

ICS 65.020.30

B 44

备案号:

DB11

北京市地方标准

DB11/T 1053.2—2013

实验用鱼 第2部分：寄生虫学等级及监测

Laboratory fish

Part 2: Parasitological standards and monitoring

地方标准信息服务平台

2013 - 12 - 20 发布

2014 - 04 - 01 实施

北京市质量技术监督局

发布

目 次

前言.....	11
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 寄生虫学等级分类.....	1
5 检测项目.....	1
6 检测程序.....	2
7 检测要求.....	3
8 检测方法.....	4
9 结果判定.....	4
附录 A（规范性附录） 实验用鱼的寄生虫学检测方法	5
附录 B（规范性附录） 寄生虫的染色法和玻片标本制备方法	6
附录 C（规范性附录） 实验用鱼寄生虫的形态、症状和检测方法	8

地方标准信息服务平台

前 言

DB11/T 1053 的本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

DB11/T 1053《实验用鱼》分为六个部分：

- 第 1 部分：微生物学等级及监测；
- 第 2 部分：寄生虫学等级及监测；
- 第 3 部分：遗传质量控制；
- 第 4 部分：病理学诊断规范；
- 第 5 部分：配合饲料技术要求；
- 第 6 部分：环境条件。

本部分为 DB11/T 1053 的第 2 部分。

本部分由北京市科学技术委员会提出。

本部分由北京市科学技术委员会归口。

本部分由北京市科学技术委员会组织实施。

本部分起草单位：中国科学院水生生物研究所、国家人口计生委科学技术研究所。

本部分主要起草人：王桂堂、李文祥、崔宗斌、孙德明。

地方标准信息服务平台

实验用鱼

第2部分：寄生虫学等级及监测

1 范围

DB11/T 1053 的本部分规定了实验用鱼（斑马鱼和剑尾鱼）的寄生虫学等级和监测标准，包括：寄生虫学的等级分类规定、检测要求、检测程序、检测方法、结果判定等要求。

本部分适用于实验用鱼（斑马鱼和剑尾鱼）寄生虫学等级分类和质量监测。

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，仅所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。

DB11/T 196 常见鱼病防治技术操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用鱼 laboratory fish

经人工饲养、繁育，对其携带的病原微生物及寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的鱼类。

4 寄生虫学等级分类

4.1 普通级实验用鱼 conventional (CV) laboratory fish

不携带所规定的鱼的烈性传染病病原和与人共患病的病原。

4.2 无特定病原体级实验用鱼 specific pathogen free (SPF) laboratory fish

除了普通级应排除的病原体外，不携带所规定的对实验用鱼危害大、重要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原体。

5 检测项目

5.1 外观检查

外观健康、无异常。

5.2 寄生虫学检查

寄生虫学等级及检测项目见表1。

表1 寄生虫学等级及检测项目

等级	应排除的寄生虫病原体	检测要求
无特定病原体等级	普通级	
	原虫 Protozoan 微孢子虫 <i>Pseudoloma neurophilia</i> 卵圆鞭毛虫 <i>Piscinodinium pillulare</i> 多子小瓜虫 <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> 寄生蠕虫 Helminth 头槽绦虫 <i>Bothriocephalidae</i>	● ● ● ○
	原虫 Protozoan 斜管虫 <i>Chilodonella</i> 车轮虫 <i>Trichodina</i> 杯体虫 <i>Apisoma</i> 粘孢子虫 Myxozoan 寄生蠕虫 Helminth 指环虫 <i>Dactylogyrus</i> 绒毛伪毛细线虫 <i>Pseudocapillaria tomentosa</i> 三代虫 <i>Gyrodactylus</i> 驼形线虫 <i>Camallanidae</i> 寄生性甲壳动物 Crustacean 锚头鳋 <i>Lernaea</i>	● ● ○ ○ ● ● ○ ○ ○
注：● 必须检测项目：指在进行实验用鱼质量评价时必须检测的项目。 ○ 必要时检测项目：指引进实验用鱼时或怀疑本病流行等必要时要求检测的项目。		

