

团 体 标 准

T/CVMA 336—2026

犬科实验动物感染细粒棘球绦虫技术规范

Technical specification for experimental canine animals infected
with *Echinococcus granulosus*

报批稿

2026-1-14 发布

2026-1-14 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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提出并归口。

本文件起草单位：新疆畜牧科学院兽医研究所（新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心）、新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站、新疆兴牧源农业有限责任公司、吉木萨尔县动物疫病预防控制中心、木垒县动物疫病预防控制中心、奇台动物疫病预防控制中心、伊犁州动物疫病预防控制中心、昌吉州动物疫病预防控制中心、巴州动物疾病控制与诊断中心、新疆农业大学。

本文件主要起草人：班万里、赵莉、吾力江·卡马力、刘帅、潘星羽、王冰洁、张壮志、张旭、艾尔肯·艾沙、王思云、艾分·沙比汗、雒维东、穆尼拉·特列吾汗、权晨曦、张玲、王延、古丽扎提·塔力甫汗、喻昌盛、慕永辉。

引 言

包虫病（棘球蚴病）是一种严重的人兽共患慢性寄生虫疾病，呈世界性分布，WOAH 将该病列为 B 类病，我国农业农村部《一、二、三类动物疫病病种名录》将其列为二类动物疫病。囊型包虫病是由细粒棘球绦虫的幼虫（细粒棘球蚴）寄生于中间宿主组织器官所致，多见于农牧区，我国主要分布在新疆、甘肃、宁夏、青海、四川、内蒙和西藏等西部 7 省区，覆盖国土面积约 44%。囊型包虫病严重危害疫区人民健康、农副产品绿色生产、畜牧业发展、食品和环境安全，极大的制约着乡村振兴战略的实施。

制定切实可行的囊型包虫病高效综合防控措施迫在眉睫，防控措施的制订需要以检测诊断、疫苗研制、药物研发、致病机理等方面研究为支撑。动物模型的建立对动物疫病发展趋势、临床表现、检测诊断、疫苗研制、药物研发、治病机理研究和防控等起重要作用，特别是寄生虫病原学以虫体形态作为最主要的鉴别依据，因此急需建立囊型包虫病病原，即细粒棘球绦虫感染动物模型。

本文件中动物模型建立方法适用于类似囊型包虫病的犬科动物寄生虫病感染模型建立、对疫苗免疫效果保护判定、新药物研发药效判定及检测诊断方法的敏感性、特异性研究；获得的相关样品适用于囊型包虫病的病原学基础研究、检测诊断、致病机理研究和防控等。

犬科实验动物感染细粒棘球绦虫技术规范

1 范围

本文件规定了犬科动物感染细粒棘球绦虫模型建立的技术要求。

本文件适用于从事人兽共患囊型包虫病防控研究、检测诊断、疫苗研制、药物研发、致病机理研究等活动的单位和个人。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 14922.1 实验动物 寄生虫等级与监测

GB/T 14922.2 实验动物 微生物等级与监测

GB/T 14925 实验动物 环境及设施

GB/T 32948 犬科动物感染细粒棘球绦虫粪抗原抗体夹心酶联免疫吸附试验诊断技术

GB/T 36195 畜禽粪便无害化处理技术规范

GB/T 39646 实验动物 健康监测总则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

Eg：细粒棘球绦虫（*Echinococcus granulosus*）

EgPSC：细粒棘球绦虫原头蚴（*Echinococcus granulosus protoscolices*）

HE 染色法：苏木精-伊红染色法（hematoxylin-eosin staining）

PCR：聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

PSC：原头蚴（*Protoscolices*）

5 感染、剖检场所与人员要求

5.1 感染、剖检场所

感染与剖检场所应远离人员聚集区域和动物饲养密集地区。应划分为准备区和污染区，两区之间应设物理屏障。准备区为防护用品及工作人员穿戴防护用品的区域；污染区为感染区和剖检操作区域，严禁非工作人员进入。

