



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3304—2012

马巴贝斯虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for *Babesiosis equine*

2012-12-12 发布

2013-07-01 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。

本标准与国际动物卫生组织(OIE)《诊断试验和疫苗标准手册》(2010)中第 2.5.8 章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:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:鱼海琼、王玉玲、朱来华、罗长保、赵吟、许如苏、林志雄、陈茹、田纯见。

马巴贝斯虫病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了马巴贝斯虫病的病原学检查、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验、微量补体结合试验和聚合酶链式反应方法的技术要求。

本标准适用于马巴贝斯虫病的血清学调查、诊断和监测。

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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

SN/T 1526 马巴贝斯虫病检测方法 微量补体结合试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

B. equi.:马巴贝斯虫

EDTA:乙二胺四乙酸

FITC:异硫氰酸荧光素

4 临床诊断

参照附录 A 的 A.1 做出初步诊断。

5 实验室诊断

5.1 血涂片镜检

5.1.1 试剂

5.1.1.1 EDTA 溶液(1 mg/mL)(参见附录 A)。

5.1.1.2 10%的姬姆萨染液(参见附录 A)。

5.1.1.3 甲醇(分析纯)。

5.1.2 器械

5.1.2.1 光学显微镜。

5.1.2.2 测微计。

5.1.3 样品的采集

用针头刺破耳静脉采血,滴于载玻片一端。也可采用血球富集法收取红细胞,取一离心管,加入抗凝血 6 mL~7 mL,充分混合,以 2 000 r/min 的速度离心 5 min,用吸管吸取上层液体弃掉,注意不要吸掉红细胞层,沉淀即为红细胞,滴于载玻片一端,以备推片。

5.1.4 血涂片制备

将上述样品以常规方法推成血片,干燥后,将少量甲醇滴于血膜上。待甲醇自然干燥后即达固定,然后用 10% 吉姆萨氏染液染色 20 min~30 min,用水冲净染液,风干,油镜检查,依其形态特征确诊。

5.1.5 结果判定

马巴贝斯虫镜检为小型虫体,虫体多位于红细胞内,裂殖子相对较小,长度小于 2~3 μm ,呈圆形或阿米巴样,通常 4 个裂殖子在一起,形成四联体或呈“马尔他十字”排列。图片参见 A.2。

5.2 间接免疫荧光抗体试验

5.2.1 仪器和设备

- 5.2.1.1 磁力搅拌器。
- 5.2.1.2 荧光显微镜。
- 5.2.1.3 微量移液器。

5.2.2 试剂和材料

- 5.2.2.1 Puck's Saline G 溶液(pH 7.2)配制方法参见附录 B。
- 5.2.2.2 山羊血清。
- 5.2.2.3 丙酮。
- 5.2.2.4 阴、阳性对照血清。
- 5.2.2.5 0.01 mol/L pH7.4 PBS,配制方法参见附录 B。
- 5.2.2.6 FITC 荧光素标记的羊抗马 IgG。

5.2.3 操作步骤

5.2.3.1 抗原片制作

- 5.2.3.1.1 无菌采集感染马巴贝斯虫病动物全血,冷藏方法送至实验室。
- 5.2.3.1.2 将装有全血的试管置台式离心机内 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 r/min 离心 15 min,用微量移液器吸弃上清液和白细胞层。
- 5.2.3.1.3 向试管中加入 Puck's Saline G 溶液,用移液器轻柔地吹打沉积的红细胞层,重新悬浮红细胞后,4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 r/min 离心 15 min,用微量移液器吸弃上清液和白细胞层,依此法重复两次,获得清洗后的红细胞。
- 5.2.3.1.4 用吸管量得红细胞体积,然后加入其两倍体积的含有 10% 山羊血清的 Puck's Saline G 溶液,重新悬浮红细胞。即如果沉积的血球量为 5 mL,则应加入含有 10% 山羊血清的 Puck's Saline G 溶液 10 mL。
- 5.2.3.1.5 取 8 μL 的红细胞悬浮液滴在载玻片的一端。再拿另一载玻片,倾斜 45 $^{\circ}$,常规推片,空气晾干,即得抗原片。
- 5.2.3.1.6 依此法制备若干抗原片,将若干封好的载玻片用锡箔纸包好,注意不要磨损抗原面,置

