



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1474—2014
代替 SN/T 1474—2004

传染性造血器官坏死病检疫技术规范

Quarantine protocol for infectious haematopoietic necrosis

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1474—2004《传染性造血器官坏死病毒逆转录聚合酶链式反应操作规程》。

本标准与 SN/T 1474—2004 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 修改了标准的名称;
- 增加了临床症状、病毒分离、中和试验、间接免疫荧光试验和酶联免疫吸附试验;
- 删除了原标准的套式逆转录聚合酶链式反应方法,替换为逆转录聚合酶链式反应方法。

本标准修改采用了世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疾病诊断手册》(2012 年版)第 2.3.4 章,主要修改如下:

- 原文中“Disease information”内容经修改简缩后作为本标准附录 A;
- 删除了原文第 5 节中检测方法的选择依据和第 6 节传染性造血器官坏死病无疫区的相关内容。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、河南省水产技术推广站。

本标准主要起草人:贾鹏、何俊强、杨俊兴、杨雪冰、郑晓聪、于力、王津津、刘荭、花群义、史秀杰、兰文升、陈兵、王红英。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1474—2004。

传染性造血器官坏死病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了传染性造血器官坏死病临床症状、病毒分离、逆转录聚合酶链式反应、酶联免疫吸附试验、中和试验、间接免疫荧光试验的检测方法。

本标准适用于传染性造血器官坏死病的诊断、监测和检测。

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实验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 概述

传染性造血器官坏死病(Infectious haematopoietic necrosis, IHN)是由传染性造血器官坏死病病毒(Infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)感染鲑、鳟鱼类后引起死亡的一种病毒性传染病,被世界动物卫生组织(OIE)列入水生动物疫病名录,我国将其列为二类动物疫病(参见附录 A)。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:细胞病变效应(cytopathic effect)

dNTPs:脱氧核糖核苷酸(deoxynucleotide triphosphates)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate);

EPC:鲤鱼上皮瘤细胞系(epithelioma papulosum cyprini)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA:酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay)

FHM:肥头鲤细胞系(fathead minnow)

FBS:胎牛血清(fetal bovine serum)

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]

HRP:辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

IHN:传染性造血器官坏死病(infectious haematopoietic necrosis)

IHNV:传染性造血器官坏死病毒(infectious haematopoietic necrosis virus)

IPNV:传染性胰脏坏死病毒(infectious pancreas necrosis virus)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

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

5 仪器和设备

- 5.1 组织研磨器或无菌研钵。
- 5.2 恒温培养箱。
- 5.3 倒置荧光显微镜。
- 5.4 PCR 扩增仪。
- 5.5 水平电泳仪。
- 5.6 凝胶成像仪。
- 5.7 酶标仪。
- 5.8 普通冰箱和-80℃超低温冰箱。
- 5.9 降温离心机。
- 5.10 微量移液器。
- 5.11 二级生物安全柜。
- 5.12 剪刀、镊子、离心管、PCR 管和细胞培养器皿等耗材。

6 试剂和材料

- 6.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 6.2 IHNV 参考株:由指定单位提供。
- 6.3 细胞系:FHM、EPC。
- 6.4 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,-20℃预冷。
- 6.5 Taq DNA 酶:-20℃保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。
- 6.6 dNTPs:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 2.5 mmol/L。
- 6.7 RNA 酶抑制剂:-20℃保存,避免温度剧烈变化。
- 6.8 逆转录酶:-20℃保存,避免温度剧烈变化。
- 6.9 RT-PCR 用引物,浓度为 20 mmol/L,序列如下:
F1:5'-AGA GAT CCC TAC ACC AGA GAC-3'
R1:5'-GGT GGT GTT GTT TCC GTG CAA-3'
扩增 IHNV 糖蛋白基因中大小为 693 bp 的片段。
- 6.10 抗体:抗 IPNV 血清、抗 IHNV 血清和单克隆抗体。
- 6.11 异硫氰酸荧光素(FITC):-20℃避光保存。
- 6.12 Triton X-100 和 Tween-20。
- 6.13 HRP 标记的抗鼠或抗兔抗体。

