ICS 65.020.30
B41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXX—XXXX

犬巴贝斯虫病诊断技术

Diagnostic techniques for canine babesiosis

(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

目　次

前　　言 II
引　　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 缩略语 1
5 临床诊断 2
6 血涂片显微镜镜检 2
7 吉氏巴贝斯虫 PCR 检测方法 4
8 吉氏巴贝斯虫抗体检测方法 5
9 综合判定 6
附 录 A （规范性附录） 溶液配制 8
附 录 B （资料性附录） PCR 扩增片段核酸序列 9
附 录 C （资料性附录） 巴贝斯虫病典型症状及病理变化 10
附 录 D （资料性附录） 传播媒介长角血蜱和镰形扇头蜱鉴定特征 11
附 录 E （规范性附录） 显微镜检测典型虫体形态 13
附 录 F （规范性附录） P47 基因特异性引物序列 14
附 录 G （规范性附录） PCR 反应体系配置及注意事项 15
附 录 H （规范性附录） PCR 检测质控标准与结果判定图 16
附 录 I （规范性附录） 用于重组抗原制备的 SA1 基因片段核酸序列 17
附 录 J （规范性附录） 吉氏巴贝斯虫 SA1 重组抗原的制备 18
附 录 K （规范性附录） 标准阴性对照血清的制备 20
附 录 L （规范性附录） 标准阳性对照血清的制备 21
附 录 M （资料性附录） 抗体检测试纸条的制备 22
附 录 N （规范性附录） 抗体检测试纸条检测结果示意图 24

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由华中农业大学提出。

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

引　言

犬巴贝斯虫病（Canine babesiosis）是由巴贝斯科、巴贝斯属的巴贝斯虫（Babesia）寄生于犬的红细胞内所引起的蜱传性血液原虫病，患病犬常出现溶血性贫血、发热、黄疸和血红蛋白尿等典型临床症状。该病在世界范围内广泛传播和流行，宿主一旦感染终生带虫，至今缺乏有效疫苗和根治药物，因此早诊断早治疗对该病的综合防控至关重要。我国的犬巴贝斯虫病的主要病原是吉氏巴贝斯虫。

目前兽医临床上急性病例多采用姬姆萨染色血液涂片的显微镜观察。该方法对检测条件的要求较低，简便快捷，可半小时内出结果；由于镜检对染虫率低的样本检出率低，需要检测人员有丰富的经验，否则容易出现漏检或误判，尤其易与泰勒虫混淆。另一方面，犬巴贝斯虫的隐性感染和既往感染较为常见，需要做实验室诊断。

为了在现有技术条件下提升犬巴贝斯虫检测的准确性，本文件从各检测方法的检测原理、敏感性和特异性等多方面综合考虑，制定了一套适用于犬的巴贝斯虫多方法联合诊断方案，以期为临床犬的吉氏巴贝斯虫病的精准诊断提供依据。

本文件中血涂片显微镜检测方法适用于从活体动物的外周血液中检测犬巴贝斯虫；聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）适用于犬巴贝斯虫核酸检测，可用于检测当前感染；BgSA1抗体检测试纸条适用于检测血清样品中的巴贝斯虫抗体，可用于实验室诊断、流行病学调查和检验检疫。

中国兽医协会 CVMA

犬巴贝斯虫病诊断技术

1 范围

本文件规定了犬巴贝斯虫的临床诊断、显微镜检测、核酸检测和抗体检测的技术要求，描述了病原学和血清学的检测方法和诊断技术要求。

本文件适用于犬巴贝斯虫病的临床诊断、实验室诊断、流行病学调查以及检验检疫。其他动物巴贝斯虫病的诊断亦可以参照本方法。

注：本文件所称犬巴贝斯虫病为吉氏巴贝斯虫感染引起的犬巴贝斯虫病。

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 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

3 术语和定义

3.1 犬巴贝斯虫病 Canine babesiosis

由吉氏巴贝斯虫寄生于犬的红细胞引起的发热性蜱传性疾病，以高热、贫血、黄疸和血红蛋白尿为主要特征。

3.2 吉氏巴贝斯虫 *Babesia gibsoni*

吉氏巴贝斯虫属于原生生物，为顶复门、孢子虫纲、梨形虫目、巴贝斯科、巴贝虫属的一类寄生于犬红细胞内的血液原虫，属小型虫体，大小为1-2 μm，在体内可呈点状、环状、梨籽形。

注 1：吉氏巴贝斯虫是感染犬的巴贝斯虫之一。

注 2：体内培养的吉氏巴贝斯虫典型形态见附录 E 中图 E.1。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对（Base Pair）

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

DTT：二硫苏糖醇（1,4-Dithiothreitol）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

IPTG：异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside）

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）

中国兽医协会 CVMA

5 临床诊断

5.1 流行病学

国内犬的巴贝斯虫病临床病例中以吉氏巴贝斯虫最为常见，日本、泰国及中国台湾的相关流行病学调查显示临床巴贝斯虫病例中约75％-85％为吉氏巴贝斯虫。1985年我国南京发现首例犬感染巴贝斯虫的病例，随后的调查显示我国大部分地区包括华东、华南、华中、华北甚至是东北地区和西北地区都有犬巴贝斯虫感染的病例报道，且部分地区发病率较高。犬巴贝斯虫病的发生与动物的性别和年龄相关性不大，而与犬接触蜱的机会有关。户外运动会增加感染巴贝斯虫的风险，此外脾脏受损或切除犬的免疫力和抵抗力降低也能够导致感染巴贝斯虫的几率升高。春夏秋季节温度适宜，环境潮湿导致蜱活动增加，犬在湿润的草地、山地或湿地上玩耍时更容易被蜱叮咬，引起巴贝斯虫感染。犬巴贝斯虫自然传播主要是通过蜱的叮咬传播，患病犬的发病大多数情况下与蜱有着直接的联系，也有研究证明通过输血、受污染的设备或经胎盘传播，以及犬只互相撕咬期间咬伤，唾液或摄入的血液直接在犬与犬之间水平传播。

