

团 体 标 准

T/CVMA 267—2025

乳突类圆线虫感染诊断技术

Diagnostic techniques for *Strongyloides papillosus* infection

2025-7-10 发布

2025-7-10 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国团体

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专利的责任。

本文件由中国兽医协会团体标准技术委员会兽医寄生虫病防治分委会提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：南京农业大学、岳阳职业技术学院、江苏农林职业技术学院。

本文件主要起草人：严若峰、李祥瑞、徐立新、宋小凯、陆明敏、许永得、李泽华、卜永谦。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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的临床、病原学和分子生物学诊断技术。
本文件适用于牛羊等反刍动物乳突类圆线虫感染的诊断。

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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

乳突类圆线虫病 strongyloidosis caused by *Strongyloides papillosus*

由乳突类圆线虫寄生于牛羊等反刍动物小肠黏膜内引起的以贫血、消瘦、腹泻为主要临床症状的一种寄生虫病。

3.2

乳突类圆线虫感染 infection of *Strongyloides papillosus*

由乳突类圆线虫寄生于牛羊等反刍动物小肠黏膜内但不表现出临床症状的一种寄生虫感染。

4 缩略语

下列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 试剂、耗材和设备

5.1 试剂

卢氏碘液、生理盐水、饱和氯化钠溶液、50×TAE缓冲液、1×TAE缓冲液、10 mg/mL溴化乙锭、1.0 % 琼脂糖凝胶、6×加样缓冲液等。本文件中所使用的试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682的要求。试剂制备或配置方法按照附录A进行。

5.2 耗材

载玻片、盖玻片、平皿、PCR反应管、搪瓷盆、塑料盆、烧杯、试管、40目网筛、挑虫针、毛笔、吸管等。

5.3 仪器

微量移液器、离心机、培养箱、光学显微镜、体视显微镜、PCR仪、紫外分光光度计、电泳仪等。

6 临床诊断

6.1 临床症状

6.1.1 轻度感染

临床症状不明显，幼畜生长发育迟缓。

6.1.2 感染初期

第三期幼虫穿过皮肤移行到肺，引起湿疹、咳嗽、呼吸困难。严重感染的动物可因极度衰弱而死亡。

6.1.3 成虫寄生阶段

动物常表现出贫血、消瘦、腹泻等症状。

6.2 流行特点

6.2.1 易感动物

牛羊等反刍动物，幼龄动物较成年动物易感。

6.2.2 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乳汁感染。

6.2.3 流行季节

夏季和雨季流行较普遍，圈舍清洁卫生不良且潮湿时易于流行。

6.3 结果判定

动物出现6.1.3临床症状且符合6.2.1流行特点，判为疑似乳突类圆线虫病。疑似病例应使用病原学或分子生物学诊断方法进一步诊断。

7 病原学诊断

7.1 虫卵检查

7.1.1 粪便样品准备

样品采集应符合NY/T 541的要求。取待检动物新鲜粪便10 g，置于烧杯，加入50 mL饱和氯化钠溶液，混匀，用40目筛过滤至另一烧杯中。将滤液分装到2~3支试管中，液面略高于试管口但不溢出，将盖玻片盖在试管口液面上，静置15 min后取下盖玻片，放在载玻片上，显微镜下检查。

7.1.2 显微镜检查

用光学显微镜于10×10倍镜下检查盖玻片内所有视野，观察是否有虫卵。乳突类圆线虫虫卵大小为42 μm~60 μm×25 μm~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。虫卵形态见附录B中图B.1和附录C中图C.1第7号图。

7.1.3 结果判定

7.1.3.1 疑似阳性

显微镜检查过程中观察到1个及以上的虫卵，且虫卵形态结构符合7.1.2的描述。判定为疑似阳性，应使用7.2或第8章规定的方法进一步诊断。

7.1.3.2 阴性

未观察到虫卵，或观察到虫卵但虫卵形态特点不符合7.1.2的描述。

7.2 幼虫检查

7.2.1 幼虫孵化

样品采集应符合NY/T 541的要求。取待检动物新鲜粪便20 g，塑成半球形，放在平皿中，加少许水（如果粪便已很稀，不用加水），盖上平皿盖，在28℃温箱中培养6 h。将粪汁吸至载玻片上，加盖玻片，显微镜下检查。

