



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3989—2014

蜜蜂急性麻痹病检疫技术规范

Quarantine protocol for acute bee paralysis of honey bees

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、吉林大学、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：宋战昀、冯新、王振国、郑腾、刘金华、孟日增、魏春艳、孟庆峰、肖成蕊、王伟利。

蜜蜂急性麻痹病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了蜜蜂急性麻痹病的病原检测,包括病原透射电子显微镜观察、RT-PCR 方法、荧光 RT-PCR 方法。

本标准适用于蜜蜂急性麻痹病的检疫。

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 18088 出入境动物检疫采样

3 现场检疫

3.1 蜂群检查

对待检的所有蜂群进行箱外观察,观察蜂群的行为是否异常、箱外是否有不正常的虫尸和有残翅的幼蜂爬行等,从中把可疑有病的蜂群挑出来,进一步进行箱内检查。

3.2 箱内检查

提脾观察,主要查看箱内有无异常的拖弃物,蜜蜂是否有行为、形态等方面的异常。封盖是否异常,巢脾上幼虫是否有病态表现及是否有死幼虫,幼虫或成年蜂身上是否携带有寄生物等。

3.3 个体检查

抽检蜂箱内蜜蜂及巢门前的死蜂,拉出中肠检查是否有病变症状,若囊内充满蜜汁、中肠呈乳白色并失去弹性、后肠积蓄黄褐色粪便则为疑似患蜜蜂急性麻痹病,及时把患病或疑似患病的蜂群撤离隔离场,并采样送实验室进一步确诊。

4 实验室诊断

4.1 透射电子显微镜观察

4.1.1 设备

透射电子显微镜(放大倍数:30 万倍)、台式冷冻高速离心机、微量可调移液器(100 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.5 μL ~10 μL)、水浴锅。

4.1.2 材料和试剂

4.1.2.1 PBS。

4.1.2.2 三氯甲烷。

4.1.2.3 3%磷钨酸溶液。

4.1.2.4 滤纸。

4.1.2.5 洁净玻璃。

4.1.2.6 铜网。

4.1.3 样品采集

4.1.3.1 成蜂样品的采集和保存

依据 GB/T 18088, 现场检疫对有临床症状的蜂群, 用灭菌后的镊子挑取蜂箱内巢脾上或蜂箱底部带有典型病状的蜜蜂, 以及在蜂箱前爬行的垂死蜜蜂和死亡蜜蜂 20~30 只, 分别装入无菌的容器中, 尽快转移到液氮中保存, 供检测用。无临床症状的蜂群, 随机挑取箱内蜜蜂 20~30 只, 分别装入无菌的容器中, 尽快转移到液氮中保存, 供检测用。

4.1.3.2 幼虫样品的采集和保存

依据 GB/T 18088, 有临床症状的蜂群, 无菌割取一小块带有病虫或死虫的巢脾 (不小于 20 cm²), 或无菌挑取单个病虫或死虫若干只装入无菌的小试管内, 尽快转移到液氮中保存供检测用。无临床症状的蜂群, 随机无菌挑取幼虫若干只分别装入无菌的小试管内, 尽快转移到液氮中保存, 供检测用。

4.1.4 样品处理

患病蜜蜂或幼虫 3~5 只, 与 2 mL 的 PBS (pH 7.6) 混匀, 充分研磨, 再加入等量的三氯甲烷, 匀浆 10 min, 然后 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清加入等体积的三氯甲烷, 在 37 ℃~40 ℃水浴中振摇 10 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 上清继续用此法处理 2~4 次。取上清, 15 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 35 000 r/min 离心 1 h, 弃去上清, 用适量 PBS 重悬沉淀即为病毒悬液。

4.1.5 透射电镜观察

4.1.5.1 取病毒悬液, 滴一小滴于蜡盘上。取铜网使有支持膜的表面与样品液表面接触, 静置 3 min~5 min, 取出铜网, 用滤纸吸去多余的液滴, 稍晾干。

4.1.5.2 取 2% 醋酸铀溶液, 滴一小滴于蜡盘上。吸附有样品的铜网放置于染液表面 (样品与染液接触), 静置 3 min~5 min。取出铜网, 用滤纸吸去多余的液滴, 白炽灯下晾干。

