

ICS 11.220
CCS B41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXX-XXXX

动物源性食品中弓形虫检测方法

Detection of *Toxoplasma gondii* in animal-derived foods

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言.....	1
引言.....	2
1 范围.....	3
2 规范性引用文件.....	3
3 术语和定义.....	3
4 缩略语.....	3
5 样品的采集、保存和运输.....	3
6 样品处理及 DNA 提取.....	4
7 套氏 PCR 法.....	5
附录 A（规范性）.....	8
附录 B（资料性）.....	9
附录 C（资料性）.....	11

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。

本文件主要起草单位：中国农业科学院上海兽医研究所、南京农业大学、山西农业大学、龙岩学院、宁波市疾病预防控制中心、艾迪威（青岛）生物科技有限公司。

本文件主要起草人：韩先干、蒋蔚、王权、陈兆国、米荣升、韩雪松、苗晋锋、王海东、黄翠琴、周文、李永东、刘振广、尹会方、何辉。

引 言

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种专性细胞内寄生的单细胞原虫 (寄生虫), 是引起弓形虫病的病原体。弓形虫是重要的人兽共患寄生虫, 可在猪、羊、牛等动物的肌肉组织内形成具有感染性的组织包囊。人若食用未经充分加热的生肉或被污染的肉制品, 可能导致感染。此类感染对孕妇、免疫功能低下人群的危害尤为突出, 已成为食品安全与公共卫生领域的关注重点。

猫科动物是唯一终末宿主, 在其肠道完成有性生殖后排出具有极强抵抗力的卵囊。人、家畜等中间宿主通过摄入卵囊或含速殖子的食物而被感染。在中间宿主体内, 弓形虫以两种形态存在: 速殖子引起急性感染, 缓殖子形成组织囊肿, 导致慢性感染和复发。

弓形虫不同形态的抵抗力差异显著, 这是影响传播的关键。猫粪排出的卵囊在潮湿环境中经 1~5 天孢子化后即具感染性, 孢子化卵囊在土壤、水中可存活数月以上, 且对常用消毒剂不敏感。肉类中的组织囊肿对低温有一定耐受, 但-12℃以下冷冻数日可被杀死。加热是最可靠的灭活方法: 67℃以上可迅速杀灭虫体, 彻底煮熟肉类、高温消毒牛奶是预防食源性感染的核心措施; 用 70℃以上热水浸泡洗涤器具至少 10 分钟, 或使用商业消毒剂处理污染表面, 均为有效消毒方式。

动物源性食品中弓形虫检测方法

1 范围

本文件规定了动物源性食品中刚地弓形虫PCR检测方法和荧光定量PCR检测方法。

本文件适用于动物源性食品（包括新鲜、冷冻的畜禽肉、内脏及其制品，以及可食用血液制品）中弓形虫的检测。

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 4789.17 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉与肉制品采样和检验处理
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 18448 实验动物弓形虫检测方法
- NY/T 573 动物弓形虫病诊断技术
- SN/T 1396 弓形虫病检疫技术规范

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。

- Ct: 循环阈值 (Cycle threshold)
- DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)
- ITS: 内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer)
- PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Saline)
- PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)
- qPCR: 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction)

5 样品的采集、保存和运输

5.1 样品的采集

5.1.1 采样环节：在不同环节进行采样，包括屠宰环节（屠宰场）、销售环节（超市、农贸市场）、储藏环节（冷库）、养殖环节（养殖场）。

5.1.2 样品种类包括：

- a) 热鲜肉：畜禽肌肉（不同部位）、内脏（肝脏、脾脏、肺脏等）；
- b) 冷冻肉类及其制品（腌制肉、火腿、腊肉、培根、香肠等）；

c) 可食用血液（抗凝血或血清）。

每份样品采集不少于 50 g（或 2 mL），用于样品检测及留样备份。

5.2 样品的保存和运输

5.2.1 采集的样品应置于冰盒中冷藏运输，需尽快送到实验室。如当天无法送达实验室的，应置于-20℃以下冷冻后运送。

5.2.2 采集的样品如在 24 h 内检测，在 2℃~8℃保存即可；在 1 月以内检测，保存温度应不高于-20℃；超过 1 个月检测，保存在-80℃冰箱（密封防挥发、使用耐低温容器）。

