ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

乳突类圆线虫感染诊断技术

Diagnostic techniques for *Strongyloides papillosus* infection

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽医协会兽医寄生虫病防治分会提出。
本文件由中国兽医协会归口。
本文件起草单位：
本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

乳突类圆线虫感染诊断技术

1 范围

本文件规定了乳突类圆线虫感染诊断技术。

本文件适用于牛羊等反刍动物乳突类圆线虫病的临床诊断、流行病学调查、进出境检疫以及驱虫治疗效果评估。

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 6682-2008，分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

bp：碱基对（Base pair）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

dNTP：脱氧核糖核苷三磷酸（Deoxyribonucleoside triphosphate）

EB：溴化乙锭（Ethidium bromide）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylene diamine tetraacetic acid）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction）

TAE：三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸（Tris-acetate-EDTA）

5 临床诊断

5.1 临床症状

5.1.1 成虫寄生阶段，宿主常表现出不同程度的贫血、消瘦、腹泻等症状。

5.1.2 感染初期，第三期幼虫穿过皮肤移行到肺，常引起湿疹、支气管炎、肺炎和胸膜炎，可因极度衰弱而死亡。

5.1.3 轻度感染时，临床症状不明显，幼畜生长发育迟缓。

5.2 流行特点

5.2.1 地理分布，呈世界性分布，我国各地均有反刍动物感染乳突类圆线虫的报道。

中国兽医协会 CVMA

5.2.2 易感动物，牛羊等反刍动物，幼龄动物较成年动物易感。

5.2.3 感染途径，第三期幼虫主要经皮肤感染，幼畜哺乳时也可通过母畜奶头经口感染。

5.2.4 流行季节，夏季和雨季，圈舍清洁卫生不良且潮湿时流行较普遍。

5.3 结果判定

反刍动物出现5.1中临床症状且符合5.2的流行特点，可判为疑似乳突类圆线虫感染。

6 病原学诊断

6.1 虫卵检查

6.1.1 粪便样品准备 取动物新鲜粪便10 g，置于烧杯，加入50 ml饱和盐水，调匀，用40目筛过滤至另一烧杯中。将滤液分装到试管中，液面略高于试管口但不溢出，将盖玻片盖在试管口液面上，操作方法可参考附录C。静置15分钟后，取下盖玻片，放在载玻片上，显微镜下检查。

6.1.2 显微镜检查 用光学显微镜于低倍镜（10×10）下检查整个盖玻片内的视野，观察是否有虫卵。乳突类圆线虫虫卵大小为（42～60）μm×（25～36）μm，椭圆形，灰白色，卵壳薄而透明，虫卵内含幼虫，幼虫盘曲折叠，形似折叠刀。虫卵形态参见附录A图1。

6.1.3 结果判定

6.1.3.1 阳性 涂片中观察到1个及以上的虫卵，且虫卵形态结构符合附录A图1和附录B中图7的特点。

6.1.3.2 疑似阳性 观察到附录B中图8和图14形态的虫卵，判为疑似阳性。判定为疑似阳性，需进一步进行鉴别诊断。

6.1.3.3 阴性 未出现6.1.3.1和6.1.3.2所述结果。

6.2 粪便培养

6.2.1 粪便样品准备 取新鲜粪便20 g，塑成半球形，放在平皿中，加少许水（如粪便已很稀，不必加水），盖上平皿盖，在27℃温箱中培养6小时。将粪汁吸至载玻片上，加盖玻片，显微镜下检查。

6.2.2 显微镜检查 用光学显微镜在低倍镜（10×10）下观察。发现具有呈S形运动能力的幼虫，滴加卢氏碘液使幼虫死亡，使用显微镜测微尺测量（方法参见附录D）幼虫大小并观察虫体形态结构特点。乳突类圆线虫第一期幼虫，体壁透明，无鞘，长200～400μm，头部钝圆，口腔短，食道呈杆状、具有前后食道球、食道长约为体长的1/4～1/5。第一期幼虫形态特点参见附录A图2。