4.1.5.3 置于透射电子显微镜下观察, 观察条件一般为加速电压: 80 kV~100 kV, 放大倍数: 20 万~30 万倍, 观察和记录病毒粒子形态、结构、长度和直径, 并拍摄病毒粒子照片。

4.1.6 结果判定

蜜蜂急性麻痹病病毒粒子电镜照片参见附录 A。

若发现均一的直径为 28 nm~30 nm, 呈球型二十面体的病毒粒子, 可初步判断为急性麻痹病病毒。若发现长短不一的椭圆形不等轴病毒粒子, 长 30 nm~65 nm, 宽 22 nm, 可初步判断为慢性麻痹病病毒。

病毒的进一步确诊, 须结合待检样品的现场检疫、生物学特性或分子生物学检测结果进行鉴定。

4.2 RT-PCR 方法

4.2.1 设备

梯度 PCR 扩增仪、台式冷冻高速离心机、微量可调移液器 (100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、2 μL~20 μL、0.5 μL~10 μL)、电泳系统、凝胶成像仪系统、电子天平 (感量 0.01 g)。

4.2.2 材料和试剂

4.2.2.1 引物:

上游引物 F1:5'-TGA GAA CAC CTG TAA TGT GG-3'

下游引物 R1:5'-ACC AGA GGG TTG ACT GTG TG-3'

扩增的目的片段为蜜蜂急性麻痹病病毒的 VP3 基因,扩增片段 452 bp。

4.2.2.2 阳性对照:蜜蜂急性麻痹病病毒阳性核酸,由指定单位提供。

4.2.2.3 RNA 提取试剂。

4.2.2.4 其他试剂:DEPC 水、AMV 反转录酶(5 U/ μ L)、AMV RT 5 \times 缓冲液、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、10 \times 缓冲液(含 Mg^{2+})、dNTPs(每种浓度均为 10 mmol/L)、RNasin(40 U/ μ L)、琼脂糖(电泳纯)、溴化乙锭(10 mg/mL)、分子量标准(100 bp~1 000 bp)、电泳缓冲液、加样缓冲液、无水乙醇。

4.2.3 样品采集

具体参见 4.1.3。

4.2.4 RNA 提取

4.2.4.1 RNA 提取按 QIAGEN¹⁾公司的 RNA 抽提试剂盒(Rneasy Mini Kit)进行,选取不超过 30 mg 待检样品,置于 DEPC 处理过的研钵中,加入液氮进行研磨,将研磨得到的粉末,快速转移至无 RNase 的 1.5 mL 离心管中。

4.2.4.2 加入 600 μ L 缓冲液 RLT,颠倒混匀,高速涡旋振荡 30 s,12 000 r/min 离心 3min,取上清液,转移到另一个 1.5 mL 离心管。

4.2.4.3 加入 600 μ L 70%的乙醇,立即吹打混匀。

4.2.4.4 将吸附柱置于收集管中,将 4.2.4.3 中混匀的混合物吸入吸附柱中,10 000 r/min 离心 15 s,倒掉废液,将吸附柱重新放回收集管中。

4.2.4.5 加入 700 μ L 缓冲液 RW1 到吸附柱中,10 000 r/min 离心 15 s,倒掉废液,将吸附柱重新放回收集管中。

4.2.4.6 加入 500 μ L 缓冲液 RPE 到吸附柱中,10 000 r/min 离心 15 s,倒掉废液,将吸附柱重新放回收集管中。

4.2.4.7 加入 500 μ L 缓冲液 RPE 到吸附柱中,10 000 r/min 离心 2 min,取出吸附柱。

4.2.4.8 将吸附柱中置于新的收集管中,12 000 r/min 离心 1 min,以去除残留的 Buffer RPE。

4.2.4.9 将吸附柱中置于 1.5 mL 离心管中,加入 30 μ L~50 μ L DEPC 水,10 000 r/min 离心 1 min,离心所得溶液中即含有 RNA。含有 RNA 的溶液应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增,否则应在-70 $^{\circ}$ C 的条件下保存。

4.2.4.10 RNA 提取可选用等效的商品化试剂盒或等效的提取方法。

4.2.5 RT-PCR

4.2.5.1 反转录合成 cDNA

反应体系:AMV RT 5 \times 缓冲液 4 μ L、dNTPs(2.5 mmol/L)2.5 μ L、RNasin(40 U/ μ L)1 μ L、AMV 反转录酶(5 U/ μ L)1 μ L、随机引物 1 μ L、模板 RNA 5 μ L,加 DEPC 水至 20 μ L。盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。