5.2.3 采集的样品应放在防泄漏的无菌容器或密封袋中，每份样品外包装应有明确的标签，标明采样人、采集地址、采集日期、动物种类、样品名称、采样人详细联系方式等。

6 样品处理及 DNA 提取

6.1 仪器设备

6.1.1 组织研磨仪。

6.1.2 1 000 μL 微量可调移液器。

6.1.3 外科手术剪、不锈钢镊子

6.1.4 肉样盘：不锈钢、铝合金或塑料制品，内有格子并编号。

6.1.5 1.5 mL 离心管、巴氏吸管、1 000 μL 吸头。

6.1.6 陶瓷珠或不锈钢珠（直径 2 mm~10 mm）

6.1.7 无菌研钵或研磨器

6.2 试剂材料

6.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS），按照附录 A 中 A.1。

6.2.2 蛋白酶 K 和 DNA 提取试剂盒

6.3 样品处理

6.3.4.1 肉类样品

取出热鲜肉或冷冻肉类及其制品（需先解冻），除去脂肪和结缔组织，进行多点取样（至少 3 个点），每个点取约 0.1 g，总质量不少于 0.3 g，用于 DNA 提取，其余样品保存在-20℃冰箱中，备用。

将所取样品混在一起，用灭菌的剪刀将肌肉剪碎，置于无菌 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL PBS，并对剪刀进行灭菌处理，避免交叉污染。

样品加入 2~3 颗陶瓷珠或不锈钢珠，用组织研磨仪研磨（60 Hz，300 s）或其他等效的研磨方式，直至样品匀浆化。研磨好的样品，吸取 300 μL 匀浆样品至新的离心管中用于后续 DNA 提取。其余样品冻在-20℃冰箱中，备用。

6.3.4.2 血液样品

用巴氏吸管吸取约 300 μL 新鲜或冻存（需先解冻）血液样品至 1.5 mL 离心管中，用于 DNA 提取。其余样品冻在-20℃冰箱中，备用。

6.4 样品 DNA 提取

6.4.1 肉类样品

研磨好的肉类样品加入 400 μL 组织裂解液和 40 μL 蛋白酶 K，充分混匀后，放置于 56℃水浴或金属浴中消化 2~3 h，直至样品裂解完全，期间可间歇振荡混匀。按组织 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。

6.4.2 血液样品

分装好的血液样品，按血液DNA提取试剂盒说明书进行样品DNA的提取。

6.4.3 核酸浓度测定

提取好的样品 DNA，用核酸检测仪测定并记录在 260 nm 和 280 nm 的吸光度。将提取的 DNA 适当稀释或浓缩，使其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7-2.0 之间，且浓度能满足检测要求，并保存于-20℃冰箱备用。

7 套式 PCR 法

7.1 仪器设备

- 7.1.1 高速台式冷冻离心机。
- 7.1.2 普通 PCR 仪。
- 7.1.3 核酸电泳仪。
- 7.1.4 核酸电泳槽。
- 7.1.5 凝胶成像分析仪。
- 7.1.6 组织研磨仪。
- 7.1.7 恒温水浴锅或金属浴。
- 7.1.8 核酸浓度测定仪（如紫外-可见分光光度计、荧光计等）。
- 7.1.9 微量可调移液器：2 μL、10 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL。
- 7.1.10 1.5 mL 离心管。
- 7.1.11 200 μL PCR 管。
- 7.1.12 吸头：10 μL、200 μL、1 000 μL。

