



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 15805.3—2018  
代替 GB/T 15805.3—2008

---

## 病毒性出血性败血症诊断规程

Code of diagnosis for viral haemorrhagic septicaemia (VHS)

2018-07-13 发布

2019-02-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 15805.3—2008《鱼类检疫方法 第3部分：病毒性出血性败血症病毒(VHSV)》。本标准与 GB/T 15805.3—2008 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增加了采样;
- 增加了临床症状;
- 增加了间接免疫荧光抗体试验(indirect immunofluorescent antibody test, IFAT)检测病毒性出血性败血症病毒抗原的方法;
- 增加了酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测病毒性出血性败血症病毒抗原的方法;
- 增加了 RT-PCR 和荧光 RT-PCR 检测方法;
- 增加了综合判定;
- 增加了 VHS 的规范性附录。

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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本标准起草单位:全国水产技术推广总站、山东出入境检验检疫局、深圳出入境检验检疫局、北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:余卫忠、孙涛、尹伟力、贾鹏、吕永辉、谷强、张利峰、岳志芹、王津津、江育林。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 15805.1—1995;
- GB/T 15805.3—2008。



## 病毒性出血性败血症诊断规程

### 1 范围

本标准规定了病毒性出血性败血症临床症状、组织病理学特征、病毒分离、中和试验、间接荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验、逆转录聚合酶链式反应和实时荧光聚合酶链式反应进行鉴定的方法。

本标准适用于鱼类病毒性出血性败血症的流行病学调查、诊断、检疫和疫情监测。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

SC/T 7016.1 鱼类细胞系 第1部分:胖头鲢肌肉细胞系(FHM)

SC/T 7016.5 鱼类细胞系 第5部分:鲤上皮瘤细胞系(EPC)

SC/T 7016.9 鱼类细胞系 第9部分:蓝鳃太阳鱼细胞系(BF-2)

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BF-2:蓝鳃太阳鱼细胞系(bluegill fry cell line)

bp:碱基对(base pair)

CPE:细胞病变效应(cytopathic effect)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

cDNA:互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

EPC:鲤上皮瘤细胞系(epithelioma papulosum cyprini cell line)

FBS:胎牛血清(fetal bovine serum)

FHM:胖头鲢肌肉细胞系(fathead monnow cell line)

FITC:异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)

HEPES:4-羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]

OPD:邻苯二胺(o-phenylenediamine)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution)

PBST:磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffer solution-tween-20)

PFU: 空斑形成单位(plaque forming unit)

RT-PCR: 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

TBE: 三羟甲基氨基甲烷硼酸乙二胺四乙酸缓冲液(Tris-Borate-EDTA)

TCID<sub>50</sub>: 50%组织细胞感染量(50% tissue culture infective dose)

TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

VHSV: 病毒性出血性败血症病毒(viral haemorrhagic septicaemia virus)

#### 4 试剂和材料

4.1 水: 应符合 GB 6682 中一级水的规格, 用于 RT-PCR 时要用 DEPC 处理, 除去 RNA 酶。

4.2 青霉素。

4.3 链霉素。

4.4 逆转录酶: -20℃保存, 避免温度剧烈变化。

4.5 RNA 酶抑制剂: -20℃保存, 避免温度剧烈变化。

4.6 dNTP: 含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L。

4.7 *Taq* 酶: -20℃保存, 避免温度剧烈变化。

4.8 溴酚蓝。

4.9 VHSV 参考株: 由农业部相关部门提供。

4.10 鼠抗 VHSV 的单克隆抗体(包被用): 由农业部相关部门提供。

4.11 抗 VHSV 的参考血清: 与包被用单抗不是来源于同一种动物, 由农业部相关部门提供。

4.12 FITC 标记的二抗: 抗 4.11 中所指动物的抗体。

4.13 辣根过氧化物酶标记的二抗: 抗 4.11 中所指动物抗体。

4.14 阴性对照: 正常细胞组织悬液。

4.15 鲤鱼上皮瘤细胞(EPC)、蓝鳃太阳鱼细胞(BF-2)、胖头鲢肌肉细胞(FHM)应分别符合 SC/T 7016.5、SC/T 7016.9 和 SC/T 7016.1 的要求。