1) 使用 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 QIAGEN 的产品,标准的使用者可以使用其他公司的同类产品。

SN/T 3989—2014

反应条件:42 ℃ 60 min,95 ℃ 5 min,冰浴 5 min。

4.2.5.2 PCR 扩增

反应体系:10×缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μL、dNTPs(2.5 mmol/L)2.5 μL、引物 F1 和 R1(20 μmol/L)各 1 μL、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL、模板 cDNA 1 μL、加 DEPC 水至 25 μL,盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。

反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保温。

4.2.5.3 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液(见 B.1)配制 1% 的琼脂糖凝胶平板,其中含有 1 μg/mL EB(见 B.2)。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 产物和 2 μL 上样缓冲液(见 B.3)混匀后加入样品孔中进行电泳。在电泳时设立 DNA 标准分子量 Marker 作对照。5 V/cm 电泳约 0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。

4.2.5.4 测序

使用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果,经核酸扩增电泳后如出现一条大小 452 bp 的 DNA 片段,应对其进行测序,参考序列见 C.1。

4.2.6 结果判定

经核酸扩增电泳后阳性对照会出现一条 452 bp 的 DNA 片段,而阴性对照和空白对照没有核酸条带。待检样品经核酸扩增电泳后,在相应 452 bp DNA 位置上有条带者并经测序验证者为阳性。无条带或条带的大小不是 452 bp 的为阴性。

4.3 荧光 RT-PCR 方法

4.3.1 设备

荧光定量 PCR 扩增仪、台式冷冻高速离心机、微量可调移液器(100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、2 μL~20 μL、0.5 μL~10 μL)、电子天平(感量 0.01 g)。

4.3.2 材料和试剂

4.3.2.1 引物和探针

上游引物 F2:5'-TCC TAT ATC GAC GAC GAA AGA CAA-3'

下游引物 R2:5'-ATG ACC ATG CGC TTG ATA-3'

探针 P1:5'-FAM-TTT CCC CGG ACT TGA C-TAMRA-3'

4.3.2.2 阳性对照:蜜蜂急性麻痹病病毒阳性核酸。

4.3.2.3 RNA 提取试剂盒。

4.3.2.4 一步法荧光 RT-PCR 试剂盒。

4.3.2.5 其他试剂:DEPC 水、无水乙醇。

4.3.3 样品采集

具体参见 4.1.3。

4.3.4 RNA 提取

具体参见 4.2.4。

4.3.5 荧光 RT-PCR 检测

4.3.5.1 扩增试剂配制

采用一步法荧光 RT-PCR 扩增可选用等效的商品化试剂盒,下面以 TIANGEN²⁾ 公司的一步法荧光 RT-PCR 扩增试剂盒(Quant one step qRT-PCR kit)进行扩增。在一个 200 mL PCR 管中加入 2×Quant One Step Probe qRT-PCR Master mix 12.5 μL、Hotmaster Taq polymerase(2.5 U/mL)1 μL、Quant RTase 0.7 μL、引物 F2 和 R2 终浓度 0.25 μmol/L、探针 P1 终浓度 0.20 μmol/L,补充 DEPC 水至 25 μL。盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。

4.3.5.2 荧光 RT-PCR 检测

离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。循环条件设置:

- 第一阶段,反转录 50 °C/30 min;
- 第二阶段,预变性 92 °C/3 min;
- 第三阶段,92 °C/10 s,45 °C/30 s,55 °C/1 min,5 个循环;
- 第四阶段,92 °C/10 s,55 °C/30 s,68 °C/30 s,40 个循环,在第四阶段每个循环的退火延伸时收集荧光。

4.3.6 结果判定

4.3.6.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

4.3.6.2 质控标准

4.3.6.2.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

4.3.6.2.2 阳性对照的 Ct 值应 <28.0,并出现典型的扩增曲线。否则,此次实验视为无效。

4.3.6.3 结果描述及判定

4.3.6.3.1 阴性:无 Ct 值并且无扩增曲线,表示样品中无蜜蜂急性麻痹病病毒。

4.3.6.3.2 阳性:Ct 值 ≤30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在蜜蜂急性麻痹病病毒。

