ICS 67.120.30

B50

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/ XXXXX—XXXX

辽宁省蜱种鉴定技术规范

Technical specification for tick species identification in Liaoning Province

（报批稿）

本稿完成日期：2022 年 11 月

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX

辽宁省市场监督管理局　发布

前　　言

本标准按照GB/T 1.1—2020给出的规则编写。

本标准由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

（辽宁省农业农村厅提出，辽宁省农业农村厅归口）

本标准起草单位：沈阳农业大学、辽宁省动物疫病预防控制中心、沈阳市疾病预防控制中心、锦州医科大学、东沃同泰（凤城）生物工程有限公司。

本标准起草人：韩小虎，陈泽良，辛晴，姜峰，车金，孙莉，于东海，崔杨书翰，刘畅，金鑫，徐昭艳，陈瑶，吴旭，王大伟等。

本标准发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862

标准起草单位通讯地址：沈阳农业大学（沈阳市沈河区东陵路120号），联系电话：024-88487156

辽宁省蜱种鉴定技术规范

1 范围

本文件规定了辽宁省常见的 5 种蜱，即长角血蜱、嗜群血蜱、日本血蜱、森林革蜱、全沟硬蜱的采集、保存、形态学鉴定以及 DNA 条形码鉴定技术。本文件适用于辽宁省蜱的种类鉴定，可辅助应用于相关蜱传病的监测与防控。其中形态学鉴定最适用于形态完整且未饱血的成蜱；DNA 条形码技术适用于任何形态及不同发育阶段的蜱，包括残损蜱、饱血蜱、幼蜱、若蜱、成蜱、蜱卵。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 36788-2018，病媒生物密度监测方法—蜱类，2019

SN/T5337—2021 动物疫病传播媒介蜱种类鉴定技术规范，2022

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

COI: 细胞色素 c 氧化酶亚基 I（Cytochrome c oxidase subunit I）

DNA: 脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸（Deoxy-ribonucleoside triphosphate）

PCR: 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

SDS: 十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate）

5 样品采集

5.1 试剂与材料

5.1.1 镊子。

5.1.2 白绒布（长 100-1000 cm，宽 50-100 cm）。

5.1.3 75%和 95%乙醇。

5.1.4 橡胶手套。

5.1.5 15 mL 和 50 mL 离心管。

5.2 设备与仪器

无需仪器或设备。

5.3 采集方法

5.3.1 防护要求

5.3.1.1 应穿浅色、表面光滑的长袖实验服，扎紧裤腿或把裤腿塞进鞋袜里，穿靴子，戴橡胶手套。

5.3.1.2 裸露皮肤应涂抹趋避剂如避蚊胺等。

5.3.1.3 帐篷等露营装备应用杀虫剂浸泡。

5.3.1.4 避免在蜱栖息地如草地、树林等环境中长时间坐卧。

5.3.1.5 野外活动结束后应检查衣物上是否有蜱。一旦发现蜱叮咬，用镊子从叮咬处夹住蜱，顺着叮咬方向小心取出，然后用碘伏或酒精反复擦洗；如果不慎将蜱的假头基留在了皮肤内，可用洁净的针头挑破伤口皮肤，挑出假头基，再用碘伏或酒精反复擦洗。建议保留蜱，置于离心管（或其他密闭容器）内 4℃暂放（供医生或专业人士进行鉴定），建议尽快就医（尤其是在有蜱传病流行的地区）。

5.3.2 畜禽体上蜱的采集

在牛、羊、犬、禽等动物身上采集蜱时，用干净、尖细的镊子尽可能靠近皮肤表面缓慢夹取蜱。尽量小心避免蜱的假头基部分残留在皮肤内。将采集到的蜱放置到 15 ml 或 50 ml 离心管中。去除蜱后，用 75%乙醇溶液对被蜱叮咬处进行消毒。

5.3.3 环境游离蜱的采集

在经常放牧的草地、野生动物巢穴及家养畜舍地面采集蜱，方法如下：

布旗采集法：白绒布一边穿入木棍，在木棍两端系以长绳，在草地上或灌木从中缓慢拖动，草地以及灌木上的蜱即可附着在旗面上。检查并用镊子收集于离心管中。

直接采集法：在稍矮的草地，可将身体稍下蹲贴近地面，轻轻扶起草叶，观察草叶背面是否有蜱；在稍高的草地，可直接观察草尖处。发现蜱后用镊子收集于离心管中；也可将叶子截断连同蜱共同置入离心管内，尽快赴实验室内进行处置（草叶需尽快去除，以免霉烂）。