7.2 试剂材料

- 7.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS），按照 A.1。
- 7.2.2 1×TAE（见附录 A.2）。
- 7.2.3 10 mg/mL 溴化乙锭（EB）（见附录 A.3）或同类核酸染料。
- 7.2.4 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒。
- 7.2.5 水：实验中配制溶液的用水应为蒸馏水或去离子水；PCR 用水符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 7.2.6 PCR 含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、含 Mg²⁺ 的即用型预混液（2×）。
- 7.2.7 套式 PCR 引物（外引物 NC1F、NC1R 和内引物 ITS1F、ITS1R 分别配成 10 μM，引物序列见附录 C.1）。
- 7.2.8 6×DNA Loading buffer。
- 7.2.9 质控标准DNA：阳性质控标准为含有弓形虫靶基因序列的灭活速殖子（1×10⁴个/mL以上）或重组质粒DNA（浓度为10⁴ copies/μL以上）。阴性质控对照为不含弓形虫速殖子的同种类肉样品。
- 7.2.10 核酸提取试剂盒

7.3 扩增引物

以刚地弓形虫 *ITS1* 基因（GenBank accession number AY259044.1）为靶基因进行套式 PCR 扩增，外引物为 NC1F 和 NC1R，目的片段大小 994 bp；内引物为 ITS1F 和 ITS1R，目的片段大小 302 bp。引物序列见附录 B.1。

7.4 反应体系

两轮 PCR 反应体系均为 25 μL 。模板 DNA 2 μL ，2 \times PCR mix buffer 12.5 μL ，上下游引物（10 μM ）各 0.5 μL ，补充双蒸水至 25 μL 。

第二轮 PCR 以第一轮扩增产物使用 TE 缓冲液稀释 50 倍后取 2 μL 作为模板。阳性对照模板为 7.2.9 中所列的阳性质控标准品，按照 6.4 节所列方法提取的、浓度在 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ -0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的弓形虫基因组 DNA 样品；或含有靶基因序列的重组质粒 DNA，浓度在 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ -0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。阴性对照模板为双蒸水。

7.5 扩增条件

两轮 PCR 的扩增条件相同。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s，56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min（或根据引物 T_{M} 值进行优化），72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s，40 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

7.6 琼脂糖凝胶电泳

用 1 \times TAE 缓冲溶液配制 1.0% 琼脂糖凝胶，加入适量 EB（终浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）或按同类核酸染料说明书推荐的终浓度添加。取第二轮 PCR 产物 5 μL 并与适量上样缓冲液混合，在 1 V/cm 至 10 V/cm 的电压下进行电泳。电泳结束后，在凝胶成像仪上观察结果并拍照。

7.7 结果判定

7.7.1 质控标准

阳性对照应出现 302 bp 条带，阴性对照无条带，判定试验结果有效。当阳性对照出现非特异性条带，或阴性对照出现目的条带时，试验结果无效，应检查试剂和操作过程后重新检测。

7.7.2 结果判定

阳性：被检样品扩增产物出现一条大小与阳性对照一致的约 302 bp 目的条带时，判为阳性。

弱阳性：若目的条带很弱，应重复检测，重复检测仍出现目的条带，判为阳性。

对于首次检测为阳性的样品，建议使用荧光定量 PCR 方法或对 PCR 产物进行测序进行确证

阴性：被检样品扩增产物没有出现目的条带，经重复检测后仍未出现目的条带时，判为阴性。

8 实时荧光定量 PCR 法

8.1 仪器设备

8.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。

8.1.2 同 7.1.1

8.1.3 同 7.1.6-7.1.12

8.2 试剂材料

8.2.1 同 7.2.1

8.2.1 实时荧光定量 PCR 含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 的即用型预混液（探针法，2 \times ）。