5.2 典型临床症状

5.2.1 发热：体温升高至 40 - 41℃，持续 3 - 5 天后，转至正常，5 - 7 天后再次升高。即呈不规则间歇热型。

5.2.2 贫血：渐进性贫血，可视黏膜苍白至黄染（见附录 C 图 C.1 中①②）。

5.2.3 血红蛋白尿：尿液颜色深黄色或桔红色或似浓茶水样（见图 C.1 中④）。

5.2.4 部分病犬有呕吐症状。

5.2.5 感染吉氏巴贝斯虫时，某些患病犬体表可以检查到硬蜱。

5.3 典型病理变化

5.3.1 血液稀薄如水，凝固不良。

5.3.2 全身皮下脂肪黄染。

5.3.3 肝脏和脾脏肿大易碎，约为正常犬的 2 - 3 倍，甚至 3 - 4 倍（见图 C.1 中③）。

5.3.4 单侧或双侧肾肿大。

5.4 流行特点

5.4.1 患病犬有蜱叮咬史，该病主要发生在长角血蜱（见附录 D 中图 D.1）和镰形扇头蜱（见附录 D 中图 D.2）分布的区域。

5.4.2 多发于 4 - 10 月，分布和发病季节往往与蜱的分布和活动季节密切相关。蜱多在春季开始出现，寒冷季节较少。

5.5 结果判定

犬出现5.2临床症状或者剖检时有5.3病理变化，并符合5.1流行特点，判为疑似吉氏巴贝斯虫病。

6 血涂片显微镜镜检

中国兽医协会 CVMA

6.1 基本要求

除特殊说明外，本文件所有操作程序均应符合GB19489和GB/T 27401的规定。

6.2 试剂耗材

6.2.1 除特别规定外，在检测中使用的试剂均为分析纯，试验用水应符合 GB/T6682 的要求。

6.2.2 姬姆萨染液原液，按照附录 A 中 A.1 方法配制。

6.2.3 姬姆萨染液工作液，按照 A.2 方法配制。

6.2.4 甲醇。

6.2.5 香柏油。

6.2.6 载玻片。

6.3 仪器设备

6.3.1 光学显微镜（含 100×物镜）。

6.3.2 单道微量移液器（1 μL - 10 μL；10 μL - 100 μL；100 μL - 1000 μL）。

6.4 血涂片制备

用剪毛剪剪去犬耳尖毛发，揉搓采血部位，使血流旺盛，针头刺破耳尖，挤取一滴耳尖静脉血于载玻片上，用推片将血液推成薄血涂片，并迅速晾干。

6.5 血涂片固定

加甲醇于血涂片，使甲醇完全覆盖血涂层，待晾干后重复一次。

6.6 血涂片染色

加姬姆萨染液于已固定好的血涂片，使其完全覆盖血涂层。室温条件染色30 min。染色结束之后，用自来水冲掉染液。将血涂片自然晾干或者吹风机吹干。

6.7 显微镜镜检

在血涂片上滴加一滴香柏油，用光学显微镜在100×物镜下观察100个视野。

6.8 结果判定

6.8.1 阳性

红细胞内观察到典型的吉氏巴贝斯虫（见附录E中图 E.1）时，判为血涂片显微镜镜检阳性。

6.8.2 疑似阳性

犬红细胞内未见典型虫体，但观察到少量点状、较大的圆形单个疑似虫体时，判为血涂片显微镜检查疑似阳性。

6.8.3 阴性

未出现6.8.1和6.8.2的结果，判为血涂片显微镜镜检阴性。

中国兽医协会 CVMA

7 吉氏巴贝斯虫 PCR 检测方法

7.1 基本要求

除特殊说明外，本文件所有操作程序均应符合GB19489和GB/T 27401的规定。

7.2 试剂耗材

7.2.1 2× Rapid Taq Master Mix（商品化）包含 Taq DNA 聚合酶、延伸促进因子、dNTP 以及优化的缓冲体系。

7.2.2 无 RNase 水。

7.2.3 全血基因组 DNA 提取试剂盒。

7.2.4 琼脂糖（电泳级）。

7.2.5 1×TAE 缓冲液，按照 A.3.2 方法配制。

7.2.6 10000× GelRed 或绿如蓝核酸染料。

7.2.7 吉氏巴贝斯虫阳性基因组对照（用体外纯培养的吉氏巴贝斯虫，染虫率达到 5 %及以上时，收集样品，提取血液基因组 DNA，稀释至 1 ng/μL；或序列合成基因片段（见附录 B 中 B.1）作为阳性对照。

7.2.8 吉氏巴贝斯虫阴性基因组对照（筛选吉氏巴贝斯虫阴性犬，提取血液基因组 DNA，稀释至 1 ng/μL）。

7.2.9 核酸分子 Marker。

7.2.10 抗凝真空采血管。

7.2.11 1.5 mL 无菌离心管。

7.2.12 200 μL PCR 管。

7.2.13 各种规格的微量移液器吸头。

7.3 仪器设备

7.3.1 PCR 扩增仪。

7.3.2 核酸电泳系统。

7.3.3 单道微量移液器（1 μL - 10 μL；10 μL - 100 μL；100 μL - 1000 μL）。

7.3.4 离心机。

7.3.5 高压蒸汽灭菌器。

7.3.6 恒温箱。

7.3.7 紫外分光光度计。

7.4 样品处理

中国兽医协会 CVMA

采集犬静脉抗凝血于密闭塑料离心管中，编号，保存于4℃，送检。

7.5 DNA 提取

用商业化的血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA，方法按照试剂盒说明书。提取的DNA立即进行PCR扩增或保存于-20℃备用。

