

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4031—2021

---

## 动物源性食品中住肉孢子虫检测方法

Detection methods of *Sarcocystis* spp. in animal-derived foods

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施

---



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、云南大学生命科学学院。

本文件主要起草人：陈兆国、米荣升、黄燕、龚海燕、张烨华、胡俊杰。

# 动物源性食品中住肉孢子虫检测方法

## 1 范围

本文件规定了动物肌肉中住肉孢子虫包囊检查和 PCR 检测方法的技术要求。

本文件压片镜检法适用于牛、羊、猪、马等动物肌肉中住肉孢子虫的检测；PCR 法适用于黄牛中寄生的隆美尔住肉孢子虫 (*S. rommeli*)，水牛中寄生的德宏住肉孢子虫 (*S. dehongensis*)，牦牛中寄生的枯氏住肉孢子虫 (*S. cruzi*)、莱氏住肉孢子虫 (*S. leynesi*)、*S. hirsuta*、*S. fusiformis*、人住肉孢子虫 (*S. hominis*)、*S. buffalonis*、中华住肉孢子虫 (*S. sinensis*)、牛住肉孢子虫 (*S. bovini*)，山羊中寄生的山羊犬住肉孢子虫 (*S. capracanis*)、家山羊犬住肉孢子虫 (*S. hircanicus*)，绵羊中寄生的柔嫩住肉孢子虫 (*S. tenella*)、白羊犬住肉孢子虫 (*S. asiaticus*)，马中寄生的柏氏住肉孢子虫 (*S. bertrami*)，猪中寄生的米氏住肉孢子虫 (*S. miescheriana*)、猪犬住肉孢子虫 (*S. suhaminus*) 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）适用本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

## 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)

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

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline)

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

根据不同动物肌肉的具体情况，每头动物采集胴体一个部位或多个部位肌肉，尤其注意采集这些肌肉中有米粒状包囊的肌肉样品，记为一份肉样，其质量不少于 50 g。

### 5.2 样品的保存和运输

5.2.1 采集的样品，不超过 24 h 检测的，在 2℃~8℃ 条件下保存即可；1 月以内检测的，存放温度不高于 -20℃；超过 1 个月检测的，存放于 -80℃ 以下冰柜，或浸泡在福尔马林溶液中。所有阳性样品，发出检测报告 30 d 后方可无害化处理。

5.2.2 样品应放在不透水、防泄漏的密封袋中，置于保温盒中，并加冰袋或冰块保持低温，尽快送到实验室。所有样品应附有一份说明，内容包括样品提交人、样品采集地点（最好标明经度和纬度）、采样日期、联系方式、动物种类、动物年龄（日龄）、动物部位、动物病史等。

## 6 检测方法

### 6.1 压片镜检法

#### 6.1.1 主要仪器设备

- 6.1.1.1 外科手术剪。
- 6.1.1.2 不锈钢镊子。
- 6.1.1.3 不锈钢、铝合金或塑料肉样盘,内有格子并编号。
- 6.1.1.4 载玻片。
- 6.1.1.5 普通生物显微镜或倒置显微镜。

#### 6.1.2 试剂

- 6.1.2.1 甘油(生化级):市售产品。
- 6.1.2.2 甘油透明液(见附录 A 中的 A.1)。

#### 6.1.3 操作方法

##### 6.1.3.1 目检

剔除肉样上附着的脂肪组织、结缔组织,撕去肌膜,暴露出肌肉表面层后,在阳光下或日光灯下仔细观察肌肉内、肌肉表面是否含有纺锤形、圆柱形、卵圆形、椭圆形、长形等形状,与肌纤维方向平行的灰白色或乳白色包囊。

##### 6.1.3.2 压片镜检

取目检时剪取的包囊、疑似包囊,直接用 2 片载玻片压片镜检。目检未见包囊的肉样,按随机采样的要求,用剪刀顺肌纤维方向剪取肉样,再沿肌纤维方向剪成铅笔芯大小的小条(约 10 mm×3 mm×3 mm),每个部位至少 4 条。将剪取的肌肉放在载玻片上,每片放置 4 条~6 条。必要时,可添加适量甘油透明液。另取一块载玻片重叠放在有肉条的载玻片上,用力挤压,使肉条压成半透明(能初步看清另一块载玻片下面背景的字样)。把制好的压片放在低倍显微镜下(10 倍×10 倍),从压片一端的边沿开始检查,直到另一端为止。