6.2.3 结果判定

6.2.3.1 阳性 发现幼虫并符合6.2.2描述的特点（参见附录A）。

6.2.3.2 阴性 未观察到幼虫，或观察到幼虫但幼虫形态特点不符合6.2.2的描述。

6.3 宿主小肠内成虫鉴定

6.3.1 成虫采集 取待检动物小肠，将肠内容物倒入大平皿中，肠黏膜用生理盐水充分清洗。冲洗物和肠内容物用水洗沉淀法（参见附录E）淘洗，发现虫体，用解剖针挑出，进行形态观察。

6.3.2 成虫形态观察 将虫体用生理盐水清洗干净，用解剖针挑至载玻片上，滴加生理盐水至覆盖整个虫体，加盖玻片。在显微镜下进行形态观察。寄生性乳突类圆线虫雌虫呈毛发状，长4.38 mm～5.92mm，乳白色，口腔小，食道长、柱状，阴门位于体中后1/3交界处，尾短、近似圆锥形。成虫形态特点参见附录A图3。

6.3.3结果判定

6.3.3.1 阳性 发现虫体具有6.3.2描述的特点。

6.3.3.2 阴性 未发现虫体或虫体形态特点不符合6.3.2的描述。

中国兽医协会 CVMA

7 分子生物学诊断

7.1 样品DNA提取

按照试剂盒说明书提取粪便样品或虫体样品DNA，用分光光度计测量DNA样品的吸光值A_{260}和A_{280}，按照“双链DNA浓度=50μg/ml×A_{260}×稀释倍数”计算样品DNA浓度，样品DNA稀释至20 ng/μl备用。

7.2 引物设计

以类乳突类圆线虫18S rDNA基因中特异性诊断序列设计PCR扩增引物，引物序列见附录F。

7.3 反应体系和条件

在PCR管中配好反应体系后，加入待检样品基因组DNA，并设置空白对照（用H_2O代替样品DNA）和阳性对照（乳突类圆线虫基因组DNA）。反应体系为：样品DNA 2μl，10×PCR bufer 2.5μl，$MgCl_2$（25mmol/L) 1.5μ1，dNTPs (2.5 mmol/L) 2μl，Taq酶(5 u/μl) 0.5μl，上游引物(25 pmol/μl) 1μl，下游引物(25 pmol/μl) 1μl，H_2O 14.5μl，总体积25μL。反应条件：95℃预变性5min；95℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸30s，共35个循环；72℃延伸10min。

7.4 PCR产物凝胶电泳和成像

用1×TAE缓冲液配制1.0%琼脂糖凝胶，取PCR产物5 μl与1 μl 6×加样缓冲液混合，加样于含溴化乙锭的1.0%琼脂糖凝胶胶块中，在1×TAE缓冲液中，5V/cm电泳约20 min，凝胶成像分析系统观察结果。

7.5 结果判定

7.5.1 阳性：PCR产物电泳后有一条大小为360bp的DNA片段（参考附录F）。

7.5.2 阴性：PCR产物电泳后无特异性条带出现。

8 综合判定

8.1 临床诊断出现5.1症状且符合5.2流行特点，判断为疑似乳突类圆线虫感染。

8.2 病原学诊断出现6.1.3.1或6.2.3.1或6.3.3.1结果判断为乳突类圆线虫感染。

8.3 分子生物学诊断出现7.5.1结果判断为乳突类圆线虫感染。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（资料性）
乳突类圆线虫病原形态