4.16 细胞生长液: 用含厄尔平衡盐(Earle's balanced salts)的 M199 培养基配置, 另加 10%胎牛血清(FBS)。

4.17 细胞维持液: 用含厄尔平衡盐(Earle's balanced salts)的 M199 培养基配置, 另加 2%胎牛血清(FBS)。

4.18 丙酮: 分析纯。

4.19 无水乙醇: 分析纯, 使用前预冷到 -20℃。

4.20 0.01 mol/L PBS: 见附录 A 中的 A.1。

4.21 固定液: 见 A.2。

4.22 PBST: 见 A.3。

4.23 包被稀释液: 见 A.4。

4.24 底物 OPD 溶液: 见 A.5。

4.25 CATB 溶液: 见 A.6。

4.26 抽提液 II: 见 A.7。

4.27 抽提液 I: 见 A.8。

4.28 1×RT 缓冲液。

4.29 TBE 缓冲液: 见 A.9。

4.30 DNA 分子量标准。

4.31 5%脱脂奶。

4.32 RT-PCR 引物:

F: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGTGAA-GCG-3',

R: 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3',

扩增 N 基因的 505 bp 片段,序列参见附录 B。

4.33 荧光 RT-PCR 引物:

F: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3',

R: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3',

探针: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1-3'。

扩增 N 基因的 532 -608 的片段,序列参见附录 B。

## 5 器材和设备

5.1 超净工作台。

5.2 生化培养箱。

5.3 荧光倒置显微镜。

5.4 冷冻离心机和离心管。

5.5 超低温冰箱和普通冰箱。

5.6 细胞培养瓶及细胞培养板。

5.7 高压灭菌锅。

5.8 磁力搅拌器。

5.9 真空高压过滤器。

5.10 组织研磨器。

5.11 PCR 仪及荧光定量 PCR 仪。

5.12 微量移液器及吸头。

5.13 电泳仪。

5.14 小型离心机。

5.15 制冰机。

5.16 微波炉或电炉。

5.17 凝胶成像仪或紫外透射仪。

5.18 酶标仪。

5.19 剪刀,镊子。

5.20 天平。

## 6 临床症状和组织病理学特征

参见附录 C。

## 7 采样

### 7.1 采样对象

鲑、鳟等易感鱼类。

## 7.2 采样水温与数量

应在水温低于 18 ℃ 进行,采样数量应符合 SC/T 7103 的要求。

## 7.3 样品采集

按 GB/T 18088 的规定执行。成熟雌鱼需取卵巢液,鱼卵则取卵膜。体长小于 4 cm 的鱼苗取整条,若是带卵黄囊的鱼应去掉卵黄囊;体长 4 cm~6 cm 的鱼苗取内脏(包括肾);体长大于 6 cm 的鱼则取肾、脾、心和脑组织。

# 8 病毒分离

## 8.1 样品处理

VHSV 的分离,每 5 尾鱼为 1 个样品,若有症状成鱼每 1 尾为 1 个样品。将所取的样品进行组织研磨,随后按 1:10 的比例将研磨好的组织样悬浮于含有 1 000 IU/mL 青霉素和 1 000 μg/mL 链霉素的培养液中,于 25 ℃ 下悬浮 2 h~4 h 或 4 ℃ 下孵育过夜。7 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。卵巢液不必匀浆,稀释 2 倍以上。7 000 r/min 离心 15 min,并在以后的步骤中直接用其上清液。

