



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3505—2013

犬恶丝虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for canine dirofilariasis

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：中华人民共和国四川出入境检验检疫局、四川农业大学、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：余华、杨光友、岳川、王昱、严玉宝、李应国、刘洋洋、陈世界、周岷江、胡娟、崔鹏博。

犬恶丝虫病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了犬恶丝虫的检疫技术规范。
本标准适用于犬恶丝虫的形态观察、PCR 检测及抗体检测。

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

3 形态观察

3.1 设备和器材

- 3.1.1 普通离心机。
- 3.1.2 光学显微镜。
- 3.1.3 体视显微镜。
- 3.1.4 解剖器材。

3.2 试剂和材料

- 3.2.1 2%(体积分数)甲醛水溶液。
- 3.2.2 美蓝染色液，配制见附录 A 的 A.1。

3.3 微丝蚴观察(改良柯氏试验)

采集待检动物外周血 5 mL，每毫升加入 9 mL 2% 甲醛水溶液，混合后 1 500 r/min 离心 10 min，去上清液，取少量沉渣，美蓝染色，镜检观察，并拍照记录。犬恶丝虫微丝蚴的主要形态特征为：大小为 $(218\ \mu\text{m}\sim329\ \mu\text{m})\times(5\ \mu\text{m}\sim7\ \mu\text{m})$ ，无鞘膜，前段呈尖锥状，后端细长、较直。染色后虫体呈蓝色，参见附录 B。

3.4 成虫观察

解剖患病动物，检查其右心室和肺动脉。成虫虫体呈微白色，细长粉丝状。口由 6 个不明显的乳突围绕。雄虫长为 12 cm~20 cm，后部呈螺旋状卷曲，有窄的尾翼膜，末端有尾乳突 11 对(肛前 5 对、肛后 6 对)，交合刺 2 根，长短不等。雌虫长为 25 cm~30 cm，尾端钝圆，阴门开口于食道后端，参见附录 B。

4 PCR 检测

4.1 设备和器材

- 4.1.1 移液器(10 μL 、200 μL 、1 000 μL 各一支)。

- 4.1.2 PCR 仪。
- 4.1.3 水平电泳槽。
- 4.1.4 pH 计。
- 4.1.5 电子天平。
- 4.1.6 冷冻离心机。
- 4.1.7 凝胶成像分析系统。
- 4.1.8 电泳仪。

4.2 试剂和材料

- 4.2.1 市售总 DNA 抽提试剂盒。

- 4.2.2 引物：

DIDR-F1 5'-AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG-3'；

DIDR-R1 5'-AGCGGGTAATCACGACTGA GTTGA-3'。

- 4.2.3 市售 PCR 缓冲液(含 Mg^{2+} 、*Taq* 聚合酶等)。

- 4.2.4 DL2000 DNA Marker。

- 4.2.5 阳性对照品(恶丝虫阳性犬血浆)。

- 4.2.6 阴性对照品(恶丝虫阴性犬血浆)。

- 4.2.7 琼脂糖。

4.3 操作方法

4.3.1 DNA 抽提

采集疑似病犬的血液,取 1.0 mL 用总 DNA 试剂盒抽提血液中的 DNA,操作步骤按照试剂盒说明书。DNA 溶解于 20 μ L 灭菌水中备用。

4.3.2 扩增和检测

25 μ L 扩增体系含:2 \times PCR 缓冲液 12.5 μ L,引物 DIDR-F1(10 pmol/ μ L)、DIDR-R1(10 pmol/ μ L)各 1.0 μ L,血液总 DNA 1.0 μ L, H_2O 10.5 μ L,混匀后稍加离心。按参数:95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;35 个循环:95 $^{\circ}C$ 变性 30 s,60 $^{\circ}C$ 复性 30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 30 s;最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min 进行扩增。同时,以 H_2O 代替模板 DNA 作空白对照。每次试验加做阴性、阳性质控对照。反应结束后,取 5.0 μ L PCR 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳(10 V/cm,30 min)。

