



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3504—2013

甲壳类水产品中并殖吸虫囊蚴检疫 技术规范

Quarantine protocol for metacercaria of *Paragonimus* in crustaceans

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
甲壳类水产品中并殖吸虫囊蚴检疫
技术规范

SN/T 3504—2013

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)64275323

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字

2013年9月第一版 2013年9月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号: 155066 • 2-25827 定价 18.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、广西大学。

本标准主要起草人：李树清、陈韶红、黄维义、张永年、陈志飞、李雯雯、王巧全、张强、王艳、李健、常正山、陈盈。

甲壳类水产品中并殖吸虫囊蚴检疫 技术规范

1 范围

本标准规定了并殖吸虫囊蚴的形态学鉴定和 PCR 检测方法。
本标准适用于蟹、虾等甲壳类水产品中并殖吸虫囊蚴的检疫、流行病学调查和监测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 概述

并殖吸虫俗称肺吸虫,主要寄生于人、犬、猫、鼠等哺乳动物的肺内。人因食入生的、未煮熟的含有并殖吸虫囊蚴的蟹类、蜊蛄和沼虾等水产品而感染。并殖吸虫的分类、分布及生活史参见附录 A。

4 设备和材料

4.1 仪器和器材

- 4.1.1 生物显微镜。
- 4.1.2 体视显微镜。
- 4.1.3 PCR 扩增仪。
- 4.1.4 电泳仪。
- 4.1.5 凝胶成像系统。
- 4.1.6 网筛(10 目,40 目)
- 4.1.7 玻璃珠(425 μm ~600 μm)。

4.2 试剂和溶液

- 4.2.1 *Taq* 酶(5 U/ μL)。
- 4.2.2 2.5 mmol/L dNTP。
- 4.2.3 25 mmol/L MgCl_2 。
- 4.2.4 10 $\times$ PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})。
- 4.2.5 分子量指示物:100 bp~2 000 bp DNA marker。
- 4.2.6 水(符合 GB/T 6682 中一级水的规定)。
- 4.2.7 人工消化液、Tris-乙酸电泳缓冲液(TAE)、琼脂糖凝胶、6 $\times$ 加样缓冲液(配制见附录 B)。

4.3 引物

扩增并殖吸虫核糖体 DNA 第二内转录间隔区(ITS2)引物序列为：
上游引物 3S:5'-GGTAC CGGTG GATCA CTCGG CTCGT G-3'
下游引物 A28:5'-GGGAT CCTGG TTAGT TTCTT TTCCT CCGC-3'

5 检验步骤

5.1 样品采集

临床上采集的样品为溪蟹、蝾蛄和沼虾等甲壳类水产品。采样比例按照 GB/T 18088 执行。

5.2 样品处理

5.2.1 捣碎法

为保证囊蚴的完整性,推荐使用竹筒和竹棒(或其他类似替代品)捣碎样品,用生理盐水清洗,用 10 目网筛过滤,除去粗蟹壳。滤液再用 40 目网筛过滤,滤液置于锥形量筒内,加水至量筒的最大刻度处,沉淀洗涤至水清,全部沉渣吸入玻璃平皿,在体视显微镜下,收集囊蚴,用生物显微镜按照 5.3 进行形态鉴定。

5.2.2 消化法

样品量多时,可使用消化法。将样品用竹筒和竹棒捣碎,移入烧杯中,按照样品与人工消化液 1 : 5 的比例加入消化液,于 37 °C 消化至无可见的肉组织。消化后的悬液用 10 目网筛过滤,除去粗蟹壳。滤液再用 40 目网筛过滤,滤液置于锥形量筒内,加水至量筒的最大刻度处,沉淀洗涤全水清。全部沉渣吸入玻璃平皿,在体视显微镜下,收集囊蚴,用生物显微镜按照 5.3 进行形态鉴定。

