

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3497—2013

水产品中颚口线虫检疫技术规范

Quarantine protocol for *Gnathostoma* in aquatic products

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

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、广西大学、广西壮族自治区疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李树清、黄维义、张鸿满、陈韶红、李雯雯、吴慧芳、李健、张永年、张子群、陈志飞、王巧全、张强、王艳。

水产品中颚口线虫检疫技术规范

1 范围

本标准规定了颚口线虫第三期幼虫的形态学鉴定和 PCR 检测方法。
本标准适用于水产品中颚口线虫的检疫、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

颚口线虫病(Gnathostomiasis)是由颚口线虫(*Gnathostoma*)引起的人兽共患寄生虫病。人主要因生食或食入未熟的含有颚口线虫第三期幼虫的水产品而导致颚口线虫病。颚口线虫的分类、生活史、分布参见附录 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)。

4.2 试剂和溶液

- 4.2.1 *Taq* 酶(5 U/ μ L)。
- 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 50%和 70%乙醇。
- 4.2.7 水,符合 GB/T 6682 中一级水的规定。
- 4.2.8 人工消化液、乳酸苯酚透明液、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

扩增颚口线虫核糖体 DNA 第二内转录间隔区(ITS2)引物序列为:

上游引物 NEWS2:5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3'。

下游引物 RIXO:5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3'。

5 检验步骤

5.1 样品采集

临床上采集的样品为鱼类、两栖类、爬行类等水产品,鱼类主要是淡水鱼,如鳙鱼、泥鳅等,采样比例按照 GB/T 18088 执行。

5.2 样品处理

取样品 250 g,剪成小块,按照样品与人工消化液 1:5 的比例加入消化液,于 37℃ 消化至无可见的肉组织。消化后的悬液用 10 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,用体视显微镜观察,挑出所见的虫体。用生物显微镜按照 5.3.1 进行颚口线虫属的鉴定,然后将虫放入 70℃ 的 50%乙醇中固定使虫体伸直,冷却后移入 70%乙醇中保存。

5.3 颚口线虫第三期幼虫的形态学鉴定

5.3.1 颚口线虫属的形态学鉴定

颚口线虫第三期幼虫有头球,头球上有 3~4 环小钩,每环钩数约 40 个;有 4 个颈囊;体表有横纹和环列的小棘,体前部棘数明显且密,体后部棘渐小且疏;食道呈棒状,分肌质部和腺质部;肠管粗大。根据这些特征可以判定为颚口线虫属第三期幼虫,第三期幼虫的模式及实物图参见附录 C。如果需要鉴定到种,再继续下面的程序。

5.3.2 颚口线虫种的形态学鉴定

5.3.2.1 虫体透明

将 5.2 中乙醇保存的虫体放入乳酸苯酚透明液中,待虫体由白色变为透明,挑出放在载玻片上,并盖上盖玻片,在显微镜下观察,按照 5.3.2.2 判定。观察结束后,用 70%乙醇将虫体洗涤至白色后,放回 70%乙醇,4℃ 保存。

5.3.2.2 虫种形态学判定

根据第三期幼虫虫体大小;头球大小、头球基板形态、头球披列每环小钩的数目和形态;颈乳突、排泄孔的位置;以及体表棘的环列数进行颚口线虫虫种的初步鉴定。常见的致病颚口线虫虫种第三期幼虫的形态特征见附录 D。由于颚口线虫第三期幼虫在不同的宿主体内,长度有很大的差异,各虫种之间头球大小、头球披列每环小钩的数目、颈乳突的位置等相似,形态特征只能对虫种进行初步鉴定,需要结合分子生物学方法进行进一步的鉴定。

5.4 颚口线虫的分子生物学鉴定

5.4.1 DNA 提取

5.4.1.1 DNA 提取可选用等效的商品化试剂盒,下面依据 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。

版权所有·禁止翻制、电子传阅、发售

(DNeasy Blood&Tissue kit)的方法进行 DNA 提取。挑取单条待鉴定虫放入灭菌离心管,加入灭菌水,每 30 min 换水一次,重复洗涤 3 次。用碾磨棒将离心管中虫体碾碎,加入 180 μL 缓冲液 ATL,20 μL 蛋白酶 K,混匀后于 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h~3 h 至消化完全,期间不时摇晃。