7.6 PCR 反应操作方法

7.6.1 反应体系

扩增吉氏巴贝斯虫P47基因的引物BgF/BgR按照附录F中表F.1引物序列合成。配制PCR反应体系，按照附录G中表G.1来配制，反应体系总体积为25 μL。吉氏巴贝斯虫阳性DNA为阳性基因组对照，吉氏巴贝斯虫阴性犬血液基因组为阴性对照。

7.6.2 反应条件

于200 μL PCR管中配制反应体系，混匀，置于PCR仪上进行扩增。扩增程序为：95℃预变性3 min；然后95℃变性15 s，61℃退火15 s，72℃延伸1 min，共扩增35个循环；72℃延伸5 min。

7.6.3 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳和成像

用1×TAE缓冲液配制1.5%琼脂糖凝胶，取PCR产物10 μL与2 μL 6×加样缓冲液混合，加样于含10000× GelRed或绿如蓝核酸染料的1.5 %琼脂糖凝胶制备的凝胶块中，在1×TAE缓冲液中，5 V/cm电泳大约30 min，当溴酚蓝达到底部时停止电泳，凝胶成像分析系统观察结果，并拍照保存。

7.6.4 质控标准

吉氏巴贝斯虫阳性DNA对照出现1071 bp的特异性条带，且阴性对照无扩增条带时，判为试验成立（按附录H中图H.1）。

7.7 结果判定

7.7.1 阳性

用特异性引物自待检样品基因组DNA中扩增出大小为1071 bp的条带，判定为吉氏巴贝斯虫核酸阳性（按图H.2）。

7.7.2 阴性

待检样品无特异性的阳性扩增条带出现，判定为吉氏巴贝斯虫核酸阴性。

8 吉氏巴贝斯虫抗体检测方法

8.1 基本要求

除特殊说明外，本文件所有操作程序均应符合GB19489和GB/T 27401的规定。

8.2 试剂耗材

8.2.1 吉氏巴贝斯虫 BgSA1 抗体检测试纸条。

8.2.2 抗凝及非抗凝真空采血管。

中国兽医协会 CVMA

8.2.3　1.5 mL 无菌离心管。

8.2.4　各种规格的微量移液器吸头。

8.3　仪器设备

8.3.1　单道微量移液器（1 μL - 10 μL；10 μL - 100 μL；100 μL - 1000 μL）。

8.3.2　离心机。

8.3.3　恒温箱。

8.3.4　核酸蛋白检测仪。

8.3.5　细胞破碎仪。

8.3.6　恒温摇床。

8.3.7　制冰机。

8.4　材料准备

吉氏巴贝斯虫SA1重组抗原按照附录J制备，吉氏巴贝斯虫标准阴性血清按照附录K制备，吉氏巴贝斯虫标准阳性血清按照附录L制备，吉氏巴贝斯虫抗体检测试纸条按照附录M制备，其他相关试剂按照附录A配制。

8.5　待检血清样品的处理

静脉无菌采集犬血液1 mL，室温条件静置2 h，待血液自然凝固之后，于2℃ - 8℃冰箱中放置2 h。4℃ 3000 g离心10 min，收集上清于1.5 mL离心管中，于 -20℃保存或送检。

8.6　操作步骤

取待检血清样品40 μL－60 μL（滴管2滴-3滴），缓慢加到样品孔中，在样品孔中滴加1滴抗体稀释液，试纸条上将有红色条带移动。静置15 min，观察结果。

8.7　结果判定

8.7.1　阳性

在试纸条上出现两条线（检测线和质控线）（见附录N.1.A）。

8.7.2　阴性

在试纸条上仅出现一条线（质控线）（见附录N.1.B）。

8.7.3　无效结果

质控线不显示。

9　综合判定

9.1　阳性

中国兽医协会 CVMA

出现5.5疑似吉氏巴贝斯虫病特征，进一步判定如下：

a) 出现6.8.1结果的，判为吉氏巴贝斯虫病阳性；

b) 出现7.7.1或8.7.1结果的，判为吉氏巴贝斯虫病阳性；

9.2 隐性感染

未出现5.5疑似巴贝斯虫病特征，进一步判定如下：

a) 出现6.8.1结果的，判为吉氏巴贝斯虫隐性感染；

b) 出现7.7.1或8.7.1结果的，判为吉氏巴贝斯虫隐性感染；

9.3 阴性

未出现5.5疑似巴贝斯虫病特征，进一步判定如下：

a) 出现6.8.2、7.7.2和8.7.2结果的，判为吉氏巴贝斯虫病阴性；

b) 出现6.8.3、7.7.2和8.7.2结果的，判为吉氏巴贝斯虫病阴性。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
（规范性附录）
溶液配制

A.1 姬姆萨染液

准备 33 mL 甘油，将 0.5 g 姬姆萨染料置于研钵中，加少量甘油进行充分研磨，然后加入全部的甘油，55℃- 60℃水浴加热 1 h - 2 h，期间不断摇动混匀。冷却至室温后加入 33 mL 甲醇，搅拌混匀，储存在棕色瓶中室温静置 6 - 12 个月，过滤备用。

A.2 姬姆萨染液工作液

按每毫升去离子水加 200 μL 姬姆萨染液原液进行配制。

A.3 TAE 缓冲液的配制

A.3.1 50×TAE 贮存液

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2 g
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。

