25	25	25	0	0
1 : 160	25	25	25	25	25	25	25	0	0
1 : 320	25	25	25	25	25	25	25	0	0
抗原对照	25	25	25	25	25	25	0	50	0
工作效价补体	25	25	25	25	25	25	25	0	25
稀释液	0	0	0	0	0	0	25	75	50
第一次感作	37 $^{\circ}$ C 振荡感作 40 min								
致敏红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50
第二次感作	37 $^{\circ}$ C 振荡感作 30 min								
结果判定									
抗原、补体、阴性血清对照均为 100%溶血,红细胞对照不发生自溶血,试验成立;抗原与血清在不同稀释度反应能发生抑制溶血的最高抗原稀释倍数,即为 1 个抗原单位									

- 4.2.3.4.3.4 每孔加入稀释好的 2 单位补体 25 μ L。
- 4.2.3.4.3.5 对照管设置
- 红细胞对照:75 μ L 稀释液+50 μ L 致敏绵羊红细胞。
- 补体对照:25 μ L 补体+50 μ L 稀释液+50 μ L 致敏绵羊红细胞。
- 抗原对照:25 μ L 抗原+50 μ L 稀释液+50 μ L 致敏绵羊红细胞。
- 4.2.3.4.3.6 将 96 孔 U 型板于振荡器上振荡 20 min,置 37 $^{\circ}$ C 振荡感作 40 min。
- 4.2.3.4.3.7 加入 50 μ L 致敏绵羊红细胞,置 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。
- 4.2.3.4.3.8 取出反应板进行结果判定并记录

能与标准阳性血清最高稀释度发生 100%抑制溶血(即不溶血)的抗原最大稀释倍数的倒数,就是抗原效价。

4.2.3.5 正式试验

4.2.3.5.1 试剂的稀释

4.2.3.5.1.1 将溶血素、抗原、补体按预试验测定的结果进行稀释。

4.2.3.5.1.2 将灭活后的被检血清、标准阳性血清、标准阴性血清分别做 1 : 5 ~ 1 : 320 系列稀释。标准阳性血清稀释倍数要大于其标注效价,阴性血清一般作 3 个连续稀释滴度。

4.2.3.5.2 试验程序

4.2.3.5.2.1 将倍比稀释的被检血清、标准阳性血清、标准阴性血清分别加入对应的孔中,每个滴度加 25 μ L,具体操作程序见表 5。

表 5 待检血清效价测定(正式试验)

	血清试验稀释度						血清抗补体稀释对照						抗原对照	5 个单位补体对照	红细胞对照
	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320			
加入血清量/ μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—	—
抗原加入量/ μL	25	25	25	25	25	25	—	—	—	—	—	—	25	—	—
稀释液加入量/ μL	—	—	—	—	—	—	25	25	25	25	25	25	25	5	40
补体加入量/ μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—
感作	恒温箱 37℃感作 1 h														
致敏红细胞量	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
第二次感作	先振荡 20 min, 再置恒温箱 37℃感作 45 min														
结果判定(溶血度)	0	0	40	70	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0

- 4.2.3.5.2.2 向各个稀释度的血清中加入 25 μL 抗原。
- 4.2.3.5.2.3 加入 5 单位补体 25 μL 。
- 4.2.3.5.2.4 同时设置抗原对照、红细胞对照、补体对照和血清抗补体对照。
- 4.2.3.5.2.5 用稀释液将对照孔补加至 75 μL 。
- 4.2.3.5.2.6 置恒温箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h。
- 4.2.3.5.2.7 加入致敏红细胞 50 μL ，先振荡 20 min，再置恒温箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 45 min。
- 4.2.3.5.2.8 取出后将微量反应板置离心机，1 000 r/min 离心 5min，判定并记录结果。

4.2.3.5.3 结果判定标准

- 4.2.3.5.3.1 各对照结果均成立时，方可判定被检血清效价。否则，重做试验。

红细胞对照：不溶血。

抗原对照：不溶血。

补体对照：50%以上溶血。

阴性血清：100%溶血。

阳性血清：抑制溶血，结果与已知效价相差 ± 1 个滴度。

血清抗补体对照：一般不能抑制补体使用，100%溶血。否则视为血清抗补体，应重新采血或改用其他方法。

4.2.3.5.3.2 被检血清效价的确定

完全不溶血：++++，25%溶血：+++，50%溶血：++，75%溶血：+，100%溶血：-。被检血清稀释度在 1:5 为++以上时判为阳性，以++血清稀释的最高倍数为判定结果。被检血清若抗补体，则选用 IFA 或 ELISA 试验检测。

附 录 A
(资料性附录)
牛巴贝斯虫病概述

A.1 病原

牛巴贝斯虫病是由顶器复合门、梨形虫目、巴贝斯虫属的原虫引起。寄生于牛的巴贝斯虫,迄今为止公认的有4个独立种:双芽巴贝斯虫、牛巴贝斯虫、分歧巴贝斯虫和大巴贝斯虫。牛巴贝斯虫和双芽巴贝斯虫是分布广泛和最为重要的两种。