7 临床症状

病鱼初期表现为游动迟缓、昏睡,有时表现为狂游、转圈游动等。病鱼体色发黑、腮丝苍白、眼球突出、腹部膨胀、鳍基充血,不透明的粘液状管型粪便悬挂于肛门。剖解可见病鱼肝脏、脾脏和肾脏等器官苍白贫血,胃内空虚,肠道等器官有出血点。存活下来的鱼常出现脊柱畸形。

8 采样和制样

8.1 样品和靶器官的采集

样品包括活的、发病的、濒死的鱼和鱼卵,采样数量按照 GB/T 18088 规定执行。体长小于 4 cm 的鱼苗取整条鱼;4 cm~6 cm 的鱼苗取肾脏在内的所有内脏;体长大于 6 cm 的鱼取脑、脾和肾,成熟雌鱼还需取其卵巢液;鱼卵仅取卵膜。由于肝脏和胃肠中的酶易将 IHNV 降解,尽量避免采集。实验室检测条件应符合 CB 19489 的规定。

8.2 小样的制备及处理

最多以 10 条鱼为一个小样,每个小样至少取 0.5 g 组织。对组织称量后,用无菌手术剪刀将其剪碎并研磨成糊状,用细胞培养液 1(见 B.1)按照 10 mL/g 比例将研磨后的组织重悬(将此组织液称为 1:10 稀释度)。卵巢液不必匀浆,用细胞培养液 1 将其稀释 2 倍。15 ℃ 孵育 4 h 或 4 ℃ 孵育过夜。4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清用于后续实验。

9 诊断方法

9.1 病毒分离

9.1.1 单层细胞的制备

用胰酶—EDTA 消化液(见 B.3)消化 EPC 或 FHM 细胞后,用细胞培养液 2(见 B.2)重悬细胞,加入细胞培养板,25 ℃ 培养,使细胞生长至单层。

9.1.2 中和 IPNV

用细胞培养液 2 将 1:10 稀释度组织上清液连续稀释至 1:100 和 1:1 000。将 1:10、1:100 和 1:1 000 组织稀释液分别与适当浓度的抗 IPNV 血清等量混合,15 ℃ 孵育 1 h。抗 IPNV 血清中和效价不低于 2 000。若样品来自于 IPNV 无疫区或确定未感染 IPNV,此步骤可以省略。

9.1.3 接种细胞

将以上 3 个不同稀释度的组织上清液分别接种至新鲜的 EPC 或 FHM 单层细胞,每个稀释度至少 3 孔,每孔中组织上清液与细胞维持液的比例为 1:10。同时,设立阳性对照和空白对照,阳性对照孔中接种 IHNV 参考株,空白对照孔中接种相同体积细胞培养液 2。15 ℃ 培养,倒置显微镜下连续观察 7 d~10 d。

9.1.4 盲传

首次接种细胞 7 d~10 d 后未出现 CPE,需进一步盲传。将细胞培养物反复冻融 3 次,收集至无菌离心管。4 ℃、7 000 r/min 离心 15 min 或用直径 0.45 μm 滤器滤除细胞碎片,取上清液。用细胞培养液 2 将上清液稀释至 1:10 和 1:100,将上清液、1:10 和 1:100 稀释液接种于新鲜的 EPC 或 FHM 单层细胞,至少 3 孔,组织上清液接种量与孔内细胞培养液比例为 1:10。同时,设立阳性对照和空白对照。15 ℃ 培养,倒置显微镜下连续观察 7 d~10 d。