A.3.2 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。

A.4 1.5%的琼脂糖凝胶

琼脂糖干粉	1.5 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，溴化乙锭或同类核酸染料，摇匀。

A.5 His-binding Buffer（pH= 8.0）

Nacl	17.352 g
Tris-base	1.21 g
NaH_2PO_4	7.8 g
去离子水	900 mL

完全溶解后，调 pH 值至 8.0，加去离子水至 1000 mL，4℃存放备用。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B
（资料性附录）
PCR 扩增片段核酸序列

B.1 P47 基因片段序列

GCCTGTACATCCACAATTGGCTACCTTTCAACAGCAACTTGAATTTGTAGCAAGGTTTGATGA
GGCGTTTAATACTGCCGAGGAAGAATATAAGAAGAAACTAGTTCACCTCCTTCCACTTTACAA
GGTGAATCCTTTCAAAGACGTCTGGATTCATTTTAAGGAAGGTGTTAAGAATGTTGCTGAATT
GTATGCTGTGTTACTTCGTGTCCCCCAATCTACAGCAACCCCTGCCGGTACGTTTATATATTCAT
CGATTCATTACCTTAGCAGATGAAGAGAGAAAGCCTTCTGCCTCTTTACAGAATCTGTTGGATA
TCGCTTTAAATGCAACAGGTGATGCTCTGCACATTGCAGATAAGGCTGTGAAGACTGTCATTG
GAATAGAGATAAAGGATGGTGTTTTAAATGCGACGCTTGAAAATGCTGAGCTTCTGTCTGAAG
TCCTGCCGGAGTTCTTTGAAAAACTTTTGGAGTTCAAAAAGGTGGTTGAGGATGCGTATGCCC
CTGAATCCCAAGTTGATGGTGGTAAGTTATTCACACGACTTGGTCACAGCCCCGTTGAACCCT
ACTTGAAGAATCACGGTTTCAAAGATGGAGATTTTAAACGTGAAGCTTCATTAAAAGATTTGA
GAAAGAAACTTATAGAGCTAGTTGACACTGGTAAGCATTTTCAGGAGGTCCTGGGCGTGCTTG
CCGCAGATGCACTTATGCGAACTCCAGATGGCCCAATGAGAAAACAAGCATGGCTCTTTTTAT
TGTCAAGTACAATGCATAACGAAGCTATGAAGGAGAGGCTTAAGGATGCCGTAAACAAAGTA
ACCGGTAAAGGAGATACCTTTGTAGAGGAACTGAAGAAACTGGGACCACAAATTAAGCTTCC
CAAGGAAAAGACTCCCAAAGGATACCTTTTCCCCGGTGAATATGTAAACTGCGATGTTCATCA
CTTCTGGACTGTGTTAACTGGGGTATTTGGTACCATACTTGACGATATAAGTAAAGCGGCCCCC
ACTGCAAAAACTGGAGGGGGTGTTGTCCCCCAGGAGTTAGCTGACCTTGTCAAGGTGCAAG

中国兽医协会 CVMA

附 录 C
（资料性附录）
巴贝斯虫病典型症状及病理变化

巴贝斯虫病典型症状及病理变化见图C.1。

① ②——可视黏膜黄染；
③ ——脾脏肿大，边缘钝圆；
④ ——血红蛋白尿。
注：③引自翟晓虎，2022。

图C.1 巴贝斯虫病典型症状及病理变化图

中国兽医协会 CVMA

附 录 D
（资料性附录）
传播媒介长角血蜱和镰形扇头蜱鉴定特征

D.1 鉴定要点

D.1.1 长角血蜱

雌蜱：体长2.52 - 3.01（平均2.75）毫米（包括假头），宽1.57 - 1.75（平均1.68）毫米。体色褐黄。假头宽短。假头基矩形，宽约为长的2.2倍（包括基突）；两侧缘几乎平行，后缘平直；基突短而稍尖，长小于其基部宽；孔区中等大小，卵圆形，前部内斜，间距约等于其长径。盾板亚圆形，边缘均匀弧形或微波状。气门板近圆形，腹缘圆角状凸出，背突短钝。足粗细中等。

雄蜱：体长2.10 - 2.38（平均2.28）毫米（包括假头），宽1.29 - 1.57毫米。体色褐黄。假头短小。假头基矩形，宽约为长的1.7倍（包括基突）；两侧缘几乎平行；基突强大，三角形，长与其基部宽约等，末端尖。盾板长卵形，中部最宽。颈沟短小，略呈弧形。气门板略呈卵圆形，背缘与腹缘近于平行。足粗细中等。

D.1.2 镰形扇头蜱

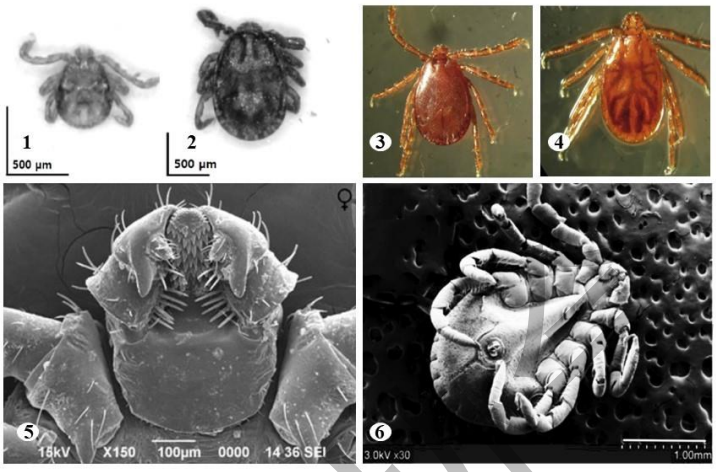
雌蜱：体长3.29 - 3.92 mm（包括假头），宽为1.93 - 2.51 mm。体呈卵圆形；前端收窄，假头基呈六边形，且前侧缘不凹入，具眼；后端圆弧形，具缘垛，肛沟明显。须肢粗短，前端相当平钝；第I、II节腹面内缘刚毛较粗，排列较紧密；第III节近似梯形，前端圆钝，能覆盖螯肢大半，长不大于宽。盾板长略胜于宽；后缘圆钝；粗刻点少而零散，细刻点多，分布不均匀。颈沟前深后浅，末端将达盾板边缘；侧沟明显，末端延至眼后。气门板长大于宽，呈短逗点形，背突粗短。足基节I外距直，较内距稍短；基节II～IV外距粗短，按节序渐小。跗节II～IV腹面亚末端具一钝齿，末端均具一尖齿。爪垫约达爪长之半。