7.2.2 显微镜检查

用光学显微镜在10×10倍镜下观察。发现具有运动能力的幼虫，滴加卢氏碘液使幼虫死亡，使用显微镜测微尺测量幼虫大小（测量方法见附录D）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 μm~400 μm，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见附录B中图B.2。

7.2.3 结果判定

7.2.3.1 阳性

发现符合7.2.2所描述特点的幼虫。

7.2.3.2 阴性

未观察到幼虫，或观察到幼虫但其形态特点不符合7.2.2的描述。

7.3 成虫检查

7.3.1 成虫采集

样品采集应符合NY/T 541的要求。成虫样品采集按以下操作步骤进行：

- a) 取待检动物小肠，将肠内容物倒入大烧杯或其他容器中，肠黏膜用生理盐水清洗并用载玻片刮取黏膜；
- b) 肠黏膜刮取物、冲洗物和肠内容物全部转移至搪瓷盆或塑料盘中，加入其体积 5 倍以上的生理盐水，用玻璃棒缓慢搅拌 2 min 使充分混匀，静置 15 min ~ 20 min；
- c) 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；
- d) 分批取少量沉淀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，发现虫体用毛笔蘸取或用吸管吸出，进行形态观察；
- e) 如此反复，至所有沉淀物全部检查完毕。

7.3.2 显微镜检查

将虫体用生理盐水清洗干净，转移至载玻片上，滴加生理盐水至覆盖整个虫体，加盖玻片。用体视显微镜在2×10倍镜下进行形态观察。寄生性乳突类圆线虫雌虫呈毛发状，长4.38 mm ~ 5.92 mm，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B中图B.3。

7.3.3 结果判定

7.3.3.1 阳性

发现虫体且虫体形态符合7.3.2描述的特点。

7.3.3.2 阴性

未发现虫体，或发现虫体但其形态特点不符合7.3.2的描述。

8 分子生物学诊断

8.1 样本 DNA 提取

样品采集应符合NY/T 541的要求。按照DNA提取试剂盒说明书提取粪便样品或虫体样品DNA，用紫外分光光度计测量DNA样品的吸光值 A_{260} ，样品DNA浓度的计算见公式（1）。样品DNA稀释至200 ng/ μ L备用。

$$\text{样品DNA浓度} = 50 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{样品稀释倍数} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A_{260} ——紫外分光光度计测量的 DNA 样品的吸光值。

8.2 引物

以类乳突类圆线虫18S rDNA基因序列（见附录E）设计PCR扩增引物，引物序列见附录F中表F.1。

8.3 反应体系

PCR反应体系见附录F中表F.2。

8.4 反应程序

PCR反应程序见附录F中表F.3。

8.5 PCR产物电泳和成像

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EB的1.0%琼脂糖凝胶点样孔中，在1×TAE缓冲液中，5 V/cm电泳约20 min，凝胶成像分析系统观察结果，电泳结果可参考附录F中图F.1。

8.6 试验成立条件

阳性对照PCR产物电泳后出现362 bp的条带，且空白对照没有条带或只出现片段较小的引物二聚体，试验成立；否则，试验不成立。

8.7 结果判定

8.7.1 阳性

待检样品出现大小为362 bp的DNA片段，该样品判断为阳性。

8.7.2 阴性

待检样品未出现362 bp的DNA片段，该样品判断为阴性。

9 综合判定

9.1 乳突类圆线虫病

符合6.1.3，并符合7.2.3.1、7.3.3.1和8.7.1等3条中任意一条，判定为乳突类圆线虫病。

9.2 乳突类圆线虫感染

不符合6.1.3，但符合7.2.3.1、7.3.3.1和8.7.1等3条中任意一条，判定为乳突类圆线虫感染。

9.3 阴性

符合7.1.3.2、7.2.3.2、7.3.3.2和8.7.2等4条中任意一条，判定为阴性。

附录 A
(规范性)
相关试剂配制方法

A.1 卢氏碘液

将5 g碘和6 g碘化钾溶于水并定容到100 mL。

A.2 生理盐水

将9 g NaCl溶于水并定容到1000 mL，高压灭菌后室温保存。

A.3 饱和氯化钠溶液

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 37.5 g，浓度约为37.5%，比重约为1.2）。

A.4 50× TAE贮存液

Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g，冰醋酸57.1 mL，Tris-Base 242 g，用约800 mL水溶解，充分混匀后用水定容至1000 mL。

