**《动物源性食品中裂头蚴检测方法》编制说明**

注：提交时黑色和蓝色字均不可删减。没有的应写“无”。

# 一、工作简况

## （一）任务来源

本任务来源于农业农村部农产品质量安全监管司《关于下达2023年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函[2023]51号），项目名称：制定《动物源性食品中裂头蚴检测方法》标准，项目编号：NYB-23093。

该任务的制定背景如下：

**1、裂头蚴严重危害动物性食品的质量和安全**

迭宫绦虫（*Spirometra* spp.）是一种常见、危害严重的人兽共患食源性寄生虫，广泛寄生于猪、犬、猫、禽鸟类、蛇、蛙、鱼、野生动物及人类体内，对宿主机体造成严重的损伤，甚至威胁生命。其中犬、猫为其终末宿主；猪、禽、鱼类、人等动物为其中间宿主或转续宿主，此时寄生的是其幼虫裂头蚴（Plerocercoid larvae，亦称spargana）。根据跌宫绦虫线粒体细胞色素c氧化酶亚基1（Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1, *cox*1）基因序列分析，目前多数学者认为该属寄生虫存在6个有效种（系），分别是：欧猥跌宫绦虫（*Spirometra erinaceieuropaei*），主要流行于欧洲；虚假跌宫绦虫复合体1（*Spirometra decipiens* complex 1），主要流行于美洲；虚假跌宫绦虫复合体2（*Spirometra decipiens* complex 2），主要流行于美洲；*Spirometra folium*，主要流行于非洲；曼氏跌宫绦虫（*Spirometra mansoni*），主要流行亚洲，在东南欧洲（如乌克兰）、大洋洲、非洲也有报道；亚洲跌宫绦虫（*Spirometra asiana*，以前称为*Spirometra* sp. 1），目前主要流行于日本。其中，我国流行的主要是曼氏跌宫绦虫。

猪感染跌宫绦虫裂头蚴后，引起食欲不振、非外寄生虫性皮肤发痒、生长缓慢等症状，严重影响养猪业的经济效益。任务承担单位自2015年起，持续承担国家农产品质量安全风险评估项目中畜禽产品病原菌和寄生虫污染风险评估工作，开展了上海、重庆、山东、广东、浙江等省市猪产品中跌宫绦虫裂头蚴携带情况的监测工作，发现2015和2016年上海、重庆、广州等地猪肉中曼氏裂头蚴的阳性率分别达3.57%和0.14%，其他年度也存在不同程度的污染；2015年 ~ 2018年，上海多个大中型屠宰场、区县农贸市场、超市采集的猪肉中裂头蚴的阳性率为0.53%。这些结果提示，上述地区猪群中存在跌宫绦虫裂头蚴感染，对猪群健康及养猪业的经济效益存在潜在威胁。

**2、裂头蚴严重危害消费者的健康**

食源性和水源性腹泻病每年导致约220万人死亡，其中多数是儿童[世界卫生组织（World Health Organization，WHO），https://www.who.int/foodsafety/ areas\_work/ foodborne-diseases/zh/]。WHO更是将2015年世界卫生日（4月7日）的主题定为“食品安全”。

我国党和政府历来高度重视包括猪肉在内的动物食品安全问题。十九大报告指出，要“实施食品安全战略，让人民吃得放心”。但我国动物食品的质量和安全离人民群众的期望仍有较大差距，食品安全事故频发，其中，动物源性病原是引发动物食品安全事件最主要的因素。2011~2014年，我国报告的食源性疾病爆发次数由每年809次递增至1 480次，患病人数由14 057人递增至17 651人；2008~2012年，卫生部收到食源性疾病爆发事件1 244起，发病44 856人，死亡749人，其中由动物源性病原引起的食源性疾病事件数占我国食源性疾病事件数的71.0%，发病人数占79.6%，死亡人数占62.0%（夏咸柱等，2016）。

猪肉是我国居民最喜欢的肉类食品，2016年，我国居民人均肉类消费量为26.1 kg，其中猪肉为19.6 kg，占75.1%。作为我国最主要肉类来源的猪肉，显然在食源性疾病感染事件中扮演着及其重要的角色。食源性寄生虫就是其中引发动物性食品安全事故的一类重要病原。2014年，联合国粮农组织（Food and agriculture organization, FAO）和WHO根据全球患病人数、全球分布情况、发病的严重程度、病死率、加重疾病的潜力、寄生虫-食物途径与国际贸易的关系、对经济的影响程度和范围等方面对食源性寄生虫进行评分，发现24种寄生虫的危害较大，跌宫绦虫就包含在其中（Robertson et al, 2013）。

迭宫绦虫的幼虫裂头蚴可寄生于人体的不同部位，其中眼裂头蚴病最常见，可引起眼脸红肿、结膜充血、奇痒、流泪，伴发热、恶心和呕吐，眼球运动障碍，严重者视角膜溃疡，并发白内障而失明；皮下裂头蚴病导致皮下结节、瘙痒、炎症、触痛或持续疼痛；脑裂头蚴病常阵发头痛，严重时昏迷、呕吐、视力模糊、肢体麻木甚至瘫痪；内脏裂头蚴病可引起呼吸道咳血、消化道炎症、尿道或膀胱炎症，后果严重。迭宫绦虫呈世界性分布，亚洲常见人患病的报道，全球病例超过1 400例，我国1000多例，尤以南方省区多见。近年来，该病发病率呈上升趋势，尤其脑脊髓裂头蚴病的比例明显增高，成为我国重要的人兽共患食源性寄生虫病之一。

1991-2001年上海卢湾区居民患寄生虫病住院病人中，由食源性寄生虫引发的占45.9%，其中裂头蚴病占0.78%。陈韶红等（2014）对2011-2013 年上海临床医院送检样品进行了寄生虫检测结果分析，发现在送检的10 212份血清样品中，曼氏迭宫绦虫占17.5%（128/730）；对5939份粪便、痰液、体液和病理切片样品进行病原学检测，共检出曼氏跌宫绦虫6例。

然而，在动物源性食品生产产业链中，对畜禽生长危害重大的疫病在养殖场受到重视，危害小但严重危害食品安全的病原如裂头蚴长期被忽视；少量检疫性病原如旋毛虫在屠宰环节得到重视，大量严重危害畜禽产品安全的病原检测阙如；贮藏、运输和销售环节基本没有监测，从而使动物性食品存在极大的安全隐患。