图 1 乳突类圆线虫虫卵（红色圆圈内为虫卵实物图，右侧为模式图）

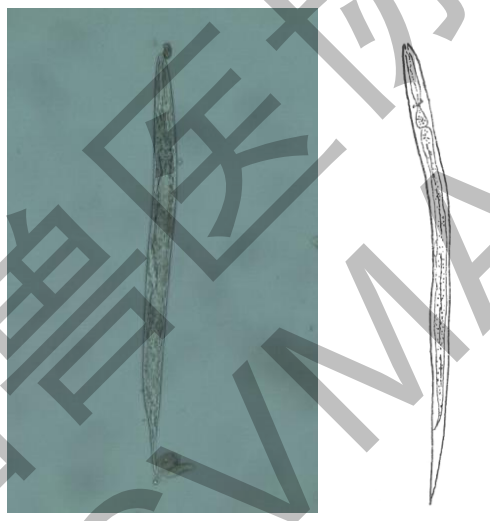
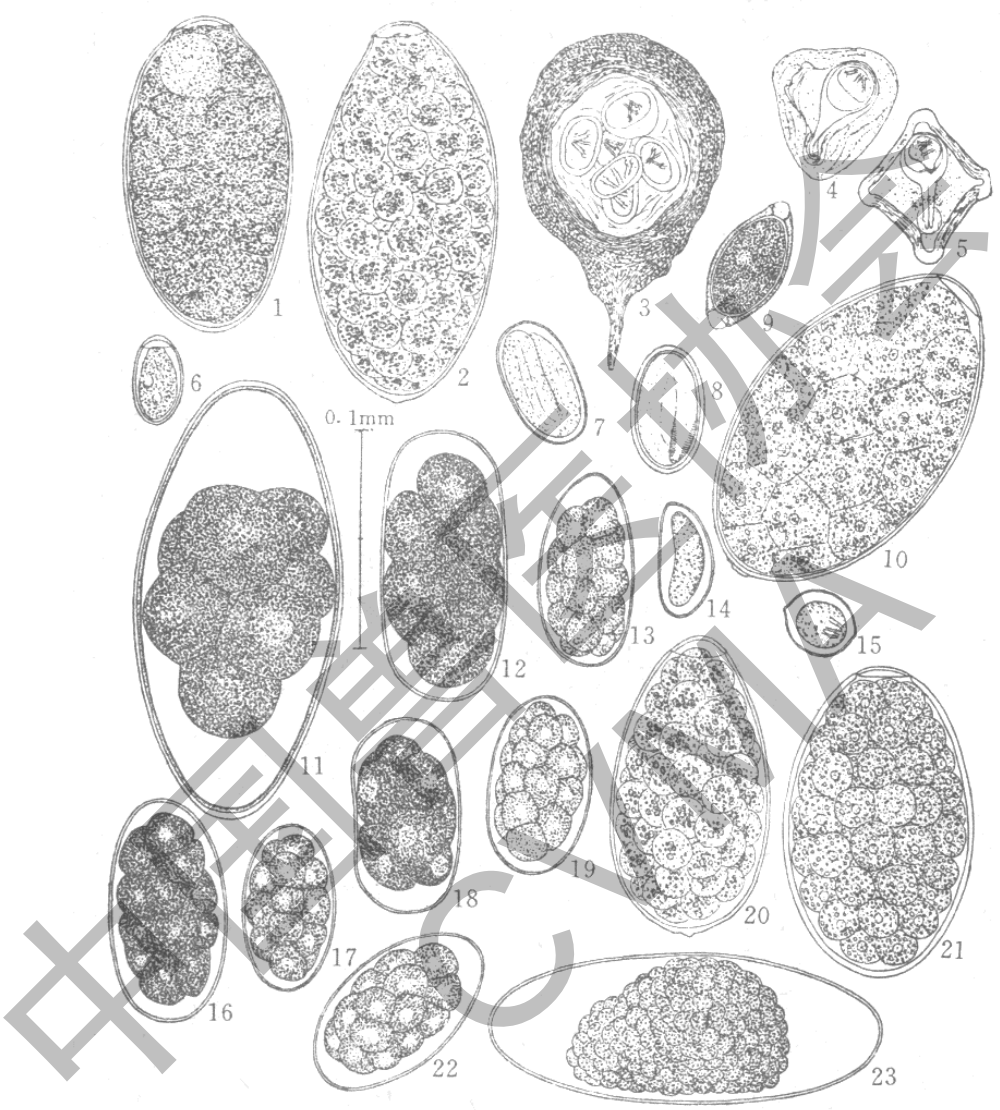


图 2 乳突类圆线虫第一期幼虫（左侧为实物图，右侧为模式图）

图 3 寄生生活的成虫（雌虫，模式图）

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（资料性）
牛羊粪便中常见蠕虫卵



1 肝片吸虫　2 鹿前后盘吸虫　3 盖氏曲子宫绦虫　4 扩展莫尼茨绦虫　5 贝氏莫尼茨绦虫
6 矛形双腔吸虫　7 乳突类圆线虫　8 美丽筒线虫　9 球鞘毛尾线虫　10 大片吸虫
11 细颈线虫　12 粗肋盖杰线虫　13 毛圆线虫　14 绵羊斯克里亚宾线虫　15 中点无卵黄腺绦虫
16 夏伯特线虫　17 血矛线虫　18 羊仰口线虫　19 食道口线虫　20 殖盘吸虫
21 大拟片吸虫　22 奥斯特线虫　23 马歇尔线虫