## 8.2 病毒分离

采用的细胞系有 BF-2、FHM、EPC。宜同时采用包括 BF-2 在内的两种细胞来培养分离病毒。把已按 1:10 制备的组织匀浆上清液再作二次 10 倍稀释(稀释液用生长液,维持液均可),即达到 1:100 和 1:1 000,接种到生长 24 h 长满细胞(BF-2、FHM、EPC)单层的细胞板中。每个样品至少接种 2 孔,每孔(2 cm<sup>2</sup>)的单层细胞最多接种 100 μL 稀释液。15 ℃~18 ℃ 吸附 1 h 后,加入含 0.01 mol/L HEPES 的细胞培养液,置于 15 ℃~18 ℃ 培养。试验中要有 2 孔阳性对照(接种 VHSV 参考株)和 2 孔空白对照(未接种病毒的细胞)。逐日于显微镜下观察致细胞病变效应(CPE),连续观察 7 d。如果在 7 d 内没有细胞病变出现,则还要用敏感细胞再盲传一次。传代程序如下:将接种上述组织上清液的细胞培养物冻融收集,7 000 r/min,4 ℃ 离心 15 min,离心后取上清接种到同种的长满单层的新鲜细胞中,再培养观察 7 d。

## 8.3 结果判定

在空白对照细胞正常,阳性对照出现 CPE 的情况下,样品接种细胞并盲传后均无 CPE 出现,判为阴性;如有 CPE 出现,为病毒分离阳性,需要立即取病毒悬液用下述任意一种方法进行 VHSV 鉴定。

# 9 中和试验

9.1 收集出现 CPE 的单层细胞,在 4 ℃ 下 2 000 g 离心 15 min,去除细胞碎片。

9.2 将含病毒的上清液从 10<sup>-2</sup> 系列稀释到 10<sup>-4</sup>。

9.3 每稀释度的病毒液与等体积的抗 VHSV 的参考血清混合,同时另取这些病毒稀释液与等体积的细胞培养液混合。(中和抗体溶液的效价按 50% 蚀斑减少单位计算不少于 1:2 000)。

9.4 同时,取参考毒株作为阳性对照,按照 9.3 的方法制备混合液。

9.5 各混合物在 15 ℃ 下孵育 1 h。

9.6 将上述混合物分别接种到生长约 24 h~48 h 的 BF-2 单层细胞上(培养于 96 孔板中),每稀释度接

2 孔,每孔 50  $\mu\text{L}$ 。

9.7 吸附后 0.5 h~1 h 后,每孔加入含有 10% 胎牛血清的细胞培养液 50  $\mu\text{L}$ ,于 15  $^{\circ}\text{C}$ ~18  $^{\circ}\text{C}$  下培养。

9.8 检查 CPE 发生情况。

9.9 结果判定:用 Reed-Muench 法计算并比较非中和对照组和中和试验组的  $\text{TCID}_{50}$  值。若病毒悬液被抗 VHSV 特异性参考血清处理后,CPE 被抑制或被显著推迟,而未被处理的细胞培养液中 CPE 明显,导致二者病毒滴度相差 2 个以上,则待测的病毒样品为 VHSV 中和试验阳性。

## 10 间接荧光抗体试验

10.1 在 2  $\text{cm}^2$  的塑料细胞培养板中或盖玻片上制备单层 BF-2 细胞,通常在 22  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h 即可达到 80% 长满单层细胞。

10.2 当准备好用作感染的单层细胞后,在传入细胞的当天或第 2 天,直接将 10 倍稀释的待鉴定的病毒悬液接种到细胞培养孔。每个待鉴定的样本接种 6 孔,阳性对照和阴性对照另各取 2 孔。

10.3 按 10.2 同样方法稀释 VHSV 病毒参考株的悬液,使得其细胞培养液中病毒滴度要达到 5 000 PFU/mL~10 000 PFU/mL。

10.4 在 15  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。

10.5 孵育结束后,吸出细胞培养液,用 0.01 mol/L PBS 漂洗 1 次,然后用冷的固定液(见 A.2)轻轻漂洗 1 次。

10.6 每 2  $\text{cm}^2$  细胞单层用 0.5 mL 固定液固定 15 min。

10.7 使单层细胞在空气中干燥至少 30 min,立即继续下步实验或置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