5.2 剖检器材、试剂和耗材

5.2.1 配备手术台、绳子、解剖刀、剪刀、止血钳、镊子等剖检材料。

5.2.2 配备普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、离心机、15 mL 离心管、50 mL 离心管、2 mL 离心管、温度计、1000 mL 锥形瓶、500 mL 烧杯、2 mL 冻存管、5 mL 注射器、无菌培养皿、巴斯德吸管、水桶、封口袋、摄影器材。

5.2.3 配备 0.9 %氯化钠溶液、4 %多聚甲醛、RNAlater、0.9 %氯化钠溶液（37 ~ 40 °C）、麻醉剂。

5.2.4 实验（采样）场所应设置更衣室，人员进入实验室前应跟换防护服，穿着防护设备。

5.3 实验人员要求

5.3.1 开展实验前需通过动物伦理委员会审定，实验操作要符合实验动物伦理标准。

5.3.2 应对所有参与实验人员进行生物安全、实验室规则的培训，掌握相关仪器、设备、防护用品使用的操作步骤和要点，使其能进行正确操作并使用；对实验室人员进行人工感染实验犬的操作及知识培训，主要包括：临床样本采集、处理方法；动物的饲养、观察、称重、测温、记录及动物福利等；动物麻醉、感染、采样等技术操作方法；动物解剖、病理取材方法。

6 实验犬质量控制要求

6.1 实验犬要求

6.1.1 细粒棘球绦虫人工感染犬选用 10 ~ 18 月龄健康的比格实验犬。

6.1.2 实验犬体重约 9 kg ~ 12 kg，需满足实验条件。

6.2 感染、剖检场所实验犬背景资料的确认

应选用背景清楚的比格实验犬进行人工感染实验。实验犬的背景信息应包括：年龄、性别、微生物监测情况、寄生虫监测情况、动物繁育及运转记录等。寄生虫监测和微生物监测分别按 GB/T 14922.1、GB/T 14922.2 的相关内容进行。

6.3 动物饲养

6.3.1 动物饲养环境按 GB/T 14925 相关要求进行。

6.3.2 实验犬应单笼饲养；

6.3.3 实验犬应建立档案，编号并记录耳号。

6.3.4 按时为实验犬提供狗粮和饮水，并及时清洁。

6.3.5 实验犬的食盆和水盆单独使用，避免混用。

6.4 实验犬常规检查

6.4.1 实验犬临床观察

实验过程中对实验犬的临床状况进行观察并记录，如发现异常，应对异常进行记录并作后续处置。观察项目包括以下内容：

- a) 实验犬的摄食和摄水量。
- b) 实验犬自然状态下被毛外观。
- c) 实验犬的活跃度，是否存在行动障碍，有无持久弓背、震颤等现象。
- d) 实验犬头部、眼睑、肛门、外生殖器、尾部、四肢等处有无异常。

6.4.2 实验犬外观评价

实验犬的外观评价包括以下内容：

- a) 实验犬精神状态良好、活动自如。
- b) 实验犬肢体匀称、四肢无残缺、无畸形和外伤。
- c) 实验犬皮肤弹性良好紧贴身体无创伤且被毛光亮、色正。
- d) 实验犬发育良好且体质健壮。
- e) 实验犬天然孔无异常分泌物。