5.2.3 囊蚴保存

鉴定后的部分囊蚴保存于 75%酒精中或于少量生理盐水中-70 °C 速冻,另取部分形态一致的囊蚴按 5.4.1 提取 DNA。

5.3 并殖吸虫囊蚴形态鉴定

并殖吸虫囊蚴一般呈球形或近球形,通常具有 2 层囊壁,但因虫种不同,可有 3 层囊壁或仅 1 层囊壁。后尾蚴折叠卷曲在囊内,能看见充满黑色颗粒的排泄囊和两侧弯曲的肠管。口吸盘有时可见到,而腹吸盘则常被排泄囊所遮盖,后尾蚴与囊壁间可有明显的空隙,也可无空隙。不同种的并殖吸虫囊蚴大小有差异,如卫氏并殖吸虫小囊蚴直径为 320 μm~360 μm,大囊蚴直径为 370 μm~400 μm。斯氏并殖吸虫囊蚴,直径为 400 μm 左右。并殖吸虫囊蚴模式图及实物图参见附录 C。由于并殖吸虫种类多,囊蚴形态相似,仅凭囊蚴形态很难准确鉴定并殖吸虫虫种。因此,需要结合分子生物学方法进一步鉴定虫种。

5.4 并殖吸虫囊蚴分子生物学鉴定

5.4.1 样品 DNA 提取

5.4.1.1 DNA 提取方法可选用等效商品化试剂盒,下面以 QIAGEN¹⁾公司的 DNA 抽提试剂盒

1) 使用 QIAGEN 公司的 DNA 试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 QIAGEN 的产品,标准的使用人可以使用其他公司的同类产品。

(DNeasy Blood & Tissue kit)进行 DNA 提取。取主要形态特征一致的囊蚴 1 个~10 个放入 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L PBS 和少量玻璃珠振荡 5 min~10 min,再加入蛋白酶 K(600 Mau/mL,活力单位/mL)20 μ L 与 ATL 缓冲液 180 μ L,56 $^{\circ}$ C 消化 1 h~3 h。期间不时振荡,至囊蚴充分裂解。

5.4.1.2 消化完全后,涡旋振荡 15 s,加 200 μ L 缓冲液 AL,立即涡旋振荡混匀,再加入 200 μ L 乙醇(96%~100%),涡旋振荡混匀。

5.4.1.3 将离心柱置于收集管上,将上一步的混合物吸入离心柱中,8 000 r/min 离心 1 min,弃收集管。

5.4.1.4 将离心柱置于新的收集管中,加 500 μ L 缓冲液 AW1,8 000 r/min 离心 1 min,弃收集管。

5.4.1.5 将离心柱置于新的收集管中,加 500 μ L 缓冲液 AW2,14 000 r/min 离心 3 min,弃收集管。

5.4.1.6 将离心柱置于灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L 缓冲液 AE 室温孵育 1 min,8 000r/min 离心 1 min,离心所得 DNA 于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

5.4.2 PCR 扩增

5.4.2.1 PCR 扩增体系

总体积为 25 μ L。模板 DNA 2 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,dNTPs 2 μ L,MgCl₂ 2.5 μ L,10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ L,Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,补充灭菌水至 25 μ L。

5.4.2.2 PCR 扩增条件

95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,68 $^{\circ}$ C 退火 1 min,68 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

5.4.2.3 电泳

用 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液配制 1.5%琼脂糖电泳凝胶,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面没过胶面。取 10 μ L 产物与 2 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液混合,加样于含溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶中。

在 1 $\times$ TAE 缓冲液中,3 V/cm~4 V/cm 电泳约 30 min,当溴酚蓝到达底部时停止电泳,用凝胶成像系统分析。

5.4.3 对照

检测过程中分别设阳性对照和空白对照。阳性对照为并殖吸虫的囊蚴或成虫,空白对照为灭菌水。

5.4.4 PCR 结果判定

PCR 扩增并殖吸虫囊蚴,扩增片段约为 520 bp(包括 102 bp 的 5.8 S 序列,ITS2 全序列和 53 bp 的 28 S 序列)。空白对照未出现扩增条带,阳性对照出现预期大小的特征条带,满足条件者,可进行样品判定。待测样品出现 520 bp 左右扩增条带,判为阳性。将阳性样品的 PCR 产物进行测序,序列与 GenBank 上的并殖吸虫 ITS2 序列进行比对。