9.1.5 结果判定

9.1.5.1 IHNN 感染 EPC 或 FHM 细胞后,可出现典型 CPE,表现为局部细胞变圆、皱缩和裂解,以此

为中心周围细胞的病变范围扩大,形成明显空斑,最终细胞呈拉网状直至全部悬浮脱落。

9.1.5.2 若样品首次接种细胞或盲传后细胞出现典型 CPE,则判定为阳性。若样品盲传后细胞仍未观察到 CPE,则判定为阴性。

9.1.5.3 若阳性对照或阴性对照不成立,换用敏感细胞,需重新实验。

9.2 逆转录聚合酶链式反应(RT-PGR)

9.2.1 对照设立

从核酸抽提起,每步实验均需要设立阳性对照、阴性对照和空白对照。用 IHNV 的病毒悬液作为阳性对照,用正常细胞悬液作为阴性对照,以 DEPC 水代替样品作为空白对照。

9.2.2 核酸抽提

取细胞培养物 250 μL 至无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管,加入 600 μL Trizol 溶液,剧烈振荡混匀后,室温放置 5 min。加 200 μL 三氯甲烷,盖紧盖子,剧烈摇动 15 s,室温放置 3 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。吸取上清液至新的无 RNA 酶离心管,加入 500 μL 预冷的异丙醇,上下翻转混匀,室温放置 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。缓慢弃上清液,将离心管倒置于吸水纸上,将液体去除。加入 1 000 μL 预冷的 75%乙醇缓慢倒转洗涤沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,将离心管倒置于吸水纸上,室温干燥沉淀 5 min~10 min。加入 20 μL DEPC 水,4 000 r/min 离心 5 s,室温溶解 10 min。-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

在实验过程中,可采用同等效果的商业化 RNA 抽提试剂盒代替以上方法。

9.2.3 反应体系

10 \times PCR buffer(见 B.4)5 μL ,25 mmol/L MgCl_2 5 μL ,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 引物 F1 和 R1 各 2.5 μL ,5 U/ μL DNA 聚合酶 0.5 μL ,5 U/ μL 逆转录酶 1 μL ,40 U/ μL RNA 酶抑制剂 1 μL ,总 RNA 5 μL ,加 DEPC 水至总体积 50 μL 。每个反应体系设置两个平行。

9.2.4 反应条件

50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

9.2.5 琼脂糖电泳

用 TBE 电泳缓冲液(见 B.5)配制浓度为 1.5%的琼脂糖(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭,见 B.6)凝胶板。将其放入水平电泳槽,使电泳缓冲液没过胶面。将 5 μL PCR 产物与 1 μL 6 \times 上样缓冲液(见 B.7)混匀后加入样品孔,5 V/cm 电泳约 40 min,当溴酚蓝到达凝胶板 3/4 处时停止,置于凝胶成像仪观察结果。电泳时,设立 DNA 标准分子量对照。

9.2.6 测序

对 RT-PCR 扩增产物进行基因测序,并将测序结果与参考序列(参见附录 C)进行比对。

9.2.7 结果判定

9.2.7.1 阳性对照可扩增出一条大小为 693 bp 的特异性条带,阴性对照和空白对照无大小为 693 bp 的条带。若阳性对照、阴性对照或空白对照不成立,则需要重新实验。

9.2.7.2 若被检样品扩增出大小为 693 bp 的特异性条带,且基因测序结果正确,则判定为阳性。若被

检样品未扩增出大小为 693 bp 的条带,则判定为阴性。

9.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

9.3.1 对照设立

取已知含有 IHNV 参考株的病毒悬液作为阳性对照,未感染病毒的细胞悬液作为阴性对照。

9.3.2 实验步骤

9.3.2.1 用 PBS(见 B.8)将抗 IHNV 血清或单克隆抗体稀释至适当工作浓度,加至酶标板,每孔 200 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

9.3.2.2 弃包被液,用 PBST(见 B.9)漂洗 4 次。

9.3.2.3 每孔加 200 μL 5%脱脂乳封闭液(见 B.10),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

