

团 体 标 准

T/CVMA xxx—2025

棘球绦虫环境样本采集及处理方法技术规范

Technical Specifications for the Collection and Processing of
Environmental Samples for *Echinococcus spp*

征求意见稿

2025 - x - xx 发布

2025 - x - 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。

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：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

引 言

两型棘球蚴（包虫）病，包括细粒棘球蚴病（CE）和多房棘球蚴病（AE，“虫癌”），是典型的兽源性人兽共患病分别是由寄生在犬等犬科动物小肠里的细粒棘球绦虫（*Echinococcus granulosus*）和/或多房棘球绦虫（*Echinococcus multilocularis*）排除的虫卵感染人，家畜和野生动物所致。棘球蚴病控制的关键点是切断病原循环和对病原在食物链中的感染情况的监测。通过粪便样品检测犬等犬科动物是否感染棘球绦虫和环境样品（包括牧草、蔬菜、水果等）是否有虫卵或虫体组织是评估犬等动物和环境对棘球蚴（包虫）病传播风险因素的关键考量指标。本标准旨在规范样品采集和测定方法，为制定棘球蚴（包虫）病精细化管理的控制策略和措施提供依据。

本标准以村为基本单位，采集犬等犬科动物粪便和环境样品包括牧草、蔬菜、水果等），通过 PCR 技术进行病原鉴定，探明村庄与感染相关的环境风险因子和流行病学传播途径的关键环节，评估中间宿主（包括人和牛羊）被感染的风险，确定棘球蚴（包虫）病的流行级别，指导棘球蚴（包虫）病的防控，环境消毒和放牧管理措施等。

本规范的制定参考了国际标准及国内相关技术规范，结合实验室实践经验，旨在为科研机构、疾病防控部门及兽医诊断实验室提供规范野外草样的采集流程，确保样品的代表性、完整性和可溯性，为后续分析提供可靠数据基础，推动棘球蚴（包虫）病的科学防控。

棘球绦虫环境样本采集及处理方法技术规范

1 范围

本标准是以村庄为基本单位，采集犬粪便和环境样本（牧草、蔬菜及水果等），进行病原鉴定，阐明村庄与这些样品中棘球绦虫感染或被绦虫虫卵污染，确定犬及环境样品对棘球绦虫（包虫）病传播的作用，为制定棘球绦虫（包虫）病精细化控制策略和措施提供依据。

本标准适用于为科研机构、疾病防控部门及兽医诊断实验室提供规范环境样品的采集流程，确保样品的代表性、完整性和可溯性，为后续分析提供可靠数据基础，推动包虫病的科学防控。

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
GB 19489 实验室生物安全通用要求
NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则
WST 664 包虫病控制

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 采样材料与人员准备

4.1 采样材料

采样用品：一次性塑料镊子、密封塑料袋（340mm*240mm）、自制PE袋（340*120mm）、夹板、防水记号笔，50 mL离心管，洁净采样袋、医疗废物收集袋、供现场联系和拍照使用的手机、采样登记本、记号笔、签字笔。

防护装备：一次性薄膜手套、一次性手套、无粉绿色乳胶手套、医用外科口罩、护目镜、头套、鞋套、防护服、消毒剂（手消毒剂、环境消毒剂）和消毒用具。

4.2 人员准备

样本采集工作人员应做好分工，每组不应少于5人，1人（A）负责采样过程的拍照记录；1人（B）负责编写采样瓶/管、密封袋编号；1人（C）负责样本采集；1人（D）负责样本接收与采样结束后的消毒工作；1人（E）负责记录原始采样表。

4.3 试剂

洗脱液（0.9 %生理盐水（含0.05 %吐温20））、商业化的DNA提取试剂盒，商业化的PCR扩增试剂盒，商业化的ELISA检测试剂盒，用于普通PCR扩增的通用引物信息见附录F。

4.4 仪器与设备

离心机、PCR仪、移液器、冰箱等。

5 操作方法

5.1 采样生物安全及实验室安全要求

采样生物安全要求样本采集人员进入采样现场前应做好个人防护，应包括一次性医用帽子、医用防护口罩、医用一次性防护服、一次性使用乳胶手套或丁腈手套、护目镜(或一次性面屏)、一次性使用防护鞋套。在采样前及结束后，按规范要求完成个人防护用品的穿脱，同组人员应互相检查个人防护是否符合要求。