4.4 结果分析

若 PCR 产物出现约 520 bp 的目的片段,则对目的产物进行测序,序列应与 GenBank 中犬恶丝虫参考序列匹配率不小于 93%。PCR 产物参考序列参见附录 C。

5 抗体检测(Dot-ELISA 法)

5.1 设备和器材

- 5.1.1 恒温培养箱。

- 5.1.2 硝酸纤维素膜(NC 膜)。

5.1.3 玻璃研钵。

5.1.4 显微镜。

5.1.5 一次性滤器(0.22 μm)。

5.2 试剂和材料

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

5.2.1 酶联葡萄球菌 A 蛋白(HRP-SPA)。

5.2.2 犬恶丝虫阳性血清。

5.2.3 犬恶丝虫阴性血清。

5.2.4 包被缓冲液,配制见 A.2。

5.2.5 封闭液,配制见 A.3。

5.2.6 PBS 缓冲液,配制见 A.4。

5.2.7 PBST 洗涤液,配制见 A.5。

5.2.8 底物溶液,配制见 A.6。

5.3 操作步骤

5.3.1 虫体抗原制备

用 PBS 缓冲液将从动物体内收集到的犬恶丝虫虫体清洗 3 次,再用玻璃研钵在冰浴上研磨,直到显微镜检查无完整虫体组织为止。然后将研磨好的组织匀浆倒入离心管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 5 次, $10\,000\text{ r/min}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,取上清液,无菌过滤(0.22 μm)后作为可溶性抗原,并测定蛋白质含量,分装后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

5.3.2 诊断膜制备

用铅笔在硝酸纤维素膜(NC 膜)光滑面将膜划成 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 小方块,将 NC 膜在蒸馏水中浸泡 20 min,完全湿透后取出,室温晾干,备用。用包被缓冲液(pH 9.6)将犬恶丝虫虫体粗抗原原液稀释至 $16.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,备用。用微量加样器在小格中央滴加 $1\text{ }\mu\text{L}$ 稀释好的虫体粗抗原, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min;将包被好的 NC 膜浸入封闭液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 50 min。将封闭好的膜片浸入 PBST 洗涤液中泡洗 3 次,每次 5 min。置室温晾干,即为诊断膜。可放入密闭干燥的塑料袋中备用。

5.3.3 ELISA 检测

每只待检动物采集血液 5 mL,分离血清用于检测。每次试验时均应设立阳性血清对照和阴性血清对照。检测步骤如下:

- 用 PBS(pH 7.4)缓冲液将待检血清按 1:150 稀释,酶联葡萄球菌 A 蛋白(HRP-SPA 稀释到工作浓度备用;
- 将预备的诊断膜浸入稀释好的血清中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,反应 60 min;
- 将诊断膜浸入 PBST 洗涤液中泡洗 3 次,每次 5 min,取出用滤纸吸干;
- 将诊断膜浸入稀释好的 HRP-SPA 溶液中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,反应 60 min;
- 重复步骤;
- 将诊断膜浸入新鲜配制的底物溶液中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,避光显色 20 min;
- 用自来水冲洗终止反应,晾干。

SN/T 3505—2013

5.4 结果判断

肉眼观察。阳性对照出现至少+,阴性无可见斑点,对照成立方可判定。依反应色泽深浅记录反应等级。+++ :斑点呈深蓝色; ++ :斑点呈蓝色; + :斑点呈灰蓝色; - :无可见斑点,即为阴性。± (可疑):仅有微弱的界限不清的斑点。对可疑者作重复检测,重复检测仍为可疑,判为阳性。

6 综合判定

检出犬恶丝虫微丝蚴,且 PCR 或血清抗体检测结果阳性,即判定动物犬恶丝虫病阳性。

检出特征性的犬恶丝虫成虫,即判定动物犬恶丝虫病阳性。

其他情况时,均判定为阴性。



附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 美蓝染色液

取 0.5 g 美蓝,溶于 30 mL 95%酒精中,加 100 mL 0.01%氢氧化钾溶液,保存在棕色瓶内。

A.2 包被缓冲液(pH 9.6)