然而，迄今我国尚无动物源性食品中跌宫绦虫裂头蚴检测方法技术标准在实施，仅有卫生标准《裂头蚴病的诊断》（WS 438-2013 ）、《裂头绦虫幼虫检测》（WS/T 571-2017）。人裂头蚴病诊断标准不适合动物源性食品中裂头蚴的检测，水产品中寄生虫的检验技术标准也不适合畜禽等动物。为规范检测、强化监管和执法，亟待建立动物性食品中裂头蚴PCR检测方法技术标准，该标准的制定将极大提升动物源性食品中裂头蚴的检测工作，提升动物产品的质量安全水平。

## （二）起草单位和主要起草人及其所做的工作

## （三）主要工作过程

要按标准各阶段为单位分别编写。列出各阶段的关键内容。征求意见、审查阶段的主要内容要详细给出。征求意见要对征求对象的代表性、回复情况、意见处理情况进行总结说明。

1. **起草阶段（2014年10月-2019年6月）**

**（1）了解和学习阶段（2014年10月-2015年3月）**

主要了解和学习了裂头蚴病研究进展、国内外动物源性食品中裂头蚴最常使用的检测技术及其优缺点。同时，了解了国内外人和动物裂头蚴现有检测技术标准，尤其是卫生行业标准《裂头蚴病的诊断》（WS 438-2013 ）等。

**（2）技术优化阶段（2015年3月-2019年3月）**

自2015年3月起，对国内外报道的动物源性食品中裂头蚴病原学检测、PCR检测技术进行了比较和优化，在实验室内相继建立了上述技术，并运用建立的技术，对田间采集的猪肉、蛙、蛇等样品进行了检测，对阳性样品进行了部分基因序列测定和系统进化发育研究。

2016年7月起，对裂头蚴病免疫学检测技术进行了研究，开展了曼氏裂头蚴免疫蛋白质组学研究，筛选获得了20个潜在的免疫诊断抗原，开展了部分抗原基因的克隆、表达、免疫反应性研究；克隆表达了曼氏跌宫绦虫半胱氨酸蛋白酶（Cysteine Protease, CP）编码基因的克隆、表达、重组蛋白反应原性研究，利用重组半胱氨酸蛋白酶（rSmCP）建立了间接ELISA诊断技术；制备了曼氏跌宫绦虫裂头蚴可溶性抗原和排泄分泌抗原，建立了间接ELISA诊断技术；比较了上述ELISA诊断方法的敏感性和特异性，并开展了现场样品的初步应用。

通过上述研究和比较，并经田间样品检测和应用，最终确定目前申报的方法。

**（3）起草阶段（2019年4月-2019年6月）**

根据国内外文献、前期研究进展，参考有关技术规范，进行了标准征求意见稿的起草。

1. **征求意见阶段（2019年6月-2023年9月）**

**（1）征集意见（2019年6月-2023年9月）**

将起草的标准征求意见稿送国内11位同行专家评审，其中大专院校专家7位，分别来自中国农业大学、南京农业大学、吉林农业大学、山东农业大学、浙江大学、河南农业大学、新疆农业大学，其中包含一位来自宠物医院的兽医临床专家（于咏兰副教授）；科研院所专家4位，分别来自中国农业科学院兰州兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、宁波市禽畜病研究所，其中宁波市禽畜病研究所主要开展家畜、家禽和宠物诊疗及疾病防控技术研发，属应用单位。因此，征求专家的代表性良好。

共收到10位专家返还意见，有一位专家未提出具体意见。共征集到意见46条，主要集中在样品采集、PCR扩增、阳性标准对照、范围、题目等方面。征集到意见46条，其中同意采纳44条，占95.65%；未采纳2条，占 4.35%，对未采纳和部分采纳者均在备注栏中均做了说明。主要涉及2个方面：（1）是否有必要增加引言，内容包括为什么要制定这个标准、裂头蚴基本概念、裂头蚴寄生部位等等。考虑到引言为非必须部分；且综合其他专家意见，考虑到人和动物裂头蚴感染早有报道，在人和动物中有一定的流行率；裂头蚴感染的基本知识在编制说明中已有相关内容，因此，标准文本中就不再介绍。（2）是否可以用构建好的含有靶基因序列的质粒作为PCR质控模板，无须用虫体作为质控标准。此意见与其他专家的观点不同；同时，样品DNA提取过程也可能存在误差，导致提取的DNA质量不符合要求，造成扩增效果不好。因此，以鉴定正确的裂头蚴或其片段作为阳性对照，与待检样品同时进行DNA提取和检测，可以更好地降低误操作带来的结果不准确，故没有采纳该建议。

**（2）修改补充和田间样品应用阶段（2019年8月-至今）**

继续从上海、重庆、山东、广州、浙江采集猪肉、猪血液，以及蛙、蛇等样品，利用标准所列方法，进行检测，评估各种方法的诊断效果及其敏感性、特异性、重复性，继续优化各种诊断方法。

**3. 审查阶段（2023年10月-至今）**

根据专家意见，结合田间应用结果、最新公开发表文献的学习，对标准征求意见稿进行修改，形成标准送审稿，报全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC181）秘书处，进行审查。

~~4. 报批阶段（此次不写本部分）~~

# 二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

## （一）标准的编写原则

主要阐述标准制定或修订过程遵循的基本原则。

1、 根据“先进性、实用性、统一性、规范性”的标准编制原则，本标准的制定将重点关注标准的通用性、适用性和可操作性，并符合我国国情；

2、标准的格式严格按照GB/T 1.1《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》、GB/T 1.2-2020《标准化工作导则 第2部分：以ISO/IEC标准化文件为基础的标准化文件起草规则》给出的规则。

## （二）提出本标准主要内容的依据

主要内容包括技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等。依据包括试验和统计数据。尤其注意本条不要写成任务来源。

**1、生产需要**

我国生猪养殖面广量大，其中中小养殖场/户占多数，这些养殖场/户技术人员数量少、缺乏高精尖的仪器设备。而裂头蚴病的诊断更多应用于屠宰企业，同样，屠宰企业的规模和技术水平参差不齐，大多数的屠宰企业缺乏专业的检测人员和高精尖的仪器设备。因此，在制定猪裂头蚴病的诊断标准时，必须要考虑生产企业的实际，选择既适合广大基层使用，又能在大专院校、科研院所使用，确保诊断的准确性、有效性和先进性。