6.5 实验犬驱虫操作要求

6.5.1 操作规程

6.5.1.1 实验犬环境适应

购置的实验犬经检疫合格后，在动物室犬笼中按标准饲养，进行至少7 d的适应性饲养，具体饲养管理技术要求见附录A。

6.5.1.2 驱虫

对实验犬联用吡喹酮（5 mg/kg）和阿苯达唑（20 mg/kg）进行驱虫，每天驱虫一次，连续驱虫3 d。采集驱虫后的粪便置于-80℃冷冻7 d备用。

7 实验犬人工感染的技术要求

7.1 EgPSC 的采集

从屠宰场采集患有囊型包虫病的脏器若干套，选用包囊直径需在2 cm以上，在实验室收集EgPSC，具体操作见附录B。

7.2 EgPSC 的鉴定

7.2.1 形态学鉴定

7.2.1.1 对 EgPSC 进行形态学鉴定具体操作见附录 C。

7.2.1.2 形态学鉴定标准：显微镜下应可见吸盘和明显的顶突及小钩。

7.2.2 分子生物学鉴定

7.2.2.1 对 EgPSC 进行分子生物学鉴定具体操作见附录 D。

7.2.2.2 分子生物学鉴定标准：虫体基因 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳，在约 510 bp 处应出现目的条带；虫体序列结果应与 GenBank 中细粒棘球绦虫 NADH1 基因序列同源性 $\geq 99\%$ 。

7.3 EgPSC 的计算和活力检测

对EgPSC进行亚甲基蓝染色并计数和活力检测，具体操作见附录E。

7.4 实验犬感染与监测技术要求

7.4.1 感染剂量与制备

制定感染计划，推荐感染剂量为 40 万枚 EgPSC；EgPSC 应在无菌条件下采集和制备，并调整至适宜浓度。

7.4.2 感染操作

采用口服方式进行感染，确保每只实验犬均按照感染计划接受感染。将 40 万枚 EgPSC 加入 15 mL 离心管中，用巴斯德吸管向犬的口中滴加，确保实验犬完全摄入 EgPSC 后，喂食犬囊液。

7.4.3 后续监测与管理

实验犬感染后，依照 GB/T 39646 相关内容定期监测实验犬，观察犬粪便中虫体节片的排出情况，按照 GB/T 32948 的检测方法检测犬粪便并做好记录，记录表见附录 F。

7.5 实验犬粪便的处理

按照感染计划定时用采样瓶采集犬粪便，犬粪便须置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻7 d后转至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用，未采集的粪样应进行无害化处理，无害化处理按照GB/T 36195相关内容进行。

8 剖检

8.1 风险评估

解剖前对实验犬的基本情况进行调查了解。严格遵守国家法律法规、相关国家标准及行业标准的要求进行感染实验，实验犬感染35 d内Eg不产生虫卵，实验人员没有感染风险。

8.2 剖检时间

实验犬感染第 35 d 进行剖检。

8.3 麻醉操作

8.3.1 实验犬麻醉前应禁食 24 h。

8.3.2 麻醉方式为颈部注射麻醉剂，麻醉计量依据麻醉药品使用说明书进行。

8.3.3 其他要求

8.3.3.1 麻醉不足时，需要补打麻醉剂。

8.3.3.2 操作过程中，麻醉动物传递过程中避免暴露于环境中造成污染。

8.4 剖检

实验犬采血完成后进行解剖，脏器放入相应的采样瓶中。取出小肠纵向剪开，观察附着在肠壁上的Eg成虫（必要时可借助放大镜），通常可在小肠的前1/3段发现Eg成虫。小肠宜被剪成4~6段，浸泡于37℃、0.9%氯化钠溶液中30 min，用刮舌板刮肠壁，肠道内容物冲洗至搪瓷盘中。用80~100目铜筛过滤除去颗粒，冲洗下来的内容物和碎屑置于黑底托盘，用放大镜或体式显微镜对虫体进行计数。

8.5 荷虫量统计

采用倍比稀释法对实验犬的荷虫量进行计数并统计记录。

9 细粒棘球绦虫的鉴定

9.1 形态学鉴定

9.1.1 虫体的形态学鉴定采用 HE 染色法，具体操作详见附录 G。

9.1.2 鉴定标准：虫体细小，体长2~7 mm，分4节，成熟节片较长，有4个吸盘，头沟明显（28~34个），生殖孔偏后。

9.2 分子生物学鉴定

9.2.1 虫体的分子生物学鉴定具体操作详见附录 F。

9.2.2 鉴定标准：虫体基因 PCR 扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳，在约510 bp处应出现目的条带；虫体序列结果应与 GenBank 中细粒棘球绦虫 NADH1 基因序列同源性 $\geq 99\%$ 。