9.3.2.4 弃封闭液,PBST 漂洗 4 次。

9.3.2.5 向被检病毒悬液中加入 Triton X-100,加入量为总体的 2%,充分混匀。

9.3.2.6 用 PBST 分别将被检病毒悬液、阳性对照、阴性对照做 2 倍系列稀释,并加入酶标板,每孔 100 μL ,20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

9.3.2.7 弃病毒悬液,PBST 漂洗 4 次。

9.3.2.8 加 100 μL 抗 IHNV 血清或抗 IHNV 单克隆抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。该步骤使用的抗体所针对的 IHNV 抗原表位应不同于包被用抗体。

9.3.2.9 PBST 漂洗 4 次。将 HRP 标记的抗体稀释至工作浓度并加入酶标板,每孔 100 μL ,20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

9.3.2.10 用 PBST 漂洗 4 次。每孔加 100 μL 显色液,避光显色。

9.3.2.11 当阳性对照开始显色,而阴性对照未显色时,加 2 mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 200 μL 。

9.3.2.12 将酶标板置于酶标仪,450 nm 波长测定 OD 值(A_{450} 值)。

在实验过程中,可以采用同等效果的商业化 ELISA 试剂盒代替以上方法。

9.3.3 结果判定

阳性对照孔 A_{450} 值(P)与阴性对照孔的 A_{450} 值(N)之比不小于 5.0(即 $P/N \geq 5.0$),表明对照成立。当被检样品孔 A_{450} 值(T)与阴性对照孔的 A_{450} 值(N)之比大于或等于 5.0(即 $T/N \geq 5.0$)判定为阳性,否则判定为阴性。

9.4 中和试验

9.4.1 对照设立

9.4.1.1 阳性对照组:用细胞培养液 2 将 IHNV 参考株病毒悬液稀释至 200 TCID₅₀,分别与抗 IHNV 血清和细胞培养液 2 等体积混合。

9.4.1.2 阴性对照组:将其他鱼类病毒悬液作为阴性对照,分别与抗 IHNV 血清和细胞培养液 2 等体积混合。

9.4.1.3 血清毒性对照组:取工作浓度的抗 IHNV 血清与细胞培养液 2 等体积混合。

9.4.1.4 空白对照组:等体积细胞培养液 2。

9.4.2 实验步骤

9.4.2.1 当 9.1 中被检样品接种细胞出现明显 CPE 后,将其反复冻融 3 次,收集细胞培养物,4 $^{\circ}\text{C}$ 、

2 000 r/min离心 15 min 或用直径为 0.45 μm 的滤器过滤除去细胞碎片。

9.4.2.2 将被检样品的细胞培养物连续倍比稀释至 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 。

9.4.2.3 将稀释后的被检样品细胞培养物分别与抗 IHNV 血清和细胞培养液 2 等体积混合。15 $^{\circ}\text{C}$ 感作 60 min。

9.4.2.4 将被检样品组接种至 24 孔细胞培养板,每个稀释度 2 孔,每孔 50 μL 。将对照组接种于 24 孔细胞培养板,阳性对照组 2 孔、阴性对照组 2 孔、血清毒性对照组 2 孔、空白对照组 2 孔。

9.4.2.5 15 $^{\circ}\text{C}$ 培养,显微镜下连续观察 2 d~5 d。

9.4.3 结果判定

9.4.3.1 阳性对照组,细胞产生 CPE 明显延迟或不出现 CPE;阴性对照组细胞产生 CPE,抗体毒性对照组和空白对照组细胞生长正常。若阳性对照组不成立,或抗体毒性对照组和空白对照组细胞生长异常,需重新实验。

9.4.3.2 接种被检样品细胞孔细胞产生 CPE 明显延迟或不出现 CPE 则判定为阳性,否则判定为阴性。

9.5 间接免疫荧光试验

9.5.1 制样

9.5.1.1 细胞培养物:用细胞培养液 2 制备 6 孔细胞培养板或飞片。当单层细胞密度生长至 80%孔底面积(生长时间不超过 24 h),将病毒悬液(由 9.1 出现 CPE 的细胞培养物制备)接种于单层细胞或飞片,每孔病毒悬液接种量与细胞培养液的比例为 1:10。15 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。弃细胞培养液 2,用 PBS 轻轻漂洗细胞 1 次。