分别称取 Na_2CO_3 1.59 g、 NaHCO_3 2.93 g,加蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL,用 NaOH 调节 pH 至 9.6。0.22 μm 滤器过滤后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.3 封闭液(10 g/L)

取 1 g BSA(牛血清白蛋白),加蒸馏水定容至 100 mL,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.4 PBS 缓冲液(pH 7.4)

取 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g,加蒸馏水至 800 mL,调节 pH 至 7.4,加蒸馏水定容至 1 000 mL,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.5 PBST 洗涤液

取 0.5 mL 吐温-20 加入 1 000 mL PBS(pH 7.4),搅拌混匀,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.6 底物溶液(现配现用)

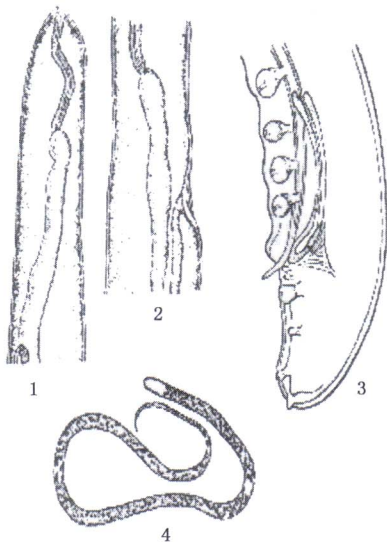
取 4.5 mg 4-氯-1-萘酚溶于 1.5 mL 无水甲醇中再加入 5 mL PBS 混合,最后加入 2 μL 双氧水,混合后立即使用。

SN/T 3505—2013

附 录 B
(资料性附录)
疫病概述

犬恶丝虫(*Dirofilaria immitis*)又称犬心丝虫(heart worm),为双瓣科、恶丝属(*Dirofilaria*)的虫种。犬恶丝虫的成虫寄生于犬心脏的右心室及肺动脉(少数见于胸腔、支气管、皮下结缔组织等处),引起循环障碍、呼吸困难、贫血、猝死等症状,即犬恶丝虫病,属于一种丝虫病。除犬外,猫和多种野生动物以及人均可感染与发病。该病不仅危害犬、猫等动物的健康,而且对人类健康亦构成威胁。微丝蚴(*Microfilariae*),为犬恶丝虫的雌虫和雄虫交配后,雌虫胎生产出的幼虫。微丝蚴通常生活于动物的外周血液中。

雌虫产出的微丝蚴进入外周血液内,在外周血液中可生存1年或1年以上,但被中间宿主吞噬以前不能进一步发育。犬恶丝虫中间宿主为蚊子(如:中华按蚊、白纹伊蚊、浅色库蚊等)。夏季蚊子吸食动物血液,微丝蚴随血液进入蚊体内,在其体内约2周发育为第三期感染性幼虫。蚊刺吸犬、猫血液时,第三期幼虫从蚊子口器中逸出,迅速钻进动物宿主皮肤,在皮下结缔组织、肌间组织、脂肪组织和肌膜下发育,经第3次、第4次蜕皮成为童虫,然后进入静脉,移行到右心室及大血管内,继续发育为成虫。从蚊子叮咬感染到发育为成虫需6个~7个月。成虫除寄生在右心室及肺动脉外,也可在后腔静脉、前腔静脉到肺动脉的毗连血管内寄生。在终宿主体内成虫可生存5年~6年,并不断产生微丝蚴。犬恶丝虫形态及生活史见图B.1~图B.2。