5.5 结果判定

根据囊蚴的形态进行初步鉴定,对疑似并殖吸虫的囊蚴需进一步分子生物学鉴定。结合形态学鉴定结果和序列分析结果,最终判定并殖吸虫虫种。

附 录 A
(资料性附录)
并殖吸虫概述

A.1 并殖吸虫分类

并殖吸虫隶属于扁形动物门(Platyhelminthes)、吸虫纲(Trematoda)、复殖目(Digenea)、并殖科(Paragonimidae)、并殖吸虫属(*Paragonimus*)。目前世界上报道的并殖吸虫有 50 多种(包括同种异名、亚种及变种),中国报道有 32 种。公认的对人体致病的有 8 种:卫氏并殖吸虫(*Paragonimus westermani*)、斯氏并殖吸虫(*Paragonimus skrjabini*)、宫崎并殖吸虫(*Paragonimus miyazakii*)、异盘并殖吸虫(*Paragonimus Heterotremus*)、非洲并殖吸虫(*Paragonimus Africanus*)、双侧宫并殖吸虫(*Paragonimus uterobilateralis*)、墨西哥并殖吸虫(*Paragonimus mexicanus*)、克氏并殖吸虫(*Paragonimus kellicotti*)。

A.2 并殖吸虫分布

并殖吸虫是世界性分布的寄生虫,主要分布在中国、日本、朝鲜、俄罗斯、菲律宾、马来西亚、印度、泰国以及非洲、南美洲。中国分布于山东、江苏、安徽、江西、浙江、福建、广东、河南、湖北、湖南、四川、贵州、广西、云南、台湾、甘肃、陕西、山西、河北、辽宁、吉林、黑龙江等 26 个省、市、自治区,西藏、新疆、内蒙古、青海、宁夏未见报道。中间宿主分布在山区、丘陵的小溪小河中。

A.3 生活史

卫氏并殖吸虫虫卵入水后,在适宜条件下约经 3 周左右发育成熟并孵出毛蚴。毛蚴在水中活动,如遇第一中间宿主川卷螺,则侵入螺体,经过胞蚴、母雷蚴、子雷蚴的发育和无性增殖阶段,最后形成许多成熟的尾蚴从螺体逸出后,侵入第二中间宿主淡水蟹或蝲蛄,或随螺体一起被吞入第二中间宿主体内形成囊蚴。当终宿主哺乳动物或人食入了含有囊蚴蟹类,囊蚴在小肠内幼虫脱囊而出,经过 1 周~3 周移行后,穿过膈经胸腔进入肺。自囊蚴进入终宿主到在肺成熟产卵,约需 2 个多月。虫体在宿主体内存活的期限与宿主体内寄居条件有关。卫氏并殖吸虫在人体一般可存活 10 年,记载有 20 年或更长。并殖吸虫每天产卵的数量的波动范围大,有报道可达到 20 000~25 000 个。

附 录 B
(规范性附录)
试剂的配制

B.1 人工消化液的配制

胃蛋白酶	10.0 g
浓盐酸	10 mL
水	1 000 mL

搅拌溶解,现配现用。

B.2 Tris-乙酸电泳缓冲液(TAE)的配制

B.2.1 50×TAE 的配制

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris 碱)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	100 mL

