

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1950—2010

---

## 片形吸虫病诊断技术规范

**Diagnostic techniques for fascioliasis**

2010-09-21 发布

2010-12-01 实施

---



中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:才学鹏、景志忠、玉佩雅、郭爱疆、靳家声、骆学农、李辉。

# 片形吸虫病诊断技术规范

## 1 范围

本标准规定了片形吸虫病(肝片吸虫病和大片吸虫病)临床诊断方法、病原检查方法和酶联免疫吸附试验免疫学诊断方法。

本标准适用于牛、羊片形吸虫病的诊断、流行病学调查及检疫。

## 2 临床诊断方法

牛、羊患本病时多呈慢性型,主要症状为体态消瘦,食欲减退,颌下、前胸、下腹部水肿,贫血,结膜与口黏膜苍白,生长受阻,产奶量降低,孕畜可能流产。急性型仅偶见于羊,可出现微热,肝脏浊音区扩大,肝部有压痛,有时突然死亡。

病理变化:在急性型时,可见到急性肝炎,肝肿大,包膜有纤维素沉积,有2 mm~5 mm长的暗红色虫道,内有凝固的血液和很小的童虫,常伴有腹膜炎。慢性型时,主要呈现慢性肝炎和慢性胆管炎。早期肝脏肿大,以后萎缩硬化,小叶间结缔组织增生,胆管扩张、肥厚、变粗,呈绳索样突出于肝脏表面。胆管内壁有盐类沉积,内膜粗糙,切时有沙沙声,在牛多见。

本病呈地方性流行,多发生在有中间宿主椎实螺的低洼和沼泽地带的放牧地区。以多雨年份特别严重。感染季节多在夏、秋两季,秋末及冬季发病较多,在温暖和多雨地区则要早些。肝片吸虫在我国各地均有分布,主要感染牛、羊;而大片形吸虫偏于热带或亚热带分布,在我国多发生在南方地区,以感染牛特别是水牛为多见,山羊等亦有感染。

## 3 病原检查

### 3.1 虫卵检查诊断方法

#### 3.1.1 水洗沉淀法(或称彻底洗净法)

##### 3.1.1.1 材料

200 mL 玻璃杯,60 目铜丝筛,玻璃棒,镊子,胶帽吸管,载玻片和盖玻片,天平,显微镜。

##### 3.1.1.2 方法

取新鲜粪便 10 g 放入玻璃杯中,先加 10 mL 水搅成糊状,然后再继续加水 20 倍。经充分混合后,用 60 目铜丝筛网滤入另一玻璃杯中,把滤过的粪便混悬液静置沉淀 30 min 后,倒掉上清液,再继续加水混合,静置沉淀。静置的时间可逐渐缩短,但至少需要 10 min。这样反复进行,直到上清液透明为止。最后吸取沉淀物放在载玻片上,加盖玻片在显微镜下作定性检查。

若作定量检查,须将所有沉淀物全部镜检(不加盖玻片,用低倍显微镜检查),统计全部虫卵数。或按 3.1.2 进行定量检查。

##### 3.1.1.3 结果判定

肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*)虫卵呈长卵圆形,大小为  $116\ \mu\text{m}\sim 132\ \mu\text{m}\times 66\ \mu\text{m}\sim 82\ \mu\text{m}$ (长 $\times$ 宽),黄褐色。前端较窄,有一个不明显的卵盖,后端较钝。卵壳较薄而透明,卵内充满卵黄细胞和一个胚细胞(参见图 A. 1)。

大片形吸虫(*Fasciola gigantica*)虫卵的形态与肝片形吸虫虫卵相似,卵呈深黄色,大小为  $150\ \mu\text{m}\sim 190\ \mu\text{m}\times 75\ \mu\text{m}\sim 90\ \mu\text{m}$ (长 $\times$ 宽)(参见图 A. 2)。

片形吸虫虫卵与前后盘吸虫(*Paramphistomum*)虫卵的形态和大小相似,鉴别要点为:前后盘吸虫

虫卵呈灰白色,有透明感,卵黄细胞松散地分布在卵内,可见到许多空隙。

### 3.1.2 片形吸虫虫卵定量计数法

#### 3.1.2.1 材料

300 mL 带刻度的三角烧瓶,1.6%氢氧化钠溶液,玻璃棒,10 mL 吸管,10 mL 离心管,离心机,饱和盐水,胶帽吸管,镊子,天秤,载玻片和盖玻片,显微镜。