中国兽医协会 CVMA

附　录　C
（资料性）
饱和盐水漂浮法

取动物粪便 10-15 克，置于 100-200 毫升的烧杯中，先加入少量饱和盐水，把粪便调匀，然后加入约为粪便的 5-10 倍量的饱和盐水，搅拌均匀，用 40 目或 60 目网筛过滤（如图 1），将滤液直接倒入试管内，补加滤液使试管充满，盖上盖玻片（盖玻片应与液面完全接触，不能留有气泡），静置 15-20 分钟（如图 2），取下盖玻片，贴在载玻片上，显微镜下检查虫卵。

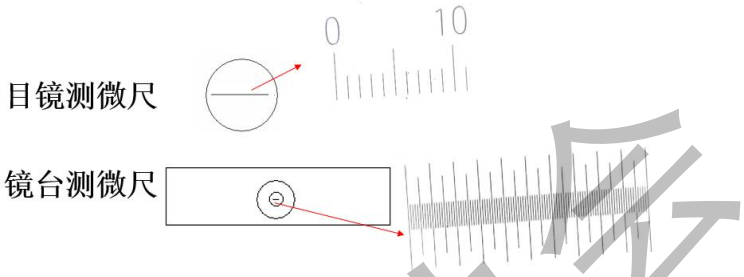
图 1 过滤粪便

图 2 粪便滤液中的虫卵在静置过程中富集于盖玻片表面

中国兽医协会 CVMA

附　录　D
（资料性）
测微技术

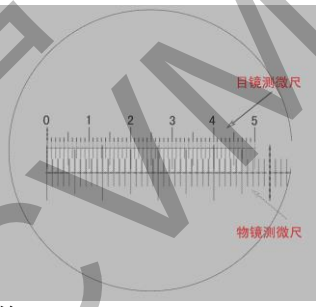
寄生虫的虫卵、幼虫和卵囊，常有恒定的大小，测量其大小，可作为确定其虫种的一种依据。虫卵和幼虫的测量需用测微器。测微器由目镜测微尺和镜台测微尺组成。



目镜测微尺是一个可放于目镜中隔环上的圆形玻璃片，其上刻有 50-100 刻度的小尺。使用时，将目镜的上端旋开，将目镜测微尺置于镜头内隔上，再将镜头旋好，此时通过此镜头即可在视野内见到有一清晰的刻度尺。此刻度并不具有绝对的长度意义，须通过镜台测微尺换算。

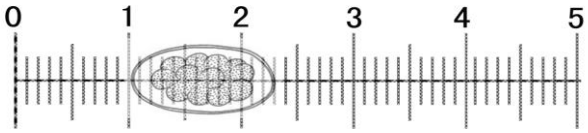
镜台测微尺是一载玻片，其中央封有一标准刻度尺，一般是将 1 mm 均分为 100 小格，即每小格的绝对长度为 0.01 mm（10μm）。

使用时将镜台测微尺放在显微镜载物台上，调整固定好测量时需要的物镜放大倍率，调节显微镜焦距能清楚地看到镜台测微尺上的刻度，移动镜台测微尺，使之与目镜测微尺重合，并使两者的起始端对齐，然后寻找下一个整数的对齐刻度。计算在此确定的物镜倍数、目镜倍数和镜筒长度的条件下，目镜测微尺中每格刻度所表示的实际长度。