A.5 1× TAE贮存液

50×TAE贮存液10 mL，水490 mL，混匀。

A.6 10 mg/mL溴化乙锭

称取溴化乙锭1 g，加水定容至100 mL，磁力搅拌充分溶解后，转移至棕色瓶内室温避光保存。

A.7 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5 μL 10 mg/mL溴化乙锭，摇匀。

A.8 6× 加样缓冲液

30 mM EDTA，36 %甘油，0.05 %溴酚蓝，pH 7.0。

附录 B
(资料性)
乳突类圆线虫病原形态

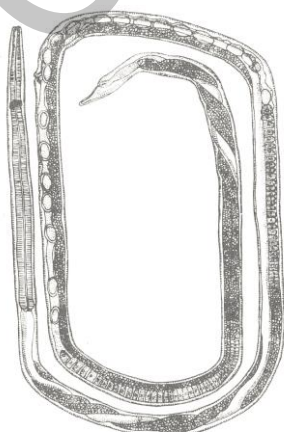
乳突类圆线虫的虫卵形态见图B.1，第一期幼虫形态见图B.2，寄生性雌虫形态见图B.3。



图B.1 乳突类圆线虫虫卵形态图



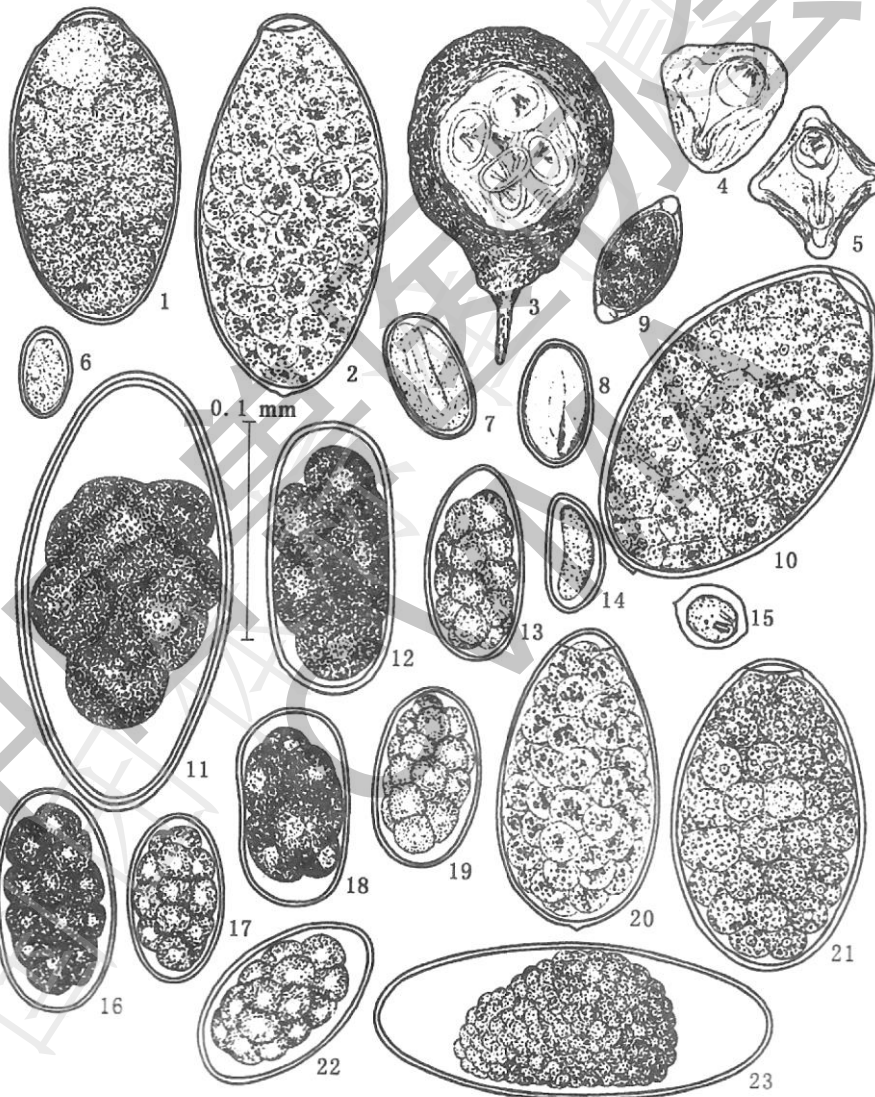
图B.2 乳突类圆线虫第一期幼虫形态图



图B.3 寄生生活的成虫形态图

附录 C
(资料性)
羊粪便中常见蠕虫卵

羊粪便中常见蠕虫卵及其基本形态见图 C.1。其中 1 为肝片吸虫，2 为鹿前后盘吸虫，3 为盖氏曲子宫绦虫，4 为扩展莫尼茨绦虫，5 为贝氏莫尼茨绦虫，6 为矛形双腔吸虫，7 为乳突类圆线虫，8 为美丽筒线虫，9 为球鞘毛尾线虫，10 为大片吸虫，11 为细颈线虫，12 为粗肋盖杰线虫，13 为毛圆线虫，14 为羊斯克里亚宾线虫，15 为中点无卵黄腺绦虫，16 为夏伯特线虫，17 为捻转血矛线虫，18 为羊仰口线虫，19 为食道口线虫，20 为殖盘吸虫，21 为大拟片形吸虫，22 为奥斯特线虫，23 为马歇尔线虫。