**2、技术依据**

当前，动物源性食品中裂头蚴的检测方法主要包括病原学、血清学和分子生物学诊断技术。

由于跌宫绦虫裂头蚴虫体较大，肉眼即可观察到。因此，目检法在生产现场应用最广，尤其适合屠宰企业在宰后检疫中运用。但目检法需要检测人员有一定的鉴别能力和实践经验，存在较大的主观性，因此，不能作为确诊的方法。而显微镜检法可以显著弥补这个缺陷，根据虫体的体表特征、大小、寄生部位等，可以进行确诊。以往，国内外主要采用该法进行动物源性食品中跌宫绦虫裂头蚴感染监测、调查；当前，国内外仍普遍应用。但该法无法鉴定裂头蚴的种类。

血清学诊断方法在猪的生前诊断中发挥重要作用，目前建立的血清学方法包括间接血凝技术、酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫印迹技术、胶体金渗滤法等，这些技术各有优缺点，其中间接血凝和胶体金渗滤法相对敏感性较低；免疫印迹技术容易产生非特异性斑点；ELISA法相对敏感、重复性相对较好，使用比较方便，应用相对较多。但是，所有免疫学方法都存在抗原特异性的问题，现有的裂头蚴诊断抗原，无论是可溶性抗原、排泄分泌抗原，还是单一重组抗原（其中应用较多的是半胱氨酸蛋白酶），与亲缘关系相近的其它蠕虫，均存在一定程度的交叉反应，从而影响了该技术的应用，目前在生产实践中甚少应用。

分子生物学方法可以进行裂头蚴种（系）的区分，有效地解决这个缺陷，而且具有灵敏、特异等优点。目前，国内外PCR检测的靶基因较多，有*cox*1（Zhu XQ et al., 2002; Liu W et al., 2010; Yanagida T et al., 2010; Tappe D et al., 2013; Boonyasiri A et al., 2014; Zhang X et al., 2015a; Zhang X et al., 2015b; Tang TH et al., 2017; Jeon HK et al., 2018; Hong X et al., 2020; Liu W et al., 2020; Bazsalovicsová E et al., 2022）、核糖体小亚基rRNA（Small subunit ribosomal RNA, SSU rRNA，也常称为18S rRNA）（Kołodziej-Sobocińska M et al., 2014; Kołodziej-Sobocińska M et al., 2016; Zhang X et al., 2017; Kondzior E et al., 2018; Kondzior E et al., 2020）、核糖体大亚基rRNA（Large subunit ribosomal RNA, Ls rRNA，也常称为28S rRNA）（Zhang X et al., 2014; Meng Y et al., 2019）、NADH脱氢酶亚基1（NADH dehydrogenase subunit 1, *nad*1）、核糖体内转录间隔区序列（internal transcribed spacer, ITS）（Lee SU et al., 1997; Dai RS et al., 2012; Ndosi BA et al., 2020）、*cox*3（Tan L et al., 2017）基因等。但基于*cox*1的PCR方法应用最广，多数学者也认为其鉴别效果更好（Hong X et al., 2020; Kuchta R et al., 2021; Bazsalovicsová E et al., 2022; Yamasaki H et al., 2024）。申请者所在实验室，采用基于*cox*1和*nad*1基因的PCR方法检测上海、浙江等地蛙中分离的疑似曼氏迭宫绦虫裂头蚴，发现均能有效扩增，并成功鉴定虫种（Zhang X et al., 2020）。

## 鉴于上述因素，本标准选择目检法和基于*cox*1部分基因的PCR方法作为动物源性食品中裂头蚴的检测方法，可兼顾生产一线和实验室鉴定使用。

## （三）新旧标准对比（适用于修订标准的情况）

# 无。

# 三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

**（一）主要试验或验证的分析**

1、建立了基于*cox*1的PCR检测技术，分析了其敏感性和特异性；将建立的PCR技术应用于上海、重庆、山东、广东、浙江猪肉及血清、牦牛肉、蛙等的检测。其中上海猪肉的总阳性率为0.53%（6/1129），重庆猪肉的总阳性率为0.37%（4/1073），广东的总阳性率为0.91（6/658）；长三角地区蛙的总阳性率为4.08（19/466）。

2、克隆表达了曼氏跌宫绦虫裂头蚴半胱氨酸蛋白酶（*Spirometra mansoni* cysteine protease, SmCP）的编码基因，重组SmCP（recombinant SmCP, rSmCP）的大小约为37 kDa，主要以包涵体形式存在。表达产物有良好的反应原性，能与小鼠感染血清反应。

3、利用重组表达的rSmCP、可溶性蛋白及排泄分泌抗原作为包被抗原，建立了检测抗体的间接ELISA技术。对小鼠感染裂头蚴后的血清进行检测，发现小鼠在感染后6 d（day 6 post infection, D6PI）抗体显著上升，OD值达1.2275，至D48PI时达到最高峰，OD值达2.214；此后，明显下降，至D51PI时将至0.552，此后有所回升，在D63PI时达0.859。

4、制备了曼氏跌宫绦虫裂头蚴的可溶性抗原；免疫兔子，制备了抗血清；利用间接ELISA技术检测，发现新西兰白兔在首免后，抗体水平迅速上升，二免时达到0.9左右，三免后抗体水平增长速度放缓。

5、采用免疫蛋白组学技术，对裂头蚴诊断抗原进行了筛选。结果，阴性血清检测发现存在296个斑点；阳性血清组存在229个斑点，扣除阴性组相同的斑点外，共获得了20个差异斑点；测定了上述斑点的氨基酸序列，对其中部分斑点的编码基因序列进行了克隆和表达；利用重组抗原，建立的间接ELISA诊断技术，目前正在对这些方法进行比较和筛选。

6、对蛙裂头蚴感染情况进行了检测。对上海闵行、江苏海门、浙江嘉兴等区采集的386只蛙进行检测，供发现阳性蛙19只，阳性率4.92%，分离猎头与虫体27条。利用基于*cox*1基因序列的系统发育分析发现，发现的虫体均为曼氏跌宫绦虫裂头蚴。其中，上海闵行、浙江嘉兴采集的56只蟾蜍，上海闵行、奉贤采集的12只牛蛙，上海奉贤采集的30只水鸡，浙江嘉兴采集的11只石蛙进行检测，均发现阳性。

