

中华人民共和国国家标准

GB/T 18647—2020
代替 GB/T 18647—2002

动物球虫病诊断技术

Diagnostic techniques for animal coccidiosis

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18647—2002《动物球虫病诊断技术》。本标准与 GB/T 18647—2002 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- “范围”部分增加了家畜(猪、牛、羊、马等)和宠物(犬、猫等)(见第 1 章);
- 增加了“临床诊断”部分(见第 3 章);
- “病原检查”部分增加了“样品采集、保存和运输”(见 4.2);
- “定性检查”和“定量检查”部分增加了不同动物粪便处理的方法(见 4.3.1.2 和 4.3.2.3);
- “定性检查”阴性结果判定部分根据不同动物修改了需要连续检查粪便天数[见 4.3.1.8 b), 2002 年版的 2.2.1.8 b)];
- “定量检查”部分增加了不同动物粪便采集量以及卵囊 OPG 的换算方法(见 4.3.2.2, 4.3.2.7~4.3.2.9);
- “病理检查”中裂殖子/裂殖体检查部分增加了对兔肝脏和鸭、鹅肾脏的检查(见 5.3.1);
- 增加了结果“综合判定”部分(见第 6 章);
- “球虫卵囊形态特征”部分增加了不同属球虫卵囊的大小和模式图(见附录 B)。

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。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院上海兽医研究所。

本标准主要起草人:董辉、黄兵、韩红玉、陈兆国、赵其平、朱顺海。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18647—2002

引 言

球虫病(coccidiosis)是多种动物的一种重要寄生虫病,各国均有发生,对家畜、家禽、宠物、鱼类和野生动物等均有不同程度的危害,特别在集约化养殖中,若控制不严,会造成重大经济损失。本病对家禽和兔危害较大,急性暴发的死亡率可超过30%;其次是猪、牛、羊等家畜,急性感染常引起下痢,生长严重受阻;犬、猫球虫病也较为常见,可引起消瘦、贫血、腹泻及生长发育受阻,严重时可导致死亡;也偶有鱼类和野生动物发生球虫病的报道。

本病的病原为顶复器门(Apicomplexa)、类椎体纲(Conoidasida)、真球虫目(Eucoccidiorida)、艾美耳科(Eimeriidae)中的艾美耳属(*Eimeria*)、等孢属(*Isospora*)、泰泽属(*Tyzzeria*)、温扬属(*Wenyonella*)球虫。每种动物都有各自特有的球虫种类,文献记录的畜禽和野生动物球虫种类已达2 000多种。国内外对球虫病的经典诊断方法是病原检查,并结合临床症状和病理剖检进行综合诊断。尽管国内外学者建立了免疫学、血清学和分子生物学等多种诊断技术,如色素试验法、子孢子制动反应、间接血凝试验、免疫荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫细胞化学技术、随机引物扩增多态性DNA(RAPD)和聚合酶链式反应(PCR)等,但由于这些方法检出的准确性和操作复杂等问题,尚不能代替现有方法。

病原检查和综合诊断技术仍是目前最常用的方法。综合诊断主要用于发病或死亡后的诊断,确定动物或动物群是否因感染球虫而发病或死亡。病原检查简单、易行,既可定性,又可定量,既可用于发病前,又可用于发病后,以确定动物或动物群感染球虫的程度。病原检查可广泛用于流行病学调查、防治药物的筛选和临床验证、进出口检疫、无本病健康动物群的建立等。

为了规范球虫与球虫病的检疫方法,使得检出结果客观、准确、一致,以保证《中华人民共和国动物防疫法》的实施,特制定本标准。

动物球虫病诊断技术

1 范围

本标准规定了动物球虫病的临床诊断、病原检查、病理检查、综合判定的技术要求。

本标准适用于家禽(鸡、鸭、鹅等)、家畜(猪、牛、羊、马、兔等)、宠物(犬、猫等)球虫病(感染)的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

NY/T 541—2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 临床诊断

根据发病临床特征,球虫病可分为急性型和慢性型。

急性型多发生于幼龄动物,病程初期表现为精神沉郁,嗜睡,被毛粗乱,食欲下降,腹泻。病程后期出现运动失调,食欲废绝,排出带血水样稀便,甚至是血便,具恶臭味,可视黏膜贫血、苍白,身体消瘦,甚至失重,最后因脱水、衰竭而死。