9.5.1.2 组织涂片:将鱼体内血液排干,取其肾脏并剪碎,置于载玻片上或细胞培养板孔内,制备成涂片。室温放置 20 min,自然风干。

9.5.2 对照设立

9.5.2.1 阳性对照:将含有 IHNV 参考株的病毒悬液稀释至 5 000 PFU/mL~10 000 PFU/mL,接种单层细胞,病毒悬液接种量与细胞培养液 2 的比例为 1:10。

9.5.2.2 阴性对照:等体积细胞培养液 2。

9.5.3 操作方法

9.5.3.1 用预冷的固定液(见 B.11)轻轻漂洗细胞 3 次。加 500 μL 固定液,室温固定 15 min。

9.5.3.2 缓慢弃固定液,室温风干 30 min。如不立即使用可置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 存放待用。

9.5.3.3 用 PBST 将 IHNV 单克隆抗体稀释至适当工作浓度。

9.5.3.4 用 PBST 缓慢漂洗 4 次,每孔 300 μL 。

9.5.3.5 彻底弃除 PBST,加 IHNV 单克隆抗体,每 2 cm^2 细胞加 250 μL 。置于湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

9.5.3.6 用 PBST 缓慢漂洗 4 次,每孔 300 μL 。

9.5.3.7 彻底弃除 PBST,加入适当工作浓度 FITC 标记的荧光抗体,置于湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

9.5.3.8 用 PBST 缓慢漂洗 4 次,每孔 300 μL 。

9.5.3.9 直接将细胞培养板置于荧光显微镜下,或用 pH8.5 甘油封片后置于在荧光显微镜下观察结果。

9.5.4 结果判定

9.5.4.1 阳性对照组可见清晰的绿色荧光。阴性对照组没有任何荧光或仅有微弱绿色背景荧光。若阳

性对照组未见清晰的绿色荧光,或阴性对照组出现异常绿色荧光,则对照不成立,需重新实验。

9.5.4.2 若被检样品组可见清晰的绿色荧光,则判定为阳性;若被检样品组没有任何荧光或仅有微弱绿色背景荧光,则判定为阴性。

10 综合判定

10.1 满足以下任何一条均可判定为 IHN 可疑:

- a) 样品为 IHNV 易感鱼类且具有典型临床症状。
- b) 样品为 IHNV 易感鱼类且具有典型、明显的组织病理变化。
- c) 病毒分离方法可见明显细胞病变。
- d) RT-PCR、ELISA、间接免疫荧光试验和中和试验中,任一种方法检测结果为阳性。

10.2 在 9.1 的基础上,满足以下任何一条均可判定为 IHN 阳性:

- a) 病毒分离出现典型、明显细胞病变,且用 RT-PCR、ELISA、中和试验和间接免疫荧光试验中的任一种方法检测细胞培养物为阳性。
- b) 用 RT-PCR、ELISA、间接免疫荧光试验和中和试验中的一种方法检测为阳性。

附 录 A
(资料性附录)
传染性造血器官坏死病

传染性造血器官坏死病(Infectious haematopoietic necrosis, IHN)是一种由传染性造血器官坏死病毒(Infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)引起鲑、鳟鱼类发病,以出血、腹部膨胀等临床症状为特征的一种病毒性传染病。该病传染性强,致死率高,一旦爆发将对鲑、鳟鱼类养殖业造成巨大经济损失,死亡率达90%~95%。因此,世界动物卫生组织(OIE)将其列入《水生动物疾病诊断手册》(2012版),我国农业部将之列为《中华人民共和国进境动物一、二类传染病、寄生虫病名录》(2008)二类动物疫病。