7、建立了曼氏跌宫绦虫裂头蚴小鼠感染模型。利用分离的裂头蚴3条感染小鼠，120 d后收获虫体2条，长度由感染时的1.0 cm成长为10 cm。

分4批次，分别用1、2、3、4个裂头蚴头节接种6只、1、1、5只小鼠，其中感染1条的部分小鼠死亡，其余在181 d收到1条虫体。感染2、3个头节的分别在325 d、156 d后各收获2条虫体，长度是原先的10倍 ~ 20倍。但感染4条的小鼠全部死亡。小鼠在感染后2 w时，嗜酸性细胞含量达到最高峰，此后逐渐下降。

比较分析发现，建立的PCR技术和间接ELISA技术的敏感性和特异性良好。将PCR技术应用于上海、重庆、山东、广东、浙江猪肉及血清、牦牛肉、蛙等的检测，其中上海猪肉的总阳性率为0.53%（6/1129），重庆猪肉的总阳性率为0.37%（4/1073），广东的总阳性率为0.91%（6/658）；长三角地区蛙的总阳性率为4.08%（19/466），效果良好。

**（二）综述报告**

**1、裂头蚴严重影响动物性食品安全，给人类健康造成重大威胁**

裂头蚴的危害随其寄生部位的不同而不同，眼裂头蚴病最常见，可引起眼脸红肿、结膜充血、微痛、奇痒有虫爬感、畏光、流泪，有时伴发热、恶心和呕吐，眼球运动障碍，严重者视角膜溃疡、并发白内障而失明；皮下裂头蚴病导致皮下结节、瘙痒、炎症、触痛或持续疼痛；口腔颌面裂头蚴病寄生处红肿、发痒、有硬结；脑脊髓裂头蚴病主要症状有癫痫样发作（占70%），肢体发作性不自主抽搐、进行性头痛（占20%）、肢体麻木，进行性肌无力或偏瘫（占50%）等，后果严重；内脏裂头蚴病可引起呼吸道咳血、消化道炎症、尿道或膀胱炎症。

裂头蚴病呈世界性分布，亚洲常有人患病的报道，如日本、韩国、朝鲜、印尼、菲律宾、马来西亚、越南等；欧洲、北美、南美、非洲也有病例报道，包括俄罗斯等，目前全球病例超过1 600例。我国有1 300多例，分布于全国31个省（区、市），尤以南方省区多见；0~85岁均可感染，其中10~30岁年龄组的感染率最高。近年来，曼氏裂头蚴病的发病率呈上升趋势，尤其脑脊髓裂头蚴病的比例明显增高，成为我国重要的人兽共患食源性寄生虫病之一。此外，增值型裂头蚴病（proliferative sparganosis）病例也与普通裂头蚴病一样在东亚、拉美国家散发，目前，世界上至少报道了16例增值型裂头蚴病病例，其中日本6例，中国4例，泰国2例，美国、巴拉圭、委内瑞拉和菲律宾各1例。而其成虫在人体也有寄生的报道，主要分布在日本、韩国、俄罗斯等少数国家，我国报道的至少有20多例，分布在广东、台湾、四川和福建等省市，感染者从3岁至58岁均有。在上海，诸葛传德（1990）、杨亢清等（1992）、潘力等（1994）、朱道韫等（1998）分别报道了1、1、1和2例曼氏裂头蚴病例。

人的感染途径主要有两种，其一是寄生于第二中间宿主蛙中寄生的裂头蚴，或寄生于第一中间宿主剑水蚤中的虫体原尾蚴经皮肤或黏膜侵入，这主要是由于我国部分地区流行蛙有清凉解毒作用的传说，常有人将生的青蛙肉敷贴在伤口，包括眼睛、口等处，蛙肉中寄生的裂头蚴即可经伤口或皮肤、黏膜侵入；其二是生食或半生食蛙、蛇、猪、马、鸡肉等，将其中寄生的裂头蚴食入，或通过饮用生水、游泳时误喝了河水，导致携带病原的第一中间宿主剑水蚤进入体内而感染。

**2、缺乏针对动物性食品的标准化的检测技术**

目前，裂头蚴的检测主要依赖于肉眼观察和显微镜检查，实验室常采用PCR等分子方法。此外，也已经发展了一些用于人感染后抗体检测的免疫学方法，包括以分泌排泄蛋白为检测抗原的ELISA、免疫印迹试验（Western blot），以及以可溶性蛋白为抗原的斑点免疫金渗滤法（dot immunogold filtrationassay, DIGFA），但市场上尚缺乏商品化、质量优良的检测试剂盒。

**3、我国动物食品裂头蚴检测技术标准缺乏，严重影响食品的质量和安全**

我国目前实施的裂头蚴领域的标准，仅有发布于2013年的卫生行业标准《裂头蚴病的诊断》（编号WS 438-2013），用于全国各级医疗机构和疾病预防控制机构对人体裂头蚴病的诊断；《裂头绦虫幼虫检测》（WS/T 571-2017），用于鱼、蛙和蛇中裂头绦虫幼虫的检测。但人裂头蚴病诊断标准不适合动物源性食品中裂头蚴的检测，水产品中寄生虫的检验技术标准也不适合畜禽等动物。迄今尚缺乏有关畜禽，尤其是动物源性食品中跌宫绦虫裂头蚴的检测技术标准，用于指导、规范现场和实验室的检测；动物以及动物源性食品中裂头蚴污染的田间调查甚少，导致：（1）我国裂头蚴中间宿主和转续宿主感染的数据、资料极其匮乏；（2）不同调查人员采用不同的方法，所得结果缺乏可比性；（3）对动物源性食品中裂头蚴的存在情况掌握不清，对其危害性缺乏认识，从而使人感染的数量持续增加。

**（三）技术经济论证**

通过比较和优化，建立了适用于猪、禽、蛙、蛇等动物肌肉、脂肪等组织中携带的跌宫绦虫裂头蚴检测用的目检法、显微镜检法、PCR检测法。将这些方法应用于上海、重庆、广州屠宰场采集的1129份、1073、658份样品的检测，结果分别发现阳性样品6、4、6份，阳性率分别为0.53%、0.37%、0.91%。详细见表1。

