

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4655—2025

动物源性食品中裂头蚴检测方法

Detection methods for plerocercoid larvae of *Spirometra* spp. in
animal-derived foods

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院上海兽医研究所。

本文件主要起草人：陈兆国、米荣升、龚海燕、黄燕、张晓丽、张艳。



引 言

迭宫绦虫(*Spirometra* spp.)隶属于绦虫纲(Cestoda)双叶槽科(Diphyllobothriidae,也称裂头科),呈世界性分布,亚洲尤其中国多见。其幼虫裂头蚴[sparganum,也称实尾蚴(plerocercoid)]可寄生于鱼、蛇、蛙、鸡,以及哺乳动物猪等动物体内,引起食欲不振、皮肤发痒、脱毛、消瘦、生长缓慢等症状,影响动物源性食品的质量和安​​全。但寄生于不同动物体内的裂头蚴大小、形态差异较大,临床症状常不典型或不明显。

动物源性食品中裂头蚴检测方法

1 范围

本文件规定了动物组织或肉及肉制品中迭宫绦虫裂头蚴目检、显微镜检和 PCR 检测方法的技术要求。本文件适用猪、鸡、蛙、鱼等动物的产品及其制品中迭宫绦虫裂头蚴的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

cox1:线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 1(Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1)基因

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

EB:溴化乙锭(Ethidium Bromide)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

TAE:Tris-乙酸电泳缓冲液(Tris Acetate-EDTA Buffer)

5 样品的采集、保存和运输

5.1 样品的采集

5.1.1 总则

根据不同动物的具体情况,每头动物采集胴体一个部位或多个部位的肌肉或组织,或者肉制品中的肌肉或组织。对小型食用动物,也可直接采集活动物。

5.1.2 猪

采集腹膜下板脂,膈肌脚、腹壁肌、胸肌、腰肌、肾周围连接脂肪的肌肉组织,尤其是皮下、腹膜下、腹壁肌肉及股部肌肉结缔组织中含有的外观似脂肪、呈蜷曲状、绿豆至黄豆大小、乳白色或略带黄色、筋膜样长线条状的组织,以及出血部位的肌肉组织,每份样品不少于 100 g。

5.1.3 鸡

采集腹部、股部、胸部、嗦囊周围的皮下和胸大肌,尤其肌胃外围脂肪、腺胃和嗦囊外围浆膜下含有的外观似脂肪、呈蜷曲状、绿豆至黄豆大小、乳白色或略带黄色、筋膜样长线条状的组织,每份样品不少于 100 g;或随机选取 20 只~30 只活鸡。

5.1.4 蛙

采集后腿、前腿、背部、胸腹部肌肉,体腔,皮下组织(尤其背部)中含有的外观似脂肪、呈蜷曲状、绿豆至黄豆大小、乳白色或略带黄色、筋膜样长线条状的组织,每份样品不少于 100 g;或随机选取 20 只~30 只活蛙。

5.1.5 鱼

采集体表、鳞和鳍,以及腹壁肌肉、腹腔表面含有的外观似脂肪、蜷曲状、绿豆至黄豆大小、乳白色或略带黄色、筋膜样长线条状的组织;或取肌肉样品,每份不少于 100 g;或按动物数量随机选取 20 尾~30 尾活鱼。

5.2 样品的运输和保存

5.2.1 样品应尽快送到检测实验室,一般不应超过 24 h。特殊情况可根据被检测对象的要求和送样运输的要求做相应处理,如加入保护剂,将样品放入带有冰块或干冰的冰壶、泡沫塑料隔热箱内等。

5.2.2 样品送往实验室时,应填报送检单。送检单内容包括送检单位(送检人)、送检日期、样品名称、采样部位、数量、来源、有关货主的信息(编号、姓名、地址、联系方法等)、要求检测的项目等。

5.2.3 检测实验室在接到样品和采样报告单时,应立即登记,填写实验序号。

5.2.4 采集的样品,当天检查的,存放于 2℃~8℃条件下;1 月以内检查的,存放于-20℃,疑似虫体亦可保存于 70%酒精中;超过 1 个月的,存放于-80℃冰箱,疑似虫体亦可保存于 70%酒精中。