#### 3.1.2.2 方法

羊:称取羊粪 10 g,放入 300 mL 容量的三角烧瓶中,加入 20 mL 1.6%浓度的氢氧化钠溶液(B.1),静置过夜。次日,将粪块搅碎,再加入 1.6%的氢氧化钠溶液到 300 mL 刻度处。再充分摇匀,立即用吸管吸取粪液 7.5 mL 注入离心管内,放离心机内以 1000 r/min 速度离心 2 min,倾去上层液体,换加饱和盐水(B.2),再次离心后,再倾去上层液体,再换加饱和盐水,如此反复操作,直到上层液体完全清澈为止。倾去上层液体后,加清水洗涤,沉淀后弃上清,将沉渣全部分滴于数张载玻片上,用低倍显微镜检查全部所制的载玻片,统计片形吸虫虫卵总数,以总数乘以 4,即为每克粪便中的片形吸虫虫卵数(EPG)。

牛:操作步骤基本同上,但用粪量改为 30 g,加入 50 mL 1.6%的氢氧化钠溶液静置过夜。次日,将粪块搅碎,再加入 1.6%的氢氧化钠溶液到 300 mL 刻度处。加入离心管中的粪液量为 5 mL,最后计得片形吸虫虫卵总数乘以 2,即为每克粪便中的片形吸虫虫卵数(EPG)。

在片形吸虫病诊断中,当牛每克粪便中的虫卵数达到 100 枚~200 枚时、羊达到 300 枚~600 枚时,即应考虑其致病性。

### 3.2 肝脏虫体检查方法

#### 3.2.1 材料

解剖刀,解剖剪,外科剪,挑针,镊子,搪瓷盆,搪瓷盘,搪瓷缸,大平皿,载玻片。

#### 3.2.2 虫体的采集

按一般剖检术式摘出肝脏,再剪断胆管与十二指肠连接部位,要注意观察断端有无虫体流出。将肝脏放搪瓷盘中。首先分离胆囊,单放在大平皿中,剪开囊壁,将胆汁用清水稀释,等自然沉淀后,检查沉淀物中是否有虫体。检查肝脏时,先看肝表面有无病变结节,发现后用剪刀剪取,放在两块载玻片中间做压片检查。然后,沿大胆管及其分支剪开,如发现虫体取出放在盛有清水的平皿中。再沿着与胆管垂直的方向将肝组织切成数大块,注意断面有无虫体或病灶。用手压挤,看是否有虫体被压出。将肝块浸入盛有多量水的搪瓷盆中,用手撕成小块,再挤压每个小肝块,洗净后取出。向搪瓷盆内再加些水进行反复水洗沉淀,检查沉淀物,用平头镊子挑出虫体。挑出的虫体用生理盐水洗净,再放在常温水内或薄荷脑液(B.3)中使虫体松弛。有些虫体的肠管内含有大量食物,可在生理盐水中放置过夜,待其食物消化或排出。

#### 3.2.3 虫体的固定

将松弛了的虫体放在吸水纸上吸干水分,再放在清洁的载玻片上,载玻片两端铺上单层滤纸,盖上另一载玻片,稍加压力将虫体压薄后,用橡皮筋或线绳扎紧,投入 70%酒精内固定。注意投入时,应以一端慢慢浸入,便于将两载玻片之间的空气赶出,固定时间应达 24 h 以上。

#### 3.2.4 虫体染色标本制作方法

采用盐酸卡红染色法,其操作步骤如下:

- a) 虫体的染色:将在 70%酒精内固定好的虫体标本取出,投到盐酸卡红染色液(B.4)中,染色 24 h 以上。尽可能将虫体深染,使虫体的内部器官充分着色。
- b) 虫体的脱色:将虫体自染色液中取出,放入酸酒精(B.5)中脱色,脱色时间一般为 1 h。要随时观察,至颜色深浅分明,即虫体外层呈淡红色、内部构造呈深红色时取出,放于 70%酒精中中和 30 min~60 min。