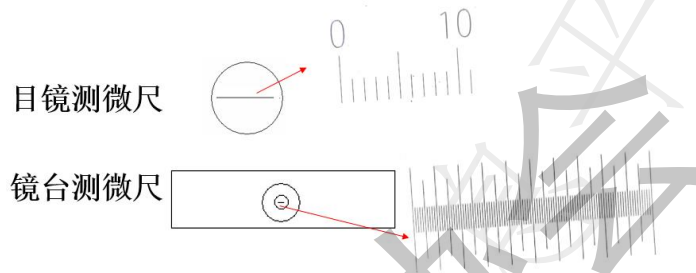


注：本图来源于《家畜寄生虫学》（第二版修订版）。

图C.1 羊粪便中常见蠕虫卵

附录 D (资料性) 测微技术

寄生虫的虫卵、幼虫和卵囊，其大小常在一定范围之内，测量其大小，可作为确定其虫种的一种依据。虫卵和幼虫的测量应使用测微器。测微器由目镜测微尺和镜台测微尺组成，见图 D.1。

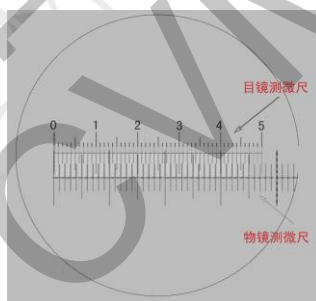


图D.1 目镜测微尺和镜台测微尺

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，应通过镜台测微尺换算。

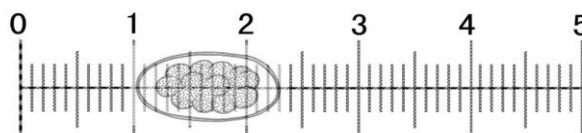
镜台测微尺是一载玻片，其中央封有一标准刻度尺，一般是将 1 mm 均分为 100 小格，即每小格的绝对长度为 0.01 mm (10 μm)。

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。如图 D.2 所示，目镜测微尺每格代表 7.5 μm (30 × 0.01 mm/40 = 0.0075 mm)。