#### 6.1.4 结果判定

6.1.4.1 不同种类的住肉孢子虫包囊大小、形态差异很大,部分种类肉眼可辨,如山羊的莫尔氏住肉孢子虫(*Sarcocystis moulei*)和绵羊的巨住肉孢子虫(*S. gigantea*)的包囊。莫尔氏住肉孢子虫包囊呈暗白色、卵圆形,长可达 17 mm,宽可达 7 mm,常见于食道;包囊内壁分枝,呈菜花状,包含 13 μm~15 μm 长的缓殖子;有时可见 2 种大小的包囊:一种末端粗而圆,缓殖子大小为(11~17)μm(平均 14.1 μm)×(3~6)μm(平均 4.5 μm),仅在食道肌肉中出现,另一种为薄壁包囊,小而细,所含缓殖子大小为(9~13)μm(平均 12.2 μm)×(2~4)μm(平均 2.9 μm),可见于膈肌和骨骼肌中。肉眼可见的巨住肉孢子虫包囊主要存在于年龄较大的老羊,食道、喉和舌头常见,横膈膜和胴体的其他部位较少出现,其包囊长度可达 1 cm,呈暗白色,圆形、椭圆形或梨形,有时类似米粒。包囊壁薄(<2 μm)、光滑,常被结缔组织包围。但多数家畜、家禽寄生的住肉孢子虫种类的包囊肉眼难以觉察,如猪的住肉孢子虫包囊长仅 2 mm 或更小。因此,目检法若直接在肌肉内发现住肉孢子虫大型包囊,可判为疑似,继续进行显微镜观察;未发现住肉孢子虫大型包囊,按显微镜观察结果判定。

6.1.4.2 在显微镜下,若发现住肉孢子虫包囊,呈纺锤形、圆柱形、卵圆形、椭圆形、长形等形状,包囊壁光滑或表面有横纹、短指状突起,压迫包囊溢出有大量直径 10 μm~20 μm,呈圆形、椭圆形或香蕉形、颜色偏暗的缓殖子(如果虫体已经钙化,则呈黑色小团块)(见附录 B),即可确定为住肉孢子虫感染。一份肌肉样品任一部位发现有住肉孢子虫包囊,即可判定该份肉样为住肉孢子虫阳性;若各部位肌肉均未发现住肉孢子虫包囊,则判定为阴性。

## 6.2 PCR 法

### 6.2.1 仪器

- 6.2.1.1 PCR 基因扩增仪。
- 6.2.1.2 高速台式冷冻离心机:最大转速大于 15 000 r/min。
- 6.2.1.3 低速大容量离心机:最大转速大于 3 000 r/min。
- 6.2.1.4 微量可调移液器:2  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L。
- 6.2.1.5 核酸电泳仪。
- 6.2.1.6 核酸电泳槽。
- 6.2.1.7 凝胶成像分析系统。
- 6.2.1.8 组织研磨仪。
- 6.2.1.9 高压蒸汽灭菌器。
- 6.2.1.10 水浴锅。
- 6.2.2 材料
- 6.2.2.1 外科手术剪。
- 6.2.2.2 不锈钢镊子。
- 6.2.2.3 烧杯:100 mL。
- 6.2.2.4 离心管:1.5 mL、2.0 mL、15.0 mL、50.0 mL。
- 6.2.2.5 200  $\mu$ L PCR 管。
- 6.2.2.6 陶瓷珠或不锈钢珠(直径 3 mm~10 mm)。
- 6.2.3 试剂
- 6.2.3.1 磷酸盐缓冲液(PBS)(见 A. 2)。
- 6.2.3.2 1 $\times$ TAE(见 A. 3)。
- 6.2.3.3 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)(见 A. 4)或同类核酸染料。
- 6.2.3.4 动物组织基因组 DNA 提取试剂盒,市售产品。
- 6.2.3.5 水:实验中配制溶液的水应为蒸馏水或去离子水,PCR 用水符合 GB/T 76682 中一级水的规格。
- 6.2.3.6 DNA 聚合酶,市售产品。
- 6.2.3.7 10 $\times$ PCR Buffer,市售产品。
- 6.2.3.8 2.5 mmol/L dNTPs(含 MgCl<sub>2</sub>),市售产品。
- 6.2.3.9 引物(上、下游引物 SF1 和 SR9 的浓度分别配成 100  $\mu$ mol/L,引物序列见附录 C)。
- 6.2.3.10 2 000 bp DNA 分子质量标准,市售产品。
- 6.2.3.11 琼脂糖(电泳级),市售产品。
- 6.2.3.12 DNA 上样缓冲液,市售产品。
- 6.2.3.13 蛋白酶 K,市售产品。
- 6.2.3.14 质控标准包囊:阳性质控标准住肉孢子虫包囊为隆美尔住肉孢子虫、德宏住肉孢子虫、家山羊犬住肉孢子虫、米氏住肉孢子虫、柏氏住肉孢子虫或其他种类的住肉孢子虫包囊,肉眼可见的大型包囊数量在 10 个以上,肉眼无法分辨的包囊在 10<sup>4</sup> 个以上。阴性质控对照为不含住肉孢子虫包囊的同种类肌肉。
- 6.2.4 操作步骤
- 6.2.4.1 DNA 抽提