6 检测程序

检测程序见图1。

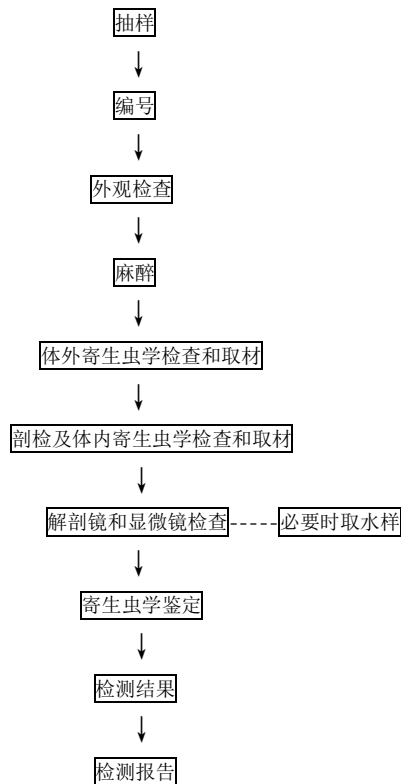


图1 检测程序

7 检测要求

7.1 检测频率

常规性监测：普通级和无特定病原体级实验用鱼种群每3个月至少检查一次。

其他检测：需要时进行。

7.2 采样要求

7.2.1 采样对象

常规性监测，选择3月龄以上的成鱼。

7.2.2 采样方式

按照DB11/T 196执行。应在每一生产、实验设施内隔离的不同水环境内随机抽取样本鱼。病理样品的采集应与微生物学、寄生虫学检测联合进行。

7.2.3 采样数量

抽样采集数量见表2。

表2 抽样采集数量

同一水环境实验用鱼数量	抽样数量
100尾以下	5尾
100尾以上	5%，最大取样量为30尾

7.2.4 样本送检及运输

样本送检运输容器应清洁卫生，防止样本腐败或污染。样本应有特定编号和标识并附送检单，写明样本的来源、种、系、级别、数量、检测项目和采样时间。

8 检测方法

寄生虫的检测方法按附录A、B、C的规定分项进行检测。

9 结果判定

9.1 合格判定

每个隔离的水环境内所有样品的微生物学指标都符合该等级标准要求，则判定该水环境内的实验用鱼群为合格。

9.2 不合格判定

每个隔离的水环境内如有一个样品的微生物学指标不符合该等级标准要求，则判定该水环境内的实验用鱼群为不合格。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性附录)
实验用鱼的寄生虫学检测方法

A.1 体外寄生虫的检测方法

A.1.1 肉眼检查

A.1.1.1 将待检鱼放在解剖盘上，肉眼检查鳞片和鳍条上有无白色包囊和寄生虫存在。

A.1.1.2 体表检查之后，将鳃盖掀起，注意鳃的色泽，粘液的多少，有无白点，鳃有无肿大，鳃丝末端是否肿大发白及是否有异物存在等变化。

A.1.2 镜检

A.1.2.1 鳞片和鳍条：采用水浸片法，即用解剖刀或镊子刮取鳞片和鳍条上的粘液，放于载玻片上，加一滴清水或生理盐水，用镊子将组织分散，加上盖玻片，在体视显微镜下观察。

A.1.2.2 鳃：先用剪刀将左右两边的鳃完整地取出，放在培养皿里。在每边鳃的第一片鳃片接近两端的位置用小剪刀取一小块鳃丝，放在载玻片上，加上少量清水，盖上盖玻片，在显微镜下检查。然后将鳃小片逐片剪开，在体视显微镜下用两根解剖针，把鳃丝逐条分开，仔细检查，或用镊子将每片鳃片的鳃上所有内含物完全刮下，放在培养皿里，用清水稀释、搅匀后，在解剖镜下进行检查。

A.1.2.3 检查单殖吸虫时，可用清水洗涤数次，倒弃上清液后在解剖镜下检查。

A.2 体内寄生虫的检测方法

A.2.1 根据部位和组织采用不同的方法检查体内寄生虫。

A.2.2 眼球：采用水浸法，即将鱼体的眼球取下，放在盛有生理盐水的培养皿中，待寄生虫游离出来后，即可在体视显微镜下观察。

A.2.3 体腔、脏器、生殖腺和鳔：首先采用肉眼观察，看组织表面有没有肉眼可见的白色包囊和寄生虫；然后将体腔用生理盐水冲洗，并盛在培养皿中，其他组织用生理盐水浸泡在培养皿中，待寄生虫游离出来后，便可在体视显微镜下观察。

A.2.4 肠道：先用肉眼检查，看肠外壁有无白点，这些白点通常是微孢子虫或粘孢子虫的孢囊。肠道内的寄生虫检测采用压片法，先把肠外壁上的脂肪组织尽量除干净，否则脂肪会混进肠的内含物，妨碍观察。除净脂肪组织后，将肠管前后拉长、剪开，如果内含物不多，用解剖刀将内含物和肠壁上的粘液都刮下来，用两片玻片压成薄片，在解剖镜下直接检查寄生蠕虫；如果肠内含物较多，则应将肠的内含物先取下来，放在培养皿里，用生理盐水冲洗搅匀，在显微镜下检查寄生虫。