图D.2 目镜测微尺长度计算方法举例

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。图 D.3 举例说明用该目镜测微尺测量虫卵大小，该虫卵长 97.5 μm (7.5 μm × 13 = 97.5 μm)。



图D.3 用目镜测微尺测量虫卵举例

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，其换算长度应重新测算。

附 录 E

(资料性)

乳突类圆线虫 PCR 扩增片段核酸序列

E.1 乳突类圆线虫 18S rDNA 基因参考序列 (GenBank Accession No. KX138391.1)

5'-AAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTACAATGTTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTAT
AACAGCTATAGACTACACGGTAAATATTTTAGTTGGATAACTGAGGTAATTCCTTGAGCTAATACACGC
TATTTATACCACATTAGTGGTGCCTTTATTTGATTAACCATTATAACGGTTGACTCAAAATATCCTTG
CTGATTTTGTATTAAAACATACCGTATGTGTATCTGGTTTATCAACTTTCGATGGTAGGGTATTGGCCT
ACCATGGTTGTGACGGATAACGGAGAATTAGGGTTCGACTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTA
CC**ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGC**-3'

注：粗体是检测的上游引物序列，下划线加粗部分的反向互补序列是检测的下游引物。

附录 F (规范性)

乳突类圆线虫 18S rDNA PCR 扩增引物、反应体系和反应程序

F.1 乳突类圆线虫 18S rDNA PCR 扩增引物

乳突类圆线虫 18S rDNA PCR 扩增引物见表 F.1。

表F.1 乳突类圆线虫18S rDNA 特异性扩增引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度
上游引物	5'-AAAGATTAAGCCATGCATGTG-3'	362 bp
下游引物	5'-GCCTGCTGCCTTCCTTGGATGT-3'	

F.2 PCR反应体系

乳突类圆线虫 18S rDNA PCR 反应体系见表 F.2。

表F.2 PCR反应体系 (50 μ L)

混合液组分	体积 (μ L)	终浓度 (μ M)
2 \times Taq PCR Mix	25.0	1 \times
上游引物 (25 pmol/ μ L)	2.0	1
下游引物 (25 pmol/ μ L)	2.0	1
样品 DNA	3.0	/
ddH ₂ O 补齐至总体积	50.0	/

注：1.PCR反应中设置阳性对照和阴性对照，阳性对照为乳突类圆线虫基因组DNA（10 ng ~ 100 ng），阴性对照为不加阳性DNA模版的双蒸水。2.将混合液充分混合后，最后加入模板，短暂离心，按照下列反应程序进行PCR反应。

F.3 PCR反应程序

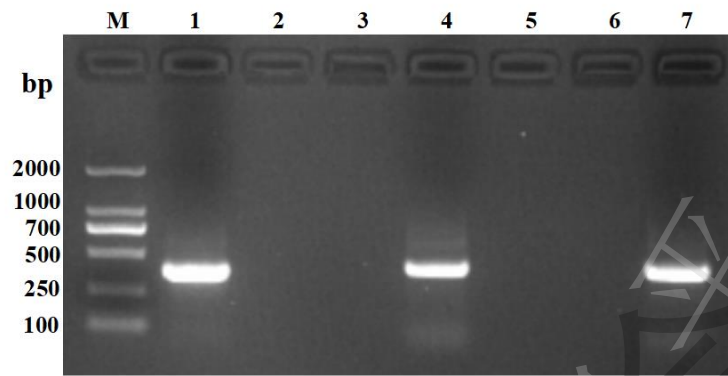
乳突类圆线虫 18S rDNA PCR 扩增反应程序见表 F.3。

表F.3 PCR扩增反应程序

温度	反应时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	5 min	1
95 $^{\circ}$ C	30 sec	35
55 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	10 min	1

F.4 乳突类圆线虫 18S rDNA 基因片段 PCR 扩增结果

乳突类圆线虫 18S rDNA 片段的 PCR 扩增结果示意图见图 F.1。



注：M为DNA相对分子质量标准；1为阳性对照；2为阴性对照；3、5和6为阴性样品；4和7为阳性样品。

图F.1 乳突类圆线虫18S rDNA的PCR扩增产物电泳结果示意图