

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

牦牛片形吸虫病诊断技术

Diagnosis techniques for yak fascioliasis

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由四川农业大学动物医学院提出。

本文件由中国兽医药协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医药协会
CVMA

牦牛片形吸虫病诊断技术

1 范围

本文件规定了牦牛片形吸虫病（肝片吸虫和大片形吸虫）的临床诊断方法、病原检查诊断方法和病理检查诊断方法。

本文件适用于牦牛片形吸虫病的诊断、流行病学调查及检疫。

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。

NY/T 1950-2020 片形吸虫病诊断技术规范

NY/T 541-2016 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 牦牛片形吸虫病 *yak fascioliasis*

由片形科（Fasciolidae）、片形属（*Fasciola*）的肝片吸虫（*Fasciola hepatica*）和大片形吸虫（*Fasciola gigantica*）单独或混合寄生于牦牛的肝胆管内引起的一种吸虫病。

3.1.1 肝片吸虫 *Fasciola hepatica*

牦牛肝片吸虫是寄生于牦牛肝胆管内的一种吸虫，虫体背腹扁平，呈叶片状，新鲜虫体呈棕红色，可引起牦牛急性或慢性肝炎和胆管炎，并伴发全身性中毒和营养障碍。

注：肝片吸虫虫体的形态见附录A图A.1。

3.1.2 大片形吸虫 *Fasciola gigantica*

牦牛大片形吸虫是寄生于牦牛肝胆管内的一种大型吸虫，虫体呈叶片状、略透明，可引起牦牛急性或慢性肝炎和胆管炎，对肝脏的损伤比肝片吸虫严重。

注：大片形吸虫虫体的形态见附录A图A.2。

4 临床诊断

4.1 临床症状

4.1.1 急性型

临床症状表现为体温升高、精神沉郁、绝食，几天内因严重贫血出现死亡。

4.1.2 慢性型

被毛无光泽，伴有脱毛现象；同时食欲减退，眼睑、下颌、胸部和腹下水肿；患严重肝炎或胆管炎时，常发生全身性中毒和营养不良等症状。

4.2 流行特点

牦牛片形吸虫病在世界各牦牛主产区均有发生。在我国，两种片形吸虫均有分布，其中肝片形吸虫主要分布在我国青藏高原及毗邻的青海、西藏、四川、甘肃、新疆和云南等6个省和自治区；而大片形吸虫流行范围则相对局限，常见于云南地区。本病呈季节性流行，感染季节多在夏、秋两季，秋末及冬季发病较多。

5 病原检查诊断方法

5.1 虫卵检查

5.1.1 材料

样品保存袋、记号笔、防水标签纸、300mL带刻度的三角烧瓶、200mL玻璃杯、1.6%氢氧化钠溶液（见附录B.1）、饱和盐水（见附录B.2）、60目铜丝筛、胶帽吸管、玻璃棒、10mL吸管、10mL离心管、离心机、镊子、载玻片和盖玻片、天平、显微镜等。

5.1.2 样品采集、保存和运输

5.1.2.1 粪便的采集

若是群体采样，采集牦牛新鲜粪便：成年牛群不少于300g，幼年（3岁以内）牛群不少于100g；若是个体采样，牦牛个体数应在20头及以上，采集量成年牛不少于100g，幼年牛不少于50g。

5.1.2.2 粪便的保存

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

5.1.2.3 样品的运输

将所采集样品在24h内送往实验室进行检测，运输条件应符合NY/T 541-2016。

5.1.3 操作

5.1.3.1 定性检查——沉淀法

取新鲜粪便10g放入玻璃杯中，加10mL水搅成糊状，然后再加20倍体积水进行均匀混合，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30min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10min。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。

5.1.3.2 定性检查结果判定

肝片吸虫虫卵较大，呈长椭圆形，黄色或黄褐色，前端较窄，后端较钝，一端有盖，卵盖不明显，卵壳薄而光滑，半透明，分2层，卵内充满卵黄细胞和1个胚细胞。虫卵大小为（100 μm ~158 μm ） \times （70 μm ~90 μm ）。大片形吸虫虫卵形态与肝片吸虫虫卵相似，但比肝片吸虫虫卵大，呈深黄色，大小为（144 μm ~208 μm ） \times （70 μm ~109 μm ），胚细胞位于卵盖一端。

注：肝片吸虫虫卵的形态见附录A图A.3，大片形吸虫虫卵的形态见附录A图A.4。

5.1.3.3 定量检查——虫卵定量计数法

称取牦牛粪便30g，放入300mL容量的三角烧瓶中，加入50mL 1.6%浓度的氢氧化钠溶液，静置过夜。次日，将粪块搅碎，再加入1.6%的氢氧化钠溶液到300mL刻度处。再充分摇匀，立即用吸管吸取粪液5mL注入离心管内，放离心机内以150g（1000r/min），离心2min，倾去上层液体，换加饱和盐水，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2，即为每克粪便中的片形吸虫虫卵数（EPG）。