**表1 上海、重庆、广州屠宰场猪膈肌裂头蚴PCR检测**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **采样省份** | **日期** | **地区** | **样品数量** | **曼氏裂头蚴** | |
|  | **阳性数** | **阳性率（%）** |
| 上海 | 2015年9-10月 | 奉贤 | 34 | 2 | 5.88 |
| 嘉定 | 63 | 3 | 4.76 |
| 松江 | 30 | 0 | 0.00 |
| 小计 | 127 | 5 | 3.94 |
| 2016年1月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 42 | 0 | 0.00 |
| 小计 | 102 | 0 | 0.00 |
| 2016年7月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定裕农 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 1 | 3.33 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 1 | 0.67 |
| 2016年10月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 奉贤深蓝 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2017年3月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 奉贤申兰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2017年12月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 奉贤申兰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2018年4月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 松江松林 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2018年7月 | 奉贤爱森 | 30 | 0 | 0.00 |
| 嘉定五丰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 松江松林 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| **合计** | | | **1129** | **6** | **0.53** |
| 重庆 | 2015年9月 | 大渡口 | 43 | 3 | 6.98 |
| 九龙坡 | 44 | 1 | 2.27 |
| 渝北 | 86 | 0 | 0.00 |
| 小计 | 173 | 4 | 2.31 |
| 2016年7月 | 渝北华牧 | 30 | 0 | 0.00 |
| 渝北旺峰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 南岸长生 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2016年10月 | 渝北华牧 | 30 | 0 | 0.00 |
| 祥旭 | 30 | 0 | 0.00 |
| 滕驰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2017年4月 | 重庆华牧 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆旺峰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆北碚 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2017年11月 | 重庆华牧 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆旺峰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆九龙坡 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆超市 | 33 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 27 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2018年4月 | 重庆华牧 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆旺峰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆九龙坡 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2018年7月 | 重庆华牧 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆旺峰 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆九龙坡 | 30 | 0 | 0.00 |
| 重庆超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| **合计** | | | **1073** | **4** | **0.37** |
| 广州 | 2015年10月 | 白云 | 60 | 2 | 3.33 |
| 花都 | 60 | 4 | 6.67 |
| 小计 | 120 | 6 | 5.00 |
| 2017年7月 | 嘉禾 | 30 | 0 | 0.00 |
| 天河 | 30 | 0 | 0.00 |
| 花都宝源 | 28 | 0 | 0.00 |
| 茅山 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 118 | 0 | 0.00 |
| 2017年10月 | 嘉禾 | 30 | 0 | 0.00 |
| 天河 | 30 | 0 | 0.00 |
| 花都宝源 | 30 | 0 | 0.00 |
| 茅山 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 120 | 0 | 0.00 |
| 2018年7月 | 孔旺记 | 90 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| 2018年10月 | 孔旺记 | 90 | 0 | 0.00 |
| 超市 | 30 | 0 | 0.00 |
| 农贸市场 | 30 | 0 | 0.00 |
| **小计** | 150 | 0 | 0.00 |
| **合计** | | | **658** | **6** | **0.91** |

为了解上海及周边地区市售蛙类裂头蚴感染情况及其种类，于2017年5月-2019年6月在上海市闵行区、松江区和奉贤区，江苏省的海门市和南通市通州区，以及浙江省嘉善县的农贸市场购买蛙类，解剖、分离裂头蚴，记录阳性率、寄生部位及虫体长度；用体式显微镜观察虫体运动情况；用苏木素染色后进行形态学鉴定；提取裂头蚴基因组DNA，PCR扩增*cox*1基因并进行序列系统发育分析。结果共检测386只蛙，分属泽陆蛙（*Fejervarya multistriata*）、黑斑蛙（*Pelophylax nigromaculatus*）、牛蛙（Lithobates catesbeiana）、棘胸蛙（*Quasipaa spinosa*）及中华大蟾蜍（*Bufo gargarizans*），裂头蚴的总阳性率为4.92%（19/386），最大感染强度为11条/只，其中黑斑蛙感染率为7.74%（13/168），泽陆蛙感染率为6.32%（6/95），其他蛙类未检测到裂头蚴，5种蛙的感染率差异不显著（*p*>0.05）（表2）。感染率最高的地区是海门市，达10.84%，接着是闵行区、奉贤区、松江区、通州区，最低是嘉善县，分别为9.52%、8.70%、6.67%、3.33%和0，城市间感染率差异不显著（*p*>0.05）（表3）。累计获得39条裂头蚴，长度在0.2 cm-7.0 cm之间，头节平均长宽为0.2 mm和1.5 mm，形态上类似曼氏裂头蚴，其中76.47%的虫体寄生于四肢骨骼肌中，11.76%寄生于背脊肌肉中（图1），二者差异极显著（χ2=21.048，*p*<0.001）。裂头蚴形态与文献报道的曼氏跌宫绦虫裂头蚴近似（图2）。39条裂头蚴部分*cox*1和*nad*1基因序列长度一致分别为418~448 bp和625~657bp，经BLAST分析，与GenBank中曼氏裂头蚴的序列一致性>90%（GenBank 登录号：MG762084、KY009916）；系统发育分析显示，长三角地区分离的裂头蚴*cox*1和*nad*1基因序列与国内其他地区报道的曼氏跌宫绦虫裂头蚴（2022年前曾错误地判定为欧猥跌宫绦虫裂头蚴）在一个分枝上（图3-4）。 上述结果提示，上海及周边地区市售黑斑蛙和泽陆蛙存在曼氏裂头蚴感染，寄生部位主要在肌肉中，尤其是后腿肌肉，人们食用蛙肉时应注意饮食安全。