IHNV作为IHN的病原,是一种基因组大小为11 131 bp、不分截段、单股负义RNA病毒,属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)粒外弹状病毒属(Novirhabdovirus)。基因组主要编码六个结构蛋白,核蛋白(Nucleocapsid protein, N)、磷蛋白(Phosphoprotein, P)、基质蛋白(Matrix protein, M)、糖蛋白(Glycoprotein, G)、非结构蛋白(Non-virion protein, NV)和RNA依赖的RNA聚合酶(Polymerase protein, L)。其中,编码糖蛋白的基因与病毒抗原表位、病毒受体等有关,也是IHNV遗传进化分析常用的目标基因序列。以糖蛋白基因序列中303 bp片段为基础,进行遗传进化分析,可将IHNV分为U、M、L和JRt基因型。IHNV基因型和地域分布有密切关系。M基因型主要分布于欧洲国家,L和U基因型主要分布于美洲和亚洲地区,JRt基因型主要分布于日本、韩国等亚洲地区。值得注意的是,日本地区IHNV分离株包括两种基因型,基因型与时间关系密切。20世纪70年代前分离的IHNV毒株属于U基因型;20世纪70年代后分离的IHNV毒株为JRt基因型。我国IHNV分离株主要属于JRt基因型。

IHN的流行病学。带毒的、发病的鱼及其鱼卵是该病的主要传染源,垂直传播是其主要传播途径,鲑鱼及少数其他种类鱼均是其易感动物。1950年,首次在美国华盛顿红大麻哈鱼卵孵化中心发现该病,随后陆续从加利福尼亚州大鳞大麻哈鱼的孵化场等多地发现该病,但仅局限于北美洲地区,被认为是一种只感染鲑鱼的地方流行性疾病。然而,IHN的传播远超出人们的预料。该病随着隐形感染的鲑鱼及鱼卵迅速传播至世界多个地区。1977年~1987年,法国、德国、意大利、西班牙、克罗地亚、俄罗斯等欧洲国家以及日本、韩国和中国台湾地区陆续出现IHN相关报道。1987年,首次在我国东北地区发现疑似IHN。1990年,在辽宁省本溪市某虹鳟养殖场报道了我国第一例IHN,该地区于1983年先后从日本、美国和俄罗斯引进高白鲑、虹鳟和大麻哈鱼。IHNV对水温敏感,当水温低于14℃时极易爆发。无论海水养殖还是淡水养殖的鲑鱼对IHNV均易感,包括虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大鳞大马哈鱼(*O. tshawytscha*)、红大马哈鱼(*O. nerka*)、狗鱼(*O. gorbuscha*)、银大马哈鱼(*O. kisutch*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、七彩鲑(*S. trutta*)、湖红点鲑(*Salvelinus namaycush*)、日本淡水鲑(*Plecoglossus altivelis*)。一些非鲑科鱼类对IHNV也易感,包括鲱鱼(*Clupea pallasii*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)、美洲白鳟(*Acipenser transmontanus*)、白斑狗鱼(*Esox lucius*)、海鲈鱼(*Cymatogaster aggregata*),幼鱼对IHNV的敏感性高于成鱼。

诊断和检测过程中,濒死的、发病的和活的鲑、鳟鱼及其鱼卵均可作为检测对象。若同一池塘养殖包括虹鳟在内的多种鱼类,仅采集虹鳟即可;当没有虹鳟,则每个品种的鱼均需采集。目前,病毒分离、分子生物学方法和免疫学方法已经应用于IHNV检测。病毒分离结合RT-PCR方法被称之为检测IHN的“黄金标准”。相比之下,由于不同实验室使用抗体等试剂的差异较大,免疫学方法得出的结果也有一定差异。因此,对免疫学方法的检测结果需做严格的复验。

附 录 B
(规范性附录)
试剂及配制

B.1 细胞培养液 1

含有 1 000 IU/mL 青霉素、800 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 10% FBS 的 M199 细胞培养液。按说明书配制 M199 细胞培养液,加入 10% FBS 以及相应浓度的抗生素,抽滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.2 细胞培养液 2

