

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2975—2011

鱼华支睾吸虫囊蚴鉴定方法

Identification for metacercaria of *Clonorchis sinensis* in fish

2011-09-09 发布

2012-04-01 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：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈信忠、郭书林、陈韶红、龚艳清、李树清、杨俊萍、陈飞、陈家旭、张仪、徐淑菲、孔繁德、胡薇、黄燕。

鱼华支睾吸虫囊蚴鉴定方法

1 范围

本标准规定了鱼体内华支睾吸虫囊蚴的压片检查法、蛋白酶消化法以及 PCR 鉴定方法。本标准适用于鱼类华支睾吸虫囊蚴的病原鉴定及其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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

囊蚴 metacercaria

复殖吸虫幼虫发育中的一个阶段。华支睾吸虫尾蚴进入第二中间宿主后或附着水生植物上,脱掉尾部,躯干部变圆,头腺分泌囊壁而成为具有感染能力的囊蚴。

3.2

中间宿主 intermediate host

寄生虫在幼虫或无性生殖时期所寄生的宿主。华支睾吸虫的幼虫需要经过两个中间宿主,第一中间宿主包括多种淡水螺,第二中间宿主包括多种淡水鱼类和虾类。

3.3

终末宿主 definitive host

寄生虫成虫或有性生殖阶段所寄生的宿主。华支睾吸虫的终末宿主主要包括人、犬、猫、猪等哺乳动物。

4 试剂和材料

4.1 所有化学试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格,用于 DNA 提取及 PCR 实验的水需用灭菌双蒸水。PCR 实验应在符合 SN/T 1193 要求的实验室进行。*Taq* 酶、dNTPs (含 dATP、dUTP、dCTP、dGTP) 等核酸提取及 PCR 所需试剂可选用商品化试剂和试剂盒。

4.2 阳性对照为华支睾吸虫囊蚴或成虫。

4.3 PCR 正向引物 CS1:5'-CGAGGGTCGGCTTATAAAC-3'

反向引物 CS2:5'-GGAAAGTTAAGCACCGACC-3'

4.4 胃蛋白酶消化液(见 A.1)。

4.5 盐酸卡红染液(见 A.2)。

- 4.6 盐酸酒精分色液(见 A. 3)。
- 4.7 CTAB 溶液(见 A. 4)。
- 4.8 抽提液 1(见 A. 5)。
- 4.9 抽提液 2(见 A. 6)。
- 4.10 TBE 电泳缓冲液(见 A. 7)。
- 4.11 核酸染色剂(EB)(见 A. 8)。
- 4.12 上样缓冲液(见 A. 9)。
- 4.13 甲醛、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯、中性树脂。

5 器材和设备

- 5.1 PCR 仪。
- 5.2 显微镜(具目镜测微尺)。
- 5.3 立体显微镜。
- 5.4 高速离心机。
- 5.5 切片机和切片器具。
- 5.6 解剖器具。
- 5.7 微量移液器。
- 5.8 染色缸。
- 5.9 载玻片和盖玻片。

6 鱼体内华支睾吸虫囊蚴的诊断

6.1 显微镜检查方法

6.1.1 压片检查法

6.1.1.1 淡水鱼类为华支睾吸虫的第二中间宿主,囊蚴可寄生于鱼体的肌肉、皮、头、鳃、鳍及鳞等各部分,尤其在鱼体中部的背部和尾部肌肉较多。在鱼体背部及肛区至尾鳍的基部各取约 2 g 肌肉,放在两张载玻片之间,用力压薄,用棉线扎紧玻片两端。

6.1.1.2 将玻片放在低倍显微镜下观察,检查各种囊蚴。新鲜鱼肉中华支睾吸虫囊蚴一般为椭圆形,大小($90\ \mu\text{m}\sim 110\ \mu\text{m}$) \times ($100\ \mu\text{m}\sim 140\ \mu\text{m}$),其外有一层鱼组织反应所产生的纤维层,囊壁分两层,外壁较厚,内壁较薄,囊内有一卷曲的活动的,可见口吸盘和腹吸盘,腹吸盘下方为一椭圆形充满黑色颗粒的排泄囊。在鱼肉中检查到具备上述特征的囊蚴,可初步判定为华支睾吸虫囊蚴。