**表2 不同种类蛙裂头蚴感染情况**

**Table 2 Prevalence of *Spirometra* sparganumin 5 species of Anura**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **蛙的种类**  **Species of Anura** | **样品数量No. Sample** | **阳性数（阳性率）No. Positive**  **(Positive rate)** | **感染强度（每只蛙的感染数）Infection intensity**  **(Spargana/frog)** | **裂头蚴总数No. sparganum** | **95%置信区间95% CI** |
| 泽陆蛙*Fejervarya multistriata* | 95 | 6(6.32%) ac | 1-3 | 9 | 2.35-13.24 |
| 黑斑蛙*Rana nigromaculata* | 168 | 13(7.74%)a | 1-11 | 30 | 4.18-12.87 |
| 蟾蜍*Bufo gargarizans* | 56 | 0(0)bc | 0 | 0 | 0-6.38 |
| *Rana spinosa* | 41 | 0(0)ac | 0 | 0 | 0-8.60 |
| 石蛙*Lithobates catesbeiana* | 26 | 0(0)ac | 0 | 0 | 0-13.23 |
| 合计Total | 386 | 19(4.92%) | 1-11 | 39 | 2.99-7.58 |

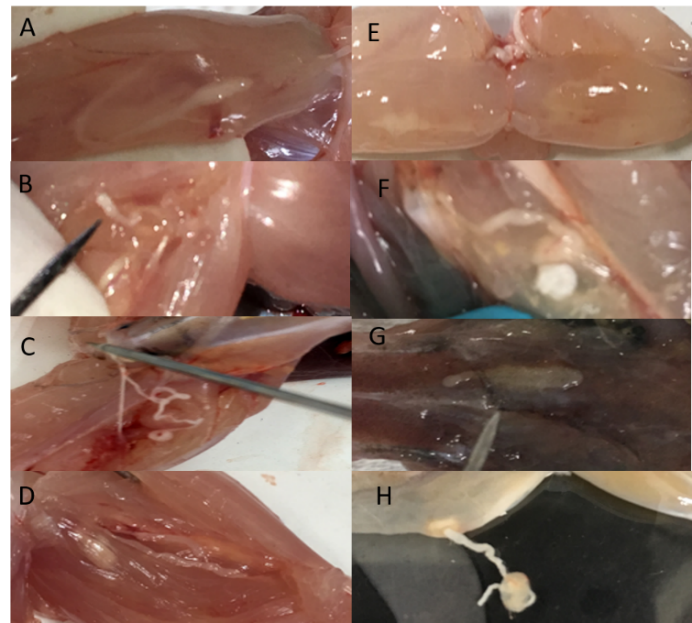
Note: Same lowercase letter within columns represented no significant differences between groups; different lowercase letter within columns represented significant differences between groups (*p* > 0.05).

**表3 不同区蛙裂头蚴感染情况**

**Table 3 Prevalence of *Spirometra* spargana in frogs (*F. multistriata* and *R. nigromaculata*)**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **地区Locations** | | **样品数No. Sample** | **阳性数No. Positive** | **感染强度Infection intensity**  **(Spargana/frog)** | **裂头蚴总数No. Sparganum** | **95%置信区间95%CI** |
| 上海  Shanghai | 闵行  Minhang | 42 | 4(9.52%)a | 1-3 | 6 | 2.66-22.62 |
| 奉贤  Fengxian | 23 | 2(8.70%)a | 1-2 | 3 | 1.07-28.04 |
| 松江  Songjiang | 30 | 2(6.67%)a | 1-2 | 3 | 0.82-22.07 |
| 小计Total | 95 | 8（8.42%） |  | 12 | 3.71-15.92 |
| 江苏  Jiangsu | 海门  Haimen | 83 | 9(10.84%)a | 1-11 | 25 | 5.08-19.59 |
| 通州Tongzhou | 60 | 2(3.33%)a | 1 | 2 | 0.41-11.53 |
| 小计Total | 143 | 11（7.69%） |  | 27 | 3.90-13.35 |
| 浙江Zhejiang | 嘉善Jiashan | 25 | 0(0)a | 0 | 0 | 0-13.72 |
| Total | | 263 | 19(7.22%) | 1-11 | 39 | 4.41-11.05 |

Note: Same lowercase letter within columns represent no significant differences between groups (*p* > 0.05).

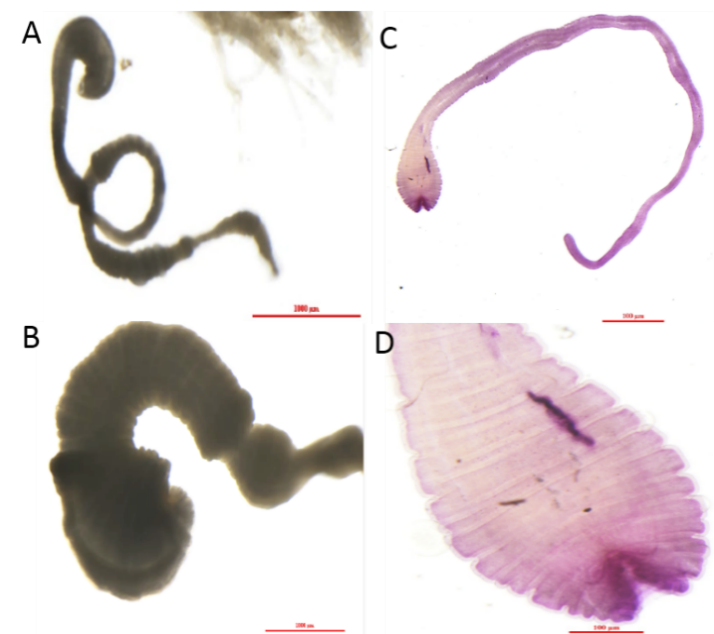


**图1青蛙体内迭宫绦虫裂头蚴寄生位置**

**Fig 1 Parasite sites of *Spirometra* spargana in frogs**

A-F：寄生于蛙腿骨骼肌的裂头蚴；A：呈棉线状的寄生蠕虫；B：剥离肌纤维后，伸出的裂头蚴头节；C：寄生部位有出血现象；D：寄生于同侧大腿肌肉上的两个裂头蚴，一个呈线性折叠，一个呈卷曲状；E：寄生于两只大腿肌肉中；F：三条裂头蚴均寄生于同一侧边，且长度不同；G：一条寄生在背肌上的裂头蚴，呈卷曲状；H：寄生于皮下的裂头蚴，头部嵌入腹壁肌肉中

A-F: Spargana parasitized in the skeletal muscle of frog thigh; A: showed clearly cotton-like parasitic worm; B: showed that spargana’s scolex was extruded after stripping muscle fibers; C: showed parasitic site had bleeding phenomenon; D: two sparganas parasitized in the ipsilateral thigh muscle with one linear fold and one curl up; E: spargana parasitized on both thighs; F: showed three spargania were parasitized on the same side with different lengths. G: one spargana parasitized in the dorsal muscle, which was curled up. H: spargana under subcutaneous with its head knots tied into the abdominal wall muscles.