实验室生物安全要求本实验操作需在符合生物安全标准的实验室进行，操作人员应经过专业培训并获得授权。实验过程中，操作人员需佩戴个人防护设备，如手套、口罩、防护服等。实验废弃物应按照生物安全相关规定进行处理，避免污染环境和造成感染风险。

5.2 采样地点及时间选择

采样地点及时间选择见附录A。

5.3 环境样本采集方法

环境样本采集方法见附录B。

5.4 犬粪便样本处理方法

犬粪便样本处理方法见附录C。

5.5 牧草样本处理方法

牧草样本处理方法见附录D。

5.6 ELISA 检测方法

ELISA检测方法见附录E。

5.7 PCR 检测方法

PCR检测方法见附录F。

附 录 A

(规范性)

采样地点及时间选择

A.1 采样基本单位：

在棘球蚴（包虫）病流行区，以村庄为基本单位，每乡随机选择不少于3个自然村采集犬粪便和环境样本（牧草、蔬菜及水果等）。每村犬粪便样本和环境样品分别不少于10份，不足的村可以采集邻村进行补充。

A.2 采样时间：可以是任何季节，最好在春季和秋季采集。

A.3 采样点：犬粪便采集于住家户，也可以是流浪无主犬的粪便。环境样品采集于居民区或居民区附近。

中国兽医协会
CVMA

附录 B (规范性)

环境样本采集方法

B.1 犬粪便和环境样本采集方法：样本采集最大的问题是交叉污染。为避免样本采集时的交叉污染，调查人员戴一次性塑料手套，每完成一次采集，更换一次手套。采集新鲜犬粪、牧草或蔬菜装入犬粪便样本采集管或环境样本采集袋。犬粪便采集管一般为50mL蓝盖试管。每个犬粪便样本量为10-20克。环境样本采集袋为25厘米x30厘米的加厚塑料自封袋。干牧草为80克左右，生菜和草莓为200-300克。样本管或环境样本采集袋提前标明采集的地点（县乡村）、时间、户主姓名，犬的颜色，大小类型（体重小于10公斤为小型犬，10-20公斤的为中型犬，大于20公斤的为大型犬）及样本采集的经纬度。采集后密封，放入封口袋中。填写样本采集记录表，包括样本管或样本袋包含的信息。

B.2 样本保存与运输：样本采集完成后，要及时做好整理归类，置 4℃冰柜暂存不得超过 48h。样本运输须符合国家法律法规要求，运送回实验室时应置于密闭、耐压、冷藏的转运箱中。同时国家生物安全法律法规要求，各实验室运输动物病原微生物菌(毒)种、样本及病料必须由取得合格证的人员负责办理。样本到达实验室后须经-80℃连续冻存 7 天以上，将虫卵杀死，将感染风险降至最低，方可进行后续检测工作。

B.3 牧草样本采集注意事项：牧草样本采集地点应选择有犬或流浪犬存在的庭院内，在牧草堆表面、牛羊食槽内多点采集，每户采集的所有牧草样本为1份。

附录 C

(规范性)

犬粪便样本处理方法

C.1 提取试剂:

参照商业化 DNA 提取试剂盒。这些试剂盒通常包含裂解液、蛋白酶 K、洗涤液和洗脱液、离心柱、收集管等，需按照试剂盒制造商的建议进行保存。

C.2 犬粪样本DNA提取: 将犬粪从-80℃冰箱中取出，室温化开；剪开巴氏吸管作为称量勺，用棉签捣碎粪便辅助称量，向试剂盒的反应管中加入250 mg粪便。

(1) 粪便管加入 800 μL 溶液 CD1，涡旋振荡器最高转速震荡 10 min；15000 g 离心 1 min，吸取上清至新的 2 mL 离心管（试剂盒提供），预计可获得 500 μL 液体，丢弃沉淀管；