5.4.1.2 消化完全后,涡旋振荡 15 s,加 200 μL 缓冲液 AL,立即涡旋振荡混匀,再加入 200 μL 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 μL 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 μL 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 μL 缓冲液 AE 室温孵育 1 min,8 000 r/min 离心 1 min,离心所得的 DNA 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

5.4.2 PCR 扩增体系

5.4.2.1 反应体积

总体积为 25 μL ,模板 DNA 2 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,dNTPs 2 μL , MgCl_2 2.5 μL ,10 $\times$ Buffer 2.5 μL ,*Taq* 酶(5 U/ μL)0.2 μL ,补充灭菌水至 25 μL 。

5.4.2.2 扩增条件

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

5.4.2.3 电泳

取 10 μL 产物与 2 μL 6 $\times$ 加样缓冲液混合,加样于含 EB 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

检测过程中分别设置阳性对照和空白对照。颚口线虫成虫或幼虫为阳性对照,灭菌水为空白对照。

5.4.4 PCR 结果判定

PCR 扩增颚口线虫 ITS2 基因,产物片段大小为 600 bp 左右(包括 127 bp 的 5.8S、ITS2 全序列和 48 bp 的 28S)。阳性对照出现预期大小的扩增条带,空白对照未出现扩增条带,满足条件者,进行判定。出现 600 bp 左右扩增片段的样品,判为阳性。将阳性样品的 PCR 产物进行测序,将其序列与 GenBank 上的颚口线虫 ITS2 序列进行比对。

5.4.5 样品判定

符合颚口线虫第三期幼虫形态特征的虫体,判定为颚口属线虫。

对判定为颚口属线虫的虫体,再根据形态学初步鉴定结果,结合虫体 ITS2 的测序比对结果,进一步判定颚口线虫虫种。

附 录 A
(资料性附录)
颚口线虫概述

A.1 颚口线虫分类

颚口线虫隶属于线形动物门(Nematoda),旋尾目(Spirurida),颚口线虫科(Gnathostomatidae),颚口线虫亚科(Gnathostomatinae),颚口属(*Gnathostoma*)。目前认为颚口属有 13 个种,分别为:棘颚口线虫(*G. spinigerum* Owen, 1836)、刚刺颚口线虫(*G. hispidum* Fedtchenko, 1872)、膨胀颚口线虫(*G. turgidum* Stossich, 1902)、美洲颚口线虫(*G. americanum* Trarassos, 1925)、杜氏颚口线虫(*G. doloresi* Tubangui, 1925)、负鼠颚口线虫(*G. didelphis* Chandler, 1932)、日本颚口线虫(*G. nipponicum* Yamaguti, 1941)、浣熊颚口线虫(*G. Procyonis* Chandler, 1942)、巴西颚口线虫(*G. brasiliense* Ruiz, 1952)、宫崎颚口线虫(*G. miyazakii* Aderson, 1964)、马来颚口线虫(*G. malaysiae* Miyazaki et Dunn, 1965)、越南颚口线虫(*G. vietnamicum* Le-Van-Hoa, 1965)以及双核颚口线虫(*G. binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991)。其中棘颚口线虫、刚刺颚口线虫、杜氏颚口线虫、日本颚口线虫、马来颚口线虫和双核颚口线虫有人体感染病例报道,前 5 个种是亚洲地区常见的致病种。

A.2 颚口线虫生活史

颚口线虫的生活史全程需经 2 个中间宿主与 1 个终末宿主。虫卵在水温 27 ℃ 的水中经过 7 d,卵母细胞发育成第一期幼虫并蜕壳,再经过 2 d 并蜕皮后成为第二期幼虫。如被第一中间宿主剑水蚤吞食,再次蜕皮成为早期第三期幼虫。感染的剑水蚤被第二中间宿主鱼、蛙吞食,幼虫发育为晚期第三期幼虫。蛇、鸟等吞食了感染第三期幼虫的鱼、蛙,则成为带虫的转续宿主。猪、猫、狗、虎、豹等终末宿主吞食了第三期幼虫,则在肝脏再一次蜕皮成为第四期幼虫,然后返回胃内发育为成虫并在胃壁上形成瘤块。人因生食或食入未熟含有颚口线虫第三期幼虫的鱼肉等水产品而导致颚口线虫病,但幼虫在人体内不会进一步发育至成虫。

A.3 颚口线虫分布

主要分布在亚洲,如日本、泰国、巴基斯坦、尼泊尔、印度、越南、孟加拉、缅甸、柬埔寨、老挝、菲律宾、印度尼西亚、斯里兰卡、马来西亚、以色列、巴勒斯坦、俄罗斯、中国等。此外,美国、厄瓜多尔、澳大利亚、墨西哥、喀麦隆、欧洲部分国家也有报道。