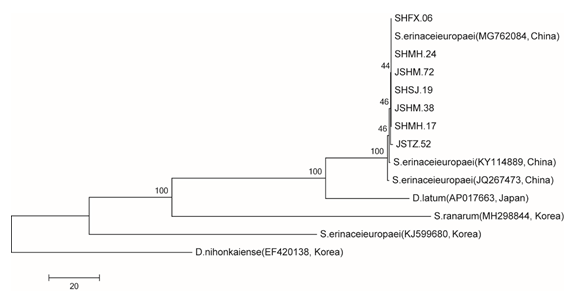


**图2立体显微镜下裂头蚴的形态特征**

Fig 2 Morphological characteristics of spargana under stereomicroscope

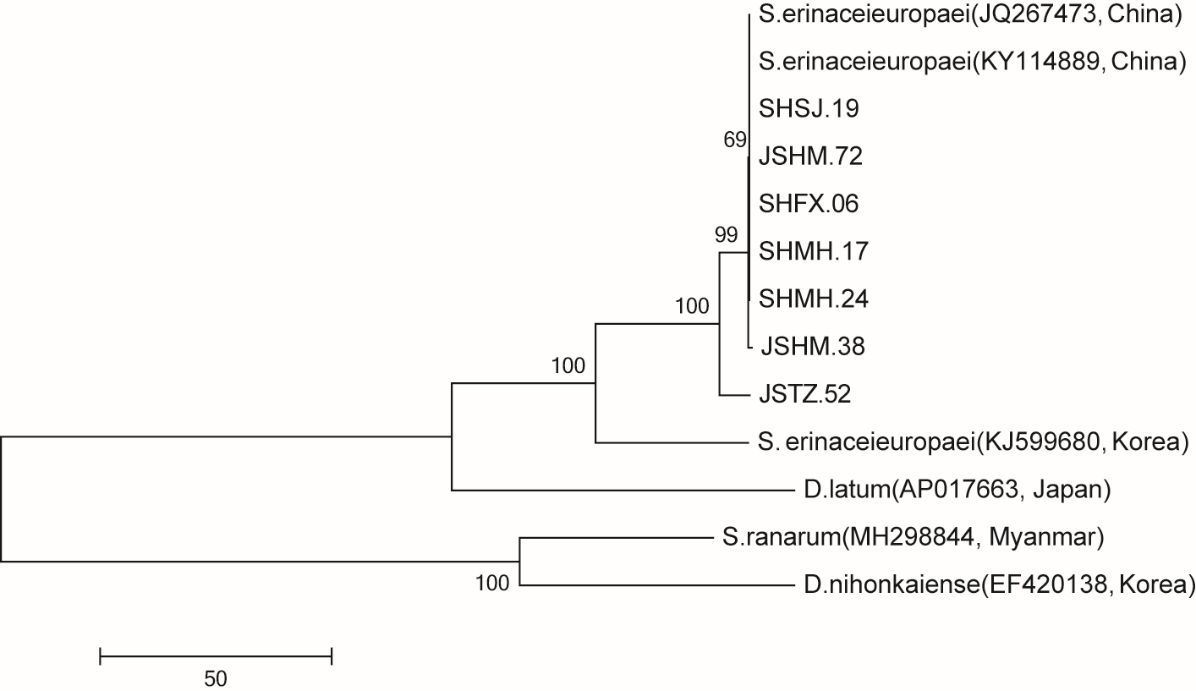
A：显示裂头蚴对蛙肉具有趋向性；B：是由于裂头蚴的收缩而产生的不同细度的头节；C：苏木精染色后，节段顶部凹陷，小叶中央有间隙；D：裂头蚴头节

A: Showed that sparganum had the chemotaxis to frog meat. B: The scolex with different fineness because of sparganum’s shrinking. C: There was a depression at the top of the scolex and a gap in the middle of the strobila after staining by Hematoxylin. D: The scolex of sparganum



**图3 裂头蚴*cox*1基因序列的系统发育分析（邻接法）**

Fig 3 Phylogenetic relationships among members of cestode inferred by Neighbor-Joining analysis using the partial sequence of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox*1), with *D. nihonkaiense* as out group.

****

**图4 裂头蚴*nad*1基因序列的系统发育分析（邻接法）**

Fig 4Phylogenetic relationships among members of cestode inferred by Neighbor-Joining analysis using the partial sequence of the NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad*1) gene, with *D. nihonkaiense* as out group.

同时，研制了一种同时检测猪肉中曼氏裂头蚴、旋毛虫、猪囊尾蚴、刚地弓形虫等4种食源性寄生虫的多重PCR方法，多重PCR可分别有效检出1.15 pg/μL浓度的旋毛虫、1.03 ng/μL浓度的刚地弓形虫、0.56 pg/μL浓度的猪囊尾蚴、1.20 ng/μL浓度的曼氏裂头蚴的DNA。结果只有弓形虫、旋毛虫、猪囊尾蚴、曼氏裂头蚴有扩增条带，而日本血吸虫、微小隐孢子虫、柔嫩艾美耳球虫、细粒棘球绦虫无扩增条带。将建立的技术应用于田间样品，对广州、上海、重庆采集的120、127、173份田间猪膈肌样品，进行多重PCR检测。结果，发现猪囊尾蚴阳性样品17份，阳性率4.05%；旋毛虫阳性样品1份，阳性率0.24%；曼氏裂头蚴阳性样品15份，阳性率3.57%；393份样品中，弓形虫阳性样品21份，阳性率5.34%。