取出新鲜或冻存肌肉,除去脂肪和结缔组织,按采集的样品体积大小,进行多点取样(至少 3 个点),每个点取 0.1 g 左右。将所取样品混合在一起,用灭菌的剪刀将肌肉剪碎,置于无菌 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。研磨好的样品加入 400  $\mu$ L PBS 和 40  $\mu$ L 蛋白酶 K,充分混匀后,放置于 56  $^{\circ}$ C 水浴锅消化 2 h~3 h 至溶液澄清,其间每 30 min 混匀 1 次。消化完成的肌肉悬浮

液,按 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。测定并记录 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度,将 DNA 适当稀释或浓缩,使其  $OD_{260}$  值在 0.1~0.8 的区间内。以 1 个  $OD_{260}$  值相当于 50 mg/L DNA 浓度来计算 DNA 的浓度;DNA 溶液  $OD_{260}/OD_{280}$  值应为 1.7~2.0,或质量能符合检测要求。将提取的基因组 DNA 置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

#### 6.2.4.2 PCR 扩增

采用 PCR 方法扩增住肉孢子虫 *cox1* 基因部分序列,PCR 产物大小约为 1 085 bp。PCR 采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系:

10×PCR Buffer(含 $\text{MgCl}_2$ )	5.0 $\mu\text{L}$
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	4.0 $\mu\text{L}$
SF1(100 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
SR9(100 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
DNA 聚合酶(1.0 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
DNA 模板	0.1 $\mu\text{g}$ ~1.0 $\mu\text{g}$
PCR 用水	补足至 50.0 $\mu\text{L}$

PCR 循环参数:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,53  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,45 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。引物 SF1 和 SR9 见附录 B。阳性对照模板为 6.2.3.14 节中所列的住肉孢子虫包囊加入 2 g 不含住肉孢子虫包囊的新鲜同种肌肉中,按 6.2.4.1 所列方法提取的、浓度为 25 mg/L~50 mg/L 的住肉基因组 DNA 样品;阴性对照模板为 2 g 不含住肉孢子虫包囊的新鲜同种肌肉按 6.2.4.1 所列方法提取的 DNA。

#### 6.2.4.3 琼脂糖凝胶电泳

用 1×TAE 缓冲溶液配制 1.0% 琼脂糖凝胶,每 100 mL 凝胶中加入 5  $\mu\text{L}$  EB(见附录 C)或同类核酸染料。取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ ,添加适量的 DNA 上样缓冲液,在 1.0% 琼脂糖凝胶中以 1 V/cm~10 V/cm 凝胶的电压下进行电泳,采用凝胶成像分析系统观察电泳结果并拍照。

#### 6.2.5 结果判定

##### 6.2.5.1 质控标准

按 6.2.4.2 方法扩增,阳性对照出现一条大小约为 1 085 bp 条带、阴性对照无条带时判定为试验有效。

##### 6.2.5.2 结果判定

阳性:被检样品扩增产物泳道出现一条大小约为 1 085 bp 条带时,判为住肉孢子虫核酸阳性。

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,判为住肉孢子虫核酸阴性。

## 7 综合判定

受检样本经压片镜检法和 PCR 法任一项检测出阳性,判为该样品阳性。

附录 A  
(资料性)  
试剂配制

## A.1 甘油透明液

甘油 20 mL  
加双蒸水至 100 mL

## A.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.39 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.93 g  
NaCl 8.50 g