10.8 用 PBST 洗 4 次。使细胞再水化,最后甩干缓冲液。

10.9 用上述的 PBST 把抗 VHSV 的参考血清稀释到工作浓度。

10.10 加入 10.9 抗血清溶液,每 2  $\text{cm}^2$  孔加 0.25 mL。将加入抗血清的细胞单层在 37  $^{\circ}\text{C}$  湿盒内反应 1 h,不要让湿盒里的水蒸发干。用 PBST 洗 4 次。

10.11 将 FITC 标记的二抗稀释到工作浓度,每 2  $\text{cm}^2$  孔加 0.25 mL。在 37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1 h。再用 PBST 漂洗 4 次。

10.12 用商品化的封片剂封片,立即观察。

10.13 用荧光显微镜观察,在观察前首先要观察阳性对照和阴性对照。应在阳性和阴性样品中看得到预期的结果后才能进行其他样品的观察。

10.14 结果判定:在阳性对照出现特异的黄绿色荧光点,阴性对照无黄绿色荧光点或仅有微弱绿色背景的情况下,待检样品在细胞质上有特异的黄绿色荧光点,判定为阳性;只有微弱的绿色背景,判定为阴性。

## 11 酶联免疫吸附试验

11.1 用包被稀释液(见 A.4)将纯化的鼠抗 VHSV 单克隆抗体稀释到工作浓度,每孔加 0.1 mL。包被 ELISA 微量板。在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜或者 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1.5 h~2 h。

11.2 用 PBST 冲洗 3 次。

11.3 用 5% 脱脂奶的 PBST(200  $\mu\text{L}$ /孔)封闭,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。再用 PBST 冲洗 3 次。

11.4 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  经 2 或 4 倍系列稀释的待检样本、未感染的细胞悬液(阴性对照)、VHSV 病毒悬液(阳性对照)及 PBST(空白对照),于 37  $^{\circ}\text{C}$  下和包被好的鼠抗 VHSV 单克隆抗体反应 1 h。再

PBST 洗 3 次。

11.5 每孔加 0.1 mL 用细胞培养液稀释到工作浓度的抗 VHSV 的纯化参考血清。该抗血清不能和包被用的单抗来源于相同的动物。37 °C 孵育 1 h。再用 PBST 洗 3 次。

11.6 每孔加 0.1 mL 0.1% 的  $H_2O_2$  (用双蒸水稀释)。37 °C 反应 15 min 以除掉非特异性的过氧化物酶。倒出孔内液体,用 PBST 洗 2 次。

11.7 每孔加入 0.1 mL 用细胞培养液稀释到工作浓度的辣根过氧化物酶标记的二抗。该二抗应是对应抗 11.5 所用的参考血清。37 °C 反应 (1.5 h~2 h)。

11.8 用 PBST 冲洗 3 次。加入 0.1 mL 底物 OPD 溶液 (见 A.5)。当阳性对照出现明显棕黄色,阴性对照无色时,立即每孔加入 0.2 mL 浓度为 2 mol/L 的硫酸终止反应,并立即用酶标仪测量各孔在波长 490 nm 时的光吸收值。此步骤的底物也可选用 TMB 溶液,选用 TMB 反应产物检测需要测量 450 nm 时的光吸收值。

11.9 结果判定:以空白对照的光吸收值调零,再测量各孔的光吸收值。先计算阳性对照和阴性对照的光吸收值之比 (即 P/N 值)。如果  $P/N \geq 2.1$ ,表明对照成立。再计算待测样品孔和阴性对照孔的 P/N 值。当  $P/N \geq 2.1$  时判为 VHSV 阳性。

## 12 RT-PCR

### 12.1 RNA 抽提

12.1.1 将病毒分离呈阳性的细胞悬液或出现典型临床症状的研磨组织样本悬液 450  $\mu$ L 加入 1.5 mL 的离心管中,同时,设立阳性对照、阴性对照和空白对照。取含有已知 VHSV 参考株的细胞悬液或含有病毒目的片段的非感染性体外转录 RNA 作为阳性对照。取正常细胞悬液作为阴性对照。取等体积的水代替模板作为空白对照。然后将样品与对照同时加入 450  $\mu$ L CTAB 溶液 (见 A.6) 用旋涡震荡器将其混匀,25 °C 作用 2.5 h。