4.3.6.3.3 有效原则:Ct >30.0 的样本建议重做。重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。必要时,可对扩增片段进行,测序结果与附录 B.2 参考序列同源性较高为阳性。

5 综合判定

经过现场检疫及透射电子显微镜观察,疑似蜜蜂急性麻痹病的样品须经 RT-PCR 方法或荧光 RT-PCR 方法确认阳性后,方可判为蜜蜂急性麻痹病阳性。

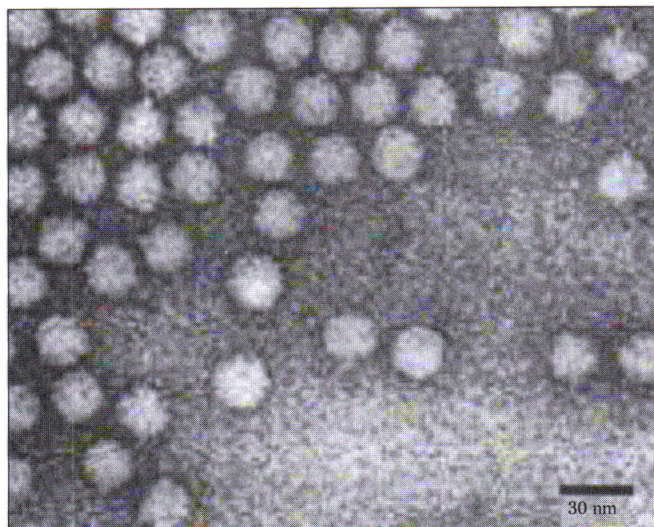
蜜蜂急性麻痹病参见附录 D。

2) 使用 TIANGEN 公司的一步法荧光 RT-PCR 试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 TIANGEN 的产品,标准的使用者可以使用其他公司的同类产品。

附 录 A

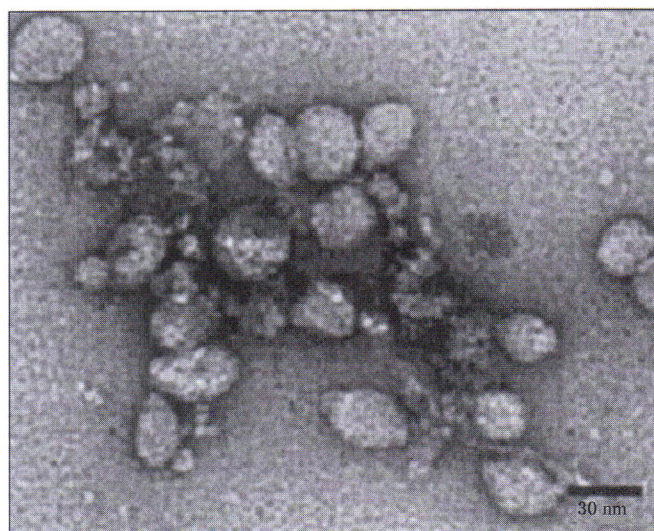
(资料性附录)

蜜蜂急性麻痹病病毒粒子和蜜蜂慢性麻痹病病毒粒子透射电镜照片



注：引自 Colin Hawthorn Denholm B.Sc.1999。

图 A.1 蜜蜂急性麻痹病病毒粒子透射电镜照片(80 KV,30 万倍)



注：引自 Aurore Chevin.2012。

图 A.2 蜜蜂慢性麻痹病病毒粒子透射电镜照片(80 KV,30 万倍)

附 录 B
(规范性附录)
试 剂 配 制

B.1 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
加水至	1 000 mL

5 mol/L 的盐酸调 pH 到 8.0。

B.2 EB(核酸染色剂)

用水配制成 10 mg/mL 的浓缩液,使用时每 100 mL 电泳液或琼脂中加 5 μ L。

B.3 上样缓冲液

每 100 mL 溶液中含:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40 g。

附 录 C
(规范性附录)