6 目检法

6.1 主要仪器设备

6.1.1 外科手术剪。

6.1.2 不锈钢镊子。

6.1.3 不锈钢、铝合金或塑料肉样盘:内有格子并编号。

6.1.4 尺子:最小刻度 0.1 cm。

6.2 检查方法

仔细观察 5.1 采集的组织样品或活动物相应的组织样品中,是否存在外观似脂肪、呈蜷曲状、绿豆至黄豆大小的组织,进一步观察是否呈乳白色或略带黄色、筋膜样长线条状,将这些组织用剪刀仔细挑出,观察其形态、测量其大小。

6.3 结果判定

若发现存在乳白色或淡黄色,长带形,呈白棉线状,长 0.5 cm~80.0 cm,宽 0.1 cm~1.0 cm;头端膨大,呈匙状,顶端中央有一孔向内凹陷;虫体不分节,体表具有不规则的横纹;末端钝圆;刚采集时不断蠕动(图例见附录 A 中的图 A.1 和图 A.2)。一份样品中任一部位发现有类似上述裂头蚴或残断裂头蚴,可判定为子宫绦虫裂头蚴疑似感染。若样品各部位均未发现上述裂头蚴或者裂头蚴的残断体,则判定为阴性。疑似虫体及残断虫体的鉴定,需采用显微镜检法或 PCR 方法检测确诊。

7 显微镜检法

7.1 主要仪器及材料

7.1.1 外科手术剪。

7.1.2 不锈钢镊子。

7.1.3 不锈钢、铝合金或塑料肉样盘:内有格子并编号。

7.1.4 载玻片。

7.1.5 注射器针头:4.5 号或 5 号,市售商品。

7.1.6 体视显微镜或生物显微镜。

7.2 试剂

生理盐水,按照附录 B 中 B.1 描述的方法配制。

7.3 操作方法

目检法发现的疑似裂头蚴虫体或裂头蚴残断体样品,可采用显微镜检法确诊。将疑似裂头蚴虫体、疑似裂头蚴残断体、组织置于载玻片上,滴加适量生理盐水,放置在体视显微镜或生物显微镜下,低倍(0.5×

10~10×10)下观察虫体外部形态和内部结构。再用注射器针头的针尖划破虫体,高倍(40×10)下观察从破损处流出的组织类型。

7.4 结果判定

若发现存在大小、颜色和形态同 6.3 描述的疑似虫体,体视显微镜下观察,疑似虫体顶端中央有一明显向内凹陷,呈隧道状,并向后延伸形成盲管;生物显微镜下观察,疑似虫体的前端背腹各有 1 条纵行的吸槽,虫体不分节,体表有凹凸不均的横皱褶,尾部钝圆;虫体内实质呈网状结构,无器官和空腔结构,调整焦距,出现数目较多的圆形或不规则的石灰小体,或存在排泄小管;用针头划破虫体后,在 40×10 倍显微镜下有折光性强、无细胞结构、比裂头蚴体细胞大、呈圆形或椭圆形盘状物的石灰小体流出,可判定为裂头蚴阳性。若样品中未发现上述形态的裂头蚴,则判定为阴性。

8 PCR 方法

8.1 主要仪器和材料

8.1.1 仪器

- 8.1.1.1 PCR 基因扩增仪。
- 8.1.1.2 高速台式冷冻离心机:最大转速大于 15 000 r/min。
- 8.1.1.3 低速大容量离心机:最大转速大于 3 000 r/min。
- 8.1.1.4 微量可调移液器:2 μ L、10 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L。
- 8.1.1.5 核酸电泳仪。
- 8.1.1.6 核酸电泳槽。
- 8.1.1.7 凝胶成像分析系统。
- 8.1.1.8 组织研磨仪。
- 8.1.1.9 高压蒸汽灭菌器。
- 8.1.1.10 水浴锅。
- 8.1.1.11 超净工作台。
- 8.1.1.12 紫外分光光度仪。
- 8.1.1.13 生物安全柜。