加水定容至 1 000 mL,混匀至 4 ℃ 保存备用。使用前作 50 倍稀释。

B.2.2 1×TAE 使用液的配制

50×TAE	20 mL
--------	-------

加水定容至 1 000 mL,混匀备用

B.3 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)的配制

EB	1 g
----	-----

加水定容至 100 mL,磁力搅拌至完全溶解,室温避光保存。

B.4 1.5%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 g
-----	-------

加 1×TAE 定容至 100 mL,完全融化后,溶液冷却至 60 ℃,加 10 mg/mL EB 5 μL(终浓度 0.5 μg/mL),轻轻混匀后,倒板。

B.5 6×加样缓冲液的配制

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g

加水至 100 mL。
置 4 ℃ 保存备用。

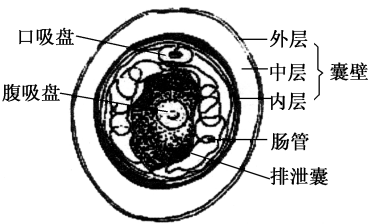
附 录 C
(资料性附录)
并殖吸虫囊蚴模式图及实物图



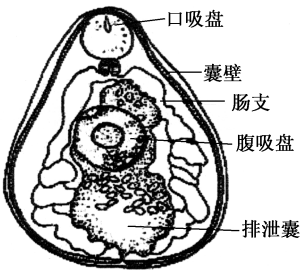
a) 卫氏并殖吸虫



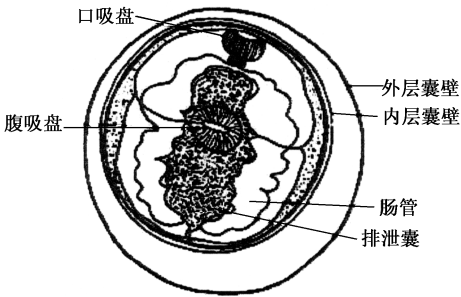
b) 斯氏狸殖吸虫



c) 团山并殖吸虫



d) 福建并殖吸虫



e) 云南并殖吸虫

图 C.1 并殖吸虫模式图²⁾

2) <http://www.pathobio.sdu.edu.cn/sdjsc/parapics/paragonimus%20westermani.html>.



图 C.2 卫氏并殖吸虫囊蚴实物图(10×10 倍)

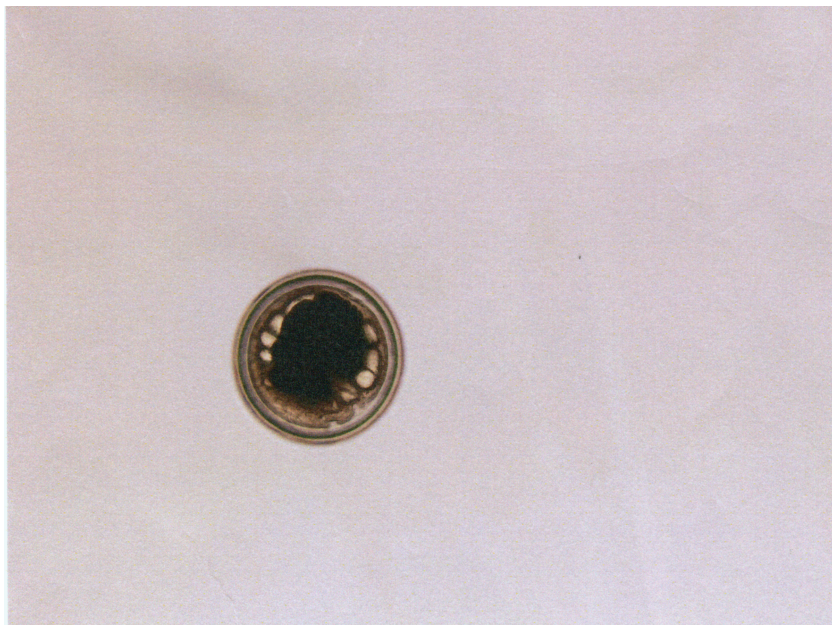
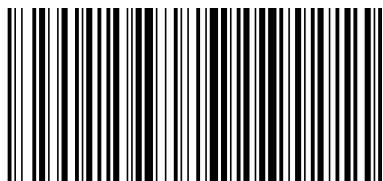


图 C.3 斯氏并殖吸虫囊蚴实物图(10×10 倍)

参 考 文 献

- [1] Blair D, Agatsuma T, Watanobe F, et al. Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences [J]. *Parasitology*, 1997, 115: 411-417.
- [2] Bowles, j. , Blair, d. & Mcmanus, d. p. . A molecular phylogeny of the human schistosomes [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1995, 4(2): 103-109.
- [3] Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, et al. Polymerase chain reaction (PCR) based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the rnelaeercarial stage [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 231-236.
- [4] 吴观陵. 人体寄生虫学. 3 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
-



SN/T 3504-2013

书号: 155066 • 2-25827

定价: 18.00 元