加入 800 mL 蒸馏水,用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.2,加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 1.034×10<sup>5</sup> Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min,保存于室温。

## A.3 1×TAE 储存液

Tris 碱 242.0 g  
冰醋酸 57.1 mL  
EDTA(0.5 mol/L, pH 8.0) 100.0 mL

加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 1.034×10<sup>5</sup> Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min,使用时用蒸馏水按 1:50 稀释成 1×TAE。

## A.4 10 mg/mL 溴化乙锭

溴化乙锭 1 g  
加蒸馏水定容至 100 mL,磁力充分搅拌使完全溶解,用棕色瓶或铝箔包好,室温保存。

## A.5 1.0% 琼脂糖凝胶

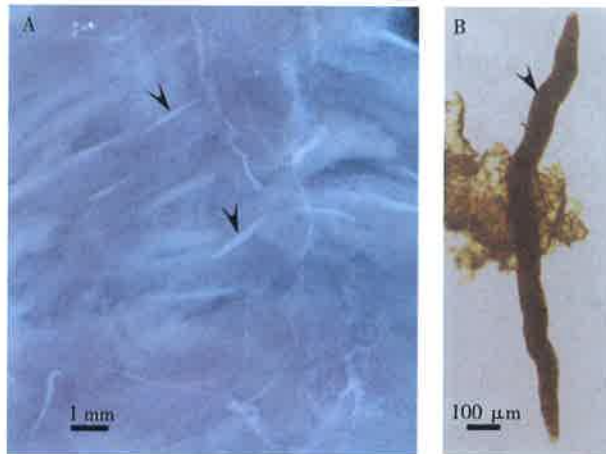
琼脂糖 1 g

加 1×TAE 定容至 100 mL,在微波炉中加热融化、混匀,冷却至 55 ℃,加入 10 mg/mL 溴化乙锭 5 μL,使浓度为 0.5 μg/mL,或适合浓度的其他核酸染料,倒入已封好的凝胶灌制平台上,插上样品梳,凝固后移去样品梳,当天使用。

附录 B  
(资料性)  
参照图及 PCR 产物序列

B.1 肌肉组织中及分离的住肉孢子虫包囊参照图

黄牛、绵羊、猪、马肌肉组织中和/或从肌肉组织中分离的住肉孢子虫包囊见图 B.1~图 B.4。



标引序号说明:

A——黄牛肌肉组织中的住肉孢子虫包囊(箭头所示);

B——黄牛肌肉中分离出的住肉孢子虫包囊(箭头所示)。

图 B.1 黄牛肌肉组织中的住肉孢子虫包囊



图 B.2 绵羊肌肉组织中的住肉孢子虫包囊(箭头所指)



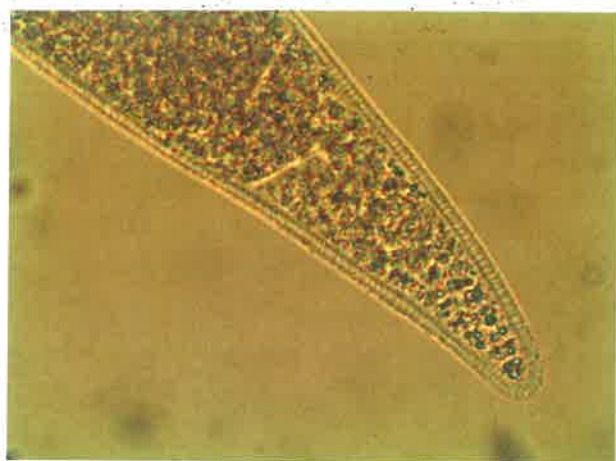
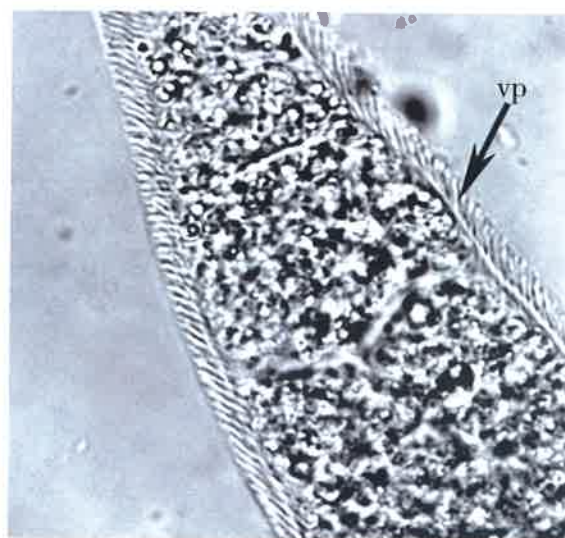