5.1.3.4 定性检查结果判定

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

5.2 肝脏虫体检查

5.2.1 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、薄荷脑液（见附录B.3）、盐酸卡红溶液（见附录B.4）、醋酒精溶液（见附录B.5）。

5.2.2 虫体的采集

5.2.2.1 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。

5.2.2.2 将肝脏放搪瓷盘中。分离胆囊，放在平皿中，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，放在载玻片中间做压片检查。

5.2.2.3 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。

5.2.2.4 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。

5.2.2.5 挑出的虫体用生理盐水洗净，再放在常温水内或薄荷脑液中使虫体松弛。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。

5.2.3 虫体的固定

将挑拣好的虫体进行固定、盐酸卡红染色、脱色脱水、透明封片后进行鉴定（详见附录C）。

5.2.4 结果判定

5.2.4.1 肝片吸虫检查结果判定

虫体呈背腹扁平的叶片状，活体为棕红色。虫体长度是宽度的两倍，前部宽于后部，口吸盘位于前端，口孔经咽通向食道和肠管，肠管分出无数分支。腹吸盘位于虫体腹面。两个睾丸呈树枝状分支，一个卵巢呈鹿角状分支。

注：肝片吸虫染色标本的虫体形态见附录A图A.5。

5.2.4.2 大片形吸虫检查结果判定

虫体形态与肝片吸虫形态极为近似。虫体大型、叶片状、略透明，长33 mm~76 mm，宽5 mm~12 mm，头椎不明显，虫体窄长，长度超过宽度的两倍以上，两侧近于平行，后端钝圆。肠管的外侧枝与肝片吸虫的相同，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。

注1：大片形吸虫染色标本的虫体形态见附录A图A.6。

注2：大片形吸虫与肝片吸虫的虫体形态区别参见附录D。

6 病理检查诊断方法

6.1 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。

6.2 病变检测

按一般剖检术式对疑似片形吸虫病感染致死或将要死亡的牦牛进行解剖摘出肝脏，观察肝脏病变情况。

6.3 病理变化

6.3.1 急性型病理变化

急性感染时，可见肝脏肿大，肝包膜下有纤维素沉积，出血，肝实质内有暗红色虫道。引起急性肝炎和内出血，腹腔中有血色液体，有腹膜炎的变化。

6.3.2 慢性型临床症状

慢性病例可见慢性胆管炎、肝炎和贫血现象。表现肝脏肿大、萎缩、硬化、黄疸。小叶间结缔组织增生，胆管扩张、增厚、变粗甚至堵塞。胆管像绳索样凸出于肝表面。

7 综合判定

7.1 疑似

凡出现第4章的临床症状或符合6.3的病变特征，可判为片形吸虫病疑似病例。

7.2 确诊

凡符合6.3的病变特征，并满足5.2.4中检查结果为片形吸虫病感染。粪便检查结果满足5.1.3.2或5.1.3.4时，可判为片形吸虫病病例。

附录 A
(资料性)

牦牛肝片吸虫、大片形吸虫成虫及虫卵形态



图 A.1 肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 成虫

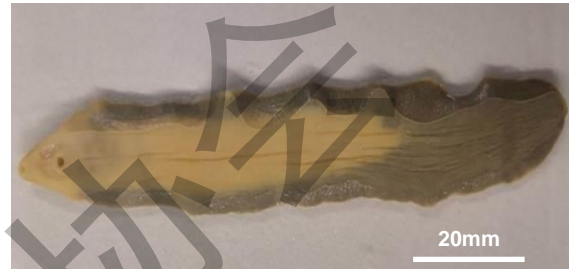


图 A.2 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 成虫

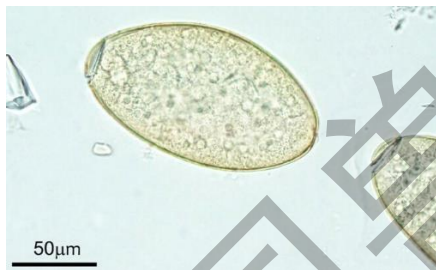


图 A.3 肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 虫卵

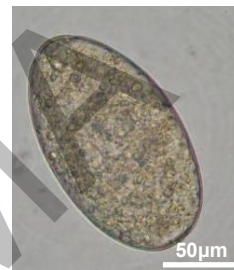


图 A.4 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 虫卵



图 A.5 肝片吸虫成虫 (*Fasciola hepatica*)
染色标本

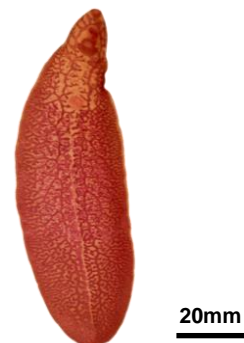


图 A.6 大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*)
染色标本

附录 B (资料性)