附 录 B
(规范性附录)
试剂的配制

B.1 人工消化液

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 乳酸苯酚透明液

苯酚	50 mL
乳酸	50 mL
甘油	100 mL
水	50 mL

B.3 Tris-乙酸电泳缓冲液(TAE)

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 4 ℃保存备用。使用前作 50 倍稀释。

B.4 1×TAE 使用液

50×TAE	20 mL
--------	-------

加水定容至 1 000 mL,混匀备用。

B.5 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)

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

加水定容至 100 mL,搅拌至完全溶解,室温避光保存。

B.6 1.5%琼脂糖凝胶

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(终浓度为 0.5 μg/mL),轻轻混匀后,倒板。

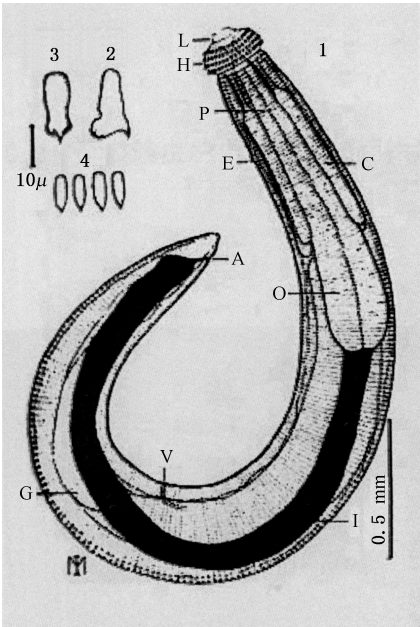
B.7 6×加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g
加水定容至	100 mL
置 4 ℃ 保存备用。	

附 录 C
(资料性附录)

颚口线虫第三期幼虫模式及实物图

颚口线虫模式图见图 C. 1,实物图见图 C. 2、图 C. 3。



说明：
1——侧面观：L=唇、H=头球、P=颈乳突、E=排泄孔、C=颈囊、O=食道、I=肠、V=阴门、G=侧线、A=肛门；
2——头球侧面小钩，侧面观；
3——头球小钩，背侧观；
4——表皮体棘。

注：引自²⁾ the Online Parasitological Center for Gnathostomiasis.

图 C. 1 棘颚口线虫第三期幼虫

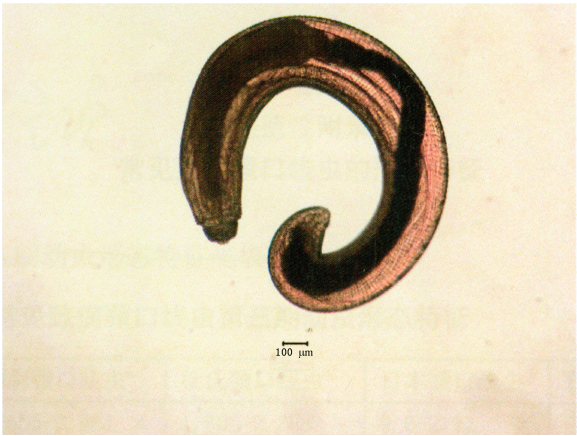


图 C. 2 颚口线虫幼虫(10×5,检测自鳝鱼)

2) <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2001/gnathostomiasis/PAGES/morphology.htm>.

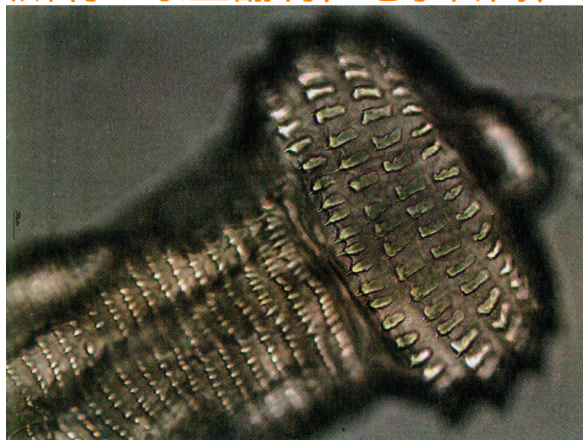


图 C.3 颚口线虫幼虫头球(10×40,检测自鳝鱼)