(2) 上清中加入 200 μL 溶液 CD2，涡旋 5 s；15000 g 离心 1min，吸取上清，放入干净的 2 mL EP 管中，丢弃沉淀管；

(3) 加入 600 μL 溶液 CD3，涡旋 5 s；吸取 650 μL 溶液加入 DNA 纯化柱，纯化柱 15000 g 离心 1 min，弃去液体，将纯化柱放回原管；

(4) 重复步骤(3)，所有上清离心后，将纯化柱取出，放入干净的 2 mL 收集管（试剂盒提供，无盖）；

(5) 加入 500 μL 溶液 EA，15000 离心 1 min，弃去下层液体，放回柱心至原管，加入 500 μL 溶液 C5；15000 g 离心 1 min，将柱心转移至干净 2 mL 收集管中（试剂盒提供，无盖）；16000 g 离心 2 min，去除残留液体；

(6) 所有纯化柱更换至 1.5mL 洗脱管（试剂盒提供），在滤膜中央滴加 50 μL 的 CD6 洗脱液，15000 g 离心 1 min；

(7) 重复步骤(6)，至洗脱液体积为 100 μL ，弃掉所有柱心，将洗脱液转移至干净的 1.5 mL EP 管中，做好标记后-20℃冻存，若立即进行 PCR，可放置冰上待用。

附录 D

(规范性)

牧草样本处理方法

D.1 牧草样本处理方法:

- (1) 提配制好洗脱液 (100 L 水+900g NaCl+50 ml 吐温 20)，充分搅拌溶解吐温 20；
- (2) 将采集的牧草 (蔬菜)，装至双层自封袋中；
- (3) 加入 300 mL 洗脱液，双手揉搓 100 次，充分冲洗牧草 (蔬菜) 表面；
- (4) 将冲洗液用 100 μ m 尼龙网进行过滤，过滤后液体收集至自制 PE 袋中；
- (5) 步骤 (3) - (4) 重复 3 次，将全部冲洗液收集至自制 PE 袋中；
- (6) 将自制 PE 袋用棉线封口固定过夜，沉淀冲洗液；
- (7) 小心取下自制 PE 袋，先弃去一半上清 (注意不要扬起底部沉淀)；
- (8) 用夹板夹住底部约 2 cm 处，弃去夹板之上全部上清，将剩余沉淀及液体混匀，倒至 50 mL 离心管，-80 $^{\circ}$ C 冻存，供后续提取 DNA。

D.2 提取试剂: 按参照商业化 DNA 提取试剂盒。这些试剂盒通常包含裂解液、洗涤液和洗脱液、离心柱、收集管等，需按照试剂盒制造商的建议进行保存。在室温下，使用带滤芯吸头并佩戴一次性手套操作。每个工作批次需设置阳性提取对照 (参考鉴定样本) 和阴性提取对照 (水)。

D.3 牧草样本 DNA 提取:

将已经洗脱的牧草样本从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出，室温化开；剪开巴氏吸管作为称量勺，用棉签捣碎沉淀物辅助称量，向试剂盒的反应管中加入 250 mg 沉淀物。

后续提取 DNA 步骤同 C.2 犬粪样本 DNA 提取。

附录 E (规范性)

ELISA 检测方法

E.1 ELISA 检测：按参照商业化 ELISA 进行检测

E.2 洗涤液配制

洗涤液由固体洗涤剂（1份）与蒸馏水或纯水（500 mL）溶解配制，需在无菌条件（无菌水及容器）下完成。配制后的洗涤液于 2~8℃保存，有效期 7 天。

E.3 样品预处理

取新鲜样品于 -80℃冷冻 7 天，室温解冻后称取 1 g，加入 1 mL 稀释洗涤液，振荡混匀；4000 rpm 离心 15 min，收集上清液；取 12 μL 上清液与 108 μL 样品稀释液混合，制备 10 倍稀释样品；阳性对照无需稀释。所有样品需充分混匀，取样时更换吸水纸并记录位置。