10 感染结果判定

细粒棘球绦虫鉴定结果均符合9.1.2和9.2.2的，可判定为动物感染模型建立成功。

11 生物安全要求

实验室生物安全要求参照GB 19489的规定执行。

12 无害化处理

实验犬尸体、脏器和排泄物等按无害化处理相关要求实施无害化处理。

附录 A
(规范性)
实验犬饲养管理

A.1 预饲养

A.1.1 实验犬需进行预饲养。

A.1.2 实验犬预饲养区与其它动物饲养区必须相对隔离。

A.1.3 除立即用于急性、致死性实验的犬外，其余的实验犬均需至少预饲养5 ~ 7 d。

A.1.4 在接收动物后预饲养期间，必须对每只实验犬建立档案。档案内容包括：动物来源、接收日期、初期检查状况、免疫情况及其它实施步骤。个体档案随动物一起保存管理。

A.2 日常饲养

A.2.1 每天记录各饲养室的温度、湿度，并观察实验犬的饮食、行为有无异常。

A.2.2 每天清洁冲洗饲养笼舍前，饲养人员要注意观察实验犬的行为。

A.2.3 实验犬对号单笼饲养，饲养面积为0.7 m²。

A.2.4 必须每天保持实验犬的饮食新鲜。实验犬每日上、下午各饲喂1次，每次饲喂150 ~ 200 g，实验特殊要求的例外。

A.2.5 饲喂动物结束后，用消毒液喷洒消毒地面，并用刮水板除去地面积水。

A.2.6 结束饲养室的工作后，必须随手关门。

A.2.7 遇动物发生异常现象，须及时进行隔离诊断、治疗。

附 录 B
(规范性)
实验犬 EgPSC 采集操作

B.1 主要试剂和材料

注射器、灭菌剪刀、镊子、记号笔、无菌纱布、试管架、无菌培养皿、50 mL离心管、250 mL试剂瓶、75 %酒精、0.9 %氯化钠溶液。

B.2 样品

选用包囊直径2 cm以上的患囊型包虫病的脏器。

B.3 人员防护

实验人员按照GB 19489的相关要求做好防护，需正确穿着PE手套、帽子、口罩、防护服、防护裤、手术衣、护目镜、胶鞋和鞋套等。

B.4 原头蚴的采集

B.4.1 将病变明显的患病脏器用蒸馏水冲洗表面，再用无菌纱布擦干，最后用75 %酒精擦拭一遍，置于托盘中（见图B.1中a）。

B.4.2 用注射器抽出包囊中的囊液置于50 mL离心管中自然沉淀，用无菌剪刀和镊子取出包囊内囊（见图B.1中b），包囊内囊置于装有无菌0.9 %氯化钠溶液的无菌培养皿中，用无菌0.9 %氯化钠溶液冲洗内囊，使PSC冲洗完全。

B.4.3 从沉淀完全后装有囊液的50 mL离心管中吸出囊液，加入适量无菌0.9%氯化钠溶液，自然沉淀后用吸管将上层液体吸出，重复3 ~ 5次（注意不能吸到沉淀中的PSC），将沉淀物倒入到无菌培养皿中并添加适量的无菌0.9 %氯化钠溶液，此沉淀物为PSC（见图B.1中c）。

B.4.4 将PSC混合，用5 mL吸管对PSC进行清洗，将5 mL吸管放置于无菌培养皿边缘侧进行吹洗，使PSC聚集成一团细沙状，将聚集在无菌培养皿中央的PSC收集到50 mL离心管中，弃去杂质。

B.4.5 将50 mL离心管中的PSC在无菌培养皿中进行清洗，重复5 ~ 8次，收集至50 mL离心管进行自然沉淀。对收集的PSC进行计数和活力检测后可用于感染犬。

