

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 571—2017

裂头绦虫幼虫检测

Detection of diphyllbothroid larvae

2017 - 08 - 01 发布

2018 - 02 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准依据GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、上海出入境检验检疫局、上海市疾病预防控制中心。

本标准起草人：陈韶红、李树清、张小萍、许学年、卢艳、蔡玉春、张永年、李浩、艾琳、郑彬。

裂头绦虫幼虫检测

1 范围

本标准规定了裂头绦虫幼虫检测的操作流程。

本标准适用于各级疾病预防控制机构、医疗机构和食品检测机构对鱼、蛙和蛇中裂头绦虫幼虫的检测。

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 18088 出入境动物检疫采样标准

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

裂头蚴 plerocercoid larvae

裂头绦虫的幼虫，是假叶目（Pseudophyllidea）、裂头科（Diphyllbothriidae）绦虫第三期幼虫的总称（参见附录A）。

3.2

阔节裂头蚴 plerocercoid larvae of *Dibothriocephalus latus* 或 *phyllobothrium latum*

寄生在鱼体内阔节裂头绦虫的第三期幼虫。

3.3

曼氏裂头蚴 plerocercoid larvae of *Spirometra mansoni*

寄生在蛙、蛇或人体内曼氏迭宫绦虫的第三期幼虫。

4 仪器器材

- 4.1 生物显微镜。
- 4.2 体视显微镜。
- 4.3 PCR 扩增仪。
- 4.4 电泳仪。
- 4.5 凝胶成像系统。
- 4.6 超净工作台。
- 4.7 高速离心机。
- 4.8 解剖用手术器械。

5 试剂材料

5.1 试剂

胃蛋白酶消化液；Tris-乙酸电泳缓冲液（TAE）；琼脂糖凝胶；6×加样缓冲液；100~2000 bp DNA marker；灭菌双蒸馏水（ddH₂O）；70%乙醇（配制见附录 B 的 B.1）。

5.2 引物

扩增裂头蚴核糖体 DNA 转录间隔区（ITS）引物序列；扩增裂头蚴细胞色素 C 氧化酶（Cox1）引物序列；阔节裂头蚴特异性引物序列及曼氏裂头蚴特异性引物序列（见附录 B 的 B.2）。

5.3 阳性对照

阳性对照为裂头绦虫相应基因片段的阳性克隆质粒或裂头蚴、裂头绦虫全基因组 DNA。

6 检测步骤

6.1 样品准备

- 6.1.1 样品种类：海鱼、淡水鱼、蛙和蛇。
- 6.1.2 样品采集：采样按照 GB/T 18088 执行。

6.2 样品检测

6.2.1 压片检查法

用手术剪对受检的鱼、蛙和蛇逐条/只进行解剖。取出内脏，将腹腔壁内膜刮下，观察腹腔内壁表面，若有可疑白色点状物，用手术剪或手术刀分离皮肉，用两把小镊子将肌肉撕开，取含有白色点状物的组织用载玻片压片，用生物显微镜镜检判定结果。

6.2.2 蛋白酶消化法

称取样品 250 g 并剪成小块，按样品与胃蛋白酶消化液 1:5 的比例加入消化液，37℃消化至无肉眼可见的肉组织为止。消化后用 0.8mm×0.8mm（10 目）网筛过滤，滤液置于尖底量筒内，加水（用水参照 GB/T 66828）至最大刻度处，沉淀洗涤至水清，全部沉渣置平皿，用体视显微镜镜检判定结果。

6.2.3 核酸检测法

6.2.3.1 取样

在体视显微镜下挑取虫体，初步鉴定后备用。PCR 反应设立阳性对照，对照为裂头绦虫相应基因片段的阳性克隆质粒或裂头蚴、裂头绦虫全基因组 DNA。无菌水作空白对照。

6.2.3.2 DNA 的提取（见附录 B 的 B.3）

6.2.3.3 反应体系

总体积为 25 μL，模板 DNA 2 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，dNTPs 2 μL，MgCl₂ 2.5 μL，10×Buffer 2.5 μL，Taq 酶（5 U/μL）0.2 μL，补充 ddH₂O 至 25 μL。

6.2.3.4 PCR 反应程序

94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃延伸 7 min。

6.2.3.5 电泳

取 10 μL 产物与 2 μL 的 6×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×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。

6.3 结果判定

6.3.1 裂头属的裂头蚴判定

若从鱼体内检出的幼虫大小若长 2mm~20 mm，宽 2mm~3 mm，乳白色，头节呈匙形，其背腹面各有一条窄而深凹的吸槽，体前端有凹陷且稍大，体不分节但具有横皱褶，尾部细，呈棍棒状，具有与成虫相似的头节，可初步判定裂头属的裂头蚴（参见附录 C）。

6.3.2 迭宫属的裂头蚴形态判定

若从蛙或蛇体内检出的幼虫大小若长 0.5cm~80 cm，宽 0.3cm~1 cm，长带形，乳白色或淡黄色，虫体前端无吸槽，顶端中央有一孔向内凹陷成隧道状，并向后延伸形成盲管，虫体不分节，具有不规则的