12.1.2 将上步处理好的样品离心管加入 600  $\mu$ L 抽提液 II (酚/三氯甲烷/异戊醇) (见 A.7),充分混合不少于 30 s。12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相 (约 800  $\mu$ L)。再加入 700  $\mu$ L 抽提液 I (三氯甲烷/异戊醇) (见 A.8),充分混合不少于 30 s。12 000 r/min 离心 5 min,小心取上层水相 (约 600  $\mu$ L)。再加入 -20 °C 预冷的 1.5 倍体积的无水乙醇 (约 900  $\mu$ L),充分混匀后,-20 °C 8 h 以上沉淀核酸。12 000 r/min 离心 30 min,小心弃去上清,干燥后加入 11  $\mu$ L 经 DEPC 处理过的水,溶解后作为 RT-PCR 模板溶液。

12.1.3 也可以采用等效的商品化的总 RNA 提取试剂盒。

### 12.2 RT-PCR 扩增

#### 12.2.1 cDNA 合成

在 20  $\mu$ L 反应体系中,添加以下反应成分至相应浓度:1 $\times$ RT 缓冲液 (pH 8.3 的 50 mmol Tris, 75 mmol KCl, 10 mmol DTT, 3 mmol  $MgCl_2$ )、1 mmol dNTP、50 pmol 的正向引物、5 U 的逆转录酶和 2  $\mu$ L 模板,置于 42 °C 反应 30 min。也可采用一步法,在一个反应体系完成逆转录和 PCR。

#### 12.2.2 DNA 扩增

在 50  $\mu$ L 反应体系中,添加以下反应成分至相应浓度:1 $\times$ PCR 缓冲液 (50 mmol KCl, pH 9.0 的 10 mmol Tris/HCl, 0.1% Triton X-100)、2.5 mmol  $MgCl_2$ 、200  $\mu$ mol dNTPs、50 pmol 的正向引物和反向引物、1.5 U 的 DNA 聚合酶、5  $\mu$ L cDNA 产物。加矿物油 (如 PCR 仪有热盖则无需加矿物油) 封液后

放置于 PCR 仪。PCR 反应条件如下:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s→55 ℃ 30 s→72 ℃ 1 min,35 次循环;然后 72 ℃ 10 min,最后 4 ℃ 保温。该步骤所用引物对某些 IVb 株可能检测不出来,在这个情况下需要用荧光 RT-PCR 来补充。

### 12.3 琼脂糖电泳

用 TBE 电泳缓冲液(见 A.9)配制 1.5% 的琼脂糖(含 0.5 μg/mL EB,见 A.10)平板。将凝胶放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面,将 6 μL PCR 扩增产物和 2 μL 电泳样品缓冲液(见 A.11)混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 分子量标准作对照。5 V/cm 电泳,当溴酚蓝到达底部时停止,在紫外透射仪或凝胶成像仪下观察。

### 12.4 结果判定

12.4.1 RT-PCR 后阳性对照会出现特异 505 bp 的 DNA 片段。阴性对照和空白对照没有该核酸带。

12.4.2 待测样品 RT-PCR 扩增后能在相应 505 bp DNA 位置上有带,并经测序验证,结果判定为阳性。无带或带的大小不是 505 bp 的均判为阴性。

## 13 荧光 RT-PCR

### 13.1 RNA 抽提

同 12.1。

### 13.2 扩增试剂准备

在 25 μL 实时荧光 RT-PCR 反应体系中添加以下反应成分至相应浓度:10×RT-PCR buffer 2.5 μL、上下游引物 0.9 μmol/L、探针 0.25 μmol/L、*Taq* 酶 1 U、逆转录酶 0.5 U,模板 10 μL,补水到总体积为 25 μL,同时按 12.1 要求设立对照。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整,也可采用商业荧光 RT-PCR 一步法试剂盒。