—80℃冰柜中保存备用。

5.2.3.2 正式试验

5.2.3.2.1 依据试验所需从—80℃冰柜中取出若干抗原片,将抗原片放置在带有干燥剂的干燥缸中,室温放置约20 min。

5.2.3.2.2 将—20℃冰箱预冷的丙酮倒入染色缸中。将抗原片放进装有丙酮的染色缸中,固定30 s。迅速取出抗原片,吹干丙酮。

5.2.3.2.3 待抗原片自然干燥后,用一次性注射器取融化的液体蜡或者指甲油等可凝固的材料,将抗原片划成 2×5 个约 1 cm^2 的小方块,并置空气中约30 min至晾干。

5.2.3.2.4 在微量反应板中,用含有1%山羊血清的PBS溶液将被检血清、阳性对照血清和阴性对照血清作1:80、1:160、1:320、1:164、1:1280稀释。

5.2.3.2.5 用微量移液器取10 μL 的稀释液滴加到抗原片上相应的小方块中,将其置湿盒中室温下感作30 min。

5.2.3.2.6 用4℃预冷的PBS冲洗玻片后,将其放入装有4℃ PBS的烧杯中磁力搅拌洗玻片10 min。倒掉液体,重新加入4℃ PBS,磁力搅拌洗10 min,依此法重复洗三次。将玻片取出置空气中晾干。

5.2.3.2.7 用含有1%山羊血清的PBS溶液将荧光素标记的羊抗马IgG作1:80稀释,取10 μL 稀释液加入到各小方块中,并将其置湿盒中室温下感作30 min。

5.2.3.2.8 重复5.2.3.2.6。

5.2.3.2.9 将干燥好的玻片置荧光显微镜下观察。

5.2.4 结果判定

5.2.4.1 阳性对照的判定

阳性对照血清的小方块中可见强烈的特异性荧光。

5.2.4.2 阴性对照的判定

阴性对照血清的小方块中未见特异性荧光。

5.2.4.3 被检血清的判定

当对照成立时,可进行试验结果判定。当被检血清1:80或更高稀释度的小方块中可见特异性荧光时,则该被检血清判定为间接免疫荧光抗体阳性。当被检血清的小方块中未见有特异性荧光时,则该被检血清判定为间接免疫荧光抗体阴性。

5.3 竞争酶联免疫吸附试验

5.3.1 试剂

5.3.1.1 *B. equi*. 抗原。

5.3.1.2 包被液,见附录C。

5.3.1.3 封闭液,见附录C。

5.3.1.4 单克隆抗体。

5.3.1.5 阴、阳性对照。

5.3.1.6 辣根过氧化物酶标记的二抗。

5.3.1.7 单克隆抗体稀释缓冲液。

5.3.1.8 检测样品稀释缓冲液。

SN/T 3304—2012

5.3.1.9 浓缩洗液。

5.3.1.10 底物液。

5.3.1.11 终止液(H_2SO_4 0.5 mol/L)。

5.3.2 主要仪器

5.3.2.1 酶标仪。

5.3.2.2 培养箱。

5.3.2.3 旋涡振荡器。

5.3.3 样品的处理

采集马新鲜血液,待血凝后,2 500 r/min 离心 10 min,无菌分离血清至指形管。

5.3.4 操作方法

5.3.4.1 试剂准备

5.3.4.1.1 酶标板包被

用包被液稀释 *B. equi*. 纯化抗原,按照优化的浓度,96 孔酶标板每孔包被 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。去除包被液,用 300 μL PBS-T 洗涤 5 次,拍干。每孔加入 300 μL 封闭液,室温孵育 1 h;弃掉封闭液,300 μL PBS-T 洗涤 5 次,拍干。现已有成熟试剂盒,口岸检疫中可直接购买经过质量认可和方法确认的包被抗原板或试剂盒。

5.3.4.1.2 对照和样品

用样品稀释液将被检血清和对照阴、阳性血清按议定书要求的比例稀释。建议预先在血清稀释微量板上稀释样品,对照设置两孔并且加在正式试验板的不同位置,每块板要有对照,提前在记录纸上记录好样品和对照的排布,加样时依据加样记录以免加错。