图中目镜测微尺每格=30×0.01mm/40=0.0075mm=7.5μm（举例）

移去镜台测微尺，将待测量样本放在显微镜载物台上，用目镜测微尺去测量样本中虫卵、幼虫或卵囊的大小。



虫卵长=7.5μm×13=97.5μm（举例）

以上计算获得的目镜测微尺的换算长度只适用于此显微镜一定的目镜和一定的物镜等条件。更换其中任意一个条件，其换算长度必需重新测算。

中国兽医协会 CVMA

附　录　E
（资料性）

水洗沉淀法

将动物小肠内容物和肠黏膜清洗物全部转移至大烧杯中（容积在 5 升以上，也可用搪瓷盆代替），加入其体积 5 倍以上的生理盐水，用玻璃棒缓慢搅拌 1-3 分钟使充分混匀，静置 15-20 分钟，倾去上清液，如此反复操作，直至上层液体透明为止，最后弃去上层液体，保留沉淀物。分批取少量沉渣物到大培养皿的生理盐水中，先后在白色和黑色的背景下寻找虫体，如此反复，至所有沉淀物全部检查完毕。

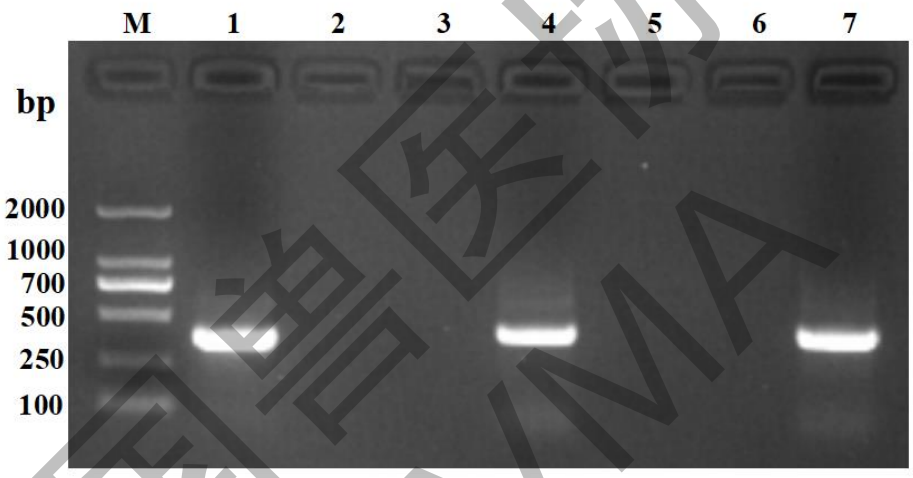
中国兽医协会
CVMA

附　录　F
（规范性）

乳突类圆线虫线虫18S rDNA基因检测

特异性引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度
上游引物	AAAGATTAAGCCATGCATGTG	360 bp
下游引物	GCCTGCTGCCTTCCTTGGATGT	



乳突类圆线虫 18S rDNA 基因扩增

M 为 DNA Marker；1 为阳性对照；2 为阴性对照；3 为空白对照；4-7 为临床样品

中国兽医协会 CVMA

附　录　G
（规范性）

标准中涉及的试剂配制方法

卢氏碘液：碘片 5 g、碘化钾 6 g、去离子水 100 mL。

生理盐水：9 g NaCl 溶于去离子水并定容到 1000 mL，高压灭菌后室温保存。

饱和盐水：将 NaCl 加入热水中，不断搅拌，直至 NaCl 不再溶解为止（100 mL 约需 NaCl 37.5g，浓度约为 37.5%，比重约为 1.2）

50×TAE 贮存液：$Na_2EDTA·2H_2O$ 37.2g，冰醋酸 57.1 mL，Tris-Base 242 g，用约 800 mL 灭菌去离子水溶解，充分混匀后用灭菌去离子水补齐至 1000 mL，常温保存备用。

1×TAE 使用液：50×TAE 贮存液 10 mL，去离子水 490 mL 混匀，常温保存备用。

10 mg/mL 溴化乙锭：称取溴化乙锭 1 g，加去离子水定容至 100 mL，磁力搅拌充分溶解后，转移至棕色瓶内室温避光保存。

1.0%琼脂糖凝胶：琼脂糖干粉 1.0 g，1×TAE 使用液 100 mL，微波炉加热至琼脂糖熔化，待稍冷却后加入终浓度为 0.5 μg/mL 溴化乙锭，摇匀。

6×加样缓冲液：30 mM EDTA, 36%甘油，0.05%溴酚蓝，pH7.0。

中国兽医协会 CVMA