### 13.3 实时荧光 RT-PCR 检测

13.3.1 将 13.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。

13.3.2 循环条件设置:

- 第一阶段,反转录 50 ℃ 30 min;
- 第二阶段,预变性 95 ℃ 15 min;
- 第三阶段,94 ℃ 15 s; 60 ℃ 40 s; 72 ℃ 20s,反应 40 个循环。

13.3.3 不同的试剂盒可根据试剂盒要求将反应参数作适当调整。

### 13.4 结果判断及表述

阴性对照无 Ct 值,无扩增曲线。阳性对照的 Ct 值应小于 35,并出现典型的扩增曲线,否则,此次实验视为无效。样本无扩增曲线,或者 Ct 值大于 35 的为阴性;出现典型的扩增曲线后 Ct 值小于或等于 35 为阳性。

## 14 综合判定

### 14.1 疑似病例的判定

易感鱼类在发病条件下出现典型的临床症状,或具有典型的病理学特征,或在病毒分离培养中出现典型的 CPE,判定为疑似病例。

### 14.2 确诊病例判定

符合 14.1 的疑似病例的组织样本直接经 RT-PCR、荧光 RT-PCR 检测结果均为阳性的;或符合 14.1 的疑似病例样本经细胞培养产生典型 CPE 的细胞悬液,采用中和试验、IFAT、ELISA 中 1 项与 RT-PCR 或荧光 RT-PCR 中 1 项进行检测,2 项检测结果均为阳性的,或 RT-PCR 和荧光 RT-PCR 2 项进行检测结果均为阳性的,判定为确诊病例。

## 附 录 A

### (规范性附录)

#### 试剂配制

#### A.1 0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)

在 1 000 mL 双蒸水中按顺序加入以下试剂： $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.19 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.22 g,  $\text{NaCl}$  8.5 g, 调 pH 为 7.2~7.4 充分搅拌溶解后, 4 °C 保存。

#### A.2 固定液

30% 丙酮与 70% 乙醇(体积比)的混合物。

#### A.3 PBST (pH 7.4)

在 1 000 mL 双蒸水中按顺序加入以下试剂： $\text{NaCl}$  8.0 g,  $\text{KCl}$  0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9.9 g, 调 pH 为 7.4 后, 加入 Tween-20 充分搅拌摇匀后, 4 °C 保存。

#### A.4 包被稀释液(pH 9.6)

在 1 000 mL 双蒸水中按顺序加入以下试剂： $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g, 调 pH 为 9.6, 充分搅拌溶解后, 4 °C 保存。

#### A.5 底物 OPD 溶液 pH 5.0

先用 600 mL 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 300 mL 0.1 mol/L 柠檬酸混合成底物稀释液。然后取 100 mL 底物稀释液, 往其中溶入 80 mg 的邻苯二胺(OPD), 然后加入 80  $\mu\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 放 5 min 不变色即可使用(临使用前配制)。

#### A.6 CTAB 溶液

CTAB 溶液: 按 CTAB 2%,  $\text{NaCl}$  1.4 mol/L, EDTA 20 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L pH 7.5 配制。用前加巯基乙醇至终浓度为 0.25% (配制时在 60 mL 水中顺序加入: 8.19 g  $\text{NaCl}$ , 0.774 g EDTA, 1.21 g Tris, 约 0.25 mL~0.3 mL 浓盐酸, 使 pH=7.5~8.0, 再加入 2 g CTAB, 溶完后最后加水到 100 mL)。

#### A.7 抽提液 II

1 mol/L Tris 水溶液饱和的酚: 三氯甲烷: 异戊醇 = 25: 24: 1 混合, 密闭避光保存。

#### A.8 抽提液 I

将三氯甲烷：异戊醇按 24：1 的比例混合，密闭避光保存。

#### A.9 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

在 1 000 mL 双蒸水中按顺序加入以下试剂：Tris 54 g，硼酸 27.5 g，EDTA 2.922 g，用 5 mol/L 的 HCl 调 pH 为 8.0 保存备用。