5.3.4.1.3 单克隆抗体

将浓缩的单克隆抗体按照其倍数稀释。

5.3.4.1.4 辣根过氧化物酶标记的二抗

将浓缩的辣根过氧化物酶标记的二抗按照其倍数稀释。

5.3.4.1.5 洗液

将浓缩的洗液按照其倍数稀释。

5.3.4.2 试验程序

5.3.4.2.1 加阴、阳性对照和被检血清样品

根据样品排列表,用经过校准的适量移液器和相应的吸头移取 50 μL 阴、阳性对照和被检血清样品至抗原包被板上的相应位置,轻拍板,使对照和样品与抗原包被板板孔底面充分接触,避免太大力,不能使液体溅出或溅入其他孔。室温 21 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,孵育 30 min。

5.3.4.2.2 洗板

每孔加入 300 μL 稀释好的洗液洗板三次,无自动洗板机时,手洗注意弃去洗液时抓紧板条以免脱

落,快速甩掉洗液后在干净的吸水纸上倒扣板用力拍打四次,过程中避免板孔干燥。

5.3.4.2.3 加单克隆抗体

每孔加稀释好的加单克隆抗体 50 μ L,轻拍板,使其与抗原包被板板孔底面充分接触,避免太大力,不能使液体溅出或溅入其他孔。室温 21 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,孵育 30 min。

5.3.4.2.4 洗板

同步步骤 5.3.4.2.2。

5.3.4.2.5 加辣根过氧化物酶标记的二抗

每孔加稀释好的加辣根过氧化物酶标记的二抗 50 μ L,轻拍板,使其与抗原包被板板孔底面充分接触,避免太大力,不能使液体溅出或溅入其他孔。室温 21 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,孵育 30 min。

5.3.4.2.6 洗板

同步步骤 5.3.4.2.2。

5.3.4.2.7 加底物

每孔加底物 50 μ L,轻拍板,室温 21 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,孵育 15 min。注意避光,无需洗板。

5.3.4.2.8 加终止液

每孔加终止液 50 μ L,轻拍板,立即于酶标仪 620 nm、630 nm 或 650 nm 条件下读取 OD 数值。

5.3.5 结果判定

5.3.5.1 有效性

5.3.5.1.1 阴性对照的 OD 平均值(ODNC)大于 0.300 且小于 2.000:即 $0.300 < ODNC < 2.000$

5.3.5.1.2 阳性对照的阻断率 $\geq 40\%$:

$$\text{阻断率}(I\%) = 100 - [(\text{样品 OD} \times 100) \div (\text{阴性对照平均 OD})]$$

5.3.5.2 结果分析

5.3.5.2.1 样品的阻断率大于等于 40%判为阳性。

5.3.5.2.2 样品的阻断率小于 40%判为阴性。

5.4 微量补体结合试验

见 SN/T 1526。

5.5 套式聚合酶链式反应

5.5.1 试剂

5.5.1.1 DNA 纯化试剂盒:红细胞裂解液、细胞裂解液、蛋白质沉淀液、DNA 水化液。

5.5.1.2 蛋白酶 K、异丙烷、2%琼脂凝胶、75%乙醇。

5.5.1.3 2 \times PCR 反应液:20 mmol/L Tris-HCl 中含 25U *Taq* DNA 聚合酶、100mmol/L KCl、3 mmol/L $MgCl_2$ 、0.4 mmol/L dATP、0.4 mmol/L dCTP、0.4 mmol/L dGTP、0.4 mmol/L dTTP, pH 8.3。