8.1.2 材料

- 8.1.2.1 外科手术剪。
- 8.1.2.2 不锈钢镊子。
- 8.1.2.3 一次性 PE 手套或乳胶手套。
- 8.1.2.4 玻棒。
- 8.2.1.5 烧杯:100 mL。
- 8.2.1.6 陶瓷珠或不锈钢珠:直径 2 mm~10 mm。
- 8.2.1.7 离心管:1.5 mL、2.0 mL、15.0 mL、50.0 mL。
- 8.2.1.8 200 μ L PCR 管。

8.2 试剂

- 8.2.1 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS):按照 B.2 描述的方法配制。
- 8.2.2 1× TAE 电泳缓冲液:按照 B.3 描述的方法配制。
- 8.2.3 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)或同类核酸染料:商品化试剂。
- 8.2.4 动物组织基因组 DNA 提取试剂盒:商品化试剂。
- 8.2.5 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液:商品化试剂。
- 8.2.6 DNA 聚合酶:商品化试剂。

- 8.2.7 10× PCR Buffer:商品化试剂。
- 8.2.8 2.5 mmol/L dNTPs(含 MgCl₂):商品化试剂。
- 8.2.9 引物:上、下游引物 JB3 和 JB4.5 的浓度分别配成 100 μmol/L,引物序列见附录 C 中的表 C.1。
- 8.2.10 100 bp~2 000 bp DNA 分子质量标准:商品化试剂。
- 8.2.11 1.2%琼脂糖电泳凝胶:按 B.4 描述的方法配制。
- 8.2.12 6×加样缓冲液:商品化试剂。
- 8.2.13 质控标准裂头蚴:阳性质控标准裂头蚴为曼氏迭宫绦虫(*Spirometra mansoni*)、其他种类迭宫绦虫(如 *S. erinaceieuropaei*、*S. decipiens*、*S. folium* 等)的裂头蚴或其片段,长度在 0.2 cm~0.5 cm。阴性质控对照为不含迭宫绦虫裂头蚴的同种类肌肉或组织。

8.3 操作步骤

8.3.1 DNA 抽提

8.3.1.1 样品预处理

样品用 PBS 冲洗 5 次~6 次,用无菌镊子取疑似虫体(阳性对照为裂头蚴虫体)的一部分(0.2 cm~0.5 cm 长),或进行组织样品多点取样(至少 3 个点,每个点取 0.1 g),混合后用灭菌剪刀剪碎,置于 1.5 mL 离心管中。加入 2 颗~3 颗陶瓷珠或不锈钢珠,用组织研磨仪研磨。再加入 400 μL PBS 和 4 μL 蛋白酶 K 混匀,置于 56℃水浴锅中消化 2 h~3 h,期间每 30 min 混匀 1 次。

8.3.1.2 核酸分离

消化悬液按 DNA 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取,检测 DNA 溶液在 260 nm 和 280 nm 的吸光度(OD 值),OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应为 1.7~2.0。将 DNA 溶液稀释或浓缩,使其 OD₂₆₀ 值在 0.1~0.8,以 1 OD₂₆₀ 值相当于 50 mg/L DNA 浓度,计算 DNA 浓度。将提取的基因组 DNA 置于-20℃冰箱中保存。

8.3.2 PCR 扩增

8.3.2.1 对待检样品提取的基因组 DNA 进行迭宫绦虫裂头蚴线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 1(Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1, *cox1*)基因部分序列的扩增,扩增片段大小约为 440 bp,序列见 C.2。

8.3.2.2 每次检测设阳性对照和阴性对照,阳性对照模板为 8.2.13 中所列的阳性质控标准裂头蚴按照 8.3.1 所列方法提取的 DNA;阴性对照模板为 2 g 8.2.13 中所列的阴性质控对照样品按照 8.3.1 所列方法提取的 DNA,模板 DNA 浓度均为 25 μg/mL~50 μg/mL。扩增采用 25 μL PCR 反应体系,反应体系配制见表 1。

表 1 PCR 反应体系

组分	体积,μL
10×PCR Buffer(含 MgCl ₂)	2.5
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	2.0
JB3(10 μmol/L)	1.0
JB4.5(10 μmol/L)	1.0
DNA 聚合酶(1.0 U/μL)	0.5
DNA 模板	2.0
PCR 用水	16.0

