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，刘宇明等。

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

辽宁省常见蜱种鉴定技术规范

1 范围

本文件规定了辽宁省常见的 5 种蜱，即长角血蜱（*Haemaphysalis longicornis*）、嗜群血蜱（*(Haemaphysalis concinna*）、日本血蜱（*Haemaphysalis japonica*）、森林革蜱（*Dermacentor silvarum*）、全沟硬蜱（*Ixodes persulcatus*）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/T 5337—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

环境游离蜱：在经常放牧的草地、野生动物巢穴及家养畜舍地面采集到的蜱。

灭菌双蒸水：经过一次蒸馏后的水，再次蒸馏，并在103.4 kPa，121℃的条件下高压蒸汽灭菌20 min，得到灭菌双蒸水。

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

5.1.3 75%和 95%乙醇。

5.1.4 乳胶手套。

5.1.5 15 mL 和 50 mL 离心管。

5.2 采集方法

5.2.1 采集人员防护要求

5.2.1.1 穿浅色、表面光滑的长袖防护服，扎紧袖口和裤腿，穿雨靴，戴乳胶手套。

5.2.1.2 裸露皮肤涂抹趋避剂如避蚊胺等。

5.2.1.3 用杀虫剂浸泡帐篷等露营装备。

5.2.1.4 避免在蜱栖息地如草地、树林等环境中长时间坐卧。

5.2.1.5 野外活动结束后检查衣物上是否有蜱。采集人员需及时进行冲淋洗浴，并检查体表，重点排查头发、腋窝、腹股沟及阴部等位置是否有蜱叮咬或爬动。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，用碘伏或酒精反复擦洗伤口；如蜱的假头基留在皮肤内，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。保留蜱，置于离心管或其他密闭容器内 4℃暂放，特别是在蜱传病流行的地区，需尽快就医。

5.2.2 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、尖细的镊子靠近皮肤表面缓慢夹取蜱，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。

5.2.3 环境游离蜱的采集

5.2.3.1 布旗采集法：白绒布一边穿入木棍，在木棍两端系以长绳，选择在人和动物经常活动的小路周边草地上或灌木丛中缓慢拖动，草地以及灌木上的蜱即可附着在旗面上。每行走约 5 米左右，即停下检查旗背面是否有蜱附着，并用镊子收集于离心管中

5.2.3.2 直接采集法：在稍矮的草地，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，直接观察草尖处。发现蜱后用镊子收集于离心管中或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。

5.2.4 衣物及布旗的处理

无需重复使用的物品，采用焚烧、煮沸或高温蒸汽的方法处理；需要重复使用的物品，如个人衣物、布旗等，采用煮沸法、高温蒸汽法或洗衣机的高温烘干功能进行处理。

5.3 蜱样本的运输及保存

5.3.1 运输

在车辆运输过程中需置于 4-8℃车载冰箱。

5.3.2 保存

用于蜱种鉴定的蜱样本置于离心管内，并加入足量的 95%的乙醇溶液或无水乙醇浸泡，定期补充乙醇。容器上需附有采集标签，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。

