

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2120—2008

流行性溃疡综合症检疫技术规范

Protocol of quarantine for epizootic ulcerative syndrome

2008-09-04 发布

2009-03-16 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

本标准修改采用国际兽疫局(OIE)《水生动物疾病诊断手册》2006 版中第 2.1.10 章,对 PCR 中样品处理以及试验条件进行了调整和优化。

本标准的附录 B 是规范性附录,附录 A 是资料性附录。

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、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:史秀杰、邱杨、何俊强、刘荭、高隆英、杨锦舜、江育林。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

流行性溃疡综合症检疫技术规范

1 范围

本标准规定了各种淡水与半咸水鱼流行性溃疡综合症的诊断方法。

本标准适用于各种淡水与半咸水鱼流行性溃疡综合症的检疫。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 概述

流行性溃疡综合症(Epizootic Ulcerative Syndrome)是由丝囊霉菌(*Aphanomyces invadans* 或者 *A. piscicida*)引起的野生及养殖的淡水与半咸水鱼类的季节性流行病,也叫做红点病(RSD)、霉菌性肉芽肿(MG)、霉菌性溃疡(UM),主要特征是在体表出现溃疡,骨骼肌中形成典型的霉菌性肉芽肿,简称EUS(参见附录A)。

4 试剂和材料

4.1 水:用于PCR(包括核酸抽提)的水要用DEPC处理,以除去DNA酶和RNA酶,其余用水应符合GB/T 6682一级水的规格。

4.2 *Taq* 酶:—20℃保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.3 dNTPs:含dCTP、dGTP、dATP、dTTP各10 mmol/L。

4.4 引物:一对引物,浓度为40 μmol/L。

序列为:

FP1:5'-AAG-GCT-TGT-GCT-GAG-CTC-ACA-CTC-3'

FP2:5'-GAT-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'

扩增丝囊霉菌ITS1 rDNA基因中的98 bp的DNA片断。

扩增产物的参考序列:

1 aaggcttggtg ctgagctcac actcggctag ccgaagggtt cgcaagaaac

51 cgatgtactt ttaatccctt taaactacat actgaaacct tagccatc

4.5 无水乙醇:分析纯,使用前预冷到—20℃。

4.6 10%福尔马林。

4.7 酒精:70%、80%、95%及无水酒精。

4.8 二甲苯。

4.9 中性树脂。

4.10 石蜡。

4.11 Harris氏苏木精染液。

4.12 0.5%伊红酒精溶液。

4.13 1%盐酸酒精溶液。

5 器材和设备

- 5.1 手术刀和镊子。
- 5.2 载玻片和盖玻片。
- 5.3 培养皿。
- 5.4 恒温培养箱。
- 5.5 普通冰箱和低温冰箱。
- 5.6 倒置显微镜。
- 5.7 研钵。
- 5.8 离心机和离心管。
- 5.9 微量移液器及吸头。
- 5.10 PCR 扩增仪。
- 5.11 电泳仪。
- 5.12 紫外观察灯或凝胶成像仪。
- 5.13 标本缸。
- 5.14 包埋机。
- 5.15 切片机。

6 流行性溃疡综合症的诊断

6.1 诊断原则

EUS 的诊断基于出现临床症状后,并通过组织病理检查观察到特征性的霉菌性肉芽肿,或者从患病组织分离到丝囊霉菌(*Aphanomyces invadans* 或者 *A. piscicida*)。

6.2 组织病理检查

取有溃疡症状的活的或濒死的病鱼,用 10% 的福尔马林固定病鱼的皮肤和肌肉($<1\text{ cm}^3$),包括坏死部位的边缘和四周的组织。固定好的组织按照常规石蜡切片方法制作切片,用苏木精-伊红(H&E)或一般的霉菌染色(如用 Grocott's 染色)后封片,显微镜下观察。

6.3 丝囊霉菌 *Aphanomyces invadans* (或 *A. piscicida*) 的分离

取有溃疡症状的活的或濒死的病鱼,用无菌刀片从溃疡的边缘横切 2 片下来。用烧红的刀片消毒暴露的肌肉表面,用无菌小刀从溃疡下部切一圆形 $2\text{ mm}^3 \sim 4\text{ mm}^3$ 的小块,放到加有 100 IU/mL 青霉素和 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 噻唑酸的 GP 肉汤(见附录 B 第 B.1 章)平板中,工具不要碰到鱼的外表面。在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养接种物并在 12 h 内用倒置显微镜镜检。将出现的菌丝重复转移到加有 100 IU/mL 青霉素和 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素的新鲜的 GP 琼脂(见附录 B 第 B.2 章)平板中,直到培养物纯净为止。霉菌分离物可以于 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 下在 GP 琼脂平板中保存 7 d,或者于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下在 GY 琼脂(见附录 B 第 B.3 章)平板中保存 1 个月。

