ICS 11.220
CCS B 41

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

犬科实验动物感染羊源细粒棘球绦虫模型建立技术规范

Technical Specifications for Establishment model of Ovine *Echinococcus granulosus* in Dogs

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

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

目　次

前　　言 I
引　　言 II
犬科实验动物感染羊源细粒棘球绦虫模型建立技术规范 3
1 范围 3
2 规范性引用文件 3
3 术语和定义 3
4 缩略语 3
5 感染、剖检场所与人员要求 3
6 实验犬质量控制要求 4
7 实验犬的标准 5
8 实验犬驱虫操作要求 5
9 羊源 Eg 人工感染犬技术要求 5
10 实验犬粪便的处理 6
11 剖检 6
12 细粒棘球绦虫的鉴定 7
13 无害化处理 7
附录 A（规范性）实验犬饲养标准规程 8
附录 B（规范性）羊源 EgPSC 采集标准操作规程 9
附录 C（规范性）羊源 EgPSC 的形态学鉴定 11
附录 D（规范性）羊源 EgPSC 的计数和活力检测标准规程 12
附录 E（规范性）Eg 成虫形态学鉴定 13
附录 F（规范性）羊源 EgPSC 及 Eg 成虫分子生物学鉴定 14
附录 G（资料性附录）监测记录表 15

中国兽医协会
CVMA

中国兽医协会
CVMA

前　　言

本标准按照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》的规则起草。

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。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

引　　言

包虫病是一种严重的人畜共患慢性寄生虫疾病，呈世界性分布，OIE 将该病列为 B 类病，农业部列为二类动物疫病。囊型包虫病是由细粒棘球绦虫的幼虫（棘球蚴）寄生于中间宿主组织器官所致，多见于畜牧业发达的国家和地区，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制措施迫在眉睫，防控措施的制订需要以检测诊断、疫苗研制、药物研发、治病机理等研究为支撑。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，应当建立囊型包虫病感染动物模型。

本文件中动物模型建立方法适用于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、治病机理研究和防控等。

中国兽医协会
CVMA

犬科实验动物感染羊源细粒棘球绦虫模型建立技术规范

1 范围

本技术规范规定了犬科动物感染羊源细粒棘球绦虫模型建立的技术要求。

本技术规范适用于从事人畜共患囊型包虫病防控研究：检测诊断、疫苗研制、药物研发、治病机理研究等活动的单位和个人。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。其中，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。

GB 19489—2008　《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》

T/CALAS3—2017　《实验动物 健康监测规则》

GB/T 14925—2023　《实验动物 环境及设施》

GB/T 36195—2018　《畜禽粪便无害化处理技术规范》

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。

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）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

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

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 剖检设施、设备

中国兽医协会 CVMA

5.2.1 应配备手术台、绳子、解剖刀、剪刀、止血钳、镊子等剖检材料。

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

5.2.3 应配备 0.9%生理盐水、4%多聚甲醛、RNAlater、生理盐水（37-40℃）、麻醉剂。

5.2.4 实验人员应佩戴防护服、防护裤、胶鞋、鞋套、手套、口罩、帽子等防护用品。

5.3 实验人员要求

5.3.1 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：

5.3.1.1 临床样本采集、处理。

5.3.1.2 动物的饲养，观察、称重、测温、记录及动物福利培训。

5.3.1.3 动物麻醉、感染、采样等技术操作进行培训。

5.3.1.4 动物解剖、病理取材培训。

6 实验犬质量控制要求

6.1 实验犬背景资料的确认

应选用背景清楚的实验比格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、动物运转记录等。寄生虫监测情况、微生物监测情况依照 GB/T 14922.1、GB/T 14922.2 实施。

