

《食品安全国家标准 动物性水产品中华支睾吸虫的检验》 (征求意见稿) 编制说明

一、标准起草基本情况

本标准制定任务来源于国家卫生健康委员会委托制定的食品安全国家标准项目,由厦门海关技术中心和寄生虫检验方法协作组负责起草制定《食品安全国家标准 动物性水产品中华支睾吸虫的鉴定》(项目编号 spaq-2019-055)。2019年8月10日正式启动,2019年12月26日召开食品安全国家标准项目制定启动会,2020年8月4日至8月8日开展标准方法集中验证工作,2020年8月15日形成草案,2020年8月16日至9月15日向有关机构和专家广泛征求意见,期间未收到重大分歧意见。2020年9月20日形成送审稿。2021年3月31日~4月1日,经第二届食品安全国家标准评审委员会微生物检验方法与规程专业委员会第五次会议审查通过,并修改标准名称为“动物性水产品中华支睾吸虫的检验”。

二、标准主要技术内容

本标准适用于即食生制动物性水产制品中华支睾吸虫囊蚴的检验。主要技术内容为形态学方法和分子生物学方法。形态学方法包括压片检查法和胃蛋白酶消化法,分子生物学方法为普通PCR方法和基因测序。根据形态学方法分离疑似囊蚴,再用PCR方法和基因测序进行确认。压片检查法操作简便,适用于有经验的专业人员对囊蚴进行初步判定,胃蛋白酶消化法可以提高囊蚴的检出率,但因部分吸虫的囊蚴形态十分相似而无法准确鉴定。因此,形态学方法只能对华支睾吸虫囊蚴做出初步判断。PCR方法适用于华支睾吸虫囊蚴的种类鉴定。

1. 压片检查法

用载玻片压片检查囊蚴,是华支睾吸虫囊蚴检查的传统方法,可初步诊断华支睾吸虫囊蚴。其基本操作为:取鱼体肌肉组织,放在两张载玻片之间,用力压薄,用棉线扎紧玻片两端,放在生物显微镜下检查。华支睾吸虫囊蚴为椭圆形,囊壁较薄,其外有一层鱼组织反应而产生的纤维层,囊内有一卷曲的活动的幼虫,可见口吸盘和腹吸盘,腹吸盘下方为充满黑色颗粒的排泄囊。

2. 胃蛋白酶消化法

华支睾吸虫囊蚴主要寄生在鱼体肌肉、鳃、鳞和鳍内,并以肌肉为主。具体操作为:肌肉组织用适量的胃蛋白酶消化液置 37 ℃ 温箱至完全消化,然后用网筛过滤。滤液静置约 30 min,沉淀物用生理盐水洗 3 次~5 次,直至上清液透明。用显微镜检查沉淀中的囊蚴。

3. PCR 方法

(1) PCR 扩增和测序结果

应用华支睾吸虫的核糖体 DNA 第二内转录间隔区 (ITS-2) 基因序列设计特异性引物。采用 2 对引物对华支睾吸虫囊蚴进行 PCR 扩增。引物 CS1 和 CS2 对华支睾吸虫囊蚴具有很好的特异性和灵敏度；引物 CsF 和 CsR 也能进行特异性扩增。

对扩增产物进行测序，引物 CS1 和 CS2 扩增序列与国内外已报告的大部分虫株序列 (AF217099、AF217094、AF217097) 同源性均为 100%；引物 CsF 和 CsR 扩增序列与 FJ381664 相应片段同源性为 99%。

(2) 引物 CS1 和 CS2 的适用性试验

对引物 CS1 和 CS2 的退火温度和引物浓度等进行了验证，确认了该引物的最佳退火温度和引物浓度。综合国内外研究和本标准工作组的验证结果，推荐使用 CS1 和 CS2 作为鉴定华支睾吸虫囊蚴的引物。

(3) 灵敏度试验

利用含有引物 CS1 和 CS2 扩增片段的质粒，按 10 倍梯度进行稀释，以测定该引物的灵敏度。经测定，本方法的检出限约为 0.003 ng/μL。另外，取单个囊蚴进行实验，结果证明标准方法可以取得良好的扩增效果。

(4) 方法的重复性和再现性

提取华支睾吸虫囊蚴 DNA，然后分成 5 份，分别在不同的时间进行 PCR 扩增，扩增条带大小和浓度基本一致。表明 PCR 方法具有很好的重复性。

(5) 特异性试验

对东方次睾吸虫、本尼登吸虫等部分华支睾吸虫近缘种吸虫的囊蚴，以及并殖吸虫、广州管圆线虫、颚口线虫、曼氏迭宫绦虫、异尖线虫等常见的食源性寄生虫的核酸进行了特异性试验，结果表明本标准推荐的 PCR 方法对华支睾吸虫具有良好的特异性。而且，本标准以最终的基因序列作为判定的依据，采用 CS1 和 CS2 引物扩增的基因序列与其他近缘种的同源性均低于 95%，可以确保方法的特异性。

实验室间的方法验证结果表明本标准对华支睾吸虫形态学描述准确，PCR 结果稳定、可信，该方法可用于动物性水产品中华支睾吸虫的鉴定。

三、国内外相关法规标准情况

华支睾吸虫病为我国地方性流行病，国外主要流行于朝鲜、印度、越南和菲律宾等少数国家。根据科技及标准查新结果表明，世界动物卫生组织 (OIE) 最新发布的《Manual of

Diagnostic Tests for Aquatic Animals》中尚无华支睾吸虫的检疫方法。世界卫生组织（WHO）发布的疫病信息也无华支睾吸虫或肝吸虫病的相关检疫标准。美国 FDA 以及欧盟等国外相关组织尚无针对水生动物华支睾吸虫囊蚴的检疫标准。

《食品安全国家标准 动物性水产制品》（GB 10136-2015）规定了寄生虫指标，其中针对即食生制动物性水产制品的吸虫囊蚴项目指标为不得检出，检测方法包括肉眼检查和胃蛋白酶消化方法。我国 2009 年发布了《华支睾吸虫病诊断标准》（WS/T 309-2009），适用于人体华支睾吸虫病的诊断。《鱼华支睾吸虫囊蚴鉴定方法》（SNT 2975-2011），适用于华支睾吸虫囊蚴的检测和鉴定。本标准是首次制定的华支睾吸虫囊蚴检验国家标准。

四、其他需要说明的事项

无。