8.3.2.3 PCR 扩增参数:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。

8.3.3 琼脂糖凝胶电泳

用 1× TAE 电泳缓冲溶液配制 1.2%琼脂糖电泳凝胶,每 100 mL 凝胶中加入 5 μL EB 或同类核酸染料。取 PCR 产物 5 μL,添加 1 μL 6×加样缓冲液,在 1.2%琼脂糖电泳凝胶中以 1 V/cm~10 V/cm 凝胶的电压进行电泳。电泳结束后,采用凝胶成像分析系统观察电泳结果并拍照。

8.4 结果判定

8.4.1 质控标准

按 8.3.2 方法扩增,阳性对照出现一条大小约为 440 bp 条带、阴性对照无条带时判定为试验有效。电泳图例见附录 C 中的图 C.1。

8.4.2 扩增结果判读

阳性:被检样品扩增产物泳道出现一条大小约为 440 bp 条带时,判为迭宫绦虫裂头蚴核酸阳性。若有需要,或需确定裂头蚴种类,可对扩增产物进行序列测定和分析。

阴性:被检样品扩增产物泳道没有出现任何条带,经重复 PCR 检测仍未出现扩增条带时,判为迭宫绦虫裂头蚴核酸阴性。

9 综合判定

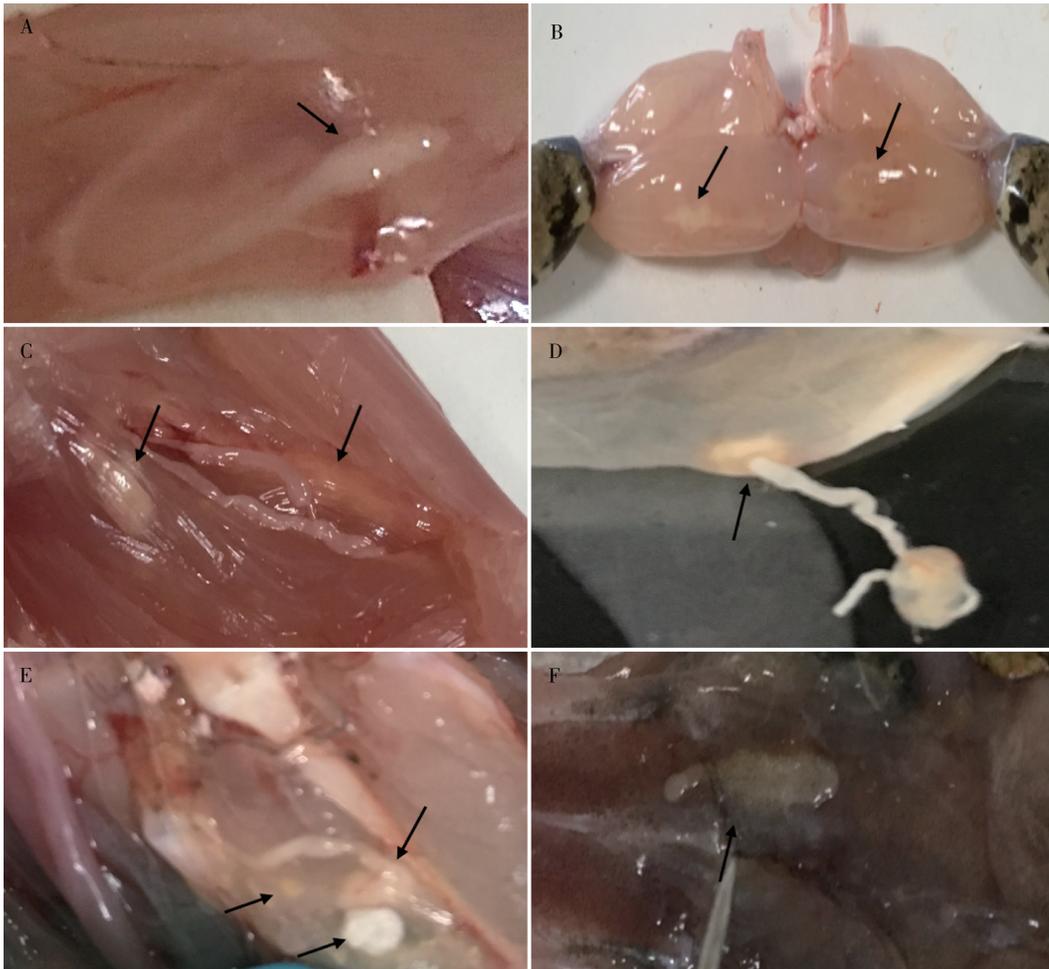
受检样品经显微镜检法和 PCR 方法任一项检测出阳性,判为该样品迭宫绦虫裂头蚴阳性。

