

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2974—2011

### 牛巴贝斯虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for bovine babesiosis

2011-09-09 发布

2012-04-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准与 OIE《陆生动物疾病诊断试验和疫苗标准手册》(2008 年版)中第 2.4.2 章“牛巴贝斯虫病”的一致性程度为非等效。

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:中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国四川出入境检验检疫局、四川农业大学。

本标准主要起草人:姜红、王玉玲、赵祥平、余华、杨光友、严玉宝、胡娟。



# 牛巴贝斯虫病检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了牛巴贝斯虫病病原鉴定、酶联免疫吸附试验和间接荧光抗体试验。  
本标准适用于牛巴贝斯虫病的检疫。

## 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

## 3 疾病概述

牛巴贝斯虫病由牛巴贝斯虫(*Babesia bovis*)、双芽巴贝斯虫(*B. bigemina*)、分歧巴贝斯虫(*B. divergens*)等寄生原虫引起。该病可以引起牛的高热、全身循环性休克,血红蛋白尿以及某些神经症状,严重可导致死亡。参见附录 A。

牛巴贝斯虫病的诊断方法主要包括:病原鉴定和血清学检查。病原鉴定中传统的方法是显微镜检查。该方法可检测出低至  $10^7$  个红细胞感染 1 个虫体。血清学实验包括间接免疫荧光试验和酶联免疫吸附试验。其中,间接免疫荧光试验已广泛用于检测巴贝斯虫抗体,但一个突出的缺点是检测样品数量少,带有一定主观性。

## 4 诊断技术

### 4.1 镜检法

#### 4.1.1 仪器和设备

普通显微镜。

#### 4.1.2 试剂和材料

姬姆萨染色液,配制方法参见附录 B。实验用水应符合 GB/T 6682 要求。

#### 4.1.3 采样部位

因牛巴贝斯虫通常分布在毛细血管血液里,活牛样品最好取自耳尖或尾尖的毛细血管;牛双芽巴贝斯虫和分歧巴贝斯虫均匀地分布于全身血液,如不能采集毛细血管血液做新鲜涂片,也可无菌采集颈静脉血加入抗凝剂 EDTA(1 mg/mL),5℃保存,几小时内送达实验室。病死牛样品除薄血涂片外,还应有取自大脑皮层、肾、肝、肺和骨髓的组织涂片。

#### 4.1.4 血涂片的制备

在洁净的载玻片三分之一处蘸一小滴血,以一端缘光滑的载玻片为推片,将推片的一端置于血滴之



前,待血液沿推片端缘扩散后,自左向右推成薄血膜,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,此为薄血涂片;取一小滴血液(约 50  $\mu\text{L}$ )滴在干净的载玻片上,待血滴风干后,80  $^{\circ}\text{C}$  加热固定 5 min,10%姬姆萨染色 15 min~20 min,此为厚血涂片。虫种鉴别以薄血涂片为好。

4.1.5 组织涂片的制备

脏器涂片的制作可用一块干净的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%姬姆萨染色 20 min~30 min。如果样品取自牛死亡后 24 h 或更长时间,其结果不可靠。

4.1.6 显微镜观察

用油镜检查所有染色涂片(见图 1、图 2)。牛巴贝斯虫较小,通常位于红细胞中央,其平均长宽约为  $(1.0\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m})\times(0.5\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \mu\text{m})$ ,虫体常成对出现,且一端相连呈钝角。分歧巴贝斯虫也较小,其形态与牛巴贝斯虫非常相似,所不同的是呈钝角的成对虫体常位于红细胞边缘。双芽巴贝斯虫较长,成对虫体往往呈锐角相连,虫体呈典型梨形,但也有形状各异的单个虫体存在,长  $3.0\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m}$ ,宽  $1.0\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m}$ ,成对排列的两个虫体各有两个不相连的红染点(牛巴贝斯虫和分歧巴贝斯虫往往只有一个红染点)。



图 1 牛红细胞内的双芽巴贝斯虫



图 2 牛红细胞内的牛巴贝斯虫

4.2 血清学方法

4.2.1 间接免疫荧光实验

4.2.1.1 仪器和设备

- 4.2.1.1.1 烘箱。
- 4.2.1.1.2 水浴箱。
- 4.2.1.1.3 荧光显微镜。



#### 4.2.1.2 抗原片的制备

选用染虫率达2%~5%的牛,从颈静脉采血制备抗原涂片。

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。洗涤后,将感染红细胞重悬于2倍体积PBS,并加入1%牛血清白蛋白(BSA),取一滴血液滴在干净的玻片上,以一端边缘光滑的载玻片为推片,将推片的一端置于血滴之前,待血液沿推片端缘扩散后,自右向左推成薄血膜。血涂片风干后,80℃烘箱固定5 min,密封已固定的血涂片,-70℃保存备用(最多可保存5年)。