- c) 虫体的脱水:将脱色好的虫体分别移入 80%、90%、95%、100%酒精中各脱水 30 min~60 min。
- d) 虫体的透明:将虫体先经 1:1 的 100%酒精和二甲苯混合液中透明 30 min,再取出放入纯二甲苯中,待虫体下沉后即可取出封片。用二甲苯透明时,时间不宜过长,否则虫体变硬而脆,不便封片。最好随时透明,随时封片。
- e) 虫体的封片:将透明的虫体放于载玻片上,滴加适量的加拿大树胶(将加拿大树胶用少量二甲苯稀释后再用,这样便于操作),用盖玻片封固,封固时切忌留有气泡在内。待干后直立装入标本盒内待检。

### 3.2.5 结果判定

肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*)虫体扁平,外观呈叶片状,自胆管取出时呈棕红色,固定后变为灰白色。体长 20 mm~40 mm,宽 8 mm~13 mm。其长度是宽度的两倍。虫体前端呈圆锥状的头椎。头椎后方变宽为肩部,肩部以后逐渐变窄,末端较尖。体表生有许多小刺。口吸盘位于头椎的前端,在头椎基部稍后方为腹吸盘。在口吸盘与腹吸盘之间有生殖孔(参见图 A.3)。肠管的外侧枝特别发达,内侧枝短,睾丸纵侧枝位于虫体的中后部,约占整个虫体的 2/3(参见图 A.4)。

大片形吸虫(*Fasciola gigantica*)外观呈长叶状,两侧比较平行,体长 33 mm~76 mm,宽 5 mm~12 mm,其长度超过宽度至少 3 倍。肩不明显或无肩,虫体前后的宽度变化较小,末端钝圆(见图 A.5)。肠管的外侧枝与肝片形吸虫的相同,但内侧枝发达,且有再分枝,睾丸偏于虫体的前半部,约占整个虫体的 1/2(见图 A.6)。

## 4 酶联免疫吸附试验诊断方法

### 4.1 材料准备

#### 4.1.1 器材

ELISA 反应板,酶联免疫检测仪,移液器。

#### 4.1.2 试剂

二抗—酶标记复合物、牛血清白蛋白(BSA)。

#### 4.1.3 片形吸虫 ELISA 抗原的制备

从感染片形吸虫牛羊的胆管中收集新鲜的虫体,将其洗涤后冻干研磨,取 500 mg 加入 100 mL 乙醚中,浸泡 7 d 后用 3 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,然后用抽气机将乙醚抽干,再加入 0.15 mol/L PBS (pH7.2)(C.1)20 mL 放 4℃ 浸泡一周,反复冻融五次,在冰上用超声波破碎仪以每次 10 s 间隔 8 s 超声,处理总计 20 min。12 000 r/min 离心 20 min。然后,将上清用饱和硫酸铵法沉淀,即 1 份抗原加 2 份饱和硫酸铵(C.2)4℃ 处理 2 h,4 000 r/min 离心 30 min。再将沉淀用 PBS 溶解,以上法再沉淀浓缩 1 次,沉淀物用 0.15 mol/L PBS (pH7.2)制成悬浮液,用 0.01 mol/L PBS(pH7.2)(C.3)4℃ 透析,每 8 h 换液 1 次,检查无铵根离子后,即可取出。虫体可溶性透析产物再经 Sephadex G-200 层析柱层析,取其洗脱第一峰作为酶联免疫吸附试验的目标抗原成分。测定蛋白含量,用抗原包被稀释液(C.4)稀释成 20 μg/mL 作为包被抗原的工作浓度。

#### 4.1.4 阴、阳性血清的制备

##### 4.1.4.1 阳性血清的制备

用实验室培育的牛、羊源片形吸虫囊蚴分别人工感染牛、羊(每头牛感染 500 个,每只羊感染 180 个),感染后 10 周从其颈静脉采血分离血清,经血凝试验效价为 1:640 以上者作为阳性对照血清,阳性血清经 56℃ 30 min 灭活后按 0.1% 含量加入 NaN<sub>3</sub>, -20℃ 保存备用。