5.3.4. 衣物及布旗的处理

用洗衣液以及常用消毒剂浸泡、洗涤并不能有效杀灭衣物、布旗中残留的蜱及蜱卵。对于不需要重复使用的物品，可采用焚烧、煮沸或高温蒸汽的方法。对于需要重复使用的个人衣物、布旗，除煮沸及高温蒸汽法以外，也可用洗衣机的烘干功能进行长时间高温烘烤。

5.4 蜱样本的运输及保存

5.4.1 运输

蜱样本在车辆运输过程中应置于车载冰箱 4-8℃，避免将蜱长期置于密闭车厢内，气温过高将导致蜱死亡变形。完整的蜱在 4℃、干燥、避光环境下，可暂存 2 周以上。

5.4.2 保存

用于蜱种鉴定的蜱样本，可置于离心管内并加入过量的 95%的乙醇溶液或无水乙醇浸泡，定期补充乙醇。容器上应附有采集标签，注明采集地点、日期、宿主、生境、海拔、经纬度、采集人等信息，避光阴凉处暂放，避免高温与阳光直射。

长期保存则需置于液氮中，或液氮冷冻 1 小时以上之后转入-80℃冰柜保存。

饱血蜱在室温、干燥环境下可产卵，并且在一定时间内孵化出幼蜱。

6 形态学鉴定

6.1 试剂与材料

6.1.1 镊子或小刷子。
6.1.2 无水乙醇。
6.1.3 橡胶手套。
6.1.4 吸水纸。

6.2 设备与仪器

体视显微镜（Leica 徕卡 Leica EZ4 W）。

6.3 形态学观察

6.3.1 用镊子夹取或用小刷子扫取乙醇溶液中浸泡的蜱，放于吸水纸上吸去表边的乙醇溶液后，放置在体视显微镜下观察。

6.3.2 观察蜱的背面观、腹面观、假头基、须肢、肛沟等，再观察气门板、生殖孔、哈氏器等形态学特征部位。蜱具体形态特征部位参见附录 B。

6.4 蜱的形态学种类判定

蜱可根据典型形态特征鉴定到属和种，具体形态特征按照附录 C 鉴定，其他不易观察到典型形态特征或残缺的蜱则需采用分子生物学方法进行种类的鉴定。

7 DNA 条形码鉴定

7.1 试剂与材料

除特别说明以外，本文件所用试剂均为分析纯，试验用水应符合规范性引用文件的规定。
7.1.1 无水乙醇。
7.1.2 灭菌双蒸水（应符合 GB/T6682 中一级水的规格，按照附录 A.2 配制）。
7.1.3 1.5 mL 离心管。
7.1.4 研磨管。
7.1.5 商品化的组织基因组 DNA 提取试剂盒 （南京诺唯赞生物科技股份有限公司 货号：DC102）。
7.1.6 50×TAE（生工生物工程（上海）股份有限公司）。
7.1.7 GOOD VIEW Ⅰ核酸荧光染色剂（北京赛百盛基因技术有限公司）。
7.1.8 16srDNA 或 COI 引物任选其一均可。
7.1.9 1.5 %琼脂糖凝胶（按照附录 A.3 配制）。

扩增片段	引物序列（5’-3’）	片段大小（bp）
16S rDNA	F-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG R-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	460
COI	F-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG R-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	710

用双蒸水将引物稀释为 20 μmol/L 工作浓度，-20℃保存备用。引物合成后采用灭菌双蒸水稀释为 10 μmol/L。

7.2 设备与仪器

7.2.1 常规 PCR 仪（赛默飞世尔科技（中国）有限公司 ProFlex ™3 x 32 孔 PCR 货号：4484073）。
7.2.2 组织研磨器（杭州遂真生物技术有限公司）。
7.2.3 超净工作台（赛默飞世尔（上海）仪器有限公司）。
7.2.4 制冰机（苏州连海制冷科技有限公司）。
7.2.5 水浴锅（国华电器有限公司 HH-2 型数显恒温水浴锅）。
7.2.6 台式小型离心机（大龙兴创实验仪器（北京）股份公司 D1524R 高速冷冻型微量台式离心机）。
7.2.7 常规冰箱（青岛海尔股份有限公司）。
7.2.8 旋涡振荡器（大龙兴创实验仪器（北京）股份公司 MX-S 漩涡混匀器）。
7.2.9 电泳仪（上海天能生命科学有限公司 Tanon ESP-60）。
7.2.10 凝胶成像系统（美国 aplegen 公司 Omega Lum G 凝胶成像系统）。
7.2.11 微量可调移液器（10 μL、100 μL、1000 μL）及配套吸头（赛默飞世尔科技（中国）有限公司）。