暂时保存需将完整的蜱置于 4℃、适当湿度、避光环境下，可暂存 2 周以上。

长期保存则需液氮冷冻 1 小时以上之后转入-80℃超低温冰箱保存。

6 形态学鉴定

6.1 试剂与材料

参照 SN/T 5337—2021 动物疫病传播媒介蜱种类鉴定技术规范，2022

6.2 设备与仪器

体视显微镜。

6.3 形态学观察

参照 SN/T 5337—2021 动物疫病传播媒介蜱种类鉴定技术规范，2022
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 进行鉴定，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，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 蛋白酶 K
7.1.6 三羟甲基基甲烷（Tris）
7.1.7 Taq DNA聚合酶及dNTP
7.1.8 琼脂糖及溴化乙锭（EB）
7.1.9 乙二胺四乙酸钠（Na_2EDTA）
7.1.10 苯酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇等
7.1.11 电泳缓冲液TBE，按照附录A.3配制。
7.1.12 50×TAE
7.1.13 Gold VIEW Ⅰ 核酸荧光染色剂。
7.1.14 16S rDNA 或 COI 引物任选其一。
7.1.15 1.5 %琼脂糖凝胶，按照附录 A.4 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。
7.2.2 组织研磨器。
7.2.3 超净工作台。
7.2.4 制冰机。
7.2.5 恒温水浴锅。
7.2.6 高速冷冻离心机。
7.2.7 常规冰箱。
7.2.8 旋涡振荡器。
7.2.9 电泳仪。
7.2.10 凝胶成像系统。
7.2.1110 μL、100 μL、1000 μL 的微量可调移液器及配套吸头。
7.2.12水平电泳槽。
7.2.13紫外分光光度计。
7.2.14高压灭菌锅。

7.3 检测方法

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，按照附录 E 提取组织 DNA 的方法,也可采用商品化的组织基因组 DNA 提取试剂盒进行。

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：蜱基因组 DNA，参照附录 A.1。

PCR 空白对照：灭菌双蒸水。

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

16S rDNA 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。

COⅠ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 16S rDNA 基因或 COⅠ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，登录数据库进行序列分析，以分值最高且序列相似度≥97%的蜱种为鉴定结果。

8 结果综合判定

8.1 典型形态特征的样品，直接判定蜱种。

8.2 缺乏典型形态特征或部分典型特征的样品，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（成蜱、若蜱、幼蜱、卵）等，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

经过一次蒸馏后的水，再次蒸馏，并在 103.4kPa，121℃条件下高压蒸汽灭菌 20 min，得到灭菌双蒸水。

A.3 电泳缓冲液 TBE

即浓贮存液5×TBE

Tris碱	54.0 g
硼酸	57.1 g
0.5M EDTA	20 mL

在pH＝8.0条件下，加蒸馏水定容至1L，工作液为稀释的0.5×TBE

A.4 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，加入核酸染料 5 μL，摇匀，倒入电泳板上，凝固后，4 ℃备用。