图 B.3 猪肌肉中分离的米氏住肉孢子虫包囊

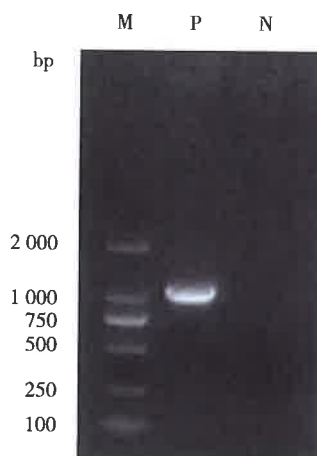


标引序号说明：  
vp——绒毛突起。

图 B.4 马肌肉中分离的柏氏住肉孢子虫包囊

### B.2 住肉孢子虫 DNA PCR 阳性参照图

家山羊犬住肉孢子虫 (*Sarcocystis hircicanis*) DNA PCR 检测阳性参照图见图 B.5。



标引序号说明：  
M——DNA 分子量标准；  
P——住肉孢子虫 DNA 扩增结果；  
N——阴性对照。

图 B.5 家山羊犬住肉孢子虫 DNA 的 PCR 扩增结果

### B.3 家山羊犬住肉孢子虫 PCR 扩增片段参照序列

家山羊犬住肉孢子虫 DNA PCR 扩增产物序列(登录号 KU820976.1)为：

```

1  ATGGCGTACAACAATCATAAAGAAGCTAGCCGTTATGTATCTACTTACGGCGGGTATCTTT
61  AGCGTTGTTGGTACTTTAATATCGGATGTGGTTTCGCTATGAACTAGCGGCTTCAGGCTCG
121  AGGCTCTTTGCCGTAGATGCCCTGGGTACTTACAATGTGCTGTTTACGATCCACGGTCTG
181  GCCATGATATTCATGTTCTTGATGCCAGCCCTGTTCTCCGGCTTCGGTAACTACTTCATA
241  CCGCTGTACTCAGGATCGGCCGAGGTCGCCTTACCGAGGATCAACTCGATATCTTACTTC
301  TTGCTGCCTCTCGGCTCGACACTCCTCCTTCACTCGATAGTTGCGGAGTTCGGTGCGGCC
361  ATCGGCTGGACTATGTATCCGCCTCTGAGCACTACCGGCGGGACTACGAATACGGAGGCC
421  ATAGACTGGGTAGTTCTTGCCCTGGGTATTCTAGGACTGAGTAGTGTGCTCGGGTTCGGTC
    
```