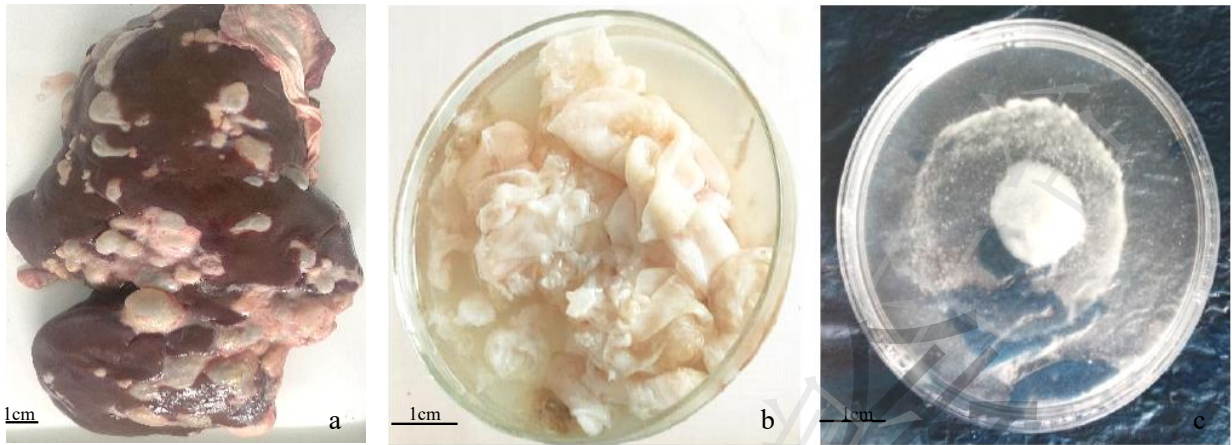
B.5 防护措施

B.5.1 实验人员应着防护器材，实验后更换的防护设备不可乱丢，应进行焚烧或高压灭菌无害化处理。

B.5.2 处理动物脏器材料的实验室，应设置更衣室，工作人员进入实验室之前，应着装防护服。

B.5.3 样品及实验器材可能污染托盘，应在采样结束后对其进行煮沸消毒后再次利用。

B.5.4 包囊材料和感染的中间宿主残留物要煮沸消毒或焚烧。



a) 患囊型包虫病的羊肝脏（眼观）

b) 分离的包囊内囊（眼观）

c) 采集的 EgPSC（眼观）

图 B.1 EgPSC 样品

附录 C
(资料性)
EgPSC 的形态学鉴定

C.1 形态学鉴定

EgPSC 的形态学鉴定步骤如下：

- 固定：取适量 EgPSC 置于 4% 多聚甲醛中固定 12 h。
- 脱水透明：蒸馏水流水冲洗 1 h 后进行脱水，乙醇溶液浓度依次为 30%、40%、50%、60%、70%，每隔 20 min 充分脱水。
- 染色：苏木素 10 倍稀释液染色过夜。
- 脱色：样品用 1% 酸酒精进行脱色。
- 脱水：乙醇溶液浓度依次为 30%、40%、50%、60%、70%，每隔 5 min 充分脱水。
- 透明：样品依次放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中，每次透明 5 min。
- 封片：滴加适量的中性树脂封片。
- 观察：显微镜下观察 EgPSC 染色及形态（见图 C.1）。