7.3 检测方法

参照 7.1.5 中所述试剂盒说明书，按要求提取蜱基因组，步骤如下：

7.3.1 样本的处理及核酸提取

使用完整或不完整的成年蜱、幼蜱、若蜱、蜱卵样品。将蜱样品放置于 1.5 mL 除酶离心管中，先用 300 μL 无水乙醇冲洗 2 次，再用 300 μL 灭菌双蒸水冲洗 2 次，放入一个新的研磨管中，管内加入 6-8 颗研磨珠，再加入 200 μL 灭菌双蒸水，将研磨管放入组织研磨器中，12000 r 研磨 5 min，用移液器吸取 200 μL 研磨液的上清液，采用 DNA 提取试剂盒提取蜱组织 DNA。

7.3.2 PCR 反应体系

反应组分	体积（μL）
Master Mix (Dye Plus)	5
上游引物（10 μM）	0.3
下游引物（10 μM）	0.3
双蒸水	3.4
蜱组织 DNA	1
总体积	10

7.3.3 PCR 扩增程序

95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 30 s；54℃退火 30 s；72℃ 延伸 50 s，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 8 min。

PCR 阳性对照：取-80℃保存蜱基因组 DNA（附录 A.1）。

PCR 空白对照：加水替代基因组 DNA。

7.3.4 琼脂糖凝胶电泳

取 5-10 μL 样品 PCR 扩增产物，进行 1.5 %的琼脂糖凝胶电泳（附录 A.3）。电泳结束后，用凝胶成像仪或者紫外透射仪观察结果。

7.3.5 结果判定

7.3.5.1 核酸电泳判定

16SDNA 阳性对照，有 460 bp 的扩增条带，同时阴性对照没有相应条带，判定试验成立；否则试验无效，需分析并排除引起试验无效的因素，并重新试验。

CO Ⅰ基因阳性对照，有 710 bp 的扩增条带，同时阴性对照没有相应条带，判定试验成立；否则试验无效，需分析并排除引起试验无效的因素，并重新试验。

在阳性、阴性对照都成立的前提下，若检测样品有 460/670 bp 的条带，则试验阳性；若检测样品无 460/670 bp 条带，则试验阴性。

7.3.5.2 核酸测序

取 16SDNA 基因或 CO Ⅰ基因的扩增产物，使用 Sanger 测序法进行测序。

7.3.5.3 序列比对分析

将 PCR 扩增后测序的 COI 序列或 16S 序列，输入 NCBI 网站 Nucleotide BLAST:Search nucleotide databases using a nucleotide query (nih.gov)的“Enter Query Sequence”对话框中，各参数选择默认，点击“BLAST”按钮开始进行比对。在弹出的比对结果页面中，以分值最高（Max Score，一般为第一行）且序列相似度≥97%的蜱种为鉴定结果。

8 结果综合判定

8.1 根据典型形态特征能够鉴定到种的样品，直接判定蜱种。

8.2 对于本身缺乏典型形态特征或部分典型特征的样品，应结合分子生物学 DNA 条形码方法结果进行蜱种鉴定。

附 录 A

（规范性）

试剂的配制

A.1 阳性对照

取蜱（成虫、若虫、幼虫、卵）等，应用商品化 DNA 提取试剂盒，提取基因组 DNA，使用 50 μL 灭菌双蒸水溶解或洗脱基因组 DNA，-80℃保存。

A.2 灭菌双蒸水

双蒸水是重蒸水的一种，是将经过一次蒸馏后的水，再次蒸馏得到的水。双蒸水再经过高压蒸汽灭菌（压力升至 103.4kPa，温度达 121℃，持续 20 min），得到灭菌双蒸水。