##### 4.1.4.2 阴性血清的制备

来自片形吸虫非疫区的健康牛、羊,经粪便检查无片形吸虫虫卵后,颈静脉采血,分离血清,经血凝试验反应为阴性者,作为阴性对照血清,保存方法同阳性血清。

4.1.5 待检血清

从牛、羊颈静脉采血,分离血清,编号,放-20℃待用。

4.2 方法

4.2.1 抗原包被

用移液器加工作浓度抗原,每孔 100 μL 至 ELISA 反应板各孔内。加盖后,置 4℃ 过夜。

4.2.2 洗涤

将 ELISA 反应板取出,用力甩净包被过夜的抗原,每孔加洗涤液(C.5)300 μL 浸泡 3 min,用力甩出洗涤液,倒置在纱布或吸水纸上轻轻拍扣,使孔内液体充分流出,重新加入洗涤液,按同样方法共洗涤 3 次。

4.2.3 封闭

加封闭液(C.6),每孔 200 μL 放 37℃ 感作 1 h 后,取出洗涤 3 次(同上 4.2.2)。

4.2.4 血清的稀释

用稀释液将待检血清、标准阴、阳性血清均作 1 : 200 倍稀释。

4.2.5 加样

按酶标板使用格式图加样。将稀释好的每份待检血清每孔 100 μL,加两孔;标准阴性血清(E<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>)二孔、阳性血清(G<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>)二孔,每孔 100 μL;空白对照孔(A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>)和酶复合物对照孔(C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>)每孔加 100 μL 稀释液。加盖,于 37℃ 感作 1 h。洗涤方法同 4.2.2。

4.2.6 加二抗—酶标记复合物

用稀释液将二抗—酶标记复合物按其说明书稀释至工作浓度,每孔加入 100 μL,但空白对照孔只加相应的稀释液。加盖后于 37℃ 感作 1 h。

4.2.7 加底物

每孔加现配制的底物溶液(C.7)100 μL,于 37℃ 感作 30 min。

4.2.8 终止反应

每孔加终止液(C.8)50 μL。

表 1 酶标板使用格式

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空白对照	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
B	空白对照	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C	二抗对照	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
D	二抗对照	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
E	阴性对照 N	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
F	阴性对照 N	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
G	阳性对照 P	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
H	阳性对照 P	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44

注:牛、羊待检血清样品稀释度为 1 : 200,标准阳性、阴性血清稀释度为 1 : 200。每份血清样品重复两孔。

4.2.9 测定 OD<sub>492nm</sub> 值

用酶联免疫检测仪测定光密度吸收值 OD<sub>492 nm</sub>,以空白对照孔调零,测定每孔待检血清孔 OD 值。求出每份被检血清 2 孔的 OD 值(P),除以同板标准阴性血清 2 孔的平均 OD 值(N),则得出每份被检血清的 P/N 值。

4.3 结果判定

在标准阴性血清 OD 值在 0.4 以下、标准阳性血清 OD 值大于 1.0 时,测定结果方为有效;否则,应查明原因,重做。待检血清的 OD 值大于或等于标准阴性血清 OD 值 2.1 倍以上(P/N ≥ 2.1)者,判定

为阳性反应；待检血清的 OD 值小于或等于标准阴性血清 OD 值 1.8 倍 ( $P/N \leq 1.8$ ) 为阴性；二者之间为可疑。

用本检测技术诊断时，检测为阳性结果者，应结合当地疫病流行情况及粪便检查技术和动物剖检技术检查结果与血吸虫和细颈囊尾蚴病做鉴别诊断。

附录 A  
(资料性附录)  
片形吸虫虫卵与虫体的形态图

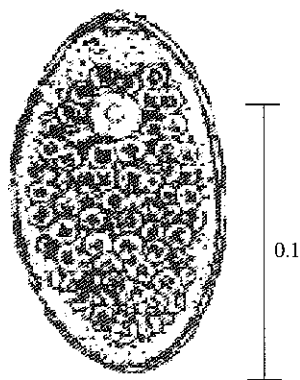


图 A.1 肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*)  
虫卵(单位:mm)

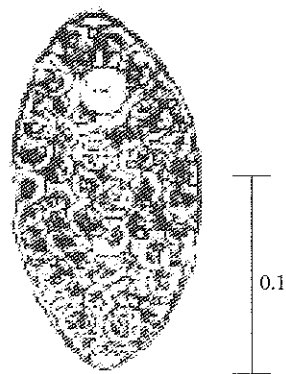


图 A.2 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*)  
虫卵(单位:mm)