6.1.2 蛋白酶消化法

6.1.2.1 取鱼体背、腹两侧及尾部肌肉,用剪刀剪碎。

6.1.2.2 取 5 g 鱼肉,置于烧杯中,用 50 mL 胃蛋白酶消化液(见 A. 1)充分混匀后置 37 °C 温箱消化过夜。

6.1.2.3 消化后的悬液用 40 目铜筛过滤,滤液用生理盐水洗涤沉淀 3 次~5 次。

6.1.2.4 全部沉淀分次吸入玻璃平皿,用解剖镜检查沉淀中的囊蚴。

6.1.2.5 按 6.1.1.2 观察囊蚴,并初步判定结果。

6.1.3 囊蚴标本制作方法

6.1.3.1 按 6.1.1 或 6.1.2 方法采集囊蚴。

版权所有·禁止翻制、电子传阅、发售

- 6.1.3.2 囊蚴用两张载玻片夹捆,不要用力压挤,以免囊蚴变形,用8%福尔马林固定2 d。
- 6.1.3.3 取出囊蚴,用自来水冲洗2 min。
- 6.1.3.4 用30%、40%、50%、60%、70%乙醇脱水各3 h,然后用盐酸卡红染液(见A.2)染色2 h~3 h或过夜,使囊蚴染成深红色。
- 6.1.3.5 自染液中取出囊蚴,放入盐酸乙醇分色液(见A.3)中分色10 min~20 min,直至虫体外层呈淡红色,内部构造呈深红色。
- 6.1.3.6 分色后的囊蚴置80%、90%、100%乙醇各90 min,再用二甲苯或水杨酸甲酯透明,移置载玻片上,用加拿大树胶封片。
- 6.1.3.7 显微镜下观察,经过染色后,华支睾吸虫囊蚴鱼皮花纹清晰,囊蚴形态完整,囊壁形态及虫体形态清晰可见(参见附录B)。根据上述特征,可初步判定为华支睾吸虫囊蚴。

6.2 PCR方法

6.2.1 取样

按6.1.1或6.1.2方法在解剖镜下挑取可疑囊蚴,初步鉴定后备用。PCR反应需设立阳性对照,该对照含有已知华支睾吸虫囊蚴感染个体的基因组DNA,或使用插入扩增产物的质粒。每一个PCR反应还应设立不添加模板的阴性对照。

6.2.2 核酸提取

- 6.2.2.1 取25 mg~100 mg含囊蚴组织样品置于1.5 mL灭菌离心管中,加入150 μ L CTAB溶液(见A.4)溶液,用一次性研磨杵充分研磨,再加入650 μ L CTAB溶液,混匀后室温放置2 h,使样品充分裂解。
- 6.2.2.2 加入350 μ L抽提液1(见A.5),充分混合后12 000g离心5 min,取上层水相。
- 6.2.2.3 加入350 μ L抽提液2(见A.6),充分混合后12 000g离心5 min,取上层水相。
- 6.2.2.4 加入1.5倍体积-20 $^{\circ}$ C预冷的无水乙醇,混匀后室温放置10 min。15 000 g离心10 min,弃上清液。
- 6.2.2.5 瞬时离心,用移液器小心吸弃残留上清液。室温放置5 min晾干沉淀。
- 6.2.2.6 加入10 μ L灭菌双蒸水,轻弹管壁使沉淀溶解,即可用作PCR模板。

6.2.3 PCR反应体系

采用50 μ L反应体系。在PCR管中依次加入灭菌双蒸水31 μ L,10 \times PCR缓冲液5 μ L,正向引物和反向引物(20 μ mol/L)各1 μ L,氯化镁(MgCl₂)(25 mmol/L)5 μ L,dNTPs(10 mmol/L)1 μ L,Taq酶(5 U/ μ L)1 μ L,DNA模板5 μ L。

6.2.4 PCR反应程序

反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min,然后94 $^{\circ}$ C 40 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s 40个循环,最后延伸72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C保存。

6.2.5 电泳

用TBE电泳缓冲液(见A.7)配制2%的琼脂糖平板,加核酸染色剂EB(见A.8)。将6 μ L样品和2 μ L样品缓冲液(见A.9)混合后加入样品孔,设立DNA标准Marker作对照。紫外检测仪下观察结果。

6.2.6 结果判定

当阳性对照在 315 bp 位置出现一条单一的核酸条带,阴性对照没有该核酸带,实验结果成立;待测样品在 315 bp 位置出现核酸条带者为阳性;无带或带的大小不是 315 bp 的样品为阴性。

6.3 综合判定

鱼体组织用压片和蛋白酶消化法检查检出囊蚴,再用 PCR 方法鉴定为阳性,可确认为华支睾吸虫囊蚴;PCR 结果为阴性的囊蚴可判定为非华支睾吸虫囊蚴。阳性样品可进行测序进一步确证,序列见 A.10。

附录 A

(规范性附录)

试剂配制和基因参考序列

A.1 胃蛋白酶消化液

胃蛋白酶	7.0 g
盐酸	10 mL
生理盐水	1 000 mL

A.2 盐酸卡红染液

蒸馏水 15 mL 加盐酸 2 mL, 煮沸, 趁热加入卡红染料 4 g。然后, 加入 85% 的乙醇 95 mL, 再滴加浓氨水中和, 直至出现沉淀。待冷却后过滤, 滤液即为盐酸卡红染液。

A.3 盐酸乙醇分色液

70% 乙醇	100 mL
浓盐酸	2 mL

A.4 CTAB 溶液

CTAB	4.0 g
NaCl	16.4 g
Tris-HCl(1 mol/L)	20 mL(pH8.0)
EDTA(0.5 mol/L)	8 mL

先用 70 mL 双蒸水溶解, 再定容至 200 mL, 灭菌冷却后加入 400 μ L 2-巯基乙醇(0.2%~1%) 摇匀。

A.5 抽提液 1

将三氯甲烷和异丙醇按 24 : 1 的比例混合, 避光保存。

A.6 抽提液 2

用 1.0 mol/L pH7.9 Tris 饱和酚、三氯甲烷、异丙醇按 25 : 24 : 1 的比例混合, 避光保存。

A.7 TBE 电泳缓冲液(5 \times 浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g

EDTA

2.9 g

先加适量蒸馏水,完全溶解后用蒸馏水定容至 1 000 mL。用 5 mol/L 的盐酸调到 pH8.0。

A.8 核酸染色剂(EB)