A.3 1×TAE 缓冲液及 1.5%琼脂糖凝胶

50×TAE 缓冲液	10 mL
蒸馏水	490 mL

1×TAE 缓冲液	100 mL
琼脂糖	1.5 g
核酸染料	5 μL

将三角瓶放在沸水浴中加热至琼脂糖充分溶解，置室温冷却到 50 ℃左右，加入核酸染液 5 μL，摇匀，倒入电泳板上，凝固后，4 ℃备用。

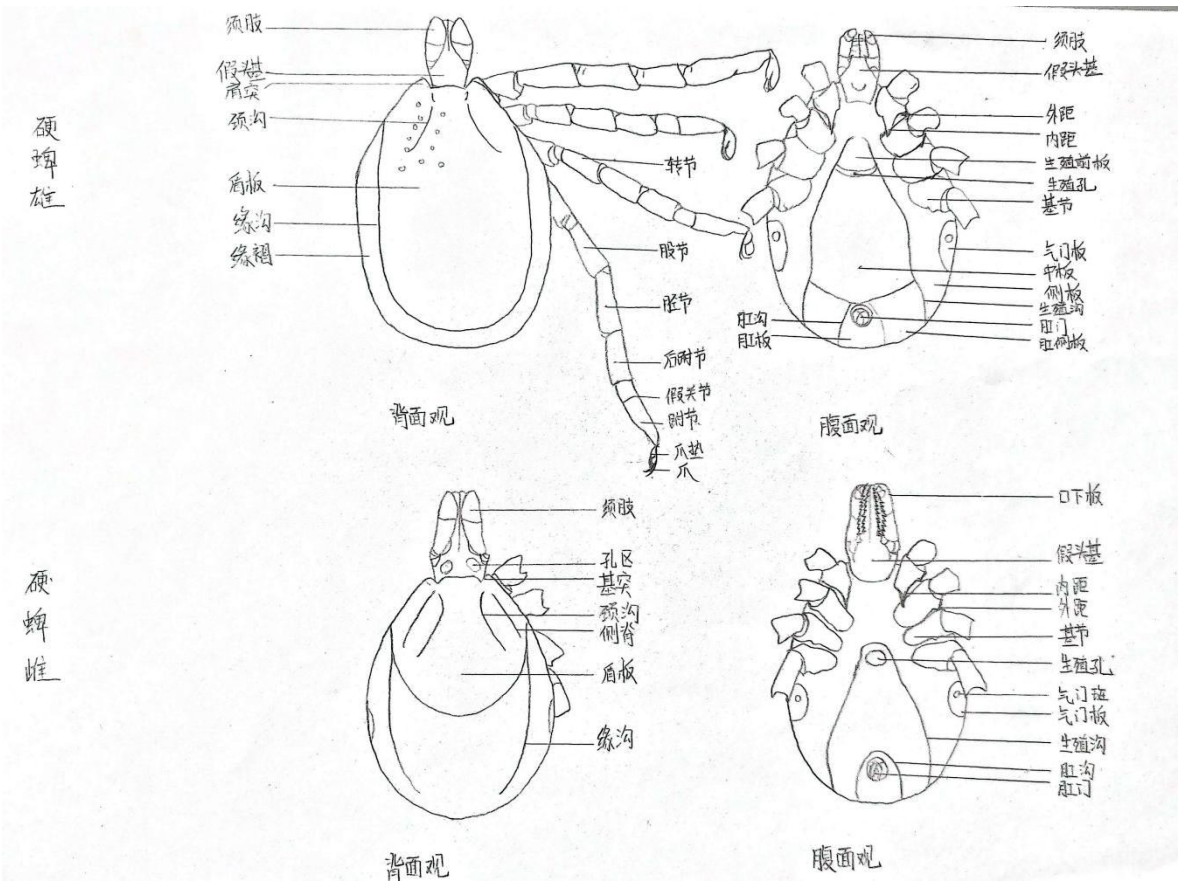
附 录 B

（资料性）

辽宁省主要蜱种的基本信息、典型形态图及基本生物学特征

B.1 辽宁省主要蜱种的形态模式图

蜱隶属于节肢动物门（Arthropoda），蛛形纲（Arachnida），蜱螨亚纲（Acarina）、寄螨目（Parasitiformes）、蜱总科（Ixodoidea），包括硬蜱、软蜱及纳蜱三类，辽宁省常见蜱种为硬蜱（暂未发现软蜱和纳蜱）。（形态结构见图 B1）