慢性型多见于大龄动物,无明显症状,主要表现为厌食,间歇性下痢,逐渐消瘦,生产性能下降等。

有以上临床症状者,可以怀疑为球虫病,确诊需进一步进行病原或病理检查。

4 病原检查

4.1 材料与试剂

4.1.1 试剂:饱和盐水,2.5%重铬酸钾溶液,配制方法分别见附录 A 中 A.1 和 A.2,配制用水符合 GB/T 6682—2008 三级水要求。

4.1.2 器材:样品保存袋、记号笔、防水标签纸、60 目和 100 目铜丝网或尼龙网、100 mL 量筒、50 mL 烧杯、50 mL 离心管、10 mL 玻璃瓶、吸管、镊子、天平、离心机、麦氏虫卵计数板、载玻片、盖玻片、显微镜等。

4.2 样品采集、保存和运输

4.2.1 动物粪便的采集:对家禽、犬、猫、兔等小型动物,若是群体采样,采集新鲜粪便不少于 200 g,若是个体采样,采集新鲜粪便不少 60 g;对猪、牛、羊、马等大型动物,若是群体采样,采集新鲜粪便不少于 300 g,若是个体采样,采集新鲜粪便不少 100 g。

4.2.2 样品的保存:样品采集后置于样品保存袋中,封口后,每份样品的包装袋上均要贴上标签,写明采集地点、采集时间、动物种类、动物年龄、粪便性状等详细资料,置于 2 ℃~8 ℃冰箱内保存。

4.2.3 样品的运输:以最快最直接的途径将所采集的样品送往实验室进行检测,运输条件符合 NY/T 541—2016 要求。

4.3 操作方法

4.3.1 定性检查

- 4.3.1.1 将被检动物或动物群的新鲜粪便充分搅匀后取 10 g,放入 50 mL 烧杯中,加入适量水。
- 4.3.1.2 轻轻搅匀,经 60 目铜丝网或尼龙网过滤;对于猪、牛、羊、马等大型动物,滤液再经 100 目铜丝网或尼龙网过滤。
- 4.3.1.3 将滤液移入 50 mL 试管,2 500 r/min 离心 10 min。
- 4.3.1.4 倾去上清液,沉淀物中加入少量饱和盐水,混匀,将管内的沉淀物混悬液移入 10 mL 玻璃瓶内。
- 4.3.1.5 用饱和盐水加满玻璃瓶,盖上盖玻片(盖玻片应与液面接触),静置 10 min。
- 4.3.1.6 取下盖玻片,将有液体的一面盖在载玻片上。
- 4.3.1.7 置载玻片于显微镜载物台上,用 10×10 或 10×40 的倍数进行检查。
- 4.3.1.8 定性检查的判定标准如下:
- 发现球虫卵囊,判为阳性,说明该动物(群)已感染球虫。将球虫阳性粪样置于 2.5% 重铬酸钾溶液中,在 25 °C~28 °C 环境中培养至孢子化卵囊后,参见附录 B 球虫卵囊形态特征,确定为哪一属的球虫。
 - 未发现球虫卵囊,需从 4.3.1.1 开始重复检查 5 次,仍未见球虫卵囊,该粪样可判为阴性。对于家禽、犬、猫等,需连续采集粪便 7 d~10 d,每天检查,均未发现球虫卵囊,方可说明该动物(群)未感染球虫;而对于猪、牛、羊、马、兔等家畜,需连续采集粪便 14 d~21 d,每天检查,均未发现球虫卵囊,说明该动物(群)未感染球虫。