含有 100 IU/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 10% FBS 的 Eagle's MEM 或 M199 细胞培养液。按说明书配制 MEM 或 M199 细胞培养液,加 10% FBS 以及相应浓度的抗生素,抽滤除菌,开放系统使用时,加入过滤除菌的 HEPES,使其在培养液中的终浓度为 0.02 mol/L,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.3 胰蛋白酶-EDTA 消化液

NaCl	0.8 g
KCl	0.02 g
KH_2PO_4	0.02 g
K_2HPO_4	0.115 g
EDTA	0.02 g
胰酶	0.1 g
双蒸水	100 mL
1 mol/L 盐酸调 pH 至 7.7,过滤除菌后分装备用。	

B.4 Taq 酶用 10 倍浓缩缓冲液(10 \times buffer)

Tris-HCl	500 mmol/L pH 8.8
KCl	500 mmol/L
TritonX-100	1%

B.5 TBE 电泳缓冲液(5 \times TBE)

Tris	54 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
加双蒸水至	1 000 mL
5 mol/L HCl 调 pH 至 8。	

B.6 溴化乙锭(Ethidium Bromide,EB)

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

B.7 6 \times 上样缓冲液

溴酚蓝 100 mg,加双蒸水 5 mL,在室温下过夜,待溶解后再称取蔗糖 25 g,加双蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中,摇匀后定容至 50 mL,加入 NaOH 溶液 1 滴,调至蓝色。

B.8 0.01 mol/L PBS

NaCl	8.5 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.83 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

将上述成分依次溶解,去离子水定容至终体积为 1 000 mL,调 pH 至 7.2,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min,室温保存。

B.9 PBST

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
双蒸水	1 000 mL
Tween-20	0.5 mL

摇匀后,4 $^{\circ}$ C 保存。

B.10 封闭液

脱脂乳	5 g
PBST	100 mL

摇匀后,4 $^{\circ}$ C 保存。

B.11 固定液

丙酮	3 mL
乙醇	7 mL

充分混匀后,室温放置,备用。

附 录 C
(资料性附录)
参考基因序列

本标准规定的 RT-PCR 方法扩增大小为 693 bp 基因片段。该片段位于全基因组 3 515 bp~4 207 bp, 属于编码糖蛋白(Glycoprotein,G)基因的部分序列。参考基因序列以 IHNV 220-90 分离株(GeneBank accession No.GQ413939)全基因组为模板,序列如下:

1	<u>agagatccct</u>	<u>acaccagaga</u>	<u>ctttctggac</u>	tcggattttg	tcggaggaaa	atgcactaaa
61	tcaccctgcc	agacgcattg	gtccaacgta	gtttggatag	gtgatgcagg	gataccagcc
121	tgtgattcca	gccaagagat	aaaaggtcac	ctctttgttg	ataaaatctc	caatcgagtc
181	gtgaaggcaa	cgagctacgg	acaccacccc	tggggactgc	atcgggcctg	tatgattgaa
241	ttctgtaagg	ggcagtggat	acggacagat	ctcggtgacc	tgatatctgt	cgtatacaat
301	tctggatcag	taaccctctc	gttcccgaag	tgtgaggaca	agacggtggg	gatgagggga
361	aacttgatg	actttgccta	tctagacgaa	ctggtgaagg	cctctgagag	cagagaggaa
421	tgtcttgagg	cgcacgccga	gataatatca	acaaacagtg	tgactccata	cctcctatcc
481	aagttccgat	ctccgcatcc	cggaataaat	gacgtctacg	ctatgcacaa	aggctccatt
541	tatcacggga	tgtgcatgac	ggtcgttgtg	gacgaggtat	ccaaggacag	gacgacgtac
601	agggcccatc	acgctaccaa	cttcacgaaa	tgggaacgac	cctttgggga	tgagtgggag
661	ggctttcacg	<u>gattgcacgg</u>	<u>aaacaacacc</u>	<u>acc</u>		