B.2 辽宁省主要蜱种的基本形态结构

蜱背腹扁平，圆形或者椭圆形，身体分为假头和躯体两部分，假头突出于躯体前或者位于躯体腹面前端，为口器部分。躯体腹部有 4 对足。蜱的躯体背腹面是否有几丁质的盾板及盾板形状等是鉴别蜱种的重要特征。蜱的发育为不全变态，包括卵、幼蜱、若蜱和成蜱四个阶段，幼蜱只有 3 对足。

B.3 辽宁省主要蜱种的寄生部位

蜱通常寄生在动物耳后、脚趾间、腋窝处以及颈项部等皮肤较薄、不易被搔动的部位，寄生数量多时蜱在动物全身可见。

B.4 辽宁省主要蜱种的宿主动物

蜱是重要的吸血性外寄生虫，在蜕皮等发育时需要附着于宿主体表吸血。主要寄生在哺乳动物体表，少数寄生在鸟类、爬行类及两栖类体表。蜱在叮咬宿主、吸食血液的同时释放毒素，可导致瘫痪、毒性反应以及宿主的过敏反应等。

B.5 辽宁省主要蜱种可导致的人兽共患病与动物疫病

蜱作为媒介可传播、携带多种人畜共患病以及动物疫病。辽宁省蜱传播的疾病主要有：Q 热、立克次体病、莱姆病、兔热病、牛环形泰勒焦虫病、森林脑炎、克里米亚-刚果出血热、粒细胞无形体病等。

附 录 C

（规范性）

蜱科属的形态学鉴定步骤

C.1 蜱科的确定（科检索表）

鉴定步骤	鉴定特征	鉴定结果
1	身体背面具几丁质盾板或假盾区； 假头向前，从背面可见； 气门板显著，位于身体腹面，足基节Ⅳ的后外侧； 须肢各节几乎等长，或第Ⅳ节收缩，内陷于第Ⅲ节腔内。	进行步骤 2
	表皮革质，身体背面无盾板（原伪盾蜱属的种类具革质假盾区，但硬化程度不高）； 假头位于腹面前方，若蜱和成蜱从背面不可见； 气门板不明显，位于足基节Ⅲ和Ⅳ之间的基节上褶上； 须肢各节几乎等长，第Ⅳ节不收缩，不内陷，不近端点。	**软蜱科** **（Argasidae）**
2	雌蜱身体背面具皱褶； 前端具乳突状革质假盾区，覆盖物褶叠程度深； 须肢 3 节，末节内陷不明显。	**纳蜱科** **（Nuttalliellidae）**
	身体背面具明显坚硬的盾板，雌蜱和未成熟蜱覆盖背面前半部，雄蜱则覆盖整个背部； 除几丁质板附近，表皮上具有细小的褶或条纹； 须肢第郁节收缩，内陷在第Ⅲ节腔内。	**硬蜱科** **（Ixodidae）**

C.2 硬蜱科各属的确定（属检索表）

<table>
<tr><th>鉴定步骤</th><th colspan="2">鉴定特征</th><th>鉴定结果</th></tr>
<tr><td rowspan="3">1</td><td colspan="2">肛沟围绕在肛门之前；
无眼；
雄蜱腹面几乎全部被几丁质板覆盖（共 7 块）；
幼蜱口下板后毛 2 对，背部无矢状感器；
通常为巢居性寄生，宿主不具专一性；
雄蜱不吸血，分布广泛。</td><td>硬蜱属
（Ixodes）</td></tr>
<tr><td rowspan="2">肛沟围绕在肛门之后，通常很小；
眼有或无；
雄蜱腹面无几丁质板，或发育不完全，仅分布在身体后端（肛侧板和副肛侧板）；
幼蜱仅 1 对口下板后毛，身体背部具矢状感器；
通常不穴居或巢居；
雄蜱吸血，分布相对有地域性。</td><td>无眼
（尤其成蜱和若蜱）</td><td>进行步骤 2</td></tr>
<tr><td>有眼</td><td>进行步骤 3</td></tr>
<tr><td>2</td><td colspan="2">假头基方形至矩形；
须肢短，呈圆锥形，第 II 节长宽约等，其外侧超出假头基边缘；
幼蜱须肢 3 节，其背面矢状感器前端具 2 对缘毛；
宿主不具专一性。</td><td>血蜱属
（Haemaphysalis）</td></tr>
<tr><td>3</td><td colspan="2">气门板正常，无脊或色斑；
缘垛有或无，但不是 9 个，须肢长度近似等于假头基，且第 II 节长与宽大致相等，有缘垛，雄蜱的第 IV 对足正常，假头基矩形，通常有色斑。</td><td>革蜱属
（Dermacentor）</td></tr>
</table>