8.2.2 荧光定量 PCR 引物（上下游引物 P1、P2 分别配成 10 μM ，引物序列见附录 C.2）。

8.2.3 荧光定量 PCR 探针（使用浓度 250 nM，探针序列见附录 C.2）。

8.2.4 同 7.2.4

8.2.5 同 7.2.5

8.2.6 同 7.2.9

8.3 引物和探针

以弓形虫 529 bp 重复序列（GenBank accession number DQ779191）为靶标进行荧光定量 PCR 扩增，引物和探针序列见附录 C.2。

8.4 qPCR 反应体系

总体积为 20 μL 。模板 DNA 2 μL ，2 \times 荧光定量 PCR mix 10 μL ，ROX 参比染料（按仪器要求添加），上下游引物（10 μM ）各 0.8 μL ，探针 0.2 μL ，用 PCR 专用水补足至 20 μL 。阳性对照模板和阴性对照模板同 7.4 所列模板。

8.5 qPCR 扩增条件

qPCR 扩增条件如下：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s；60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s；45 个循环。在 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸结束时收集荧光信号。

8.6 结果判定

8.6.1 质控标准

阳性对照 Ct 值 <26 ，并出现特异性扩增曲线；阴性对照无 Ct 值，且没有特异性扩增曲线，试验结果成立。若阴性对照出现扩增曲线（Ct 值 <40 ），表明存在污染，试验结果无效，应重新检测。

8.6.2 结果判定

阳性：当样品 Ct 值 ≤ 36 ，且出现特征性的扩增曲线，判定为阳性。

阴性：当样品无 Ct 值或者无特征性扩增曲线，判定为阴性。

疑似：当样品 $36 < \text{Ct} < 40$ ，且出现特征性的扩增曲线，应重新检测。重新检测时，模板量加倍，并做 3 个重复；复检后至少 2 个重复反应有特异性阳性曲线且 Ct 值 ≤ 38 ，判为阳性；否则判为阴性（复检时应重新提取样品 DNA，原模板 2 μL 改为 4 μL ，其他试剂按比例调整或保持体系不变）。

9 综合判定

受检样品经套式 PCR 或荧光定量 PCR 检测，任一方法检出阳性，均判为该样品阳性。两种方法检测样品均为阴性，判为该样品阴性。

附 录 A
(规范性)
试剂配制

A.1 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2)

称取磷酸氢二钠 1.44 g、磷酸氢二钾 0.2 g、氯化钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g，溶于 800 mL 去离子水中，用盐酸溶液（如 1 mol/L 或 6 mol/L）调节 pH 至 7.2，定容至 1 L。配制好的 PBS 溶液应在 121℃ 高压灭菌 20 min。

A.2 50×TAE 电泳缓冲液（母液）

称取 Tris 碱 242 g、冰醋酸 57.1 mL、0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 mL，加蒸馏水定容至 1 L。在 1.034×10^5 Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min，保存于室温。使用时用蒸馏水按 1:50 稀释成 1×TAE。

A.3 SYBR Safe (10,000× 浓缩液)

吸取 10 μL 浓缩液，加蒸馏水定容至 100 mL，用磁力搅拌器充分混匀。将配制好的工作液转移至棕色瓶中，或使用铝箔包裹瓶身，室温避光保存。

A.4 琼脂糖凝胶 (1.0%)

称取琼脂糖 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 5 μL 溴化乙锭 (10 mg/mL) 至终浓度为 5 μg/mL，或其他同类 EB 替代染料，按照产品的推荐稀释倍数进行添加。

附录 B

(资料性)

引物及扩增片段参考序列与 PCR 扩增图

B.1 套式 PCR 引物序列

外引物: NC1F: 5'-TGC GGA AGG ATC ATT CAC G-3'

NC1R: 5'-CCG TTA CTA AGG GAA TCA TAG TT-3'

内引物: ITS1F: 5'-GAT TTG CAT TCA AGA AGC TGA TAG TAT-3'

ITS1R: 5'-AGT TAG GAA GCA ATC TGA AAG CAC ATC-3'