雄蜱：体长3.94 - 4.77 mm（包括假头），宽为2.20 - 2.61 mm。体型与雌蜱相似。须肢粗短，第I、II节腹面内缘刚毛粗，排列紧密。盾板刻点粗细不均，分布亦不均匀。颈沟前深后浅，末端达到眼后水平线；侧沟窄长而深，末端达到第II缘垛。尾突有时明显。肛侧板镰刀形，内缘强度凹入；副肛侧板小，末端尖细。气门板长逗点形，背突粗短，末端圆钝。足与雌虫相似。

D.2 形态

长角血蜱形态特征见图D.1，镰形扇头蜱形态特征见图D.2。

中国兽医协会 CVMA



标引序号说明：

①——幼蜱；

②——若蜱；

③——雄蜱；

④——雌蜱；

⑤——雌蜱假头背面。

注：

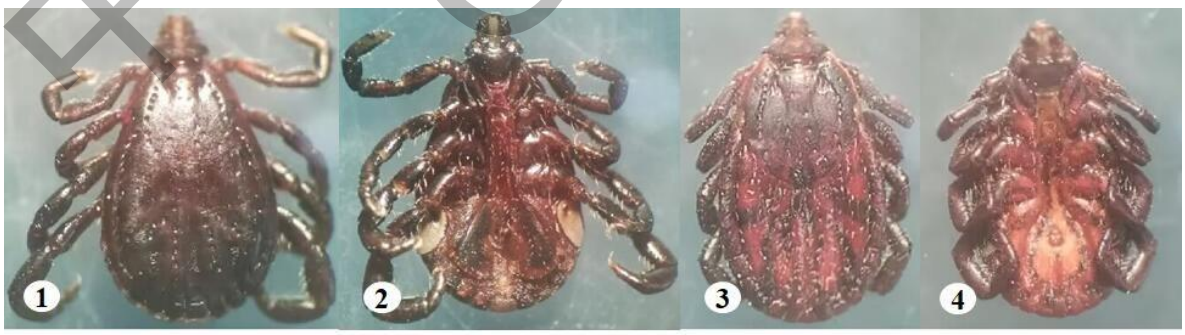
①②引自 Junsoo Lee, etal., 2022；

③④引自 Ju Jiang, etal., 2018；

⑤引自 Rajeev Kungur Brahma, etal., 2014；

⑥引自 Desmond O. Agwunobi, etal., 2020。

图 D.1　长角血蜱形态图



标引序号说明：

①——雄蜱背面；

②——雄蜱腹面；

③——雌蜱背面；

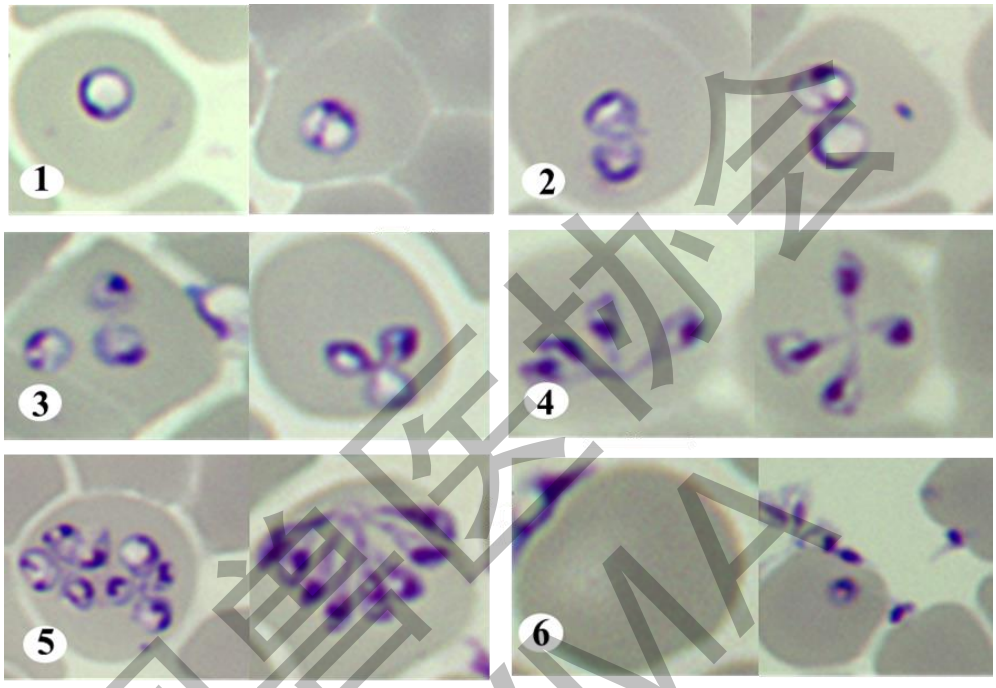
④——雌蜱腹面。

图 D.2　镰形扇头蜱形态图

中国兽医协会 CVMA

附 录 E
（规范性附录）
显微镜检测典型虫体形态

E.1 吉氏巴贝斯虫典型形态图



①——红细胞内一个虫体状态；
②——红细胞内两个虫体状态；
③——红细胞内三个虫体状态；
④——红细胞内四个虫体状态；
⑤——红细胞内八个虫体状态；
⑥——红细胞外虫体状态。