注：目前辽宁省内，主要硬蜱科成员为全沟硬蜱，革蜱属成员为森林革蜱，血蜱属成员为长角血蜱、嗜群血蜱、日本血蜱。

附 录 D
（规范性）
辽宁省主要蜱种形态鉴别特征

D.1 辽宁省主要蜱种形态鉴别特征

参 考 文 献

[1] GB/T 36788-2018，病媒生物密度监测方法—蜱类，2019
[2] SN/T5337-2021，动物疫病传播媒介蜱种类鉴定技术规范，2021
[3] 李朝品，蜱螨与人类疾病. 中国科学技术大学出版社，1995

蜱属	蜱种	性别	腹面特征	背面特征
血蜱属	长角血蜱	雌性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 只有一距。	盾板仅占前部，无眼， 假头基矩形， 须肢第二节后外角轻度或中度突出， 须肢第三节背面后缘有一发达三角形尖刺。
		雄性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 只有一距。	盾板覆盖整个背面，无眼， 假头基矩形， 须肢第二节后外角轻度或中度突出， 须肢第三节背面后缘有一发达三角形尖刺。
	嗜群血蜱	雌性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 只有一距，足基节 II—IV 内距较基节 I 内距显著短。	盾板仅占前部，无眼， 假头基矩形， 须肢第二节后外角轻度或中度突出， 须肢第二节与第三节外缘几乎等长。
		雄性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 只有一距。	盾板覆盖整个背面，无眼， 假头基矩形，须肢第二节后外角轻度或中度突出， 须肢第三节顶端向内测弯曲，须肢合拢时交叠呈钳状。
	日本血蜱	雌性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 只有一距，足基节 II—IV 内距较基节 I 内距稍短或等长。	盾板仅占前部，无眼， 假头基矩形， 须肢第二节后外角轻度或中度突出， 须肢第二节外缘明显短于第三节外缘。
		雄性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 只有一距，口下板齿式 5/5。	盾板覆盖整个背面，无眼， 假头基矩形， 须肢第二节后外角轻度或中度突出， 须肢第三节顶端不向内侧弯曲。
革蜱属	森林革蜱	雌性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 有 2 个发达的距，内距较尖窄，基节 IV 外距的末端超出该节后缘，生殖孔有翼状突。	盾板仅占前部，有眼， 盾板有珐琅斑； 须肢粗短， 足转节 I 背面后缘的距略长，末端尖细。
		雄性	肛沟围绕肛门之后，足基节 I 有 2 个发达的距，内距较为尖窄，基节 IV 外距不超出该节后侧缘，气门板背突末端达到盾板边缘。	盾板覆盖整个背面，有眼， 盾板珐琅斑较多且较浓； 须肢粗短， 足转节 I 背面后缘的距略长，末端尖细。
硬蜱属	全沟硬蜱	雌性	肛沟围绕肛门之前，足基节 I 内距明显或后内角窄小如距突；基节 IV 有短的外距或内距，耳状突粗短或呈脊状。	盾板仅占前部， 足长度适中； 假头基后侧角不尖出， 盾板卵圆形。
		雄性	肛沟围绕肛门之前，足基节 I 有或长或短的内距；基节 II—IV 或仅基节 IV 有粗短的外距，气门板大，卵圆形。	盾板覆盖整个背面。

[4] 李朝品，医学蜱螨学. 人民军医出版社，2006

[5] 刘敬泽，蜱类学. 中国林业出版社，2003

[6] 陈泽，蜱的系统分类学. 科学出版社，2021

[7] 叶向光，常见医学蜱螨图片，科学出版社，2020

[8] Park SW, et al. Prevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Haemaphysalis longicornis ticks in South Korea. Ticks and tick-borne diseases. 2014;5:975–977. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.020.

[9] Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 1994;3:294–299.

[10] Xing Zhang ， etal. Rapid Spread of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus by Parthenogenetic Asian Longhorned Ticks. Emerg Infect Dis. 2022 Feb; 28(2): 363–372