附 录 D
(规范性附录)
常见致病颚口线虫的形态特征

表 D.1 常见致病颚口线虫第三期幼虫形态特征

形态特征		棘颚口线虫 ^a	刚刺颚口线虫 ^a	杜氏颚口线虫 ^a	日本颚口线虫 ^a	日本颚口线虫 ^b	双核颚口线虫 ^b
虫体(长度×宽度,单位 mm×mm)		(1.1~4.55)×(0.145~0.732)	(1.555~2.961)×(0.253~0.315)	(1.502~2.888)×(0.217~0.333)	(0.6~2.11)×(0.10~0.20)	(0.520~1.440)×(0.051~0.130)	(0.518~0.558)×(0.044~0.058)
头球大小(高×直径,单位 mm×mm)		(0.062~0.244)×(0.127~0.366)	(0.062~0.164)×(0.126~0.226)	(0.051~0.073)×(0.121~0.179)	— ^c	(0.038~0.060)×(0.079~0.110)	— ^c
头球基板形态		类长方形	不规则亚铃形	不规则梅花状	类长方形	— ^d	— ^d
每排头球小钩数	I	36~45	33~39	34~43	34~38	32~38	37~41
	II	39~49	33~45	34~38	37~38	33~40	39~44
	III	40~52	34~46	33~40	41~46	38~45	41~47
	IV	46~55	36~48	33~42	无	无	44~53
颈乳突位置		位于体棘的第11~16环列之间	位于体棘的第9~14环列之间,多数在9~10列之间	位于体棘的第14~18环列之间,多数在15~16列之间	位于体棘的第8~12环列之间	位于体棘的第8~17环列之间	位于体棘的第12~16环列之间
排泄孔位置		在体棘第24~27环列之间	在体棘第19~24环列之间,多数在19~20之间	在体棘第23~27环列之间,多数在24~25之间	— ^d	— ^d	— ^d
体棘环列数		227~288	175~245	185~225	213~232	191~248	242~285

^a Advanced third-stage 晚三期幼虫。
^b Early third-stage 早三期幼虫。
^c 未测定。
^d 无资料。

参 考 文 献

- [1] Almeyda-Artigas, R. J. ,Bargues, M. D. & Mas-Coma, S. . ITS-2 rDNA sequencing of Gnathostoma species(Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas[J]. Journal of Parasitology,2000,86:537-544.
- [2] Andol, K. ,Tsunemori, M. , Akahane, H. . Comparative study on DNA sequences of ribosomal DNA and cytochrome c oxidase subunit 1 of mitochondrial DNA among five species of gnathostomes [J]. Journal of Helminthology,2006,80:7-13.
- [3] Ellis, R. E. , Sulston, J. E. , and Coulson, A. R. . The rDNA of *C. elegans*: Sequence and structure[J]. Nucleic Acids Research,1986,14:2345-2364.
- [4] Gasser, R. B. , AND Hoste, H. . Genetic markers for closely related parasitic nematodes[J]. Molecular and Cellular Probes,1995,9:315-320.
- [5] Hashimoto, K. , Watanabe, T. , Liu, C. X. , Init, I. , Blair, D. , Ohnishi, S. & Agatsuma, T. Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese Fasciola species is *F. gigantica*[J]. Parasitology Research,1997,83:220-225.
- [6] 林秀敏,陈清泉. 江苏省洪泽地区动物的棘颚口线虫病流行病学调查及病原学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),1986,1:100-102.
- [7] Mosqueda-Cabrera, M. A. , Almeyda-Artigas, R. J. , Sanchez-Miranda, E. Etal. Description and development of the early third-stage larva of *Gnathostoma turgidum* Stossich,1902 (Nematoda: Gnathostomatidae) and contributions to its life cycle[J]. Parasitol Res,2010,106(6):1321-1326.
- [8] 吴观陵. 人体寄生虫学(第3版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.

版权所有 · 禁止翻制、电子传阅、发售

SN/T 3497—2013

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
水产品中颚口线虫检疫技术规范
SN/T 3497—2013

*

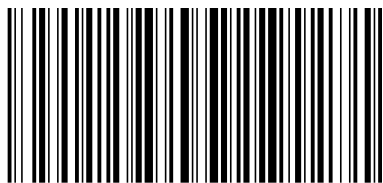
中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)64275323
网址 www.spc.net.cn
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2013年8月第一版 2013年8月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066 · 2-25855 定价 21.00 元



SN/T 3497—2013