A.2 流行病学

牛巴贝斯虫病主要是经蜱传播的一种急性季节性疾病,常发生在放牧牛群中,黄牛、水牛和牦牛均易感染,成地方性流行。在我国,微小牛蜱是双芽巴贝斯虫的主要传播媒介,病原在雌体内经卵传递给下一代,由第二代的若虫或成虫传播给易感牛。双芽巴贝斯虫病的发病季节出现春、夏、秋3次流行。其中,夏、秋两季是主要发病季节。牛巴贝斯虫病的流行病学与双芽巴贝斯虫病相似。分歧巴贝斯虫病主要分布在欧洲的西部和北部,其季节动态表现为两个发病高潮,第一个高潮为4月底、5月初至7月末、8月初,第二个高潮为8月中旬至9月或更迟。第一个高潮为主要发病期,占全年病例的90%。

A.3 症状

牛巴贝斯虫病多表现为急性和亚急性发病过程,媒介感染后经7 d~14 d的潜伏期后在血液中出现虫体,体温上升到40℃~42℃,呈稽留热型。精神不振,食欲减退,病情迅速恶化。出现可视黏膜苍白、黄染、血红蛋白尿和急性贫血。病程5 d~8 d,如不及时治疗,病死率50%以上。

附 录 B
(资料性附录)
牛泰勒氏焦虫病概述

B.1 病原

泰勒氏焦虫是在网状内皮系统和红细胞内寄生的血液型虫体,主要呈环形,似戒指状,大小为 $0.8\ \mu\text{m}\sim 1.7\ \mu\text{m}$,红细胞内有1~4个虫体;呈椭圆形,比环形略大,长与宽之比为1.5:1,一个红细胞内有1~2个虫体;逗点形或卵圆形,大小为 $(1.5\ \mu\text{m}\sim 2.1\ \mu\text{m})\times 0.7\ \mu\text{m}$,一个细胞内有4个~6个虫体。

B.2 流行病学

牛泰勒氏焦虫的传播者主要是由璃眼蜱属的残缘璃眼蜱,泰勒氏焦虫不能经卵传递。本病于6月开始发生,7月达最高潮,8月逐渐平息。死亡率约为16%~60%。在流行地区,以满1岁至3岁的牛发病为多,患过本病的幼牛成为带虫者,可保持带虫免疫达36个月甚至6年之久。

B.3 症状

潜伏期14 d~20 d。本病取急性经过,大部分病牛经3 d~20 d趋于死亡。病牛体温升高到 $39\ ^\circ\text{C}\sim 42\ ^\circ\text{C}$,为稽留热,4 d~10 d内维持在 $41\ ^\circ\text{C}$ 左右。少数病牛呈弛张热或间歇热。病牛随体温升高而表现沉郁,行走无力,离群落后,个别病牛表现流眼泪,以后贫血黄染,结膜布满绿豆大出血斑。病初食欲减退,中后期病牛有异食癖,反刍次数减少,磨牙,流涎,排黑而干的粪便,常带有黏液或血丝,体表淋巴结肿大为本病的特征。

附 录 C

(规范性附录)

试剂配制

C.1 姬姆萨染色液的配制

姬姆萨染色料粉 0.5 g, 中型纯甘油 25 mL, 无水中性甲醇 25 mL。先将姬姆萨染色粉置研钵中, 加少量甘油充分研磨, 边加边磨, 直到甘油全部加完为止。将其倒入 60 mL~100 mL 棕色小口试剂瓶中, 在研钵中加少量甲醇以冲洗甘油染液, 冲洗液仍倾入上述瓶, 再加甲醇冲洗, 直到 25 mL 甲醇全部用完为止。塞紧瓶塞, 充分摇匀, 而后将瓶置于 65 °C 温箱中 24 h 或室温 3 d~5 d, 并不时摇匀, 过滤后即为原料液。染色时将姬姆萨染色液原液 10 mL 加到中性蒸馏水 90 mL 中混匀。

C.2 红细胞裂解液(ELS)

称取 NH_4Cl 4.15 g 加双蒸水 450 mL 进行溶解, 称取 Tris 1.029 7 g 加双蒸水 50 mL, 后者加入前者, 混匀, 121 °C 高压灭菌 20 min, 备用。

C.3 抗原制备

采集高寄生虫血病(血液中感染虫体的红细胞达到 30% 以上的)牛全血, 加入等量的含抗凝剂的阿氏液中, 待红细胞沉降到三角烧瓶底部时吸出淡黄色的血浆和阿氏液上清, 用冷巴比妥缓冲液反复洗红细胞 3~5 次, 然后加入适量蒸馏水裂解红细胞, 30 000 g 离心 30 min, 弃上清液。再加入冷巴比妥缓冲液, 20 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 反复 3~5 次洗沉淀物。加入 5% (质量浓度) 的聚乙烯吡咯烷酮, 用磁力搅拌器搅拌 30 min, 用两层灭菌纱布过滤, 小份分装, 每瓶 2 mL, 冻干, -70 °C 以下保存备用。

C.4 阿氏液

葡萄糖	20.5 g	
柠檬酸钠	8.0 g	
氯化钠	4.2 g	

溶于双馏水中, 用柠檬酸调 pH 值至 6.1, 定容至 1 000 mL, 抽滤灭菌。

C.5 5×巴比妥储备液

溶液 I:	
氯化钠	85.0 g
5,5-二乙基巴比妥酸钠	3.75 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.68 g
氯化钙	0.28 g

溶于 1 000 mL 双馏水中。

溶液 II:

取 5,5-二乙基巴比妥酸钠 5.75 g 溶于 500 mL 接近沸腾的热双馏水中至自然冷却。将溶液 II 加入溶液 I 中, 定容至 2 000 mL, 4 °C 储存备用。