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
传染性造血器官坏死病检疫技术规范
SN/T 1474—2014

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

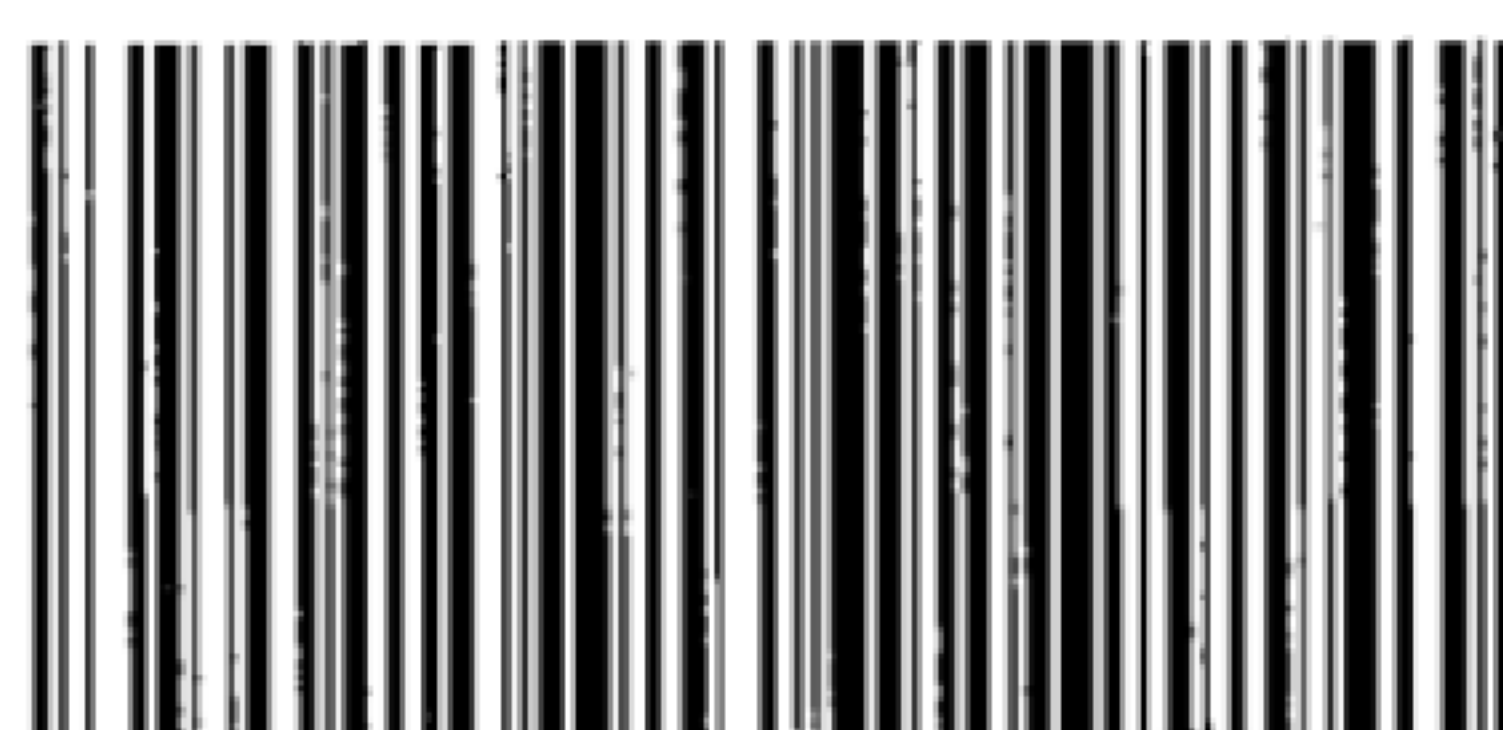
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2015 年 12 月第一版 2015 年 12 月第一次印刷
印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-29353 定价 18.00 元



SN/T 1474-2014