4.3.2 定量检查

- 4.3.2.1 对定性检查中呈阳性的粪样,需进行定量检查。
- 4.3.2.2 每份粪样取 3 个重复,每个重复根据待检动物种类不同取不同粪便量,家禽、犬、猫、兔等小型动物取粪样 2 g,猪、牛、羊、马等大型动物取粪样 10 g,放入 50 mL 烧杯。
- 4.3.2.3 加入适量自来水搅匀,经 60 目铜丝网或尼龙网过滤,用少量自来水冲洗 3 次~5 次滤网;对于猪、牛、羊、马等大型动物,滤液再经 100 目铜丝网或尼龙网过滤,用少量自来水冲洗 3 次~5 次滤网。
- 4.3.2.4 将滤液移入 50 mL 试管,2 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液。
- 4.3.2.5 用少量饱和盐水将沉淀物搅匀,移入 100 mL 量筒,加饱和盐水至 60 mL 处,充分混匀。
- 4.3.2.6 用吸管吸取混悬液注满麦氏虫卵计数板的 2 个计数室,静置 5 min。
- 4.3.2.7 将麦氏虫卵计数板置于显微镜下检查,用 10×10 的倍数数出每个计数室(1 cm×1 cm×0.15 cm=0.15 cm³)内的所有卵囊数,将两个计数室的卵囊数之和除以 2 即得卵囊平均值。对压线的卵囊,按左、上压线计,右、下压线不计处理。根据每个重复的卵囊平均值,计算出三个重复的平均值 A。
- 4.3.2.8 家禽、犬、猫、兔等动物的每克粪便卵囊数(oocyst per gram, OPG)按式(1)计算,猪、牛、羊、马等动物的 OPG 按式(2)计算:

$$\text{OPG} = (A \div 0.15) \times 60 \div 2 = A \times 200 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{OPG} = (A \div 0.15) \times 60 \div 10 = A \times 40 \quad \dots\dots\dots(2)$$

- 4.3.2.9 对卵囊数较多的粪样,可在 60 mL 总体积的基础上,用饱和盐水再稀释 B 倍后计数,家禽、犬、猫、兔等动物的 OPG 按式(3)计算,猪、牛、羊、马等动物的 OPG 按式(4)计算:

$$\text{OPG} = A \times 200 \times B \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{OPG} = A \times 40 \times B \quad \dots\dots\dots(4)$$

- 4.3.2.10 定量检查的判定标准如下:

- OPG>10×10⁴,为严重感染;



- b) $1 \times 10^4 \leq \text{OPG} \leq 10 \times 10^4$, 为中度感染;
- c) $\text{OPG} < 1 \times 10^4$, 为轻度感染。

5 病理检查

5.1 材料准备

- 5.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS), 配制方法见 A.3, 配制用水符合 GB/T 6682—2008 三级水要求。
- 5.1.2 50 mL 或 100 mL 烧杯、吸管、手术剪刀、镊子、玻片、盖玻片、显微镜、研钵等。
- 5.1.3 疑为发生球虫感染致死或将要死亡的动物。

5.2 病变检查

- 5.2.1 对疑为球虫感染致死或将要死亡的动物进行解剖, 观察病变情况。
- 5.2.2 主要检查球虫寄生部位(器官)的病变。大多数的球虫寄生于肠上皮细胞, 若肠道明显肿大、胀气或变形, 肠浆膜面出现针尖大小、颜色为鲜红色、褐色或白色的斑点或斑块或结节; 肠内容物充满血凝块、脱落的上皮细胞、纤维素样物、黏液等, 呈暗红色、橙黄色或乳白色, 多为稀薄状; 肠黏膜增厚, 有坏死的病灶等, 可疑为球虫病, 进一步做裂殖子、裂殖体或卵囊检查。
- 5.2.3 对兔, 还应检查肝脏; 对鸭、鹅, 还应检查肾脏; 若这些脏器上有灰白色的斑点或斑块, 可疑为球虫病, 进一步做裂殖子、裂殖体或卵囊检查。

5.3 裂殖子/裂殖体检查

- 5.3.1 取病变明显的肠道, 纵向剪开, 用磷酸盐缓冲液轻轻洗去黏膜表层的杂物, 刮取少许黏膜; 对兔或鸭、鹅, 还应分别刮取肝脏或肾脏灰白色的斑点或斑块。
- 5.3.2 将刮取物放在载玻片上, 滴 1 滴~2 滴磷酸盐缓冲液, 加盖玻片, 置于显微镜载物台上。
- 5.3.3 在高倍镜下观察, 如见有大量球形的像剥了皮的橘子似的裂殖体(直径大多为 $10 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$) 和香蕉形或月牙形的裂殖子(大小大多为 $5 \mu\text{m} \sim 8 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m} \sim 3 \mu\text{m}$), 判为球虫感染。