NY/T 4031—2021

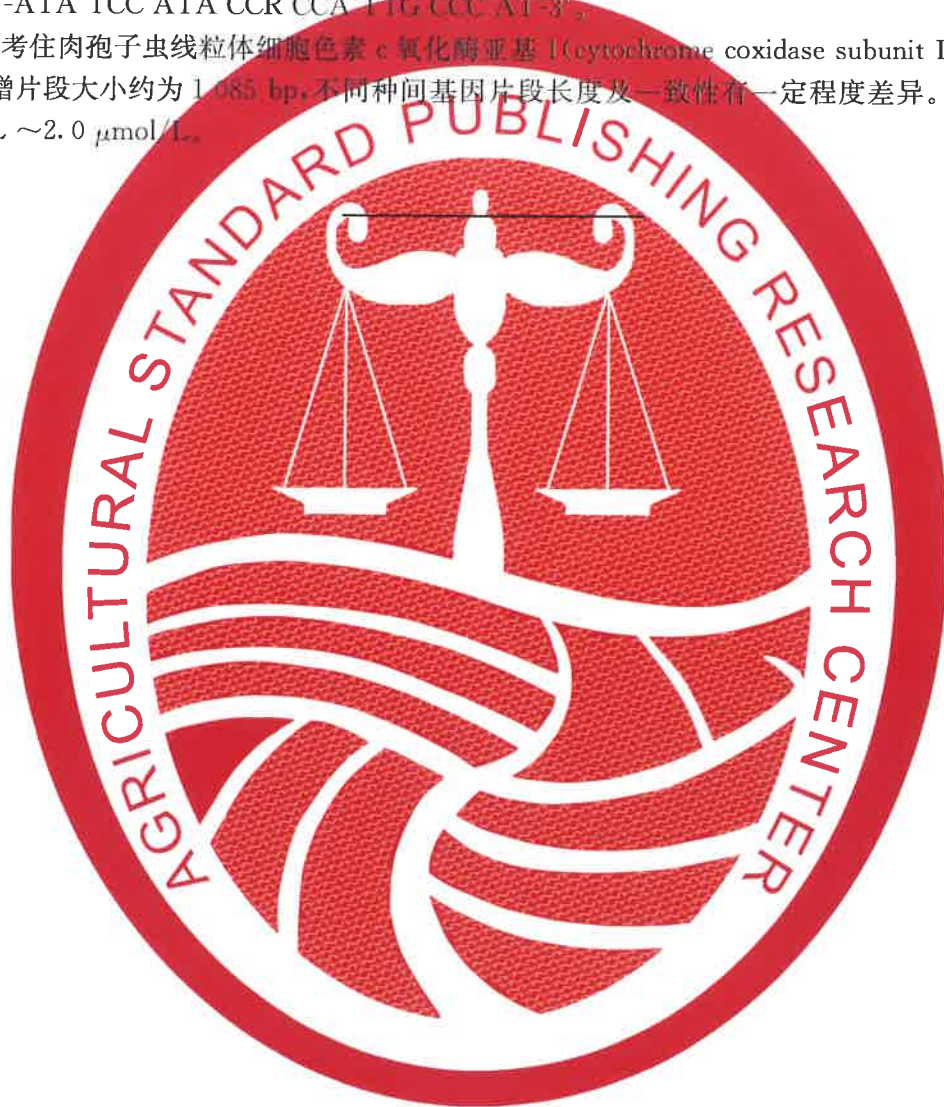
481 AACTTCCTAGGTACTGTACTGTTTGGCGGTTCAATGGCCTCGCTACGTCATGCTGCACTT  
541 CTGGTATGGGCAGTGATATTTACCGCCTTAATGTTGATCATCACCATACCGATCTTTACC  
601 GGAGCACTAGTAATGCTCCTAGCCGATCTAGAGTCTAACTACGGCTTCTACGACGGTGGC  
661 CTTGGTGGAGACGCCATACTGTACCAGCACTTATTCTGGTTCTTCGGGCACCCTGAAGTA  
721 TATATCCTGATTCTACCGGGGTTTGGCGTAATATCGCAATGCCTGAGCAGCGTGAGCGGT  
781 AGAGCAGTATTCGGAAGTCAGGCCATGATTCTCGCTATGGGCTGCATATCGATACTCGGT  
841 ACCCTGGTATGGGCTCATCACATGATGACCACTGGCCTCGAAGCCGATACACGATCGTAC  
901 TTCTCTGCCGTGACTATCATGATAGCCATACCGACGGGCACTAAGATATTCAACTGGATA  
961 TGTACGGTAATGGCCTCACCACGTCACTGGATATCGACGGATCAATGGATCGCCATATCC  
1 021 TTCGCCGTGCTGTTTCAGCCTGGGAGGCACGACAGGCGTAGTCATGGGCAATGGCGGTATG  
1 081 GATAT

附录 C  
(资料性)  
引物序列

SF1:5'-ATG GCG TAC AAC AAT CAT AAA GAA-3';

SR9:5'-ATA TCC ATA CCR CCA TTG CCC AT-3'.

引物参考住肉孢子虫线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cytochrome coxidase subunit I, *cox1*) 基因序列设计, 扩增片段大小约为 1 085 bp, 不同种间基因片段长度及一致性有一定程度差异。引物终浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  ~2.0  $\mu\text{mol/L}$ 。



中华人民共和国  
农业行业标准  
动物源性食品中住肉孢子虫检测方法

NY/T 4031—2021

\* \* \*

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京科印技术咨询有限公司印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

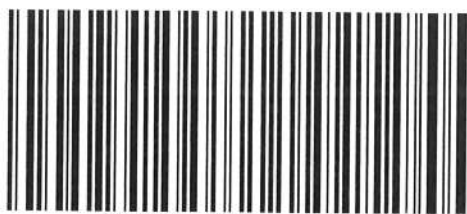
2022 年 4 月第 1 版 2022 年 4 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8929

定价: 34.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 4031—2021