A.3 其它检测方法

寄生虫的检测除了活体检测，还可以通过寄生虫标本的简单染色法（附录B）和常规的组织切片法来对寄生虫进行形态鉴定。

附 录 B (规范性附录)
寄生虫的染色法和玻片标本制备方法

B.1 原虫的涂片染色法

B.1.1 把保存在70%酒精里的原虫涂片放到梯度酒精水化,每一阶段5min~6min。

B.1.2 然后把涂片放进2%的铁明矾溶液中媒染,纤毛虫2h~4h,鞭毛虫和粘孢子虫6h~10h。

B.1.3 媒染后,用蒸馏水洗2次,每次4min~5min,然后放进海氏苏木精溶液中染色。

B.1.4 染色的时间:纤毛虫2h~4h,鞭毛虫和粘孢子虫6h~10h。

B.1.5 染好后取出,用蒸馏水冲洗粘附在玻片上的染料,放入2%的磷钨酸溶液中褪色。在褪色过程中,每隔一定时间要放在显微镜下观察,当核成紫蓝色,细胞质为浅灰蓝色,纤毛和鞭毛都看得见,即可,褪色时间大约6h~8h。这时把涂片从染色缸中取出,涂面朝上,放在盛有自来水的培养皿中,用微流水冲洗0.5h,然后用梯度酒精脱水,每一阶段5min,但在95%和无水酒精中的时间为10min,然后移至二甲苯,透明10min。

B.1.6 最后把已透明的涂片放在滴有加拿大树胶的清洁载玻片上,封固,贴上标签。

B.2 吸虫、绦虫、棘头虫的整体染色法

B.2.1 把保存在70%酒精里的标本(挑选压得平整、姿态正常的)放到梯度酒精水化,每一阶段10min~15min,然后用爱氏苏木精染色。

B.2.2 把蒸馏水洗过的虫体放进染色液中,经1h~3h(视虫体大小而定)后,水洗;如染色太深,可放在1%酸酒精(1%盐酸乙醇液:盐酸1份+70%乙醇100份)中褪色。在褪色过程中,要时常在体视显微镜下观察,当虫体体壁呈现为浅灰蓝色,内部器官为紫蓝色时就可以中止褪色处理。

B.2.3 褪色好的标本用微流水冲洗至少1h(或多次换水),然后用梯度酒精脱水,每一阶段停留10min~15min。在95%和无水酒精两阶段,都必须更换一次酒精,时间也要延长一些。再从1/2无水酒精+1/2二甲苯接着移至纯二甲苯中,时间相同,使虫体透明,然后用镊子或干燥吸管取虫体,放在滴有加拿大树胶的载玻片上,用针将虫体拨正,盖上盖玻片。

B.3 几种不需要染色的寄生虫处理方法

B.3.1 具有几丁质的甲壳类、单殖吸虫和棘头虫

把固定的标本取出,放在载玻片上,用吸水纸把虫体上表面的水分吸干,然后滴上适量的配好的4%聚乙烯醇于虫体上,在体视显微镜下用竹签把虫体拨正,盖上盖玻片即可。

B.3.2 线虫

把用巴氏液固定的线虫取出,放在20%甘油酒精中,然后逐步上升至40%、60%、80%和100%甘油,每一阶段6h~12h,待虫体透明后可取出在显微镜下观察。标本应固定在甘油胶胨中。

B.3.3 粘孢子虫

B.3.3.1 悬滴法:把新鲜的粘孢子虫的包囊放在干净的盖玻片上,加一滴水,把包囊弄破,在上面盖一小块的盖玻片,用吸水纸吸出多余的水分。然后使带有小盖玻片的一面朝下,放在一张凹玻片的凹洞里,这样可以在油镜下观察。

B.3.3.2 甘油胶胨法:把包囊放在载玻片的中间位置,弄破包囊,用小镊子取一小块甘油胶胨,放在孢子的位置上面,把载玻片放在酒精灯的火焰上略为加热,等甘油胶胨完全融解,盖上盖玻片,轻轻压平,平放在桌上。

B.3.4 纤毛虫

甘油酒精法，把已固定在5%福尔马林中的纤毛虫取出，保存在10%的甘油酒精中，观察时取出标本放在载玻片上，盖上盖玻片，从一旁加入10%的甘油酒精，让酒精逐步挥发，甘油逐步变浓，经24h，虫体变成透明。

地方标准信息服务平台

附 录 C
(规范性附录)