#### A.10 EB(Ethidium Bromide, 核酸染色剂)

用水配制成 5 mg/mL 的浓缩液。用时每 10 mL 电泳液或琼脂中加 1  $\mu$ L。

#### A.11 电泳样品缓冲液

每 100 mL 水溶液中含：溴酚蓝 0.25 g，蔗糖 40 g。



附 录 B  
(资料性附录)  
扩增 VHS 病毒 N 基因的序列

```

1  atggaaggag gaattcgtgc agcgttttca gccctgaatg atgttaggat tgaccccacc
61  ggtggagagg gacgggtact tgtacctggt gaagtggagc tcgtcgtgta tgcgggtgga
121 tttggtgagg aagataggaa ggtgattgtg gatgcactct ccgcactcgg gggaccccag
181 actgtacagg cgttgtcogt gottototcc tatgtactcc aagggaatac acaggaggac
241 ctagaaacaa agtgcaaggc cctcacagac atgggcttca aggtgacaca ggcagccagg
301 gccacgagca tcgaggcagg aatcatgatg cccatgagag aactggccct gactgtcaat
361 gacgacaacc tcatggaaat cgttaagggg accttgatga catgctccct tctgaccaag
421 tactcggtag acaagatgat caagtacatc accaagaaac tcggggagct ggcagacacc
481 cagggagttg gggaactgca gcacttcacc gctgacaagg cagccatcag gaaactcgca
541 ggatgtgtgc gtcccgga ca gaagatcacc aaggccctct atgcattcat cctgactgag
601 atcgagagcc ccaccaccca gtcgagggcc cgagccatgg gggcgttgag gctcaacggg
661 acaggaatga ccatgattgg gttgttcacc caggccgcca acaacttggg cattgccccg
721 gcaaagctgc tggaggacct ctgcatggag tccctgggtg agtcagccag acggatcatc
781 cagttgatga gacaggtgtc agaggcgaag tccatccaag agcgctacgc catcatgatg
841 agtcggatgc tgggagagtc ctactacaag tcgtatggac tcaatgacaa ctccaagatc
901 tctacatto tgtcacagat cagcgggaag tacgcagtgg actccctgga aggcctggag
961 gggatcaagg tgacagagaa gttccgcgag ttcgctgagc ttgttgcgga agtcctggtg
1021 gacaagtacg agaggattgg agaggacagc acggaggtct cagatgtcat cagggaggcg
1081 gccagacagc acgcgcgcag gacatccgcc aagccagagc caagggcccg caacttcagg
1141 agcttcaccg gaagggggaa ggagcaggag aagggggggg ccgatgatga cgactacccc
1201 gaggactctg actaa

```

注 1: 字体标灰色的是 RT-PCR 引物序列。

注 2: 字体标横线的是荧光 RT-PCR 引物序列。

注 3: 字体标方框的是荧光 RT-PCR 探针序列。



## 附录 C

(资料性附录)

## 病毒性出血性败血症(VHS)

## C.1 疾病描述

病毒性出血性败血症(VHS)是一种由弹状病毒(VHSV)引起的死亡率极高的疾病。该病最早流行于欧洲大陆,对欧洲的鲑鱼养殖造成了巨大的损失。研究表明,在沿太平洋和大西洋的北美海岸、英国周边海域、波罗的海、斯卡格拉克海峡、卡特加特海峡以及日本的周边海域的众多养殖与野生鱼类物种中都有 VHSV 的存在。该病曾被世界动物卫生组织(OIE)、亚太水产养殖中心(NACA)列为必须申报的疫病,我国农业部公布的“一、二、三类动物疫病病种名录”将其列为二类动物疫病。