5.4 卵囊检查

- 5.4.1 将病变明显的肠道, 纵向剪开, 取少量内容物, 放在载玻片上, 滴 1 滴~2 滴磷酸盐缓冲液, 加盖玻片, 轻轻将内容物压散, 置显微镜下检查, 若见大量球虫卵囊(形态参见附录 B), 判为球虫感染。
- 5.4.2 或取有灰白色斑点或斑块的肠道, 纵向剪开, 用磷酸盐缓冲液轻轻洗去黏膜表层的杂物, 刮取少许有灰白色斑的黏膜, 放在载玻片上, 滴 1 滴~2 滴磷酸盐缓冲液, 加盖玻片, 轻轻将黏膜内容物压散, 置显微镜下检查, 若见大量球虫卵囊, 判为球虫感染。
- 5.4.3 对疑为兔或鸭、鹅的球虫病, 从有灰白色斑点或斑块的肝脏或肾脏上, 剪取少量病变组织, 放在研钵内, 加适量磷酸盐缓冲液, 充分研磨。取 1 滴研磨液在载玻片上, 加盖玻片, 置显微镜下检查, 若见大量球虫卵囊, 判为球虫感染。

6 综合判定

6.1 疑似

凡出现第 3 章的临床症状和/或符合 5.2 的病变特征, 可判为球虫病疑似病例。

6.2 确诊

凡符合 5.2 的病变特征, 并满足 5.3 和/或 5.4 中检查结果为球虫感染, 或粪便定量检查结果满足 4.3.2.10 中 a) 或 b) 时, 可判为球虫病病例。

附录 A
(规范性附录)
试剂及其配制

A.1 饱和盐水配制

称取 400 g 食盐,放入三角烧瓶中,加入 1 000 mL 水,加热烧瓶至沸腾,充分搅拌后冷却至室温,有少量盐析出,即为饱和盐水,密度约 1.18 g/cm³。

A.2 2.5%重铬酸钾溶液配制

称取 25 g 重铬酸钾固体,放入 1 L 烧杯中,加入开水至 1 000 mL 刻度处,充分搅拌使重铬酸钾完全溶解后,冷却至室温,即为 2.5%重铬酸钾溶液。

A.3 磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制

将下列试剂按次序加入到 1 000 mL 定量瓶中。

氯化钠	8.00 g
氯化钾	0.20 g
磷酸氢二钠	1.44 g
磷酸二氢钾	0.24 g
蒸馏水	800 mL

充分搅匀,用适量 1 mol/L 盐酸(HCl)调溶液的 pH 值至 7.4,再加蒸馏水定容至 1 L。分装至 500 mL 或 250 mL 的玻璃瓶中,在 103.41 kPa 压力下蒸气灭菌 20 min,室温保存。