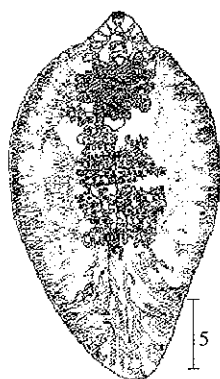


图 A.3 肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*)  
成虫(单位:mm)

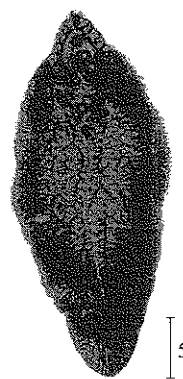


图 A.4 肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*)  
染色标本(单位:mm)

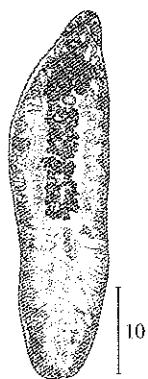


图 A.5 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*)  
成虫(单位:mm)



图 A.6 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*)  
染色标本(单位:mm)



**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**虫卵检查液的配制**

**B.1 1.6%氢氧化钠溶液的配制**

氢氧化钠:1.6 g,加入蒸馏水定容至 100 mL,溶解后即成。

**B.2 饱和盐水的配制**

将食盐加入热水内,不断搅拌,直到食盐不再溶解为止(100 mL 约需 37.5 g 食盐,浓度约为 37.5%,比重约为 1.20)。

**B.3 薄荷脑液的配制**

取薄荷脑 24 g,溶于 95%酒精 10 mL 中,制成薄荷脑饱和酒精溶液,使用时将此液一滴,加入 100 mL 水中即可。

**B.4 盐酸卡红的配制**

取蒸馏水 15 mL 加盐酸 2 mL,煮沸。趁热加入卡红染粉 4 g,再加入 85%酒精 95 mL,再滴加浓氨水 1 滴~2 滴以中和。待出现沉淀,放冷,过滤,其滤液即为盐酸卡红染液。

**B.5 酸酒精的配制**

70%酒精 100 mL,加浓盐酸 2 mL。

附录 C  
(规范性附录)  
ELISA 反应液的配制

C.1 磷酸盐缓冲液 0.15 mol/L (pH7.2)

甲液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  53.7 g, 加无离子水至 1 000 mL;  
乙液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20.4 g, 加无离子水至 1 000 mL。  
0.85 g NaCl 溶于 76.1 mL 甲液与 23.9 mL 乙液的混合物中。

C.2 饱和硫酸铵

硫酸铵 760 g, 加无离子水至 1 000 mL, 加温溶解(不超过 80℃)。室温放置后, 用少量浓氨水调 pH 至 7.2~7.4。在室温下有少量硫酸铵析出, 其上清液即为饱和硫酸铵。

C.3 磷酸盐缓冲液 0.01 mol/L (pH7.2)

甲液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.58 g, 加无离子水至 1 000 mL;  
乙液:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.56 g, 加无离子水至 1 000 mL。  
8.5 g NaCl 溶于 720 mL 甲液与 280 mL 乙液的混合物中。

C.4 抗原包被稀释液(0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液)

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  (无水碳酸钠) 1.6 g,  $\text{NaHCO}_3$  (碳酸氢钠) 2.9 g, 加无离子水至 1 000 mL。

C.5 稀释液、洗涤液(pH7.2 磷酸盐缓冲液-吐温 20)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
KCl	0.2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 g
NaCl	8.0 g
吐温 20	0.5 mL

加无离子水至 1 000 mL。

C.6 封闭液

0.5% 牛血清白蛋白(BSA): 0.5 g 牛血清白蛋白加不含吐温 20 的磷酸盐缓冲液至 100 mL。

C.7 底物溶液

甲液: 0.1 mol/L 柠檬酸 4.2 g/200 mL;  
乙液: 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  14.3 g/200 mL。  
取 24.3 mL 甲液与 25.7 mL 乙液混合, 用前加 20 mg 邻苯二胺(OPD), 加 30% 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 40  $\mu\text{L}$ 。

C.8 终止液

2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液:取分析纯浓硫酸 11.8 mL,加水至 100 mL。

---