SN/T 3304—2012

5.5.2 仪器设备

- 5.5.2.1 高速台式冷冻离心机。
- 5.5.2.2 PCR 仪。
- 5.5.2.3 电泳槽。
- 5.5.2.4 凝胶成像系统。

5.5.3 样品的采集与前处理

见 GB/T 18088 采样。

5.5.4 操作方法

5.5.4.1 核酸的提取

- 5.5.4.1.1 取 1.5 mL 的灭菌离心管,对每管进行编号。
- 5.5.4.1.2 取 100 μL 抗凝血加入 300 μL 细胞裂解液,振荡混匀,静置 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 3 min。
- 5.5.4.1.3 加入 50 μL 蛋白酶 K(2 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。
- 5.5.4.1.4 加入 200 μL 蛋白质沉淀液,轻轻颠倒 10 次,静置 2 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 2 min。
- 5.5.4.1.5 取与上述数量相同的 1.5 mL 灭菌离心管,将上清液转入相应的管中,至少吸取 750 μL ,注意不要吸取中间层,然后加入 500 μL 预冷的异丙烷,颠倒混匀。
- 5.5.4.1.6 12 000 r/min 离心 5 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,沾干液体,注意避免交叉污染。
- 5.5.4.1.7 加入 500 μL 75%乙醇,颠倒洗涤,12 000 r/min 离心 1 min,轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上,沾干液体,室温干燥 3 min。
- 5.5.4.1.8 加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀。

以上核酸提取步骤可采用认可和确认的试剂盒。

5.5.4.2 扩增体系

5.5.4.2.1 引物

外引物序列为 P1:5'-GAGGAGGAGAAACCCAAG-3',P2:5'-GCCATCGCCCTTGTAGAG-3';
内引物序列为 P3:5'-TCAAGGACAACAAGCCATAC-3',P4:5'-TTGCCTGGAGCCTTGAAG-3'。

引物浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

5.5.4.2.2 套式 PCR 第一轮反应

PCR 反应液	12.5 μL
外引物对反应混合液	7.5 μL
DNA 模板	5.0 μL

反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,25 个循环;最后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;保持 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.5.4.2.3 套式 PCR 第二轮反应

PCR 反应液	12.5 μL
内引物对混合反应液	11.5 μL

第一轮 PCR 反应物 1.0 μL

反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,25 个循环;最后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;保持 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.5.4.2.4 结果判定

预先灌制 1.5%琼脂糖凝胶,然后取 5 μL 二级反应产物进行电泳,电泳时电压为 70 V,60 min。凝胶成像系统采集数据。

每次检测应设立马巴贝斯虫阳性对照、阴性对照,对照成立方可判定结果。当被检样品在 229 bp 处出现条带判为阳性,参考序列参见附录 D,无任何条带出现判为阴性。

6 检疫结果综合判定

涂片镜检发现典型虫体,可确诊。

补体结合试验、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验之一结果阳性可确诊。

套式聚合酶链式反应阳性则为疑似病例,需要结合其他方法判定结果。

附 录 A

(资料性附录)

马巴贝斯虫病的概况及染色液配置

A.1 临床症状

马巴贝斯虫病由梨形虫众多种类中的马巴贝斯虫(*Babesia equi*,)引起。梨形虫是指顶复门(Api-complexa Levine)梨形虫纲(Piroplasma)梨形虫目(Piroplasmida Wenyon)巴贝斯科(Babesiidae)巴贝斯属(*Babesia*)及泰勒科(Theileriidae)泰勒属(*Theileria*)中的原虫。梨形虫呈梨形、圆形、杆状或阿米巴样。主要寄生于红细胞,有时也寄生于其他细胞,在脊椎动物宿主体内进行裂殖生殖,在无脊椎动物宿主内进行孢子生殖。传播媒介为硬蜱。发育须以哺乳动物为中间宿主,蜱为终末宿主。具有典型的孢子虫三阶段生活史,裂殖生殖在哺乳动物体内进行。其中马巴贝斯虫可引起马巴贝斯虫病。巴贝斯虫的种类也较多,分别感染牛、马、羊、犬等,可造成重大经济损失。牛的巴贝斯虫包括牛巴贝斯虫(*B. bovis*),双芽巴贝斯虫(*B. bigemina*)、分歧巴贝斯虫(*B. divergens*)和卵形巴贝斯虫(*B. ovata*)。寄生于羊的巴贝斯虫为莫氏巴贝斯虫(*B. motasi*)。寄生于犬的虫种为犬巴贝斯虫(*B. canis*)和吉氏巴贝斯虫(*B. gibsoni*),吉氏巴贝斯虫为主要致病虫种。马巴贝斯虫病曾被称为马纳塔焦虫病(Nuttalliosis)或纳氏焦虫病。马巴贝斯虫常与弩巴贝斯虫混合感染。是一种经蜱传播的急性发作的季节性血液原虫病。其特征是马属动物的发热、贫血、黄疸、呼吸困难和血红蛋白尿等。主要寄生于马、驴、骡、斑马的红细胞和淋巴细胞内。