试剂及其配制

B.1 1.6%氢氧化钠溶液的配制

氢氧化钠 0.8g，加入蒸馏水定容至50mL，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（200mL约需75g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12g，溶于95%酒精5mL中，制成薄荷脑饱和酒精溶液，使用时将此液半滴，加入50mL蒸馏水中即可。

B.4 盐酸卡红的配制

取蒸馏水30mL加盐酸4mL，煮沸。趁热加入卡红染粉8g，再加入85%酒精180mL，再滴加浓氨水2滴~4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50mL，加浓盐酸1mL。

中国兽医协会
CVMA

附录 C (资料性)

肝片吸虫虫体的固定、染色和封片

C.1 固定

将挑拣出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24h以上。

C.2 染色（盐酸卡红染色法）

C.2.1 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。

C.2.2 脱色

将虫体自染色液中取出放入酸酒精中脱色，脱色时间一般为1h。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30min~60min。

C.2.3 脱水

将脱色好的虫体分别移入80%、90%、95%、100%酒精中各脱水30min~60min。

C.2.4 透明

将虫体先经1:1的100%酒精和二甲苯混合液中透明30min，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。

C.3 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。

中国兽医协会
CVMA

附录 D (资料性)

牦牛肝片吸虫、大片形吸虫虫体形态特征

D.1 肝片吸虫 *Fasciola hepatica*

虫体背腹扁平,呈叶片状;新鲜虫体呈棕红色(图A.1),固定后呈灰白色。虫体大小为(20mm~30mm)×(5mm~13mm),长度是宽度的两倍。虫体前部宽于后部,前端呈圆锥状突出,称为头锥,其底部较宽似“肩”。从肩往后逐渐变窄,体表生有许多小刺。口吸盘位于前端,底部为口孔,口孔经咽通向食道和肠管,肠管分为两支终于盲端,每个肠支又分出无数分支。腹吸盘位于虫体腹面,肩的水平线下。两个睾丸呈树枝状分支,前后排列于虫体的中后部,每个睾丸发出一条输出管,汇总于输精管而进入雄茎囊,其内有储精囊、前列腺和雄茎。生殖孔开口于腹吸盘之前。卵巢一个,呈鹿角状分支,位于睾丸的右上方。子宫位于卵巢与腹吸盘之间,孕卵子宫呈褐色菊花状。卵黄腺甚发达,满布于虫体的两侧和睾丸之后;左右两侧的卵黄管汇合为卵黄总管,横于虫体的前1/3与中1/3的交界处,在其中央形成卵黄囊,再与卵模相通。

D.2 大片形吸虫 *Fasciola gigantica*

虫体呈叶片状、略透明,大小为(33mm~76mm)×(5mm~12mm),头锥不明显,虫体窄长,长度超过宽度的两倍以上,两侧近于平行,后端钝圆(见图A.2)。肠管的外侧枝与肝片吸虫相同,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。

D.3 大片形吸虫与肝片吸虫形态区别要点见表D.1

表D.1 大片形吸虫与肝片吸虫的区别要点

位置/特征	区别(大片形吸虫对比肝片吸虫)
长度	较窄长,长与宽之比约为 5:1
肩部	不明显,两侧缘近于平行
吸盘	腹吸盘较口吸盘约大 1.5 倍
咽、食道	咽长于食道
肠管	内侧支数目很多,并有明显的小支
睾丸	位置较前,睾丸以后的部分延伸较长
尾端	钝圆,呈 U 字形

参考文献

- [1] 杨光友. 兽医寄生虫病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [2] 柴正明. 青海兴海牦牛肝片吸虫感染情况调查[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(12): 43-44.
- [3] Castillo Almeida NE, Gurram P, Kolluri N, *et al.* The brief case: what a fluke! A case of fascioliasis with pulmonary involvement in a peace corps volunteer[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(10):e00177-120.
- [4] Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fascioliasis[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1154:71-103.
- [5] Corrales Y, Ferrer E, Fernández J, *et al.* Diagnosis and risk factors of bovine and human Fascioliasis in cattle farms from a Venezuelan Andean rural area[J]. Acta Parasitol, 2021, 66(3):1048-1054.
- [6] Gao X, Wang D, Zhang Z, *et al.* Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola* species isolated from yaks on Qinghai-Tibet Plateau, China[J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 824785.
- [7] Cai Q, Lei M, Li C, *et al.* Epidemiological investigation of yak (*Bos grunniens*) Fascioliasis in the pastoral area of Qinghai-Tibet Plateau, China[J]. Animals, 2023, 13(21): 3330.