6.4 丝囊霉菌 *Aphanomyces invadans* (或 *A. piscicida*) 的鉴定

6.4.1 诱导次级游走孢子

取 6.3 中带有生长活力菌丝的一小团琼脂(直径约 $3\text{ mm} \sim 4\text{ mm}$),放到含有 GPY 肉汤(见附录 B 第 B.4 章)的平皿中,于 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 4 d。在 5 个含有灭菌池塘水的平皿中依次洗涤培养物,洗脱琼脂,再将培养物放到新的灭菌池塘水中 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。12 h 后如果能形成原代孢囊群落,在倒置显微镜下观察。

6.4.2 PCR 鉴定

6.4.2.1 样品处理

取 6.4.1 GPY 肉汤中分离到的霉菌菌丝,加入液氮后研磨成粉末,取 50 mg 转入 1.5 mL 的离心管中,用 CTAB-酚-三氯甲烷-异戊醇抽提法抽提 DNA。加 CTAB(见附录 B 第 B.6 章) $900\text{ }\mu\text{L}$,摇匀后,

25℃作用2.5 h。加600 μL 酚-三氯甲烷-异戊醇(见附录B第B.8章),充分混合30 s,12 000 r/min离心5 min,取上层水相(约800 μL)。加700 μL 三氯甲烷-异戊醇(见附录B第B.7章),用力混合30 s,12 000 r/min离心5 min,取上层水相(约600 μL)。加1.5倍体积-20℃预冷的无水乙醇,混匀后-20℃过夜以沉淀核酸(在不能及时进行PCR检测的情况下,可置于1.5倍体积无水乙醇中,长期保存);15 000 r/min离心30 min,小心弃上清液,立即用滤纸吸干(应尽量充分吸干),37℃干燥约30 min;加11 μL水溶解,吹打20下,-80℃冻融一次,做PCR模板。

6.4.2.2 PCR 扩增

PCR反应混合物总体积100 μL:含10 μL Taq酶用10倍浓缩缓冲液、10 μL 氯化镁(MgCl₂)、2 μL dNTP混合物、引物各2.5 μL、1 μL Taq酶和62 μL水,然后加入10 μL待测样品DNA作为模板。如果PCR仪没有热盖还需要加入50 μL矿物油。混匀后稍离心,再将反应管置于PCR扩增仪。先95℃变性3 min,然后95℃ 30 s→68℃ 30 s→72℃ 30 s;35次循环,再72℃ 5 min。

6.4.2.3 设立对照

在6.4.2.2中设立阳性对照、阴性对照、空白对照。取已知的丝囊霉菌 *Aphanomyces invadans*(或 *A. piscicida*)(由指定单位提供)和其他非丝囊霉菌属的霉菌,用6.4.2.1中的方法制备PCR模板,分别设立阳性对照和阴性对照;用10 μL水作为PCR模板,设立空白对照。

6.4.2.4 琼脂糖电泳

用TBE缓冲液(见附录B第B.9章)配制1.5%的琼脂糖(含0.5 μg/mL EB)板,约0.5 cm厚。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将6 μL PCR扩增产物和2 μL上样缓冲液(见附录B第B.11章),混匀后加入样品孔。30 mA电泳约0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。在电泳时设立DNA标准分子量Marker作对照。用紫外灯或凝胶成像仪观察核酸带。

6.5 结果判定

6.5.1 组织病理检查

组织切片染色后,观察到在骨骼肌中有丝囊霉菌 *Aphanomyces invadans*(或 *A. piscicida*)菌丝和典型的霉菌性肉芽肿(参见附录A的图A.1),可确诊是流行性溃疡综合症。

6.5.2 诱导次级游走孢子

经诱导的霉菌在倒置显微镜下观察,出现能游动的次级游走孢子(参见附录A的图A.2),可确认是丝囊霉菌 *Aphanomyces invadans*(或 *A. piscicida*)。

6.5.3 PCR 结果判定

PCR后阳性对照出现一条98 bp的DNA片段,阴性对照和空白对照没有该扩增带。待测样品PCR后在相应的98 bp的DNA位置上有带,取PCR扩增产物测序,同参考序列进行比较,符合的可判断结果为阳性,可确认是丝囊霉菌 *Aphanomyces invadans*(或 *A. piscicida*)。无扩增带或扩增带的大小不是98 bp的为阴性。

附 录 A
(资料性附录)
流行性溃疡综合症

流行性溃疡综合症(Epizootic Ulcerative Syndrome)是由丝囊霉菌(*Aphanomyces invadans* 或者 *A. piscicida*)引起的野生及养殖的淡水与半咸水鱼类的季节性流行病,也叫做红点病(RSD)、霉菌性肉芽肿(MG)、霉菌性溃疡(UM),主要特征是在体表出现溃疡,骨骼肌中形成典型的霉菌性肉芽肿,简称 EUS。