附录 A
(资料性)

曼氏迭宫绦虫裂头蚴参照图

A.1 肌肉组织及皮下组织寄生的曼氏迭宫绦虫裂头蚴参照图

蛙肌肉组织及皮下组织中寄生的曼氏迭宫绦虫裂头蚴见图 A.1。



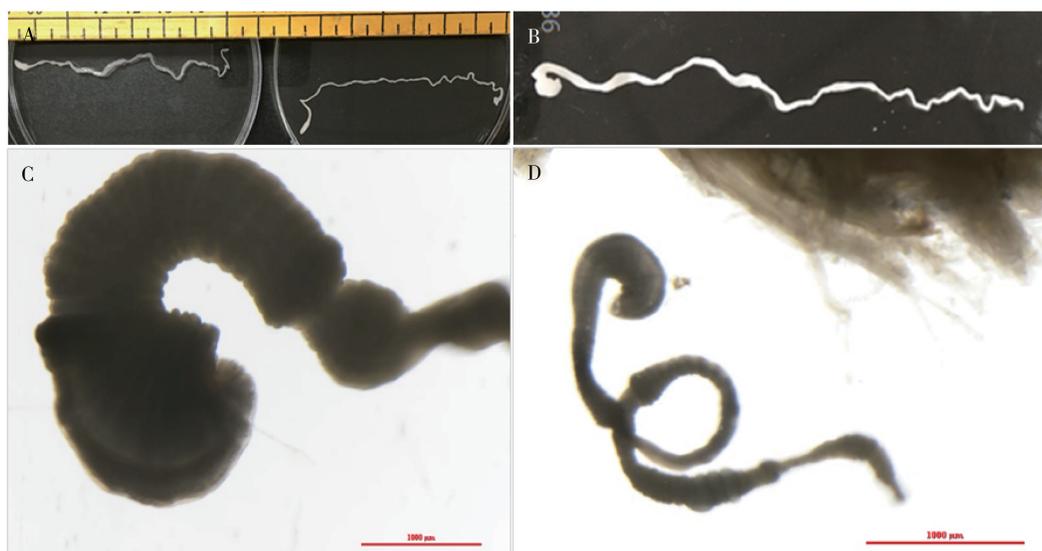
标引序号说明：

- A——单侧蛙肌肉组织中的曼氏迭宫绦虫裂头蚴(箭头所示)；
- B——两侧蛙肌肉组织中的曼氏迭宫绦虫裂头蚴(箭头所示)；
- C——侧蛙肌肉组织中寄生 2 条曼氏迭宫绦虫裂头蚴(箭头所示)；
- D——皮下组织中寄生的曼氏迭宫绦虫裂头蚴(箭头所示)；
- E——侧蛙肌肉组织中寄生 3 条曼氏迭宫绦虫裂头蚴(箭头所示)；
- F——蛙背侧肌肉组织中寄生的曼氏迭宫绦虫裂头蚴(箭头所示)。

图 A.1 蛙肌肉组织及皮组织中寄生的曼氏迭宫绦虫裂头蚴

A.2 从肌肉组织中分离的曼氏迭宫绦虫裂头蚴参照图

从蛙肌肉组织中分离的曼氏迭宫绦虫裂头蚴见图 A.2。



标引序号说明：

A、B——曼氏迭宫绦虫裂头蚴，目检；

C——褶皱聚拢时的曼氏迭宫绦虫裂头蚴，镜检 2×10 ；

D——正在向蛙肌肉进行趋化运动的曼氏迭宫绦虫裂头蚴，镜检 0.68×10 。

图 A. 2 蛙肌肉组织中分离的曼氏迭宫绦虫裂头蚴

附 录 B
(规范性)
试 剂 的 配 制

B.1 生理盐水

在 9.0 g NaCl 中加入 800 mL 蒸馏水,加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 121 °C、 1.034×10^5 Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min,保存于室温。