皱褶，可初步判定为迭宫属的裂头蚴（参见附录 C）。

6.3.3 核酸扩增结果判定

6.3.3.1 目的基因扩增片段出现条带而空白对照未出现条带，实验结果成立。

6.3.3.2 阔节裂头蚴特异引物扩增，出现 428 bp 的特征条带，初步判定该虫种为阔节裂头蚴。

6.3.3.3 曼氏裂头蚴特异引物扩增，出现 156 bp 的特征条带，初步判定该虫种为曼氏裂头蚴。

6.3.3.4 若要进一步对幼虫定种，需将引物扩增产物进行测序，将其序列与 GenBank 上序列进行比对后定种。

附 录 A
(资料性附录)
病原学资料

裂头蚴 (plerocercoid) 是假叶目 (Pseudophyllidea)、裂头科 (Diphyllbothriidae) 绦虫的第三期幼虫的总称。裂头科中的裂头属 (*Dibothriocephalus*) 又名双叶槽属 (*Diphyllbothrium*) 及迭宫属 (*Spirometra*) 的裂头蚴可感染人体。

A.1 形态

A.1.1 裂头属的裂头蚴的形态

阔节裂头蚴长 2 mm~20 mm, 宽 2mm~3 mm, 乳白色, 头节呈匙形, 其背腹面各有一条窄而深凹的吸槽, 体前端有凹陷且稍大, 体不分节但具有横皱褶, 尾部细, 呈棍棒状, 具有与成虫相似的头节, 裂头蚴皮层表面覆盖微毛, 长度约 1.5 μm。

A.1.2 迭宫属的裂头蚴形态

曼氏裂头蚴长 0.5cm~80 cm, 宽 0.3cm~1 cm, 长带形, 乳白色或淡黄色, 虫体前端无吸槽, 顶端中央有一孔向内凹陷成隧道状, 并向后延伸形成盲管, 虫体不分节, 具有不规则的皱褶。

A.2 生活史

阔节裂头绦虫成虫寄生在人以及犬、猫、猪等动物的小肠内。虫卵随宿主粪便排出后, 在 15~25℃ 的水中, 经过 7d~15d 的发育, 孵出钩球蚴。当钩球蚴被剑水蚤吞食后, 在其血腔内经过 2 周~3 周的发育成原尾蚴。当受感染的剑水蚤被小鱼或幼鱼吞食后, 原尾蚴可在鱼的肌肉、性腺、卵内发育为裂头蚴, 裂头蚴并可随着鱼卵排出。当大鱼吞食含有裂头蚴的小鱼或鱼卵后, 裂头蚴可侵入大鱼的肌肉组织内继续生存, 直到终宿主食入带裂头蚴的鱼时, 裂头蚴方能在其肠内经 5 周~6 周发育为成虫。成虫在终宿主体内可活 5 年~13 年。可感染阔节裂头蚴的第二中间宿主有: 白斑狗鱼 (*Esox lucius*)、江鳕 (*Lota lota*)、河鲈 (*Perca fluviatilis*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、樱花钩吻鲑 (*Oncorhynchus masou*)、鲮鱼 (*Liza haematocheila*)、溪红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*)、虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)、雅罗鱼属鲤 (*Leuciscus rutilus*)、八目鳗 (*Lampetra japonicum*) 等。

曼氏迭宫绦虫的成虫寄生在猫、犬及食肉野生动物为终宿主的小肠内, 虫卵随宿主粪便排出体外, 在适宜温度下, 经过 2 周~5 周发育孵出六钩蚴, 被剑水蚤吞食后发育成原尾蚴, 原尾蚴被蛙类吞食可发育成裂头蚴, 人吞食含有裂头蚴的第二中间宿主可引起曼氏裂头蚴病。可感染曼氏裂头蚴的第二中间宿主为蛙类; 鸟类、蛇类、猪可作为转续宿主。

附 录 B
(规范性附录)
与检测相关的技术方法

B.1 试剂配制**B.1.1 胃蛋白酶消化液**

胃蛋白酶2 g, 浓盐酸0.7 mL, 加蒸馏水至100 mL, 现用现配。

B.1.2 Tris-乙酸电泳缓冲液 (TAE)

三羟甲基氨基甲烷 (Tris碱) 242 g, 冰乙酸57.1 mL, pH 8.0的 0.5 mol/L EDTA液100 mL, 加蒸馏水定容至1000 mL, 制成50×TAE缓冲液, 混匀4℃保存备用。临用前50倍稀释。

B.1.3 1×TAE使用液

50×TAE 20 mL, 加蒸馏水定容至1000 mL, 混匀备用。

B.1.4 10 mg/mL溴化乙锭液

溴化乙锭1 g, 加蒸馏水定容至100 mL, 磁力搅拌至完全溶解, 室温避光保存。

B.1.5 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 溴化乙锭5 μL (终浓度0.5 μg/mL), 轻轻混匀后, 制备凝胶。