6.2 动物饲养

动物饲养环境应按照 GB 19489—2008要求进行。

6.2.1 实验犬应单笼饲养；

6.2.2 实验犬应建立档案，编号并记录耳号。

6.2.3 按时为实验犬提供狗粮和饮水，并及时清洁。

6.2.4 实验犬的食盆和水盆单独使用，避免混用。

6.3 实验犬常规检疫

6.3.1 应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：

6.3.1.1 实验犬的摄食和摄水量。

6.3.1.2 实验犬自然状态下被毛外观。

中国兽医协会 CVMA

6.3.1.3 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。

6.3.1.4 实验犬头部、眼睑、肛门、外生殖器、尾部、四肢等处有无异常。

6.3.2 实验犬外观评价标准主要包括：

6.3.2.1 实验犬精神状态良好、活动自如。

6.3.2.2 实验犬肢体匀称、四肢无残缺、无畸形和外伤。

6.3.2.3 实验犬皮肤弹性良好紧贴身体无创伤且被毛光亮、色正。

6.3.2.4 实验犬发育良好且体质健壮。

6.3.2.5 实验犬天然孔无异常分泌物。

7 实验犬的标准

7.1 羊源细粒棘球绦虫人工感染犬选用 10 月龄健康未免疫的比格犬。

7.2 实验犬体重约 9-10 kg，需适应实验条件。

8 实验犬驱虫操作要求

8.1 操作规程

8.1.1 实验犬环境适应

购置的实验犬经检测合格后，在动物室犬笼中按标准饲养，进行至少 7d 的适应性饲养，具体饲养标准见附录 A。

8.1.2 驱虫

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

9 羊源 Eg 人工感染犬技术要求

9.1 羊源 EgPSC 的采集

从羊屠宰场采集患有囊型包虫病的羊肝脏若干副，包囊直径需在 2cm 以上，在实验室收集羊源 EgPSC，具体操作见附录 B。

9.2 羊源 EgPSC 的鉴定

对羊源 EgPSC 进行形态学鉴定，具体操作见附录 C。

9.3 羊源 EgPSC 的计数和活力检测

对羊源 EgPSC 进行亚甲基染色并计数和活力检测，具体操作见附录 D。

中国兽医协会 CVMA

9.4 感染实验犬的技术要求

9.4.1 感染剂量与制备

根据研究目的，可设计不同的感染剂量制定感染计划，推荐感染剂量为 40 万枚 EgPSC；羊源 EgPSC 应在无菌条件下制备，并调整至适宜浓度。

9.4.2 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 15mL 离心管中，用剪过滴头的巴氏德管向犬的口中滴加，确保实验犬完全摄入 EgPSC 后，将火腿肠混入包囊囊液对犬喂食。

9.4.3 后续监测与管理

实验犬感染后，依照 T/CALAS3—2017 规程定期监测实验犬。观察犬粪便中虫体节片的排出情况，并做好记录，记录表见附录 F。

10 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℃冷冻 7d 后-20℃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—2018 执行。

11 剖检

11.1 风险评估

解剖前对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进行感染实验，实验犬感染 35d 内 Eg 不产生虫卵，实验人员没有感染风险。

11.2 剖检时间

实验犬感染第 35d 进行剖检。

11.3 麻醉操作

11.3.1 实验犬麻醉前应禁食 24h。

11.3.2 麻醉方式为颈部注射麻醉剂，安乐处死，麻醉计量依据麻醉药品使用说明书进行。

11.3.3 其他要求

11.3.3.1 麻醉不足时，需要补打麻醉剂。

11.3.3.2 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。

11.4 剖检

实验犬采血完成后进行处死后并解剖，脏器放入相应的采样瓶中。取出小肠纵向剪开，观察附着在

中国兽医协会 CVMA

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 ℃生理盐水中 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。