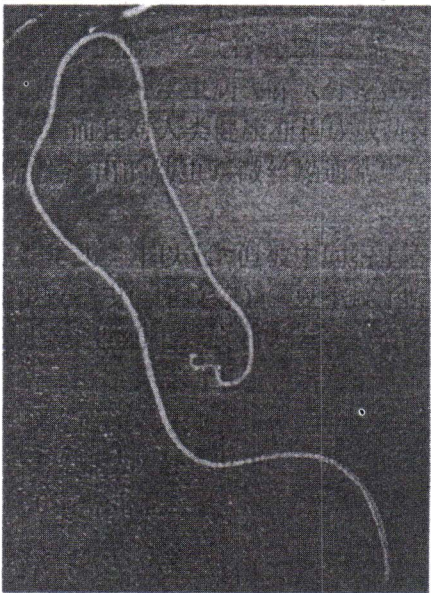


注: 引自杨光友《动物寄生虫病学》,2009。

说明:

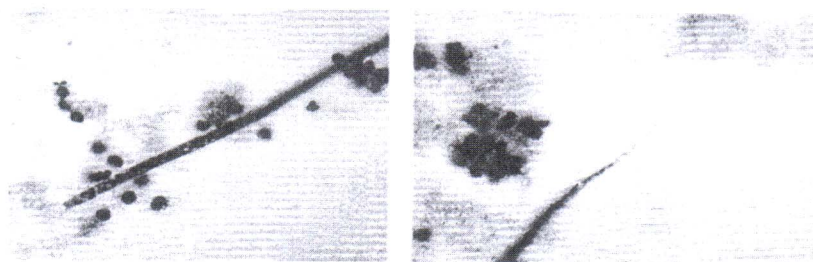
- 1 —— 虫体头部;
- 2 —— 雌虫阴门部;
- 3 —— 雄虫尾端;
- 4 —— 微丝蚴。

图 B.1 犬恶丝虫虫体形态



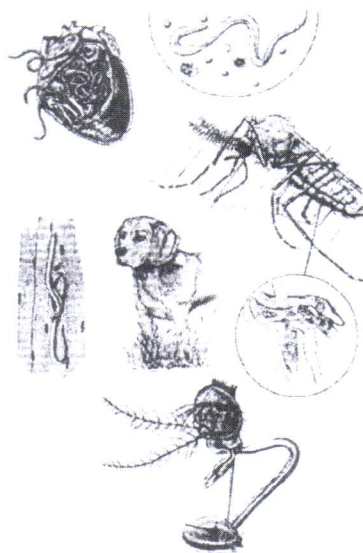
注: 杨光友摄。

图 B.2 犬恶丝虫成虫形态



注：Rishniw, 2006。

图 B.3 改良柯氏试验检查涂片中的犬恶丝虫微丝蚴(40×)



注：引自 Bowman《Parasitology for Veterinarians (Seventh edition) 》, 1999。

图 B.4 犬恶丝虫生活史

附 录 C
(资料性附录)

犬恶丝虫 PCR 产物参考序列

5'-AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAGCACAAAGATTTCGAATGCACATTGCACCATCGGGT
TGATTCCCGATGGTACGTCTGGTTGAGGGTCAATATCGATCAGATTATCAAATAATATAC
CAAAATTGATACATATGATACATATGAATGATATATGTTTTGGATATATTATTTGTTAA
AATTAATTCATCAGGTGATGATGTGATGATAATCATTGAAAAATGACAAAAATCCCCTGA
TTAAGTATAATAAAAAATAGTAAGTAAAAAAGGCAAATTTTTACTTACAAAATATTACAT
ATTGGAATAAATAATTTAATCTTTCATATATATAACTGTGATACATCATAAATATATAT
ATAGCAAAAGAAAGATATAAATTATTATCATTTTTTTTTTGATCATTATTGCTATAATTAT
TATCCTGCTTGTTTAACTATAATAATAGCAATGAATGAATCAAAATTTAAATGATACGTT
AAAATCCAACCAATATGTTATAAATTTTCTTTCATTTTTTGACCTCAACTCAGTCGTGATT
ACCCGCT-3'