A.2 虫体形态

马巴贝斯虫为小型虫体,长度不超过红细胞半径。呈圆形、椭圆形、单梨籽形、十字架形等多种形态。以圆形和椭圆形虫体占多数。典型的形状为4个梨籽形虫体以尖端相连成十字架形。镜检虫体依其形态特征如图A.1。

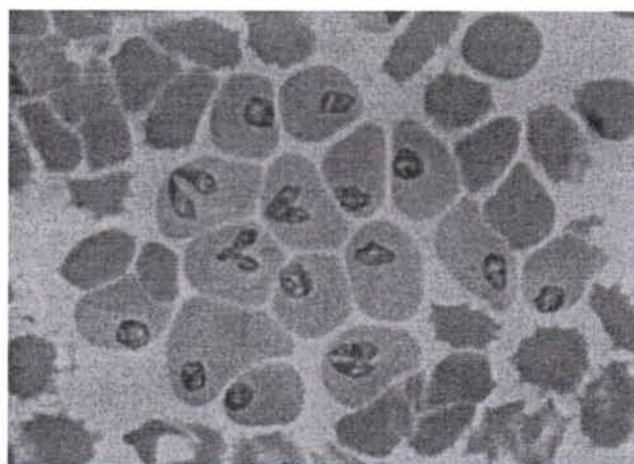


图 A.1 巴贝斯虫参考图片(10×100 倍)

A.3 1 mg/mL EDTA 溶液的配制

准确称取 1.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠 ($\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 加入 800 mL 生理盐水中, 置 $55\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中溶解, 冷却后用生理盐水定容至 1 L, $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。

A.4 吉姆萨染色液配制

吉姆萨粉末 1 g 先溶于少量甘油, 在研钵内研磨 30 min 以上, 至看不见颗粒为止, 再将全部 (66 mL) 剩余甘油倒入, 于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱内保温 2 h。然后再加入甲醇 (66 mL), 搅匀后保存于棕色瓶中。母液配制后放入冰箱可长期保存, 一般刚配制的母液染色效果欠佳, 保存时间越长越好。

临用时用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液稀释 10 倍。

附录 B

(资料性附录)

间接免疫荧光抗体试验溶液配制

B.1 Puck's Saline G 溶液(pH 7.2)的配制

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.016 g
KCl	0.4 g
KH_2PO_4	0.15 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.154 g
NaCl	8.0 g
Na_2HPO_4	0.231 g
d-葡萄糖	1.10 g

向容器中加入约 800 mL 的 GB/T 6682 二级蒸馏水,搅拌至溶液全部溶解后,用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.2,加入蒸馏水至 1 000 mL,置 115 °C 高压灭菌 15 min。冷却后 4 °C 冰箱中保存备用。

B.2 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶液的配制

KCl	2.0 g
KH_2PO_4	2.4 g
NaCl	80 g
Na_2HPO_4	14.4 g

向容器中加入 10 L 的蒸馏水,搅拌至溶液全部溶解后,用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.2,然后置 115 °C 高压灭菌 15 min。冷却后 4 °C 冰箱中保存备用。

B.3 阿氏液的配制

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	2.05 g
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0.80 g
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0.05 g
NaCl	0.42 g

向容器中加蒸馏水至 100 mL,溶解后调 pH 至 6.1 后分装,115 °C 高压灭菌 15 min,冷却后 4 °C 冰箱中保存备用。

附 录 C
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验溶液配制

C.1 包被缓冲液(pH 9.6, 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液)

Na_2CO_3	3.18 g
NaHCO_3	5.86 g
加蒸馏水至	1 000 mL

C.2 封闭液

牛血清白蛋白(BSA)1 g 溶于 100 mL PBS 中。

附 录 D
(资料性附录)

套式聚合酶链式扩增参考序列

	tcaag	gacaacaagc	catacgtcgt	catcgccgtt
301	gagtccgccc	ttcacctcgt	tctcaagaag	gacggtgata
351	gctcgaggtc	gccgagttct	accaggaggt	cttgttcaag
401	ccgtctccgt	tgacttggcc	gctgcagtct	ccgacaagtt
451	acctttggct	ccggcaagaa	gcacaccttc	aaggtccag
			gcaa	