11.5 荷虫量统计

倍比稀释法对实验犬的荷虫量进行计数并统计记录。

12 细粒棘球绦虫的鉴定

12.1 形态学鉴定

虫体的形态学鉴定采用 HE 染色法，具体操作详见附录 E。

12.2 分子生物学鉴定

虫体的分子生物学鉴定具体操作详见附录 F。

13 无害化处理

实验犬尸体、脏器和排泄物等实施无害化处理（高温高压、焚烧或深埋）。

中国兽医协会
CVMA

附录 A
（规范性）
实验犬饲养标准规程

A.1 饲养规程

A.1.1 预饲养（检疫）

A.1.1.1 预饲养区与其它动物饲养区必须相对隔离。

A.1.1.2 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 5-7d。

A.1.1.3 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.2.1.1 必须每天记录各饲养室的温度、湿度，并观察动物的饮食、行为有无异常。

A.2.1.2 每天清洁冲洗饲养笼舍前，饲养人员要注意观察动物的行为。

A.2.1.3 实验犬对号单笼饲养，饲养面积为 0.7m^2。

A.2.1.4 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 150-200g，实验特殊要求的例外。

A.2.1.5 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.2.1.6 结束饲养室的工作后，必须随手关门。

A.2.1.7 遇动物发生异常现象，须及时进行隔离诊断、治疗。

中国兽医协会 CVMA

附录 B
（规范性）
羊源 EgPSC 采集标准操作规程

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、培养皿、50mL 离心管、250mL 试剂瓶、75%酒精、0.9%生理盐水。

B.2 样品

选用包囊直径 2cm 以上的患囊型包虫病的羊肝脏。

B.3 人员防护

按照 GB 19489—2008 的要求，防护人员按要求做好防护，需正确佩戴 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

将病变明显的患病羊肝脏用蒸馏水冲洗表面，再用无菌纱布擦干，最后用 75%酒精擦拭一遍，置于托盘中。用注射器抽出包囊中的囊液置于 50mL 离心管中自然沉淀，用无菌剪刀和镊子取出包囊内囊，包囊内囊置于装有无菌生理盐水的无菌培养皿中，用无菌生理盐水冲洗内囊，使 PSC 冲洗完全。向沉淀完全后装有囊液的 50mL 离心管中吸出囊液，加入适量无菌生理盐水，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），将沉淀物倒入到培养皿中并添加适量的无菌生理盐水，此沉淀物为 PSC。将 PSC 混合，用 5mL 吸管对 PSC 进行清洗，将 5mL 吸管放置于玻璃皿边缘侧进行吹洗，使 PSC 聚集成一团细沙状，将聚集在平皿中央的 PSC 收集到 50 mL 管中，其余无关杂质丢弃，再将收集在 50 mL 管中的 PSC 在玻璃平皿中进行清洗，重复 5~8 次，最后两次用加了青链霉素的无菌生理盐水进行漂洗，将所有收集的 PSC 汇集在同一个 50 mL 管进行自然沉淀。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

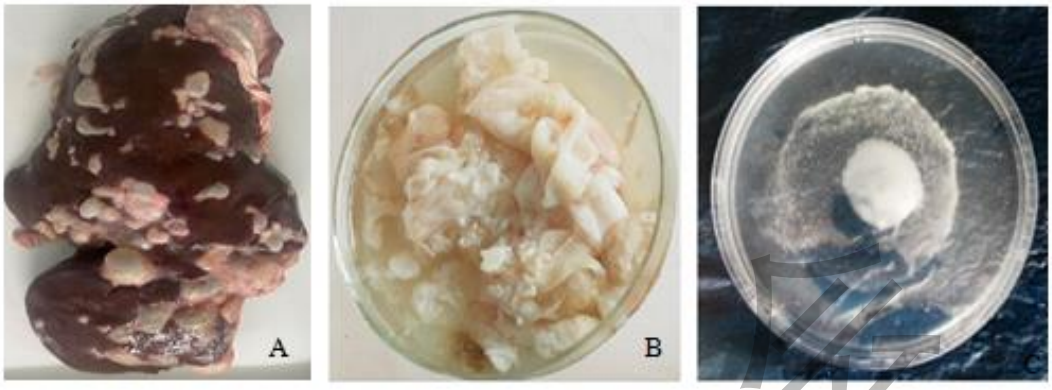
B.5.1. 实验人员应着防护设备，实验后更换的防护设备不可乱丢，应进行焚烧或高压灭菌无害化处理。

