

《食品安全国家标准 动物性水产品中并殖吸虫的检验》(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,《食品安全国家标准 动物性水产品中并殖吸虫的鉴定》(spaq-2019-056),由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所和寄生虫检验方法协作组共同起草制定。2019年8月,正式启动标准制定工作。2019年12月5日在上海召开了食品安全国家标准项目启动会,在广泛调查研究和讨论的基础上,起草了本标准。2020年6~8月,在并殖吸虫流行区进行了现场样本的测定验证和现场的集中验证,同时,邀请了5家以上专业技术机构进行标准方法实验室间验证工作,2020年8月在方法验证的基础上,形成讨论稿,并通过信函的方式广泛征求意见,期间未收到重大分歧意见,经整理归纳后,形成送审稿。2021年3月31日~4月1日,第二届食品安全国家标准审评委员会微生物检验方法和规程专业委员会第五次会议审查通过,并将标准名称修改为“动物性水产品中并殖吸虫的检验”。

二、标准主要技术内容

本标准是将传统的形态学方法和PCR方法相融合的定性检测方法。提取囊蚴是检测的第一个步骤,囊蚴的分离提取涉及两种方法:捣碎法、消化法;PCR方法是在前2种方法基础上对虫种进行定种。捣碎法操作简单,是检测水产品中并殖吸虫囊蚴最常用的形态学鉴定的基础;胃蛋白酶消化法适用于大样本量的检测鉴定,主要用于感染度不高的样本以提高检出率为目的;但是这两种方法都是对并殖吸虫囊蚴形态鉴定的进行初步判断;PCR检测方法可以对囊蚴进行种类确定,因此适用于并殖吸虫囊蚴的定种。

1. 形态学方法

1.1 捣碎法

通过捣碎水产品外壳使得肌肉组织溢出甲壳动物的保护壳,经过滤沉淀,把寄生在这些水产品的肌肉中的并殖吸虫囊蚴分离出来,采用陶瓷研钵为捣碎工具;选用筛孔直径2 mm(10目)和筛孔直径0.425 mm(40目)网筛依次过滤沉淀,全部沉淀置于玻璃平皿中,在体视显微镜下分离囊蚴。并殖吸虫的囊蚴一般呈球形或近椭圆球形,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。

1.2 胃蛋白酶消化法

将样品用陶瓷研钵捣碎，移入三角烧杯中，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 4 h~6 h，至无可见的肉组织消化后的悬液用 10 目网筛过滤，除去粗蟹壳再用 40 目网筛过滤除去细蟹壳，滤液置于锥形量杯内，加生理盐水至锥形量杯的最大刻度处，用生理盐水洗涤沉淀 3 次~5 次至上清液透明为止，全部沉渣吸入玻璃平皿，在体视显微镜下，收集囊蚴。

2 PCR方法

应用并殖吸虫的保守基因序列设计引物，建立PCR检测并殖吸虫囊蚴的方法，可以通过扩增目的基因进行测序，在基因水平上对并殖吸虫囊蚴进行鉴定和定种的优势。本标准最初提出核糖体DNA内转录间隔区2 (ITS-2) 和粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cox1) 两组引物序列对其定种。将囊蚴扩增的PCR产物进行基因序列测定，测序峰图整齐单一，无杂乱套叠的情况，测序质量符合要求。为避免两条目标序列出现矛盾的情况，最终采用提供ITS-2一条目标序列。

形态学方法检出疑似并殖吸虫囊蚴、PCR结果为阳性且扩增片段基因序列与任何一条参考序列同源性 ≥95%，报告检出并殖吸虫囊蚴。形态学方法鉴定未检出囊蚴、或PCR结果为阴性、或基因序列与参考序列同源性 <95%，报告未检出并殖吸虫囊蚴。

本标准的方法通过实验室间验证和现场验证，验证结果表明本标准对并殖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并殖吸虫的鉴定。

三、国内外相关法规标准情况

《食品安全国家标准 动物性水产制品》(GB 10136-2015) 规定了寄生虫指标吸虫囊蚴不得检出。至今，世界动物卫生组织 (OIE) 等国际组织发布的《Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals》和《Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals》中尚无有关并殖吸虫囊蚴的检疫和鉴定的方法资料。世界卫生组织(WHO)发布的报告疫病信息中尚无并殖吸虫和并殖吸虫病相关诊断资料。AOAC、ISO、美国 FDA 以及欧盟等国外相关组织尚无对水生动物并殖吸虫囊蚴的检验标准。

《甲壳类水产品中并殖吸虫囊蚴检疫技术规范》(SN/T 3054-2013)，在并殖吸虫流行区、上海口岸进境水产品的检验及国内水产品的监测得到了广泛应用。本标准在此基础上，明确了检测样品是即食生制动物性水产制品的肌肉，增加了提取囊蚴 DNA 的经典方法，补充完善了并殖吸虫的模式图和实物图，对分子生物学鉴定的方法提出了具体数值要求，并提供了标准参考序列，使标准根据有可操作性，可用于动物性水产品中并殖吸虫囊蚴的检测和鉴定。

表 1、国内相关检测标准

序号	来源国家或组织	标准号	标准名称	方法名称	检测范围/适用基质	与制修订标准的关系
----	---------	-----	------	------	-----------	-----------

1	中国	SN/T 3054-2013	《甲壳类水产品中并殖吸虫囊蚴检 疫技术规范》	形态学及分子 鉴定	动物性水产品虾、 蟹、蜆蛄	非等效
---	----	-------------------	---------------------------	--------------	------------------	-----

四、其他需要说明的事项

无。