B.1.6 6×加样缓冲液

溴酚蓝0.25 g, 蔗糖40 g, 加蒸馏水至100 mL。置4℃保存备用。

B.1.7 商品化试剂盒

Taq酶、dNTP等核酸提取及PCR试剂可选用商品化试剂和试剂盒。

B.2 引物模板

裂头绦虫幼虫相关引物见表B.2

表B.2裂头绦虫幼虫相关引物

引物名称	引物编号	序列	片段大小/bp
裂头蚴 ITS 通用引物	18S-DF1	5'-ACTTGATCATTTAGAGGAAGT-3'	1409
	28S-DR4	5'-CTCCGCTTAGTGATATGCT-3'	
裂头蚴 Cox1 通用引物	JB6	5'-GATAGTAAGGGTGTGA-3'	650
	JB5R	5'-CAAGTATCRTGCAAAATATTATCAAG-3'	
阔节裂头蚴特异引物	DI/Dn-1805F	5'-CAGTGGAATGGTGCTTGTAAATGT-3'	428

	DI-2211R	5'-TAACCTTTACTTATAACTACT-3'	
曼氏裂头蚴特异性引物	F965	5'-CTTGGCTTTATATGATTTAAATAG-3'	156
	R1120	5'-GTTTGGTGCACAGTACGTTTAAAA-3'	

B.3 DNA的提取

B.3.1 挑取单条待鉴定虫体放入灭菌离心管，加入灭菌蒸馏水，半小时换一次水，重复洗涤3次，洗涤完毕后弃掉离心管中蒸馏水，用碾磨棒将离心管中虫体碾碎，加入180 μ l Buffer ATL，20 μ l蛋白酶K，混匀后于56℃孵育1~3 h至消化完全，期间不时振荡摇晃。

B.3.2 消化完全后，漩涡震荡15 s，加200 μ l Buffer AL，立即漩涡振荡混匀，再加入200 μ l 乙醇（96~100%），漩涡振荡混匀。

B.3.3 离心柱置于收集管上，将上一步的混合物吸入离心柱中，8000 r/min离心 1 min，弃收集管。

B.3.4 将离心柱置于新的收集管中，加500 μ l Buffer AW1，8000 r/min离心 1 min，弃收集管。

B.3.5 将离心柱置于新的收集管中，加500 μ l Buffer AW2，14000 r/min离心 3 min，弃收集管。

B.3.6 将离心柱置于灭菌的1.5 ml离心管中，加入200 μ l Buffer AE室温孵育1 min，8000 r/min离心 1 min，离心所得DNA于-20℃冰箱保存备用（重复该步骤可扩大DNA回收率）。

B.4 实验试剂代码解释（试剂盒自带）

Buffer AL: 裂解缓冲液（Lysis buffer）

Buffer AW1: 洗涤缓冲液1

Buffer AW2: 洗涤缓冲液2

Buffer ATL : 组织溶解缓冲液

Buffer AE: 溶解缓冲液

附录 C
(资料性附录)
裂头蚴实物图

C.1 白鱼肌肉中的阔节裂头蚴见图C.1



图C.1

C.2 鳟鱼肌肉中的阔节裂头蚴见图C.2



图C.2

C.3 蛙体内的曼氏裂头蚴见图C.3



图C.3

C.4 蛇体的曼氏裂头蚴见图C.4



图C.4

注：图C.1来自参考自文献：Tomáš Scholz, Hector H. Garcia, Roman Kuchta, Barbara Wicht. Update on the Human Broad Tapeworm (*Genus Diphyllbothrium*), Including Clinical Relevance. [J]Clin Microbiol Rev. 2009 January; 22(1): 146–160. doi: 10.1128/CMR.00033-08
图 C.2、C.3、C.4 为检测样品自己拍摄。

参 考 文 献

- [1] 吴观陵. 人体寄生虫学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [2] Scholz T, Garcia HH, Kuchta R, Wicht B. Update on the human broad tapeworm (genus *diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clin Microbiol Rev.* 2009, 22(1):146-160.
- [3] 余森海, 许隆祺. 人体寄生虫学彩色图谱. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1992.
- [4] 刘自逵, 刘国华, 戴荣四, 刘伟, 李芬, 等. 湖南省狷迭宫绦虫的线粒体 *cox1* 和 *nad1* 基因的序列测定及种系发育分析. *畜牧兽医学报.* 2010, 41: 463-468.
- [5] Wicht B, Ruggeri-Bernardi N, Yanagida T, Nakao M, Peduzzi R, *et al.* Inter-and intra-specific characterization of tapeworms of the genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Diphylobothriidea) from Switzerland, using nuclear and mitochondrial DNA targets. *Parasitol Int.* 2010, 59: 35-39.
- [6] SH Chen, L Ai, YN Zhang, JX Chen, WZ Zhang, *et al.* Molecular Detection of *Diphyllobothrium nihonkaiense* in Humans, China. *Emerg Infect Dis,* 2014,20: 315–318.
-