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 感染性材料可能污染洗涤槽，要在加热煮沸后再处理。

中国兽医协会 CVMA

B.5.4 参与检查中间宿主材料的工作人员，要佩戴防护眼镜。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　　B)分离的包囊内囊　　C)采集的 EgPSC

图 B.1 羊源 EgPSC 样品

中国兽医协会
CVMA

附录 C
（规范性）
羊源 EgPSC 的形态学鉴定

C.1 形态学鉴定

羊源 EgPSC 的形态学鉴定步骤如下：

a) 固定：取适量羊源 EgPSC 置于 4%多聚甲醛中固定 12 h。

b) 脱水透明：蒸馏水冲洗 1h 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。

c) 染色：苏木素 10 倍稀释液染色过夜。

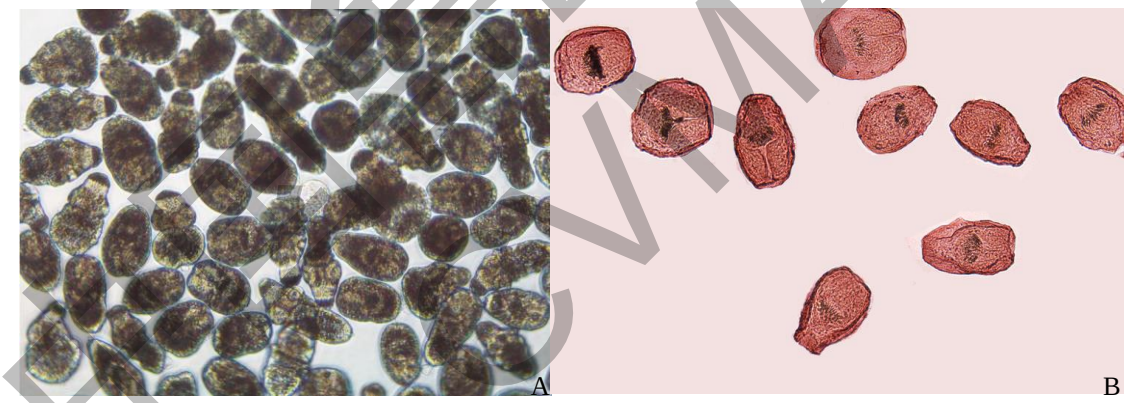
d) 脱色：样品用 1%酸酒精进行脱色。

e) 脱水：乙醇溶液浓度依次为 30%、40%、50%、60%、70%，每隔 5 min 充分脱水。

f) 透明：样品依次放入二甲苯I和二甲苯II中，每次透明 5 min。

g) 封片：滴加适量的中性树胶封片。

h) 观察：显微镜下观察羊源 EgPSC 染色，置于 40 倍视野下观察视野中羊源 EgPSC 的形态。



A)羊源 EgPSC 未染色　　B)羊源 EgPSC 苏木素染色

图 C.1　羊源 EgPSC 形态鉴定

中国兽医协会 CVMA

附录 D
（规范性）
羊源 EgPSC 的计数和活力检测标准规程

D.1 亚甲基蓝染色法

羊源 EgPSC 的计数和活力检测实验步骤：

D.1.1 将待染色 EgPSC 稀释至所需浓度。

D.1.2. EgPSC 悬液加适量新鲜配制的亚甲基蓝染液，室温下染 3-5 min。

D.1.3 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.1.4 死亡的细胞着浅蓝色并膨大，无光泽。