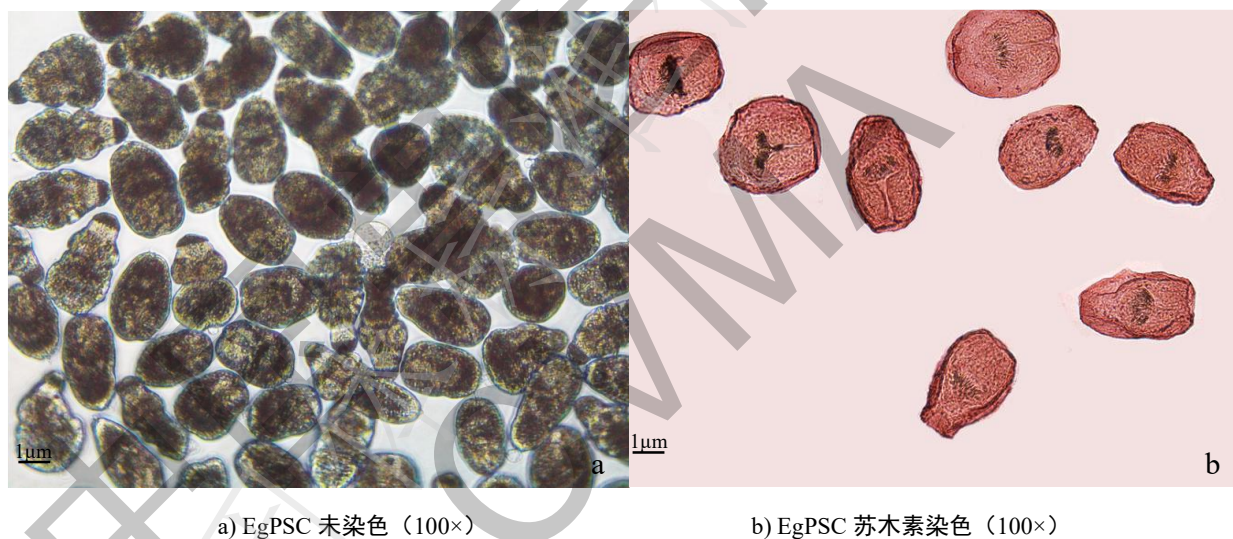


图 C.1 EgPSC 形态鉴定

附录 D

(规范性)

EgPSC 及 Eg 成虫分子生物学鉴定

D.1 引物的合成

合成细粒棘球绦虫 NADH I 通用引物，详见表 D.1。

表 D.1 *Echinococcus granulosus* 基因的引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度
NADH I 上游引物	5'- GGKTATTCTCARTTTCGTAAGGG -3'	510 bp
NADH I 下游引物	5'- ATCAAATGGAGTACGATTAGTYTCAC -3'	

D.2 PCR 扩增

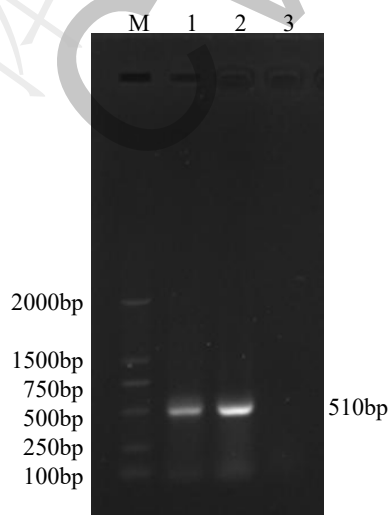
反应体系为 2 × Taq PCR MasterMix 12.5 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、模板 DNA 2.0 μL，灭菌纯化水 8.5 μL。扩增条件为 94 °C 预变性 4 min；94 °C 变性 30 s，52 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环，72 °C 延伸 10 min。