该病于 1971 首次报道在日本养殖的香鱼(*Plecoglossus altivelis*)中流行,随后又于 1972 年在澳大利亚东部的半咸水鱼灰鲷(*Mugil cephalus*)发现该病。疾病迅速扩散,从巴布亚新几内亚进入东南亚到南亚,现已进入西亚,到达巴基斯坦。在美国爆发的鲱鱼(*Brevoortia tyrannus*)溃疡病和亚洲的 EUS 非常相似。已经确诊有 50 多种鱼会受到 EUS 的侵害。但有些重要的养殖品种如罗非鱼、遮目鱼、鲤鱼等对这种病有抗性。引起 EUS 的霉菌已知是丝囊霉菌(*Aphanomyces invadans* 或者 *A. piscicida*);弹状病毒和寄生虫在疾病的爆发中也起到了一定的作用,革兰氏阴性菌会引起病鱼的继发感染而对病鱼造成进一步的损伤。EUS 大多在低水温时期或 18℃~22℃ 大降雨之后爆发。爆发时,各种野生和养殖的淡水鱼(包括在稻田、河口、湖泊和河流)有很高的死亡率。病鱼早期不吃食,鱼体发黑,病鱼漂浮在水面上,有时变得不停地游动,在体表、头、鳃盖和尾部可见红斑。在后期会出现较大的红色或灰色的浅部溃疡,并常伴有棕色的坏死,在躯干和背部有大块的损伤。除了乌鳢和鲮鱼外,大多数鱼在这个阶段就会死亡。对于特别敏感的鱼,损伤会逐步扩展加深,以至到达身体较深的部位,或者造成头盖骨软组织和硬组织的坏死,使活鱼的脑部暴露出来。丝囊霉菌经游走孢子在水体中水平传播。只有游走孢子可以感染有损伤的鱼的皮肤,并入侵组织长出菌丝。在自然水域中很难控制该病。若该病在小水体和封闭水体里爆发,通过石灰消毒用水、改善水质、清除病鱼等方法,可以有效地降低死亡率和控制该病。

鉴于 EUS 在水产养殖业中造成的巨大危害,OIE 将其列入鱼类疫病检疫名录中。

患病鱼肌肉中典型霉菌性肉芽肿和丝囊霉菌菌丝见图 A.1 和图 A.2。



图 A.1 患病鱼肌肉中典型霉菌性肉芽肿



图 A.2 丝囊霉菌菌丝

附 录 B
(规范性附录)
试 剂 配 制

B.1 GP(葡萄糖/蛋白胨)肉汤

葡萄糖	3.0 g
蛋白胨	1.0 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.128 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.014 g
氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.029 g
氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2.4 mg
氯化锰($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.8 mg
硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	3.9 mg
硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4 mg
高压灭菌过的池塘水	1 000.0 mL

B.2 GP(葡萄糖/蛋白胨)琼脂

GP 肉汤	1 000.0 mL
琼脂	12 g

B.3 GY(葡萄糖/酵母)琼脂

葡萄糖	10 g
酵母提取物	2.5 g
琼脂	15.0 g
高压灭菌过的池塘水	1 000.0 mL

B.4 GPY(葡萄糖/蛋白胨/酵母)肉汤

GP 肉汤	1 000.0 mL
酵母提取物	0.5 g

B.5 高压灭菌过的池塘水

将池塘水/湖泊水过滤后加入 2 倍的无菌水后高压灭菌, pH 为 6~7。

B.6 CTAB 溶液

按 CTAB 2%, 氯化钠(NaCl) 1.4 mol/L, EDTA 20.0 mmol/L, Tris-HCl 20.0 mmol/L pH=7.5 配制。用前加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

B.7 三氯甲烷-异戊醇

将两者按 24:1 的比例混合, 密闭避光保存。

B.8 酚-三氯甲烷-异戊醇

用 1 mol/L Tris 饱和过的重蒸酚, 和三氯甲烷-异戊醇等体积混合, 密闭避光保存。

B.9 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
水	1 000.0 mL

用 5.0 mol/L 的盐酸(HCl)调 pH 到 8.0。

B.10 EB

用水配制成 10.0 mg/mL 的浓缩液。用时每 10.0 mL 电泳液或琼脂中加 1.0 μ L。

B.11 上样缓冲液

每 100.0 mL 溶液中含:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40.0 g。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
流行性溃疡综合症检疫技术规范
SN/T 2120—2008

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2008 年 11 月第一版 2008 年 11 月第一次印刷
印数 1—2 000



SN/T 2120-2008

书号: 155066 • 2-19207 定价 12.00 元