

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）

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

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。

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

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。

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 μ L - 10 μ L；10 μ L - 100 μ L；100 μ L - 1000 μ L）。

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°C - 8°C冰箱中放置2 h。4°C 3000 g离心10 min，收集上清于1.5 mL离心管中，于 -20°C保存或送检。

8.6 操作步骤

取待检血清样品40 μ L - 60 μ L（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

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。

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 ₂ EDTA·2H ₂ O	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 ₂ PO 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。

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
GGCGTTTAATACTGCCGAGGAAGAATATAAGAAGAACTAGTTCACCTCCTTCCACTTTACAA
GGTGAATCCTTTCAAAGACGTCTGGATTCATTTTAAGGAAGGTGTTAAGAATGTTGCTGAATT
GTATGCTGTGTTACTTCGTGTCCCCCAATCTACAGCAACCCCTGCCGGTACGTTTATATATTCA
CGATTCATTACCTTAGCAGATGAAGAGAGAAAGCCTTCTGCCTCTTTACAGAATCTGTTGGATA
TCGCTTTAAATGCAACAGGTGATGCTCTGCACATTGCAGATAAGGCTGTGAAGACTGTCATTG
GAATAGAGATAAAGGATGGTGTGTTTTAAATGCGACGCTTGAAAATGCTGAGCTTCTGTCTGAAG
TCCTGCCGGAGTTCTTTGAAAACTTTTGGAGTTCAAAAAGGTGGTTGAGGATGCGTATGCCC
CTGAATCCCAAGTTGATGGTGGTAAGTTATTCACACGACTTGGTCACAGCCCCGTTGAACCCT
ACTTGAAGAATCACGGTTTTCAAAGATGGAGATTTTAAACGTGAAGCTTCATTAAGATTGTA
GAAAGAACTTATAGAGCTAGTTGACACTGGTAAGCATTTTCAGGAGGTCCTGGGCGTGCTTG
CCGCAGATGCACTTATGCGAACTCCAGATGGCCCAATGAGAAAACAAGCATGGCTCTTTTTAT
TGTCAGTACAATGCATAACGAAGCTATGAAGGAGAGGCTTAAGGATGCCGTAAACAAAGTA
ACCGGTAAAGGAGATACCTTTGTAGAGGAAGTGAAGAACTGGGACCACAAATTAAGCTTCC
CAAGGAAAAGACTCCCAAAGGATACCTTTTCCCCGGTGAATATGTAACTGCGATGTTTCATCA
CTTCTGGACTGTGTTAACTGGGGTATTTGGTACCATACTTGACGATATAAGTAAAGCGGCCCCC
ACTGCAAAAAGTGGAGGGGGTGTGTTGTCCCCCAGGAGTTAGCTGACCTTGTCAAGGTGCAAG

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

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。

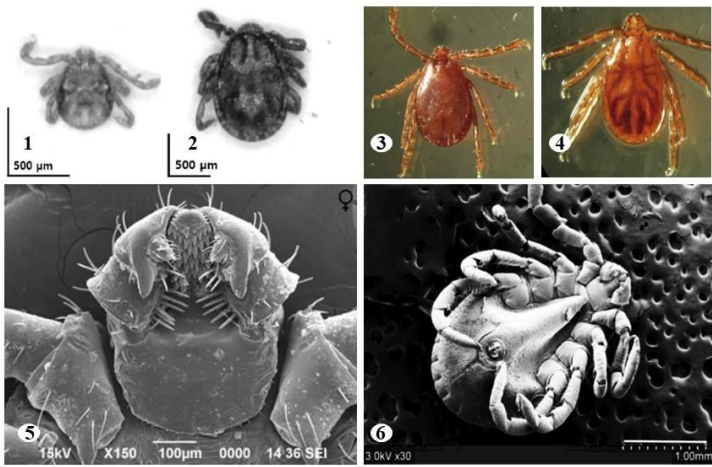
D.1.2 镰形扇头蜱

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。



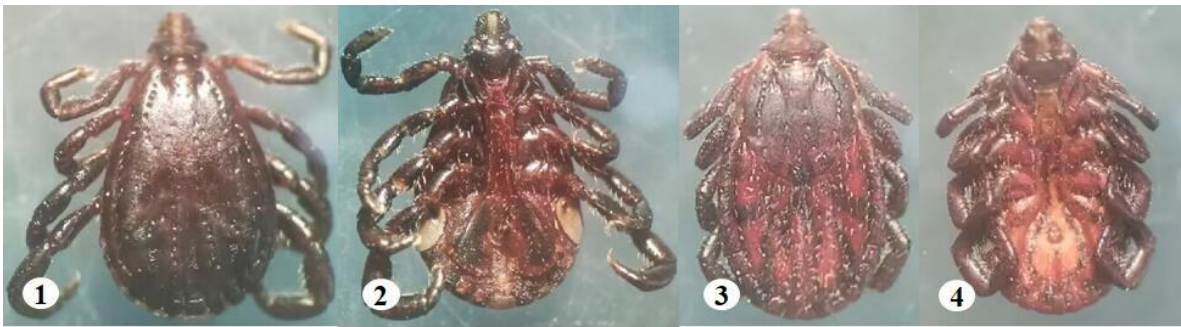
标引序号说明:

- 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

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/625224030142011231>