EgPSC 成活率（%）= [1.00 – (蓝色 EgPSC 数/总 EgPSC 数)] × 100

注意事项：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。

羊源 EgPSC 采用倍比稀释法进行计数。

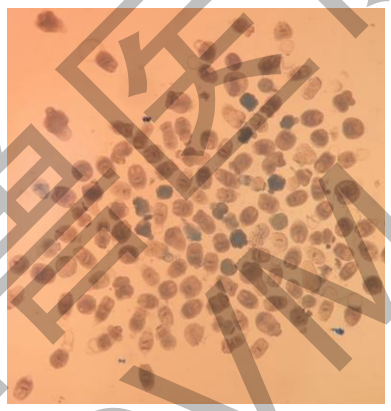


图 D.1　羊源 EgPSC 活力检测

中国兽医协会 CVMA

附录 E
（规范性）
Eg 成虫形态学鉴定

E.1 Eg 成虫形态学鉴定

Eg成虫虫体染色的制作步骤如下：

a) 取材固定：用巴氏德管将虫体移到生理盐水中，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。

b) 虫体标本 HE 染色：

1) 标本经 4%多聚甲醛固定后，移入流水中冲洗 1 h 后用去离子水冲洗数次；
2) 将冲洗后的虫体置于稀释好的苏木素染液中染色过夜；
3) 染色后的虫体分别转入 30%、40%、50%、60%、70%乙醇中脱水，30 min/次；
4) 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；
5) 再用自来水冲洗约 2 min，蒸馏水洗 1 min；
6) 将虫体转入到伊红染液中染色 1 min～2 min，
7) 染色后的虫体分别转入 80%、90%、95%、100%乙醇中脱水，15 min/次；
8) 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；
9) 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；
10) 显微镜下观察虫体 HE 染色结果。

A)Eg 感染犬小肠　　B)Eg 成虫

图 E.1　Eg 成虫形态鉴定

中国兽医协会 CVMA

附录 F

（规范性）

羊源 EgPSC 及 Eg 成虫分子生物学鉴定

F.1 引物的合成

合成细粒棘球绦虫 NADH I通用引物，详见下表 1

表 1 *Echinococcus granulosus* 基因的引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
NADH I	GGKTATTCTCARTTTCGTAAGGG	ATCAAATGGAGTACGATTAGTYTCAC

F.2 PCR 扩增

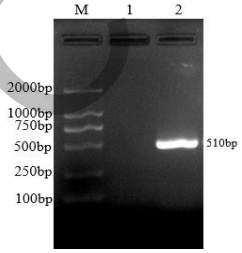
反应体系为 2 × Taq PCR MasterMix 12.5 μL、上下游引物（10 μmol / L）各 1 μL、模板 DNA 3.0 μL，灭菌纯化水 7.5 μL。扩增条件为 94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃ 延伸 1 min，共 35 个循环，72℃延伸 10 min。

F.2.3 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。

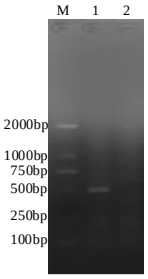
F.2.4 序列分析

对扩增产物进行测序分析，序列结果应与 NADH1 基因序列同源性≥ 99%。



M：DNA 分子质量标准；1：阴性对照；2：羊源 EgPSC 样品

图 F.1　羊源 EgPSC NADH I基因的 PCR 扩增结果



M：DNA 分子质量标准；1：羊源 Eg 成虫样品；2：阴性对照；

图 F.2　羊源 Eg 成虫 NADH I基因的 PCR 扩增结果

中国兽医协会 CVMA

附录 G

（资料性附录）

监测记录表

羊源细粒棘球绦虫人工感染比格犬实验														
操作人：				记录人：						时间： 年 月 日				
实验分组	耳刺号	铁牌号	性别	出生日期	发出体重(kg)	外观形态	进食情况	是否出现异常	采取措施	现体重	用药名称	用药途径	剂 量	备注（圈舍）

中国兽医协会
CVMA