图 E.1　吉氏巴贝斯虫典型形态图

中国兽医协会 CVMA

附 录 F
（规范性附录）
P47 基因特异性引物序列

采用PCR方法开展巴贝斯虫检测时，需合成扩增P47基因的引物见表F.1。

表F.1　P47基因特异性引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度
BgF	5'-GCCTGTACATCCACAATTGGCTACC-3'	1071 bp
BgR	5'-CTTGCACCTTGACAAGGTCAGCTAAC-3'	
注：BgF——正向引物； BgR——反向引物；		

中国兽医协会
CVMA

附 录 G
（规范性附录）
PCR 反应体系配制及注意事项

G.1 反应体系配制

每个 PCR 反应体系包括的组分见表 G.1。

表 G.1 PCR 反应体系

组成成分	加样体积/μL	总体积/μL
2 ×Rapid Taq Master Mix	12.5	25
BgF（10 μM）	1	
BgR（10 μM）	1	
DNA	1	
ddH_2O	9.5	

G.2 注意事项

G.2.1 在配制 PCR 反应体系过程中，阳性对照 DNA 与待检样品 DNA 应该在不同区域添加，以免造成污染。

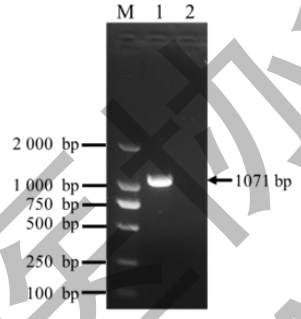
G.2.2 所有试剂应按照要求分别在 4℃或-20℃条件保存，使用时在室温条件下融化，混合均匀，放置于冰上。

中国兽医协会 CVMA

附 录 H
（规范性附录）
PCR 检测质控标准与结果判定图

H.1 P47 基因特异性引物扩增质控标准

用吉氏巴贝斯虫P47基因特异性引物，仅可自吉氏巴贝斯虫阳性基因组中扩增出大小约为1071 bp的片段（见图 H.1）。

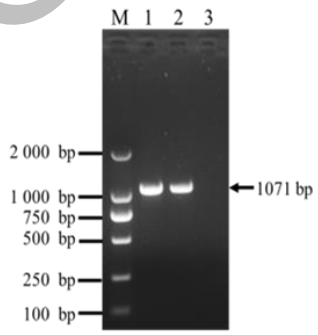


标引序号说明：
M——核酸分子Marker；
1 ——吉氏巴贝斯虫阳性基因组对照；
2 ——吉氏巴贝斯虫阴性基因组对照，

图 H.1 吉氏巴贝斯虫特异性引物扩增质控标准图

H.2 吉氏巴贝斯虫 P47 基因特异性引物检测结果

用吉氏巴贝斯虫P47基因特异性引物，自待检样品基因组中扩增出大小约为1071 bp的片段（见图 H.2）。



标引序号说明：
M——核酸分子Marker；
1 ——吉氏巴贝斯虫阳性基因组对照；
2 ——待检样品；
3 ——吉氏巴贝斯虫阴性基因组对照。

图H.2 吉氏巴贝斯虫特异性引物检测的阳性样品结果图

中国兽医协会 CVMA

附 录 I
（规范性附录）
用于重组抗原制备的 SA1 基因片段核酸序列

I.1 SA1 基因片段序列

ACACAAATAACAACACCTGTGGATGACAATGATTCTGCTCCAATGGAGCCACATTCTGTCAAAGA
TATGTTACACTTCCTAGGTAAATTGCAGCAGGACACAAACCTGAAAGAAAAGTTTGTCAATGAAC
TGGAGAAGGTAGTTAAGGAGTATCTGGACACCACGCAAGTTGAGAAAAAAGGGTATACTGCTAA
TTTCGATAGTTTGTTGGAACACGTGAATAAACTACGTCATGAGCTGTTGAACGACACCGGTGATT
ATGGAAAATTTAAGGATCTTAACGAAGAGGGTGTGACAAAGGCTTTTGAAATACTTGTCCAGTG
GATTCCAATCTTGCACAGTGAGTTTTCGTTGCTGTATTTCCTCTCCTCTACGGAGGGACAAGGTAT
TGGCGGAAATCAATGGATTGAACAATATTTCGGACCAGAGCATACAGGTACACAGGCACACAAG
TGGTTGACTGATAAGTTAAATGAAGCTAAGGACCCTTTCACTGTGAAGAAAGGTTTTGAGGATGG
TGATCTAAAACGAGGTGGTAGGATTACCGCAGCTGTGACTGGTAATCTGGGAATAAACTACTATT
CCGGCGGACCTCTAAACTACATGCAATATGGACTGTTTTTCCTTTCTGGTGATACTTTGCTAGCTG
CGAATCTTGCAAGCGCCCTTCTATTCCTGGCAGAGTTCTGTAGGGAAGTAAGTGAGAACAAGTTT
CCCGAGAAGACCACGCTTGATAAATATAAATGTCTTAAGGATGTATGCAAGGATGTAAAAGATA
AAATTGATGCTTTTCATAAGCATATTTTGCCTCTATATAATCCTTTAACGGTTGAAGACATAGAAG
GTGATGACGATAGTAAACTTGGTGAGGTTGTACGCATGGCGGAGGGTAGGTGTAATGAAATGTA
CAAAGGAAAGTTAAAAAAAGAGAAATTTGACGAATATGTCACATGGATGAAAAGGAATCTTGCA
AAACTTATGCTTCTGCTGAGGGAGATGCACACTGACTCTGCCAGATGGACTGTTGAAGATTTAAT
GTATGTCCAGTCTCATGGACCATCCAAATACGGTTATACGTTCGTGGATAAGAGATGGGATACAA
GTATATATTTCACATTTAAGCAGTCTATAGAAGACCTTGCACTTTTTGAATCAAGCAATGGTCTTT
TTAGTCTGCTTAGGTGCTTAGATGGCCAGAGGGCATTAAGAGAGAGGGAAGTCTTTGAAAAATT
AGAAGAAGAAAAGAAAAAGAAAGAAGAGGCTAATAAAAAAGTAAGACGGGTAGCTAAACCAG
CAACTGAGGTTGGAGAAGGAGAGGGGAATTCGTCAGGAAAACAGACACCAGTTCCTACACCACC
CACTGGTAAGACCCAGTTGAAGGAACAAACACTTGCGGATGGTCATTCTGAAGATCCAAAACAC
AAGGGTGCAACTAAGCAGACCTCTGAAACCGTTCCACCTGCTCACCAAACAACAGCAAAAGGAC
CTCCAACAGAAAATGAGGCAGGCCATAAGGCATCAAAGCCAAATGAAACTGAGTCTAACAAGGC
AGAAGGGGTTCCTAAGAAGGAAGAGGAAGTGCCTCAAGAAGGAAAAGGAGATGAGAAAGGTGT
CCATACCTCCGTTAAAGCAAAGGCGGAAGGCACAGCGAATGAGGCATCATTCTCTGCTTACTCAG
TGAGAGTGGCCACAGCATTTTTGGCCCTTTTGTCTGTAATGTAA