**（四）预期的经济效果**

我国是世界畜牧业大国，2021年，我国肉类总产量8 990.0万吨，其中，猪肉产量5 295.9万吨，居世界第一；年末生猪存栏44 922.4万头，肉猪出栏67 128.0万头，居世界第一位，约占世界总量的一半。年饲养家禽近百亿只。此外，蛙（包括虎纹蛙、棘胸蛙、中国林蛙、牛蛙、猪蛙等）、蛇（包括眼镜蛇、眼镜王蛇、滑鼠蛇、灰鼠蛇、蟒蛇、乌梢蛇等）等特种养殖业近年来也有了迅速发展。据统计，我国年食用活蛇达20 000吨，约1 500万条；仅广州市一地，单月消费活蛇达600吨，年销量达8 000吨。另外，药用、工艺及观赏用蛇数量也非常惊人。据《中国中药资源》称, 我国仅蕲蛇药材的年需求量为50 000 ～ 60 000 kg。而蛙类，仅黑龙江省野生和养殖的林蛙总量达4.5亿只，其中野生种蛙720万只，农垦林蛙驯养中心存栏8 000万只，铁力市养殖成品蛙2 400万只，兴隆林业局存栏1 500万只以上；吉林延边林区林蛙养殖户就有3 263户，年产成品蛙5 331万只，产值17 481万元。而这些动物源性食品、药材中裂头蚴的感染率又较高。随着人们保健意识的增强，以及对裂头蚴危害了解的增加，必然要求加强动物源性食品中裂头蚴污染情况的调查。因此，动物源性食品中裂头蚴检测技术拥有广阔的市场前景，一旦技术经商业化推广应用后，其经济效益和社会效益将极其显著。

# 四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国内同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品有关数据对比情况

如前所述，当前，动物源性食品中裂头蚴的检测方法主要包括病原学、血清学和分子生物学诊断技术。

由于跌宫绦虫裂头蚴虫体较大，肉眼即可观察到。因此，目检法在生产现场应用最广，尤其适合屠宰企业在宰后检疫中运用。但目检法需要检测人员有一定的鉴别能力和实践经验，存在较大的主观性，因此，不能作为确诊的方法。而显微镜检法可以显著弥补这个缺陷，根据虫体的体表特征、大小、寄生部位等，可以进行确诊。以往，国内外主要采用该法进行动物源性食品中跌宫绦虫裂头蚴感染监测、调查；当前，国内外仍普遍应用。但该法无法鉴定裂头蚴的种类。

血清学诊断方法在猪的生前诊断中发挥重要作用，但现有的裂头蚴诊断抗原，无论是可溶性抗原、排泄分泌抗原，还是单一重组抗原（其中应用较多的是半胱氨酸蛋白酶），与亲缘关系相近的其它蠕虫，均存在一定程度的交叉反应，从而影响了该技术的应用，目前在生产实践中甚少应用。

分子生物学方法可以有效地避免这个问题，具有灵敏、特异、能确定种（系）等优点。目前，国内外PCR检测的靶基因较多，有*cox*1、18S rRNA、28S rRNA、*nad*1、ITS、*cox*3基因等。但基于*cox*1的PCR方法应用最广，多数学者也认为其鉴别效果更好。但*cox*1全长约1566 bp，PCR扩增较为困难，检测应用非常不便，故多数学者采用部分片段扩增的办法，以提高检测灵敏度。起草者所在实验室，采用基于*cox*1和*nad*1基因部分序列的PCR方法检测上海、浙江等地蛙中分离的疑似曼氏迭宫绦虫裂头蚴，发现均能有效扩增，并成功鉴定虫种（Zhang X et al., 2020）。

## 鉴于上述因素，本标准选择目检法、显微镜检法和基于*cox*1基因部分序列的PCR方法作为动物源性食品中裂头蚴的检测方法，可兼顾生产一线和实验室鉴定使用。因此，本标准采用的技术与国际主流技术同步，达到国际先进。从起草者实验室运用这些技术对猪、蛙等动物源性食品中裂头蚴的检测结果看，与国外检测结果基本相近（Zhang X et al., 2020），证明本标准选用技术是可靠、合适的。

# 五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

主要说明标准与相应法律法规和强制性标准之间的衔接、协调情况。列出与标标准密切相关的法律法规、强制性标准的名称和编号。

本标准制定遵循GB/T1.1-2009、GB/T 1.2-2020 、GB/T18088-2000、《中华人民共和国动物防疫法》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《动物检疫管理办法》、《农业部国家（行业）标准的计划编制、制定和审查管理办法》等相关法律、法规规定。

本标准与卫生标准《裂头蚴病的诊断》（WS 438-2013 ）、《裂头绦虫幼虫检测》（WS/T 571-2017）的应用对象不同，可以相互补充，共同促进人和动物裂头蚴感染的防控。

# 六、重大分歧意见的处理经过和依据

说明各方面专家对标准主要内容（如参数、指标、试验方法）有哪些重大分歧，以及标准起草单位在修改完善标准过程中，对专家分歧意见的处理主要依据和处理结果。对同一方法或问题有不同解决方案的应讨论出最佳方案。

# 标准立项阶段征求意见稿共送国内11位同行专家评审，其中大专院校专家7位，分别来自中国农业大学、南京农业大学、吉林农业大学、山东农业大学、浙江大学、河南农业大学、新疆农业大学，其中包含一位来自宠物医院的兽医临床专家；科研院所专家4位，分别来自中国农业科学院兰州兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、宁波市禽畜病研究所，其中宁波市禽畜病研究所主要开展家畜、家禽和宠物诊疗及疾病防控技术研发，属应用单位。共收到10位专家返还意见，有一位专家未提出具体意见。共征集到意见46条，主要集中在样品采集、PCR扩增、阳性标准对照、范围、题目等方面。共采纳43条，占93.48%；不采纳3条，主要集中在仪器、材料和试剂，试剂配制，引物等方面，占6.52%。无重大分歧。

# 七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

严格按照立项下达的性质编写。无需增加解释文字。建议将本修订标准批准为推荐性标准。

由于跌宫绦虫裂头蚴尚未列入我国动物源性食品中强制性检疫对象，建议为推荐性标准。

# 八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

标准一旦审核通过，建议尽快组织有关动物疾病防疫机构、规模养殖企业的兽医、野生动物保护机构的兽医、食品安全尤其是动物性食品安全检测人员和检验检疫人员等，进行标准宣传、技术培训，使本标准尽早为相关领域技术人员，以及公众所熟知。同时，也要想方设法，确保相关基层单位有充足的技术人员和业务经费，并配备相关仪器设备，为本标准的贯彻执行创造条件。

# 九、废止现行有关标准的建议；

无。

# 十、其他应予说明的事项。

主要包括标准项目任务完成中有关**标准名称变更**、对有争议问题、遗留问题处理、尚需探讨的问题和制定或修订配套标准的说明等。

无。