B.2 *ITS* 基因参考序列

参考刚地弓形虫 RH 株 17S, 5.8S, 26S 和 5S rRNA 基因组序列 (1776 bp-2769 bp) (GenBank 登录号: X75429) :

TGCGGAAGGATCATTACACGTCCTTATCCTTTATTAACCATCAACCTTTGAATCCCAAGCAAACA
 TGAGTTTGCATCTCTCTCCATTGGAGAGATTTGCATTCAAGAAGCGTGATAGTATCGAAAGGTATTA
 TTGCCTTCTTCATGTTGGATATCCTGCGCTGCTTCCAATATTGGAAGCCAGTGCAGGTATCCGGGGG
 TGCACAGCGAAGGGGCTCAATTTCTGGAAATTCGTGTCTCTGTTGGGATACTGATTTCCAGGAGTT
 TCTTCAGTGTGCATTCTTTTTTCCCACACCGTTATTTCAAACAACAAATCTGAGGAACATTTGAGAG
 AGAGTGAAAGATTGTATCTTTCTGCATCTCTCTCGATGTGCTTTCAGATTGCTTCTAAACTATAATG
 TTATTTTAAATTTTTCAGCAATGGATGTCTTGGCTCGCGCAACGATGAAGGACGCAGCGAACTGCAA
 ACGCAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAGATTTCTGAACGCAAATGGCACCTTGGGGAT
 ATTCTCCTTGGTACGTCTGTTTCAGTGTCTTTGAAATCACAATTTTCTGCTTTTTTTAGGGTCGTTGCT
 TCAGTTTGGCTGAAGCCCCCTAGGAGCAGTATGATTGGGTGTCATGAGTGTGAATACTCAATGTC
 ACCCTGAATAATGAACACAGCGGAGAACTACTCGTGCCTCTTCTTTTAGAGGCTCAAGTGTATTG
 TTGAGTTGTATCGATGACATCATTGAGATACGGTGGCTTCTTCATTGAAGACAAAGTTTCATTGATG
 CTGTCGATCGACTTCAATACCGCAATGGAATTTTCGGTTCATTGTTGCTCTGCGAGGTTTCGTCGTT
 GTTGTTTTGTCTCGGGCGTTTGTCCGATTTATTTATCAGACCTGAAATCAGGCGAGGTTACCCGCTG
 AACTTAAGCATATTATTAAGCGGAGGAGAAGAAAATAACTATGATTCCTTAGTAACGG

B.3 弓形虫 *ITS* 基因片段 PCR 扩增图

弓形虫 DNA PCR 检测结果电泳参照图见图 B.1。

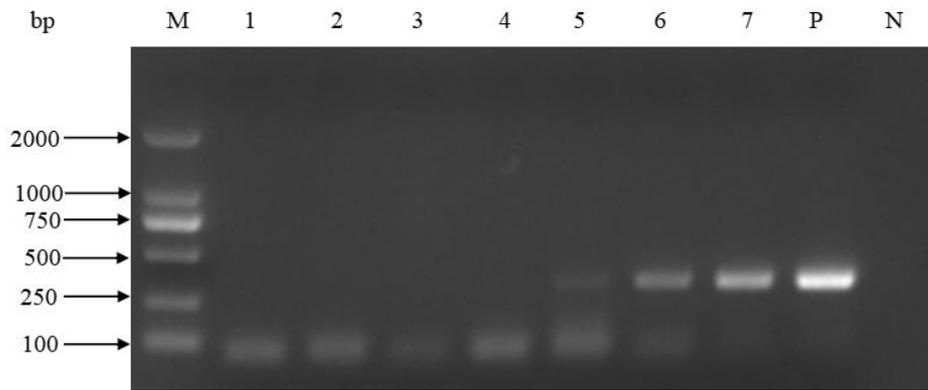


图 B.1 猪肉样品中弓形虫套式 PCR 第二轮扩增产物电泳结果
1-7: 猪肉样品; P: 阳性对照; N: 阴性对照

附录 C (资料性)