用灭菌蒸馏水配制成 10 mg/mL 的浓缩液。用时每 100 mL 琼脂中加 5 μ L。

A.9 上样缓冲液

每 100 mL 溶液中含:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40 g。

A.10 PCR 产物参考序列

ggaaagttaa gcaccgaccg gtgcaaaaca gatttgcac gaatgcattg ccaatactga agcctcaacc aaagacaaag
gaccaacaac ggagcgcgca cattcacaac aataacaaca attgagccac gactccgccg ccaccccctc atctaggcag tcagcccaga
catggttgcg tccggcacat tggggaaaag ccatagatcc ggcacccac acacatacac acaattgtgt ggggaaatca tgccagctgg
caagacccaa gccacgactt tttgggcgtc gtgatagttt ataagccgac cctcg

附录 B

(资料性附录)

华支睾吸虫病及其囊蚴形态

B.1 华支睾吸虫病概述

华支睾吸虫病(*Clonorchiasis sinensis*)又称肝吸虫病,是由华支睾吸虫寄生引起肝胆病变为主的一种食源性人兽共患寄生虫病。华支睾吸虫病流行于中国、朝鲜、印度、越南、菲律宾等国家。在我国,广东、广西、香港、台湾以及东北三省较为严重,长江流域、黄淮流域及部分丘陵流行区呈轻、中度流行。成虫主要寄生在人、犬、猫、猪等哺乳动物的肝胆管内,成虫排出的虫卵经胆汁入小肠后随粪便排出体外。虫卵入水后被第一中间宿主淡水螺吞食,在螺体内发育为尾蚴逸出,尾蚴遇到第二中间宿主淡水鱼,钻入鱼体内发育成囊蚴。人们因生食或半生食含有活囊蚴的鱼、虾而感染。囊蚴进入十二指肠后,移行至胆管发育为成虫。人们生食或半生食鱼虾是主要的感染方式,如吃生鱼片和鱼生粥,可将活囊蚴食入而感染。另外,用同一块砧板处理生、熟食物,或饮用生水,也有可能感染。动物的粪便入水而污染鱼塘,可引起肝吸虫病的传播。在烧、烤、烫或蒸鱼时,可因温度不够或时间不足而不能杀死全部囊蚴。

B.2 鱼华支睾吸虫囊蚴的主要宿主和形态结构

淡水鱼类和虾类是华支睾吸虫的第二中间宿主。该虫对鱼类的选择性不强,国内已证实的淡水鱼宿主有 12 科 39 属 68 种。但从流行病学角度看,养殖的淡水鲤科鱼类,如草鱼、青鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲫鱼、鲤鱼、鳊鱼和鲫鱼等特别重要,麦穗鱼等野生小型鱼类感染率很高。囊蚴可分布在鱼体的肌肉、皮、头、鳃、鳍及鳞等各部分,一般以肌肉最多,尤其在鱼体中部的背部和尾部肌肉较多。因鱼的种属不同,囊蚴的分布也有所不同。除淡水鱼外,淡水虾如细足米虾、巨掌沼虾等也可有囊蚴寄生。

华支睾吸虫囊蚴形态结构见图 B.1。

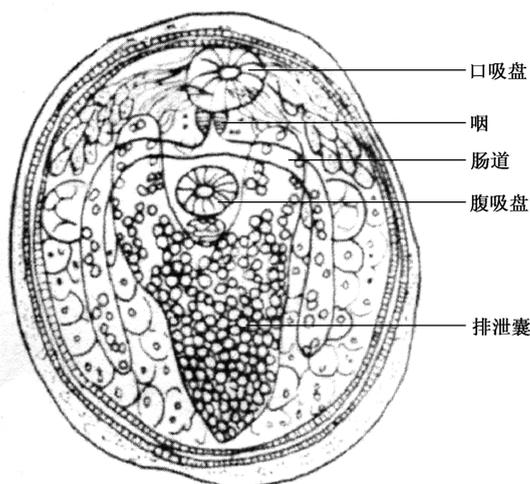


图 B.1 华支睾吸虫囊蚴模式图

版权所有·禁止翻制、电子传阅、发售

SN/T 2975—2011

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
鱼华支睾吸虫囊蚴鉴定方法
SN/T 2975—2011

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

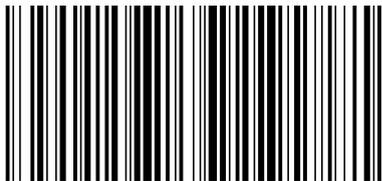
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2012年3月第一版 2012年3月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-23044 定价 16.00 元



SN/T 2975-2011