E.4 ELISA 操作流程

- (1) 试剂平衡：试剂盒使用前恢复至 20~28℃，轻旋混匀。
- (2) 加样：阴性、阳性对照各加两孔（100 μL/孔）；相应孔中加入 100 μL 已稀释好的样品。
- (3) 37℃孵育 30 min（±1 min）。
- (4) 洗涤：弃孔内液体，每孔加 300 μL 洗涤液，重复洗涤 5 次；最后一次拍干残留液体。
- (5) 每孔加 100 μL 酶结合物溶液，37℃孵育 30 min（±1 min）；
- (6) 重复步骤（4）。
- (7) 按 1:1 比例混合蓝色液 A 和 B，每孔加入 100 μL 混合液；
- (8) 37℃孵育 15 min（±1 min）。
- (9) 读值：向反应孔中加入 50 μL 终止液，在 OD 值 450nm 下测量，15m 内读值有效。

E.5. 结果分析

- (1) 试验成立判断

阴性对照平均值(NC \bar{X}) NC \bar{X} =(NC1+NC2) /2

阴性对照平均值(PC \bar{X}) PC \bar{X} =(PC1+PC2) /2

试验成立判断标准 PC \bar{X} ≥0.5； NC \bar{X} <0.3

如果试验无效，试验中的操作值得怀疑，应按照操作说明书重做一次试验。

- (2) 结果判定：

样品的计算 $S/P = \text{样品 OD450/PC } \bar{X}$

如果 S/P 值 ≥ 0.2 ，样品应判定为抗原阳性。

如果 S/P 值 < 0.2 ，样品应判定为抗原阴性。

记录各孔反应结果，确保样品位置与记录一致，实验全程使用无菌操作。

中国兽医协会
CVMA

附录 F (规范性)

PCR 检测方法

F.1 扩增试剂

常规 PCR 扩增可选用商业化 PCR Master Mix，这些 Mix 通常包含 DNA 聚合酶、dNTP 混合物、缓冲液（内含维持反应体系 pH 稳定的成分及 Mg^{2+} 等金属离子），部分还含有荧光染料（方便电泳观察）。

均需按照制造商的建议保存。

F.2 引物

包含一对引物（Egr10917），具有 480bp 的扩增产物鉴定为存在细粒棘球绦虫基因，见表 E.2。

| 检测靶标（基因） | 引物名称 | 序列 |
|----------|------------|--------------------------------------|
| 细粒棘球绦虫基因 | Egr10917-F | 5'- CGA TAC TTC TCT CGG CTT CCA A-3' |
| | Egr10917-R | 5'- GGT GCT GCT GTG TAA CGT G -3' |

F.3 试剂及待检样本的准备：室温下解冻相关试剂（水、阳性对照样本 DNA 提取物、Mix、引物、所需鉴定样本 DNA 提取物），将阳性样本、阴性样本、引物、Taq 酶、DEPC 水放置于冰盒上，于超净台中操作。

F.4 反应体系配置：见表 E.4

表 E.4 反应体系

| 标准 50 μ L 反应体系 | |
|--------------------|----------------------------|
| 引物 | 上下游各 1 μ L，共 2 μ L |
| 模板 | 2 μ L |
| 水 | 21 μ L |
| Taq 酶 | 25 μ L |

F.5 PCR 扩增程序：见表 E.5

表 E.5 扩增程序

| 步骤 | 温度/时间 | 循环数 |
|------|--------------|------|
| 预变性 | 94°C, 3 min | 1 |
| 变性 | 94°C, 30 sec | 30 |
| 退火 | 58°C, 30 sec | |
| 延伸 | 72°C, 1 min | |
| 最终延伸 | 72°C, 5 min | 1 |
| 低温保存 | 4°C | 无限循环 |

F.6 PCR 扩增的阴性对照：水，此对照用于 PCR 扩增过程中，以验证是否存在污染。

F.7 PCR 扩增的阳性对照：Eg 阳性样本、Em 阳性样本，此对照用于样本 DNA 扩增过程中，以验证 PCR 系统的正常运行。

F.8 结果判定：阳性扩增对照应显示出 480 bp 的扩增产物，若未出现该条带或出现其他大小的条带，则需重新进行 PCR 反应；阴性扩增对照不应显示扩增产物，若出现非引物二聚体等异常条带，也需重新进行 PCR 反应，并更换扩增试剂。若样本出现 480 bp 扩增产物，则鉴定为存在细粒棘球绦虫基因；若无扩增产物，则重新进行 DNA 提取和 PCR 扩增；若重复后仍无扩增产物，则结果判定为“无法确定”。