中国兽医协会 CVMA

附 录 J
（规范性附录）
吉氏巴贝斯虫 SA1 重组抗原的制备

J.1 器械与设备

细胞破碎仪、恒温摇床、制冰机、紫外分光光度计。

J.2 材料

引物 ExpSA1-F -F/ ExpSA1-R（20 μmol/L）， *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶，T4 DNA 连接酶，琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒，克隆载体 pETASY-Blunt，表达载体 pET-28a，感受态大肠杆菌 DH5α，感受态大肠杆菌 BL21，卡那霉素，异丙基-β-D 硫代吡喃半乳糖苷（IPTG），His 标签蛋白纯化试剂盒，LB 培养基，一次性针头滤器（孔径 0.45 μm），蛋白浓缩管。

J.3 引物序列

表 J.1 扩增吉氏巴贝斯虫 SA1 基因表达片段的引物

目的基因	引物	序列	酶切位点
SA1	ExpSA1-F	5'-GGATCCACACAAATAACAACACCTG-3'	*Bam*H I
	ExpSA1-R	5'-CTCGAGTTACATTACAGACAAAAGGG-3'	*Xho* I

ExpSA1-F 和 ExpSA1-R 引物对扩增吉氏巴贝斯虫 SA1 表达片段大小为 1719 bp。

J.4 表达载体的构建和鉴定

J.4.1 吉氏巴贝斯虫表达片段的扩增

引物用 Exp SA1-F 和 ExpSA1-R，DNA 模板用吉氏巴贝斯虫标准阳性基因组 DNA，反应体系为 25 μL，加样比例见附录 G 中 G.1，反应条件为 95℃预变性 3 min，95℃变性 15 s，53℃退火 20 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；72℃延伸 5 min，15℃保温。扩增结束后，用商品化琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收合适大小的 PCR 产物。

J.4.2 双酶切

用 20 μL 酶切体系：J.4.1 回收的 10 μL 吉氏巴贝斯虫 SA1 基因 PCR 产物或 pET-28a 质粒，10×酶切缓冲液 2 μL，*Bam*H I 和 *Xho* I 各 1 μL，ddH_2O 6 μL，37℃酶切 30 - 60 min。并回收酶切产物。

J.4.3 重组质粒的构建与转化

用 20 μL 连接体系：J.4.2 酶切回收的吉氏巴贝斯虫 SA1 基因片段 9 μL，双酶切回收的质粒 pET-28a 片段 3 μL，T4 DNA 连接酶 1 μL，10×连接缓冲液 2 μL，ddH_2O 5 μL。25℃水浴连接 40 min。将连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5α，操作步骤根据说明书进行。

J.4.4 阳性菌株的鉴定

将 J.4.3 筛选的阳性菌液送相关公司测序，测序结果正确的菌株菌液转入 BL21 用于重组抗原表达。

J.5 蛋白表达和纯化

中国兽医协会 CVMA

J. 5. 1 取 J.4.4 吉氏巴贝斯虫 SA1 阳性菌株菌液，按 1：100 的比例接种到含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中，37℃ 180 rpm/min 振荡培养至菌液 OD_{600} 为 0.6 - 0.8。加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG，37℃振荡培养 4 h。

J. 5. 2 将诱导培养的菌液分装到离心管中，在 4℃下 8000 rpm 离心 10 min，弃上清液。

J. 5. 3 沉淀用 His-binding Buffer 重悬到 50 mL 离心管中。将离心管垂直置于碎冰，于 4℃，1000 bar 压力破碎仪上破碎 3-5 次。

J. 5. 4 将 J.5.3 压力破碎的菌体裂解物在 4℃以 12000 rpm/min 离心 10 min，取上清液用 0.45 μm 滤器过滤。滤过液用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化重组蛋白。