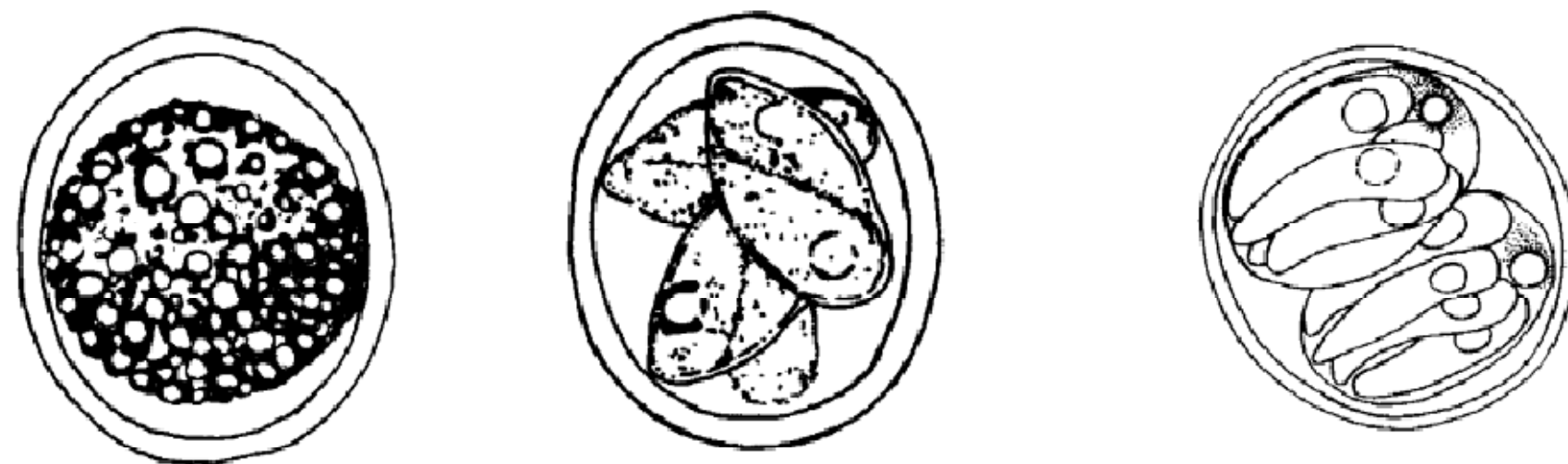
附录 B
(资料性附录)
球虫卵囊形态特征

B.1 球虫卵囊呈椭圆形、圆形、卵圆形或梨形等不同的形态,均有卵囊壁。

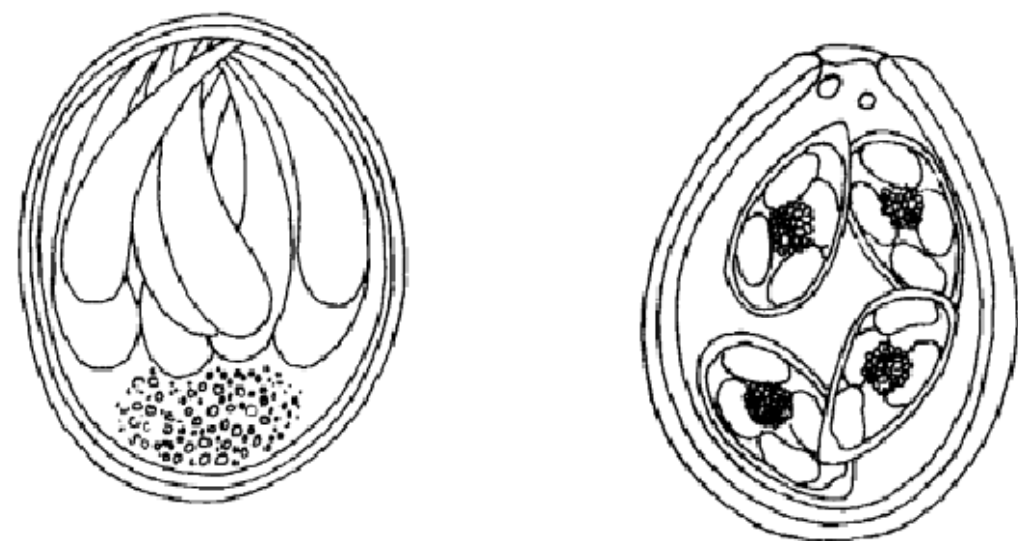
B.2 未发育成熟的卵囊称为未孢子化卵囊,其颗粒状的原生质多数呈圆形,位于卵囊中间[图 B.1 中 a)]。

B.3 发育成熟的卵囊称为孢子化卵囊,因属不同,其内含的孢子囊和子孢子数不相同:

- a) 艾美耳属(*Eimeria*)球虫卵囊内有 4 个孢子囊,每个孢子囊含 2 个子孢子[图 B.1 中 b)],卵囊大小大多为 $(15\ \mu\text{m}\sim 40\ \mu\text{m})\times(10\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m})$ 。
- b) 等孢属(*Isospora*)球虫卵囊内有 2 个孢子囊,每个孢子囊含 4 个子孢子[图 B.1 中 c)],卵囊大小大多为 $(15\ \mu\text{m}\sim 40\ \mu\text{m})\times(10\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m})$ 。
- c) 泰泽属(*Tyzzeria*)球虫卵囊内没有孢子囊,内含 8 个子孢子[图 B.1 中 d)],卵囊大小大多为 $(10\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m})\times(10\ \mu\text{m}\sim 15\ \mu\text{m})$ 。
- d) 温扬属(*Wenyonella*)球虫卵囊内有 4 个孢子囊,每个孢子囊含 4 个子孢子[图 B.1 中 e)],卵囊大小大多为 $(15\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m})\times(10\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m})$ 。



a) 未孢子化卵囊 b) 艾美耳属孢子化卵囊 c) 等孢属孢子化卵囊



d) 泰泽属孢子化卵囊 e) 温扬属孢子化卵囊

图 B.1 不同属球虫卵囊的模式图