引物及参考序列与荧光定量 PCR 扩增曲线

C.1 刚地弓形虫 529 bp 基因 (repetitive DNA) 参考序列

参考刚地弓形虫 repetitive DNA 基因序列 (GenBank 登录号: PV766914):

```
CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTTAAATTTTTTTTCTTTTTTGTTTTTCTGATTTTGTTTTTT
TTGACTCCGGCCCAGCTGCCTCTGTCTGGGATGAGACCGCGGAGCCGAAGTGCCTTTTTTTTTTTG
ATTTTTTTTTTGTTTTTTTCACAGGCGAGCTCGCCTGTGCTTGGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTCGA
AGGGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTCCAGCCGTCTTGGAGGAGAGATATCAGGACTGTAGAT
GAAGGCGAGGGTGAGGATGAGGGGGTGGCGTGGTTGGGAAGCGACGAGAGTTCGGAGAGGGAGA
AGATGTTTCCGGCTTGGCTGCTTTTCTGGAGGGTGGAAAAGAGACACCGGAATGCGATCTAGAC
GAGACGACGCTTTCCTCGTGGTGTGGCGGAGAGAATTGAAGAGTGGAGAAGAGGGGCGAGGGAG
ACAAGAGTCGGAGGCTTGGACGAAGGGAGGAGGAGGCGTAGGAGAGGAATCCAGATGCACTGTG
TCTGCAG
```

C.2 荧光定量 PCR 引物和探针

引物: 上游引物 P1: 5'-GCT CGC CTG TGC TTG GAG-3'

下游引物 P2: 5'-ATC TTC TCC CTC TCC GAC TCT C-3'

探针: FAM-TCG CTT CCC AAC CAC GCC ACC C-BHQ1

C.3 弓形虫 529 bp 基因荧光定量 PCR 扩增曲线

弓形虫 DNA 荧光定量 PCR 扩增曲线参照图见图 C.1。

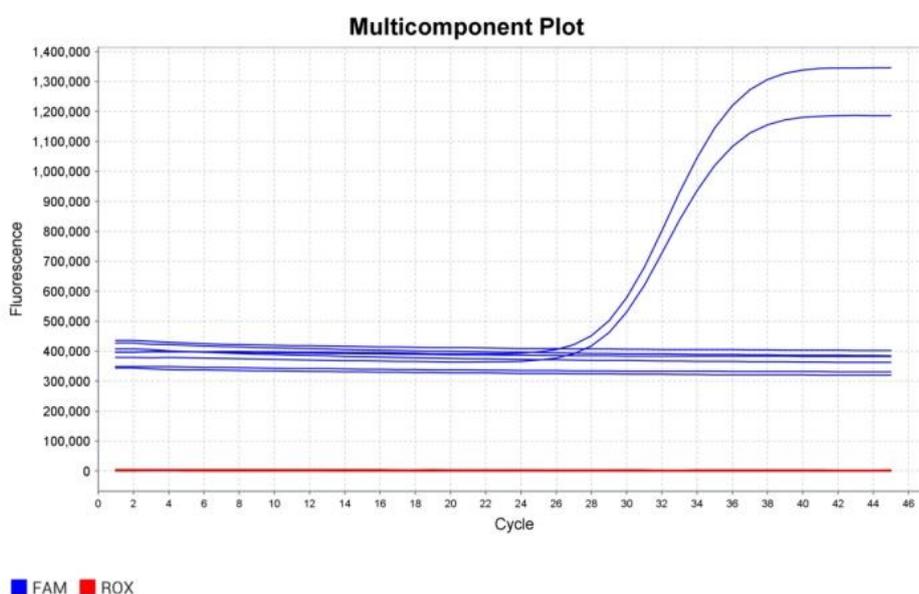


图 C.1 猪肉样品中弓形虫荧光定量 PCR 扩增曲线