J. 5. 5 将纯化后的蛋白溶液装入处理好的透析袋中，用 PBS（pH 7.5）在 4℃透析 4 h - 5 h，重复该透析步骤 3 次。

J. 5. 6 将透析后的蛋白转入蛋白浓缩管，于 4℃ 4000 rpm 离心，用紫外分光光度计测定蛋白浓度，待浓缩管中蛋白浓度大于 1 mg/mL 时停止离心。

J. 5. 7 浓缩的重组蛋白分装于 1.5 mL 离心管，每支 1.0 mL，置于-20℃保存。

中国兽医协会
CVMA

附 录 K
（规范性附录）
标准阴性对照血清的制备

K.1 实验动物选择

选取健康无病原感染的比格犬，按照第6章和第7章的要求进行血涂片检查和PCR检测，两种方法均为阴性时符合要求。

K.2 血清抗体检测

采集符合K.1要求的犬耳尖静脉血1 mL，分离血清。以附录M制备的BgSA1抗体检测试纸条，检测犬血清中抗吉氏巴贝斯虫的抗体。当出现8.7.2结果时符合要求。

K.3 标准阴性血清的收集

将符合K.2要求的犬颈动脉放血至死亡，无菌收集全部血液，或采集需要量的静脉血，分离血清。该血清即为标准阴性对照血清，分装于不同规格的血清瓶或离心管，置于-20℃冰箱保存备用。

中国兽医协会
CVMA

附 录 L
（规范性附录）
标准阳性对照血清的制备

L.1 实验动物选择

选择符合K.1和K.2要求的犬，用于制备吉氏巴贝斯虫标准阳性对照血清。

L.2 吉氏巴贝斯虫感染

将已知染虫率的吉氏巴贝斯虫培养物进行2800 g 2 min离心，取下层10^7个染虫红细胞于无菌EP管中，加入1 mL生理盐水混匀。选择符合L.1要求的比格犬，进行保定，随后对注射位点消毒，将含10^7个染虫红细胞的混合液于背部分5 - 6点进行皮下注射。

L.3 抗体检测

每天定时检测感染犬体温，并采耳尖血制作血涂片，姬姆萨染液染色后镜检计算染虫率。采集犬静脉血1 mL，分离血清。用BgSA1抗体检测试纸条，检测L.2分离的感染前血清和感染后血清中的吉氏巴贝斯虫抗体。当感染前血清出现8.7.2结果，感染后血清出现8.7.1结果时符合要求。

L.4 标准阳性血清收集

将符合L.3要求的犬颈动脉放血至死亡，无菌收集全部血液，或采集需要量的静脉血，分离血清。该血清即为吉氏巴贝斯虫标准阳性对照血清，分装于不同规格的血清瓶或离心管，置于-20℃冰箱保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附 录 M
（资料性附录）
抗体检测试纸条的制备

M.1 SA1 重组抗原的制备

见附录J。

M.2 单克隆抗体制备

羊抗鼠IgG：用纯化的鼠免疫球蛋白免疫山羊后，取羊的B淋巴细胞，利用杂交瘤技术，通过细胞融合，筛选制成羊抗鼠抗体。该抗体用于胶体金试纸条硝酸纤维素膜（NC膜）的质控线，以此检验试纸条的有效性。

M.3 多克隆抗体制备

鼠抗犬IgG：用纯化的犬免疫球蛋白免疫小鼠后，取小鼠的B淋巴细胞，利用杂交瘤技术，通过细胞融合，筛选制成鼠抗犬抗体。该抗体可与金标抗原-吉氏巴贝斯虫抗体复合物结合，形成夹心抗原抗体复合物，用于胶体金试纸条硝酸纤维素膜（NC膜）的捕获。

M.4 金标抗原制备

用氯金酸制备40 nm胶体金颗粒，将SA1重组抗原与胶体金颗粒按照10 μg/mL进行标记，标记完后用配方为2% Tris，4% Casein的封闭液进行封闭。标记好的金标抗原用高速离心法进行纯化，去除游离抗原和蛋白及其它小分子物质。沉淀采用0.242% Tris，1% BSA的复溶液重悬，置2 ~ 8℃保存。

M.5 胶体金结合垫制备

将重悬好的金标记抗原溶液从冰箱中取出恢复至室温，用辅料切条机将玻璃纤维素膜切成（8.5 cm*30 cm）的规格，将制备的金标抗原喷涂于切好的玻璃纤维膜条上，37℃烘箱烘12~18个小时，即制成胶体金结合垫。

M.6 胶体金样品垫制备

样品垫浸泡于0.6% Tris，0.5% Casein，1% PVP30，1% S9，0.5% Toween-80，0.3% EDTA的处理液中，在45℃的烘箱中烘12~18个小时后，切成15 mm宽度，即制成胶体金样品垫。

M.7 试剂条板制备

中国兽医协会 CVMA

将处理好的胶体金样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜（NC膜）、吸水垫纸按顺序依次粘贴在试剂条板上。吸水垫与硝酸纤维素膜（NC膜）应重叠2 ~ 3 mm，胶体金结合垫搭在硝酸纤维素膜（NC膜）上重叠1 ~ 2 mm，胶体金样品垫搭在胶体金结合垫上重叠2 ~ 5 mm，制成试纸条板。

M.8 NC膜喷样

在制备好的试纸条板的NC膜上分别喷涂捕获抗体（鼠抗犬IgG抗体）和质控抗体（羊抗鼠IgG抗体），线宽1 mm，喷完后在45℃的烘箱中烘12~18个小时。

M.9 试剂条板切条和试纸条组装

将NC膜喷有抗体的试纸条板切成3.5 mm ± 0.2 mm的试纸条放入塑料卡壳内，立即放入内置干燥剂的铝箔袋内封口。

中国兽医协会
CVMA

附 录 N
（规范性附录）
抗体检测试纸条检测结果示意图

标引序号说明：
A——吉氏巴贝斯虫抗体阳性
B——吉氏巴贝斯虫抗体阴性

图N.1 BgSA1抗体检测试纸条检测结果示意图

中国兽医协会 CVMA