

# 《食品安全国家标准 动物性水产品中异尖线虫的检验》

## （征求意见稿）编制说明

### 一、标准起草基本情况

本标准制定任务来源于国家卫生健康委员会委托制定的食品安全国家标准项目，由南京海关动植物与食品检测中心、中国检验检测学会、寄生虫检验方法协作组制定《食品安全国家标准 动物性水产品中异尖线虫的检验》，项目编号为 spaq-2019-053。2019 年 8 月收到正式通知，2019 年 11 月 1 日在北京召开 2019 年食品安全国家标准项目启动会，启动会后项目组正式协调成立，在广泛调查研究和讨论的基础上，起草了本标准，并邀请五家以上专业技术机构进行方法标准实验室间验证工作。2020 年 8 月在方法验证的基础上，形成讨论稿，并通过信函的方式向有关机构和专家广泛征求意见，期间未收到重大分歧意见，经整理归纳后，形成送审稿。2021 年 3 月 31 日~2021 年 4 月 1 日，第二届食品安全国家标准审评委员会微生物检验方法与规程专业委员会第五次会议审查通过，并修改标准名称为“动物性水产品中异尖线虫的检验”。

### 二、标准主要技术内容

本标准共涉及两种检测方法：形态学方法和 PCR 方法，其中形态学方法又分为直接解剖观察法和蛋白酶消化法，适用范围有所不同。直接解剖观察法操作简便，适用于有经验的技术人员使用，蛋白酶消化法可以提高异尖线虫的检出率。在取样和样本制备过程中，可采用直接解剖观察法进行检测，如果检出可疑虫体，则进一步做 PCR 检测；如果采用直接解剖观察法未检出异尖线虫，则需要用蛋白酶消化法进行检测；也可直接对样本采用蛋白酶消化法进行检测。因形态学观察方法大多依赖于技术人员的操作经验，对疑似异尖线虫虫体可用 PCR 方法做进一步鉴定。

#### 1. 形态学方法

##### 1.1 直接解剖法

取动物性水产制品，剖解，肉眼或体视显微镜观察肌肉等组织。动物性水产制品中的异尖线虫为第三期幼虫，虫体多以包囊形式寄生于宿主体内，包囊往往是一种圆形或长形套，紧包住虫体，若发现黄白色、无色微透明或乳白色的虫体或包囊，用镊子轻轻取出虫体或从包囊内分离出虫体，将虫体置于加有生理盐水的培养皿中，清除虫体周围杂物。

用肉眼或体视显微镜观察分离的虫体，异尖线虫第三期幼虫的虫体呈黄白色、乳白色或无色微透明，外形呈长纺锤形，体长 10 mm~30 mm 不等，头端较尾端尖细，头部有唇块，在腹侧有一明显的钻齿，中肠部体宽为 430  $\mu\text{m}$ ~550  $\mu\text{m}$ ，无侧翼。异尖线虫第三期幼虫活虫肉眼可见距头端 2~3 mm 处有一个 1 mm 的白点，即为长形小胃，显微镜下观察呈深色不透明。

##### 1.2 胃蛋白酶消化法

采集动物性水产制品的肌肉组织用剪刀剪成小块。取样品 200 g，按照 1:5~1:10 的比例加入胃蛋白酶消化液，充分搅拌混匀，于 37 °C 恒温箱放置 4 h~16 h，使肌肉完全消化，可根据不同水产品种类以及消化时间对胃蛋白酶浓度和使用量进行调整。消化后的悬液用网筛过滤，并用生理盐水冲洗网筛上的残留物。收集滤液置于锥形量杯内，搅拌后沉淀 20 min~30 min。轻轻倾去上清液，加入适量生理盐水，搅拌后再沉淀 20 min~30 min，直至上清液透明为止，沉淀备用。全部沉淀物分次转移至玻璃平皿，在体视显微镜下去除沉淀中的杂质，分离收集疑似虫体，用生物显微镜观察虫体形态。具备上述特征的虫体，可判定为异尖线虫。疑似虫体立即用于 DNA 提取或-20 °C 保存备用。

## 2. PCR 方法

通过不同地区不同来源的异尖线虫进行检测筛选，确定 NC2 和 NC5 作为标准使用的引物。通过对异尖线虫、颚口线虫、刺激隐核虫、华支睾吸虫、管圆线虫、并殖吸虫、曼氏迭宫绦虫裂头蚴和鱼肌肉组织匀浆（带鱼、马鲛鱼、黑鲷鱼）提取 DNA，按建立的 PCR 检测方法进行扩增，琼脂糖凝胶电泳结果显示只有异尖线虫 DNA 能够扩增出目的条带，其他均无扩增条带。取 PCR 产物进行基因序列测定，将测序结果与 DNA 序列数据库参考序列进行同源性比对，结果表明与异尖线虫属同源性高于 95%。

形态学方法检出异尖线虫科幼虫，报告检出异尖线虫幼虫。形态学方法检出疑似异尖线虫科幼虫、PCR 结果为阳性且扩增片段基因序列与任何一条参考序列同源性 $\geq 95\%$ ，报告检出异尖线虫幼虫。形态学方法未检出异尖线虫科幼虫、或 PCR 结果为阴性、或扩增片段基因序列与参考序列同源性 $< 95\%$ ，报告未检出异尖线虫幼虫。

实验室间的方法验证结果表明本标准对异尖线虫形态学描述准确，PCR 结果稳定、可信，该方法可用于动物性水产品中异尖线虫的鉴定。

## 三、国内外相关法规标准情况

《食品安全国家标准 动物性水产制品》（GB 10136-2015）规定了寄生虫指标，其中针对即食生制动物性水产制品的线虫项目指标为不得检出。至今，世界动物卫生组织（OIE）最新发布的《Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals》和《Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals》中尚无有关异尖线虫的检测和鉴定方法方面的资料。未查到 ISO、AOAC、美国 FDA、英国食品标准化委员会等其他相关国际法规标准的规定。《异尖线虫病诊断规程》（SN/T 1509-2005）中规定了异尖线虫形态学鉴定方法，水产行业标准《鱼类简单异尖线虫幼虫检测方法》（SC/T 7210-2011）中规定了简单异尖线虫形态学和 PCR 鉴定方法。

本标准部分采用了行业标准 SN/T 1509-2005 和 SC/T 7210-2011 中形态学鉴定的内容，在此基础上对检测鉴定技术做了进一步更新，增加了异尖线虫科的 PCR 及测序分析方法。

## 四、其他需要说明的事项