D.3 凝胶电泳检测

产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，在约 510 bp 处出现目的条带。

D.4 序列分析

对 EgPSC 和 Eg 成虫样品扩增产物进行测序分析，序列结果应与 NADH I 基因序列同源性 ≥ 99 % (见图 D.1 和图 D.2)。



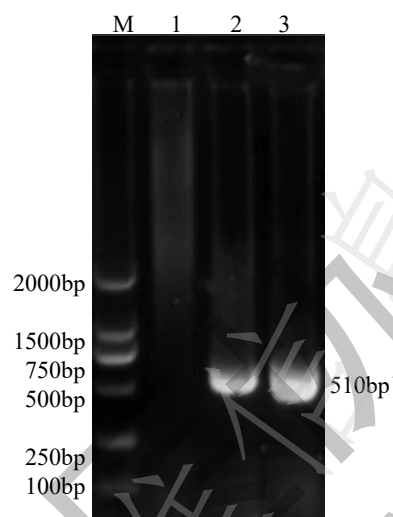
标引序号说明：

M——DNA 分子质量标准；

1——EgPSC 样品；

- 2——阳性对照；
3——阴性对照。

图 D.1 EgPSC NADH I基因的 PCR 扩增结果



标引序号说明：

- M——DNA 分子质量标准；
1——阴性对照；
2——阳性对照；
3——Eg 成虫样品。

图 D.2 Eg 成虫 NADH I基因的 PCR 扩增结果

附录 E
(规范性)
EgPSC 的计数和活力检测

E.1 亚甲基蓝染色

亚甲基蓝染色步骤如下：

- a) 将待染色 EgPSC 稀释至所需浓度。
- b) 向 EgPSC 悬液中加入适量新鲜配制的亚甲基蓝染色液，室温下染 3~5 min。
- c) 取一滴染色过的 EgPSC 悬液置玻片上，加盖玻片后放高倍显微镜下观察。
- d) 死亡的原头蚴着浅蓝色并膨大，无光泽（见图 E.1）。

E.2 EgPSC 的计数和活力检测

采用倍比稀释法计算视野内蓝色 EgPSC 的数量和总 EgPSC 数量，EgPSC 成活率按照公式（1）进行计算。

$$n = [1 - (M/N)] \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

n——EgPSC 成活率；

M——蓝色 EgPSC 的数量；

N——总 EgPSC 的数量。

注：亚甲基蓝染色时，时间不宜过长。否则，部分活 EgPSC 也会着色，会干扰计数。

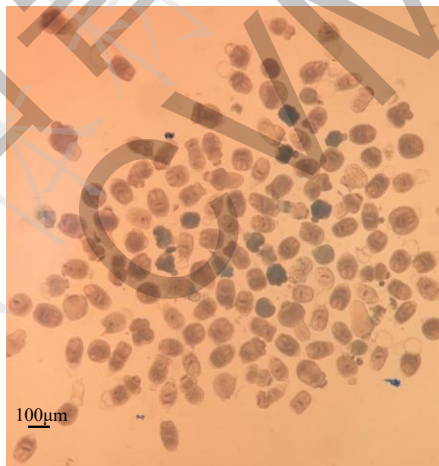


图 E.1 EgPSC 活力检测（40×）

附录 G
(规范性)
Eg 成虫形态学鉴定

G.1 Eg成虫虫体取材固定

用巴斯德吸管将虫体移到 0.9%氯化钠溶液中，洗去杂质，静置约 30 min，虫体活动全部停止，吸去液体，置于 4%多聚甲醛中固定 24 h。

G.2 虫体标本HE染色

- a) 标本经 4%多聚甲醛固定后，移入流水中冲洗 1 h 后用去离子水冲洗 3 次；
- b) 将冲洗后的虫体置于稀释好的苏木素染液中染色过夜；
- c) 染色后的虫体分别转入 30%、40%、50%、60%、70%乙醇中脱水，30 min/次；
- d) 用 1%盐酸乙醇分化约 20 s，镜检下控制，虫体褪色至颜色合适为止；
- e) 再用自来水冲洗约 2 min，蒸馏水洗 1 min；
- f) 将虫体转入到伊红染液中染色 1~2 min；
- g) 染色后的虫体分别转入 80%、90%、95%、100%乙醇中脱水，15 min/次；
- h) 用 1:1 无水乙醇和脱蜡液混合液透明 30 min，然后用脱蜡液原液透明 20 min；
- i) 用滤纸吸干切片边缘多余的脱蜡液，滴加适量的中性树胶，加盖玻片封固；
- j) 显微镜下观察虫体 HE 染色结果（见图 G.1）。



图 G.1 Eg 成虫形态鉴定 (40×)