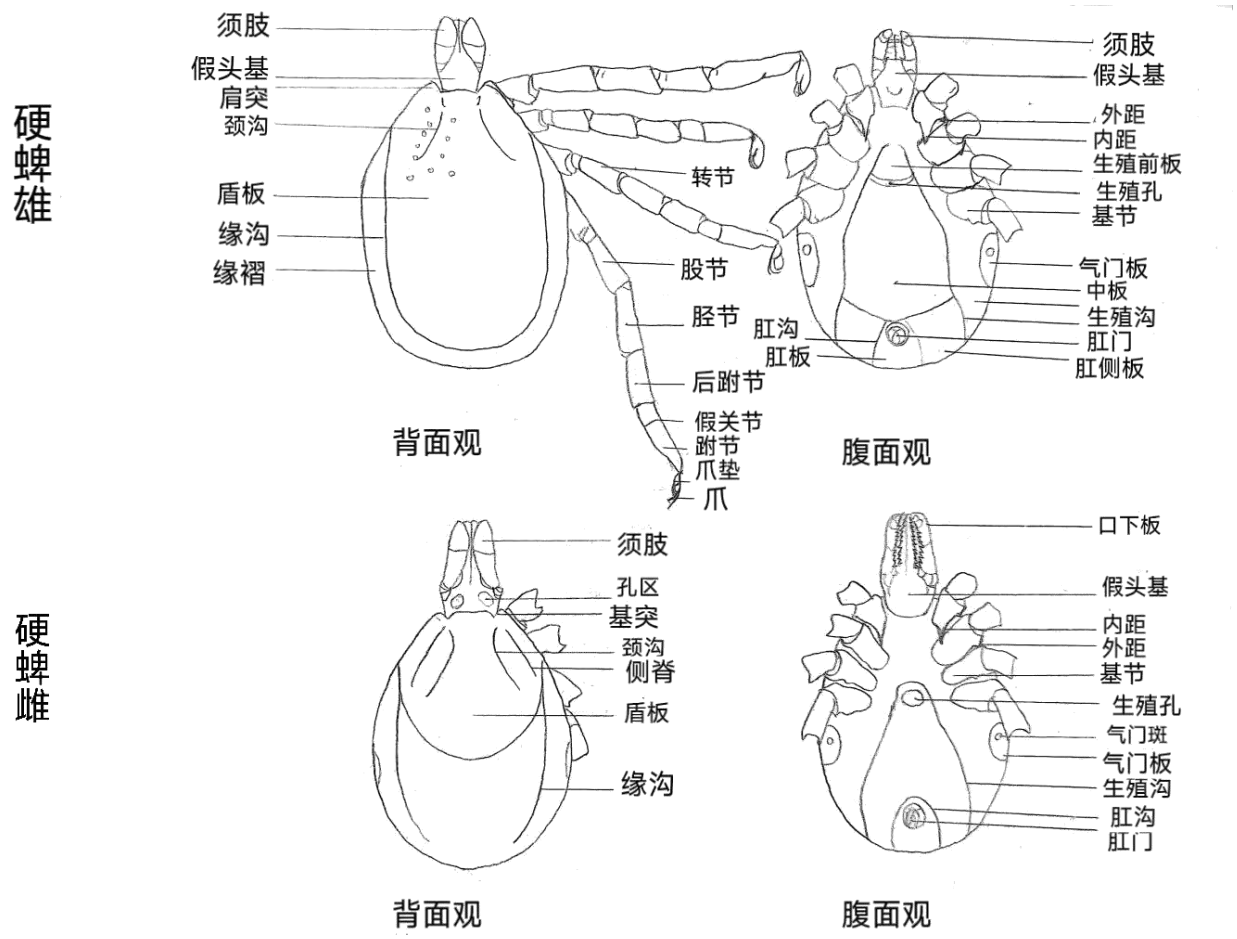
附 录 B

（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*），包括硬蜱科、软蜱科及纳蜱科，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部、脚趾间、腋窝处、颈项部、阴部及肛门等皮肤较薄、不易被搔动的部位，寄生数量多时蜱在动物全身可见。

B.4 蜱种的主要宿主动物

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、森林脑炎、克里米亚-刚果出血热、人粒细胞无形体病、兔热病、牛环形泰勒虫病等。

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Ⅰ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">鉴别特征</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

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。

附 录 E

（规范性）

样品 DNA 的抽提

E.1 加入60μL 10％SDS溶液，10μL 20mg/mL蛋白酶K，温和混匀，37℃温育1h。

E.2 加入100μL 5mol/L的NaCl溶液，上下颠倒离心管十多次，充分混匀。

E.3 加入80μL CTAB/NaCl溶液，温和混匀，65℃温育10min。

E.4 加入700μL氯仿/异戊醇，温和混匀，12000rpm/min 离速离心2min。

E.5 吸取上清液至另一干净离心管，加入等体积的酚或氯仿或异戊醇，上下颠倒混匀，12000rpm/min高速离心2min。

E.6 吸取上清液至另一干净离心管，加入2倍体积冰冷的无水乙醇沉淀DNA，温和混匀。

E.7 在12000rpm/min，30min，4℃条件下离心，彻底去除上清液。

E.8 用300μL70％预冷的乙醇洗涤沉淀，在12000rpm/min，15min，4℃条件下离心，弃上清液，再离心10秒，用移液器彻底除去酒精，风干。

E.9 沉淀溶于100μL TE溶液中。-20℃保存。

E.10 或者采用等效的DNA提取试剂盒，按照说明书进行操作。

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

[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