## C.2 宿主

该病最早主要对养殖虹鳟鱼,养殖大菱鲆,养殖牙鲆,以及几种野生海洋鱼类感染。随着研究的深入 VHSV 易感宿主种类的数量正在不断增加。

## C.3 流行水温

疾病通常发生于温度在 4℃~14℃之间。温度高于 15℃抑制病毒生长。低温通常会导致疾病大范围的爆发。病毒在 4℃淡水中能够存活 28 d~35 d,研究发现在 4℃已过滤的淡水中 1 年内还有感染性。如果水中添加卵巢液或血液制品,如牛血清等有机物质,病毒能存活更长的时间。在 15℃的天然淡水中,13 d 后 99.9% 的病毒失活时间为 13 d。但在海水中病毒 4 d 内灭活。其他研究发现,在 15℃海水,10 h 后病毒的传染性减少 50%,但 40 h 后仍可以恢复。在商用冷冻温度下冰冻的受感染鱼解冻后不会完全杀灭病毒,但会降低病毒的感染性或病毒滴度效价 90% 以上。

## C.4 临床症状

该病在急性感染期表现出明显的临床症状:发病迅速,死亡率高(鱼苗可达 100%)。病鱼嗜睡,皮肤变黑,眼球突出,贫血(鳃苍白),鳍条基部、鳃、眼睛、皮肤出血,游泳异常(快速窜动、螺旋转动等),腹腔水肿引起腹部膨胀。肾脏及肝脏有明显的影响。在急性期肾脏成暗红色,肝脏是苍白有斑的,在皮肤,肌肉和内脏中有出血症状。消化道内没有食物。急性感染期之后,疾病出现亚临床(临床症状不明显)的慢性症状,此时鱼类不出现明显的外部症状。由于病毒感染脑部,VHS 会出现神经性症状,出现异常剧烈的游泳行为,例如不断快速窜动和/或螺旋转动等。致命的病毒最初存在于尿液,而肾,脾,脑及心脏,是病毒最丰富的场所。所有年龄的鱼都易受感染,但幼鱼比成鱼更容易受感染。

## C.5 组织病理学

组织病理学结果显示 VHSV 阳性内皮细胞主要存在于血管系统。肾、肝、脾会出现大量的点状坏死和变性,细胞浆出现空泡、核固缩、核溶解,淋巴细胞浸润。红血球会在骨骼肌肌束和纤维处聚集。

## C.6 病原学

C.6.1 该病毒属于弹状病毒科,鱼类弹状病毒属。病毒粒子呈弹状,直径约 70 nm,长约 180 nm,具包膜。内包含一个约 11 000 个核苷酸的单链负股 RNA,基因编码 6 个蛋白质(N-核蛋白,P-磷蛋白,M-基质蛋白,G-糖蛋白,NV-非病毒粒子蛋白,L-和病毒有关的聚合酶蛋白)。

C.6.2 VHSV 包含三个血清亚型:1 亚型(包括丹麦的 F1 和 heddam)、2 亚型(包括 23/75,DK-5131 和 DK-5276)、3 亚型(包括 DK-5151 和 DK-5422)。

C.6.3 VHSV 目前发现有四个不同的基因型:

基因 I 型:几个亚谱系包括欧洲淡水分离株,黑海地区分离株,和一组来自波罗的海、卡特加特海峡、斯卡格拉克海峡、北海和英吉利海峡的海洋分离株。

基因 II 型:波罗的海海洋分离株。

基因 III 型:北大西洋海(从法兰德斯到挪威海岸)、北海、斯卡格拉克海峡和卡特加特海峡分离株。

基因 IV 型:北美和日本/韩国分离株(2 个亚谱系 IV a 和 IV b)。

C.6.4 该病的主要传播途径是接触其他被感染的鱼类或受污染的水、污染物等导致的横向传播,也可以通过食鱼鸟类进行传播。在疾病爆发期间以及刚结束爆发期病毒可以很容易通过细胞培养分离出来。肾脏和脾脏组织中的病毒滴度最高。对于带毒(临床健康)鱼,VHSV 的检测较难。BF-2 细胞对淡水欧洲株高度敏感。但是由于不同病毒株对不同细胞敏感性的差异,在分离病毒时建议采用包括 BF-2 在内的二种不同细胞,以提高检出率。

---