蜜蜂急性麻痹病 RT-PCR 及荧光 RT-PCR 扩增参考序列

C.1 RT-PCR 扩增参考序列

Acute bee paralysis Virus, complete genome, ACCESSION: AF150629, 452 bp

```
01 TGAGAACACC TGTAATGTGG GTGGATACAT TAAAGGATGA GAGAAGACCA ATTGAAAAAG
61 TAGATCAACT GAAAACACGT GTGTTTTCCTA ATGGGCTAT GGACTTTTCT ATCACTTTTA
121 GAATGTACTA TTTGGGCTTC ATAGCACACC TTATGGAAAA TCGAATAACC AATGAAGTAT
181 CCATAGGAAC TAATGTTTAT TCCCAAGATT GGAATAAGAC AGTTAGAAAA CTTAAACTA
241 TGGGACCCAA GGTATTGCA GGAGATTCT CAACCTTTGA TGGATCTTG AATGTTTGCA
301 TTATGGAAAA ATTTGCTGAC CTAGCGAATG AATTTTATGA TGACGGATCA GAGAATGCAT
361 TAATTCGACA TGTTTGTCTT ATGGATGTAT ATAACCTAAC ACACATTTGT GGTGATTCCG
421 TATATATGAT GA CACACAGT CAACCTCTG GT
```

C.2 荧光 RT-PCR 扩增参考序列

Acute bee paralysis virus isolate 950411b-6 structural protein gene, partial cds, ACCESSION: AF263736.1

```
01 TCCTATATCG ACGACGAAAG ACAATATTTC CCCGGACTTG ACTCAATTGG
61 ATGGAATTAA AGCGC
```

附 录 D
(资料性附录)
蜜蜂急性麻痹病

D.1 简介

蜜蜂急性麻痹病(Acute Bee Paralysis)是由急性麻痹病毒(Acute Bee Paralysis Virus, ABPV)引起的一种成年蜜蜂传染病。蜜蜂急性麻痹病又叫“黑蜂病”或“瘫痪病”,严重影响成年蜂的寿命,造成蜂群群势下降,蜂蜜和王浆的产量降低,是多年来危害成年蜂的主要传染病。该病于1963年首次在英国被发现,目前包括我国在内的许多国家都有此病的分布。

D.2 病原

病原为蜜蜂急性麻痹病病毒,属于小RNA病毒科单链RNA病毒,无包膜,病毒颗粒直径为28 nm~30 nm,呈球型二十面体,氯化铯浮力密度为1.33~1.45。

D.3 症状与流行

蜜蜂急性麻痹病的症状表现有两种类型:“Ⅰ型”症状是病蜂翅膀和体躯不正常抖动,飞不起来而跌落在地并爬到草茎上去;有时数以千计的病蜂聚集成团,有时在蜂箱内乱挤成团;腹部因蜜囊充水而肿胀,翅膀张开并脱落;病蜂几天后死亡;“Ⅱ型”症状是病蜂的腹部不肿胀,有时反而缩小。病蜂体表绒毛脱光,身体油光发黑,在巢内常常遭到老齡工蜂的追咬。病蜂飞出箱外后,守卫蜂不许它们飞回蜂巢,使它看起来像盗蜂。几天后,病蜂开始发抖,不能飞翔,不久便死去。以上两种症状在同一蜂群中出现时,往往是其中一种为主。在早春和晚秋,气温低,蜂群活动少,多以“Ⅰ型”为主;夏秋时节,蜂群活动积极,常以“Ⅱ型”症状为主。

该病传播速度快,发病严重,比较顽固难治,对蜜蜂的危害很大。如不及时防治,轻则造成蜂蜜严重减产,重则会使蜜蜂出现大量死亡。ABPV是已知的唯一自然交替寄主的蜜蜂病毒。蜜蜂麻痹病毒是通过蜜蜂建巢、调换巢脾、利用病群育王等途径传播给健康蜂群,也可通过成年蜂唾液腺分泌物、被污染的花粉传播,与染病蜂接触和吸食被污染的饲料而发病,而大蜂螨是该病毒高效的传播媒介。

D.4 鉴别诊断

急性麻痹病病毒与慢性麻痹病病毒的区别在于:

- a) 形态不一样,急性麻痹病病毒是等轴的,而慢性麻痹病病毒是不对称的,为长椭圆形不等轴病毒粒子,长30 nm~65 nm,宽22 nm;
- b) 在自然感染的麻痹病蜂群中,慢性麻痹病病毒比急性麻痹病病毒颗粒多得多;
- c) 注射上述两种病毒后的蜜蜂寿命相差很大,注射慢性麻痹病病毒出现症状后还可存活若干天,而急性麻痹病出现症状后大约1 d后死亡;
- d) 急性麻痹病病毒复制速度比较慢性麻痹病病毒快,很快达到较高浓度;
- e) 两者无血清学关系。