实验用鱼寄生虫的形态、症状和检测方法

表 C.1 实验用鱼寄生虫的形态、症状、检测方法

寄生虫名称	寄生虫形态特征	临床症状	检测方法
微孢子虫 <i>Pseudoloma neurophilia</i>	胞内寄生, 孢子为卵形或梨形, 后端有一突出的液泡。孢子大小 $5.4\mu\text{m}\times 2.7\mu\text{m}$ 。	感染中枢神经系统(脑和脊髓)。病鱼身体消瘦, 脊椎骨弯曲。	组织切片法
卵圆鞭毛虫 <i>Piscinoodinium pillulare</i>	营养体卵圆形, 不透明, 不能运动。大小约为 $(9\sim 12)\mu\text{m}\times (40\sim 90)\mu\text{m}$ 。	寄生于皮肤和鳃。病鱼通常悬浮在水体的表层, 呼吸困难。又名丝绒病。	水浸片法
多子小瓜虫 <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	成虫卵圆形, 乳白色。体有分布均匀的可运动的纤毛, 胞口位于体前端腹面, 体中部有一马蹄形大核。成虫大小为 $(0.3\sim 0.8)\text{mm}\times (0.35\sim 0.5)\text{mm}$ 。	寄生于皮肤和鳃。严重感染的病鱼乏力, 粘液增多, 呼吸困难, 体表呈现许多小白点, 又名白点病。	水浸片法
斜管虫 <i>Chilodonella</i>	腹面呈卵形, 左右各具纤毛带。胞口在前端, 具漏斗状口管, 末端紧缩, 向左作螺旋状绕一圈。后端大、小核各一个。大小 $(40\sim 60)\mu\text{m}\times (25\sim 47)\mu\text{m}$ 。	寄生于体表和鳃。病鱼粘液增多, 体表形成苍白色或淡蓝色粘液层, 组织破坏, 呼吸困难。	水浸片法
车轮虫 <i>Trichodina</i>	虫体圆形, 大小 $20\mu\text{m}\sim 40\mu\text{m}$ 构成齿环的齿体具有发达的空锥形部以及向外的齿钩和向中心的齿棘。	寄生于鳃和皮肤。病鱼产生大量的粘液, 鱼体消瘦, 发黑, 游动缓慢, 呼吸困难。	水浸片法
杯体虫 <i>Apiosoma</i>	虫体呈杯状, 前端粗, 后端变窄。前端有 1 圆盘形的口围盘, 四周有纤毛。虫体大小为 $(14\sim 80)\mu\text{m}\times (11\sim 25)\mu\text{m}$ 。	寄生于鳃和皮肤。病鱼游动缓慢, 呼吸困难。	水浸片法
粘孢子虫 myxozoans	孢囊白色, 孢子有极囊。	寄生于肾、胆囊、输尿管、肠、鳃、体表等处。病鱼消瘦, 体色发黑。	水浸片法
指环虫 <i>Dactylogyrus</i>	后吸器具 7 对边缘小钩, 1 对中央大钩, 眼点 2 对。虫体大小为 $(0.2\sim 1.4)\text{mm}\times (0.07\sim 0.35)\text{mm}$ 。	寄生于鳃。病鱼鳃丝粘液增多, 呼吸苦难, 游动缓慢。	水浸片法
三代虫 <i>Gyrodactylus</i>	后吸器具 1 对中央大钩, 16 个边缘小钩, 无眼点。虫体大小为 $(0.3\sim 0.6)\text{mm}\times (0.07\sim 0.15)\text{mm}$ 。	寄生于体表及鳃。病鱼粘液增多, 鱼体消瘦, 呼吸困难。	水浸片法
绒毛伪毛细线虫 <i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	雌虫 7 mm ~12 mm, 卵椭圆形, 两头有塞子样的结构; 雄虫 4 mm ~7 mm, 后部有一粘液囊和平滑的交合刺。	寄生于内脏, 严重感染的病鱼体色发黑, 瘦弱, 游动无力。	压片法
头槽绦虫 <i>Bothriocephalidae</i>	头节有一个明显的顶端盘和两个较深的吸沟, 成熟接片都有一套生殖系统。钩球蚴阶段在中间宿主剑水蚤或水蚯蚓内发育成原尾蚴。	寄生于肠道, 影响生长发育, 体色发黑, 消瘦。虫体大量繁殖后阻塞肠道, 可形成穿孔。	压片法
驼形线虫 <i>Camallanidae</i>	虫体细长, 尾部很尖细, 活体为红色, 肉眼可见。口囊由几丁质侧瓣组成, 侧瓣有纵肋纹, 旁有三角形几丁质突起, 生殖孔位于体中部。	寄生于肠道, 严重感染病鱼消瘦, 肠壁发炎。	压片法

表 C.1 实验用鱼寄生虫的形态、症状、检测方法(续)

寄生虫名称	寄生虫形态特征	临床症状	检测方法
锚头蚤 <i>Lernaea</i>	头胸部分枝，具有 1 对角或 2 对角。颈部细长呈圆柱状，渐渐扩大为躯干部，腹部短，钝圆，在末端有 1 对小而分节的尾叉。	寄生于体表。病鱼食欲减退，身体消瘦，行动迟缓，使小鱼失去平衡，产生畸形弯曲。	肉眼观察 水浸片法

地方标准信息服务平台