#### 4.2.1.3 正式试验

4.2.1.3.1 待检血清和对照血清用PBS 1:30 稀释。血清使用前,可经56℃水浴30 min 灭活,也可不经灭活。用油笔将抗原涂片划成8个~10个疏水小区。用精密移液器在每小格内加入5 μL~10 μL 稀释血清,将玻片放入湿盒内置37℃ 30 min。在每张玻片上设弱阳性血清,阴性血清对照。

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

4.2.1.3.3 孵育后,用PBS洗玻片1次,再用PBS和水依次各冲洗一次,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。

#### 4.2.1.4 结果判定

结果判定如下:

- (一)无荧光;
- (±)极弱的可疑荧光;
- (+)荧光较弱,但清楚可见;
- (++)荧光明亮;
- (+++ ~++++)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 间接酶联免疫吸附试验

##### 4.2.2.1 仪器设备

- 4.2.2.1.1 酶标仪。
- 4.2.2.1.2 洗板机。
- 4.2.2.1.3 恒温培养箱。

##### 4.2.2.2 试剂<sup>1)</sup>

- 4.2.2.2.1 包被有重组抗原的96孔微量板。
- 4.2.2.2.2 20 倍的浓缩洗液。
- 4.2.2.2.3 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗。
- 4.2.2.2.4 底物和终止液。
- 4.2.2.2.5 阴性对照血清和阳性对照血清。

1) 由Svanova Biotech AB公司提供。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。



4.2.2.2.6 待检血清:在无菌条件下采取血样,分离血清。实验前用1倍的洗液做1:100稀释。

4.2.2.3 试验程序

- 4.2.2.3.1 试验前,血清样品、试剂和反应板均恢复到室温。
- 4.2.2.3.2 阴、阳性对照和待检血清用1倍的洗液做1:100稀释。
- 4.2.2.3.3 稀释后的阴阳性对照 100 μL/孔,各加双孔。
- 4.2.2.3.4 稀释后的待检血清 100 μL/孔,按顺序依次加入。
- 4.2.2.3.5 将酶标板封板后,37℃感作 30 min。
- 4.2.2.3.6 弃掉各孔液体,每孔加入 250 μL~300 μL 已稀释好的洗液,轻轻振动后甩掉,连续洗涤 3 次。最后一次洗涤后,将酶标板在吸水纸上轻拍,除去孔内剩余的液体。
- 4.2.2.3.7 每孔加酶标结合物 100 μL,封板后,37℃感作 30 min。
- 4.2.2.3.8 重复洗板步骤。
- 4.2.2.3.9 每孔加 TMB 底物 100 μL,室温避光感作 30 min,从加完第一孔开始计时。
- 4.2.2.3.10 每孔加终止液 100 μL,混匀。
- 4.2.2.3.11 酶标仪以空气作为空白对照,在 15 min 内,在 450 nm 波长下测量和记录阴阳性对照和待检血清的吸光值(OD)。

4.2.2.4 试验有效性检测

- 4.2.2.4.1 阳性对照的数值彼此差异不得大过 25%;
- 4.2.2.4.2 阳性对照的吸光值应介于 1.0~2.3 之间,阴性对照的阳性百分比值应小于 20。

4.2.2.5 结果计算和判定

按式(1)计算阳性百分比值(PP):

$$A = \frac{B(或C)}{D} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- A——阳性百分比值;
- B——待检血清孔的 OD 值;
- C——阴性对照孔的 OD 均值;
- D——阳性对照孔的 OD 均值。

当待检血清的 PP 值小于等于 25,判定牛巴贝斯虫病为阴性;当待检血清的 PP 值大于等于 40,判定牛巴贝斯虫病为阳性。当待检血清的 PP 值介于 26 至 39 之间,牛巴贝斯虫病为可疑,需重复试验,若仍为可疑,需最少间隔 3 周重新采血试验。



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,第二个高潮位 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 潜伏期在血液中出现虫体,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。出现可视粘膜苍白、黄染、血红蛋白尿和急性贫血。病程 5 d~8 d,不及时治疗 50% 以上死亡。

### A.4 诊断

牛巴贝斯虫病的诊断方法主要分为病原鉴定和血清学检测。显微镜检查染色的厚、薄血液涂片是传统的病原鉴定方法。其次,目前很多实验室都在尝试使用 DNA 探针或 PCR 的方法检测,使检测的敏感性和特异性得到了极大的提高。血清学诊断主要为间接荧光抗体试验和酶联免疫吸附试验。目前,市场上已有商品化的酶联免疫吸附试验的试剂盒。



附 录 B  
(资料性附录)  
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。先将姬氏染色粉置研钵中, 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 或室温内 3 d~5 d, 并不时摇匀, 过滤后即为原液。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, 现用现制备。

---



中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
牛巴贝斯虫病检疫技术规范  
SN/T 2974—2011

\*

中国标准出版社出版  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字  
2012年3月第一版 2012年3月第一次印刷  
印数 1—1 600

\*

书号:155066·2-23043 定价 16.00 元



SN/T 2974-2011