B.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

配制 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液所需试剂如下:

- a) 0.39 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;
- b) 1.93 g 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- c) 8.5 g 的 NaCl。

加入 800 mL 蒸馏水,用 1.0 mol/L HCl 调节溶液的 pH 至 7.2,加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 121 °C、 1.034×10^5 Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min,保存于室温。

B.3 1×TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)

配制 50× TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)所需试剂如下:

- a) 242 g 的 Tris 碱;
- b) 57.1 mL 的冰乙酸;
- c) 100 mL 的 EDTA(0.5 mol/L,pH 8.0)。

加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 121 °C、 1.034×10^5 Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min,使用时用蒸馏水按 1 : 49 稀释成 1×TAE。

B.4 1.2%琼脂糖电泳凝胶

将琼脂糖 1.2 g 加入 90 mL 1×TAE 电泳缓冲液中,加 1×TAE 电泳缓冲液定容至 100 mL,加热融化,温度降至 55 °C 左右,加入 10 mg/mL 溴化乙锭 5 μL 或其他适宜的核酸染料混匀,倒入已封好两端、水平放置的凝胶灌制平台上,厚度为 3 mm~5 mm,插上样品梳,凝固后移去样品梳,当天使用。

附 录 C

(资料性)

引物及扩增片段参考序列与 PCR 扩增图

C.1 PCR 扩增引物序列

引物参考迭宫绦虫裂头蚴 *cox1* 基因序列设计,扩增片段大小约为 440 bp,不同种系间基因片段长度及序列一致性可能有一定程度差异。引物终浓度为 0.1 μmol/L~2.0 μmol/L。PCR 方法引物序列见表 C.1。

表 C.1 PCR 方法引物序列

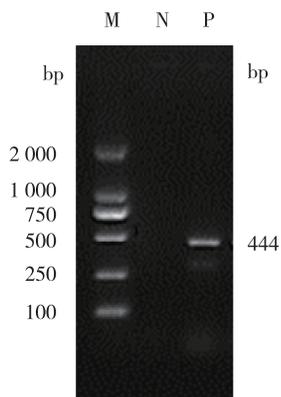
引物	序列(5'-3')	扩增产物大小, bp
JB3	5'- TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT -3'	440
JB4.5	5'- TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG -3'	

C.2 曼氏迭宫绦虫裂头蚴 *cox1* 基因扩增片段参考序列

TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTATGTATTGATTTTGCCTGGTTTTGGTATGGTAAGTCA
 TGTGTGTAGTAAATTAGGTTGTTTCATATGATACTTTTGGTTTTTATGGTTTTATTATTTGCT
 ATGTTTTCTATAGTGTGTTTAGGTTAGCGTGGTTTGGGGTCACCACATGTTTACTGTGGGGTT
 GGACGTGAAGACTGCTGTTTTCTTTAGTTCTGTGACTATGATTATTGGGGTTCCCACGGGTA
 TAAAGGTGTTTTCTTGGCTTTATATGATTTTAAATAGTCGTGTTTCGTTGCGTGAGCCTGTG
 TTTTGATGGGTTTTATCCTTTATTGTGTTGTTTACTATGGGTGGTGTACTGGTATAATTCT
 TTCTGCTTGTGTGTTGGATAAAATTTGCATGACACGTGGTTTGTGGTGGCTCATTTCATT
 ATGTTCTTTCTTTA

C.3 曼氏迭宫绦虫裂头蚴 *cox1* 基因片段 PCR 扩增图

曼氏迭宫绦虫 DNA PCR 检测参照图见图 C.1。



标引序号说明:

M——DL2000 DNA 分子量标准;

N——阴性对照;

P——曼氏迭宫绦虫裂头蚴 *cox1* 基因部分片段扩增结果。

图 C.1 曼氏迭宫绦虫裂头蚴 DNA 的 PCR 扩增结果