

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4050—2014

---

### 鲍鱼疱疹病毒感染检疫技术规范

Quarantine Protocol for infection with abalone herpesvirus

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：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵玉然、尹伟力、蒋玉婷、郑晓聪、孙明君、郑小龙、何俊强、于力、王津津、岳志芹。

## 鲍鱼疱疹病毒感染检疫技术规范

### 1 范围

本标准规定了鲍鱼疱疹病毒感染的临床诊断、病理组织学方法和分子生物学方法。  
本标准适用于鲍鱼疱疹病毒感染的诊断和监测。

### 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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AbHV:鲍鱼疱疹病毒 (Abalone herpesvirus)

BCIP:5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (5-Bromo-4-Chloro-3-IndolylPhosphate)

Ct 值:荧光信号达到设定的阈值所经历的扩增循环次数 (Cycle threshold value)

EDTA:乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

NBT:氯化硝基四氮唑蓝 (Nitrotetrazolium Blue chloride)

PCR:聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

SDS:十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate)

### 4 试剂和材料

4.1 水:符合 GB/T 6682 中三级水的规格。

4.2 苏木精。

4.3 伊红。

4.4 引物:见表 1。

表 1 引物序列

名称	序 列
AbHV ORF66F1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'
AbHV ORF66R1	5'-CAA-GGC-TGC-TAT-GCG-TAT-GA-3'
AbHV 66Prb1	5'- <b>6FAM</b> -TGG-CCG-TCG-AGA-TGT-CCA-TG- <b>TAMRA</b> -3'

表 1 (续)

名称	序 列
AbHV ORF77F1	5'-CAA-CCA-CTT-GTT-CGG-GTT-CT-3'
AbHV ORF77R1	5'-CAG-GGT-GAT-TAA-TGC-GGA-GT-3'
AbHV 77Prbl	5'-6FAM-TCC-GTA-CGC-GGG-ATC-TTC-GT-TAMRA-3'
18SF1	5'-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AGG-AA-3'
18SR1	5'-GCT-GGA-ATT-ACC-GCG-GCT-3'
18SPrb	5'-6VIC-TGC-TGG-CAC-CAG-ACT-TGC-CCT-C-TAMRA-3'
AbHV-16	5'-GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG-3'
AbHV-17	5'-TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C-3'
AbHV ORF66f1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'
AbHV ORF66r2	5'-GCC-GGT-CTT-TGA-AGG-ATC-TA-3'

- 4.5 EDTA。
- 4.6 SDS。
- 4.7 蛋白酶 K 见附录 A。
- 4.8 *Taq*Man® Fast Universal PCR Master Mix 实时 PCR 反应液预混液(含热启动 DNA 聚合酶,buffer,UNG 酶)。
- 4.9 *Taq*® 聚合酶预混液(含 *Taq* 酶,  $Mg^{2+}$ , dNTP, 缓冲液)。
- 4.10 地高辛标记试剂盒。

## 5 仪器设备与检测环境要求

- 5.1 切片机。
- 5.2 显微镜。
- 5.3 PCR 扩增仪。
- 5.4 水平电泳仪。
- 5.5 实时 PCR 仪。
- 5.6 检测实验室符合 GB 19489 的要求。

## 6 样品采集

参照 GB/T 18088 规定进行,样品采集出现疑似临床症状的样品或濒死的样品。

## 7 检测方法

### 7.1 临床症状观察

患病个体的临床症状主要表现为鲍鱼活力很低,无食欲,怕光,生长速度变慢,粘液增多,足变黑变硬,口部肿胀和突出,踏板肌肉活力下降,足边缘向内卷曲,导致暴露出清洁光亮的壳,死亡的鲍显示肝胰腺和消化道肿大(参考附录 B)。



## 7.2 显微镜观察

### 7.2.1 取样

用灭菌剪刀活体解剖取脑和神经节等神经组织。

### 7.2.2 固定

迅速将组织切成厚度不超过 3 mm 的组织块,用 Davidson's 固定液(见 A.1)固定 2 h 以上。根据组织块大小,固定时间可适当调整,或放置过夜,期间按需要更换一次固定液。临床样品也可用 10% 甲醛固定,长期保存。

### 7.2.3 切片

固定好的组织块用水充分洗涤,按下列程序处理:70%乙醇(60 min)→85%乙醇(60 min)→95%乙醇(60 min)→无水乙醇(2次,30 min/次)→二甲苯+无水乙醇(体积比 1:1)(30 min)→二甲苯浸泡(2次,30 min/次)→二甲苯+石蜡(体积比 1:1)(15 min)→石蜡(15 min)两次→石蜡包埋→切片(根据组织块大小和种类,各步时间作适当调整)。切片厚度最好不超过 6  $\mu\text{m}$ 。

### 7.2.4 染色

二甲苯(5 min)→二甲苯+无水乙醇(体积比 1:1)(3 min)→无水乙醇(3 min)→95%乙醇(3 min)→85%乙醇(3 min)→70%乙醇(3 min)→蒸馏水(5 min)→苏木精(60 min)→伊红(5 min)→蒸馏水(5 min)→85%乙醇(5 min)→95%乙醇(5 min)→无水乙醇浸泡(2次,5 min/次)→二甲苯+无水乙醇(体积比 1:1)(5 min)→二甲苯浸泡(2次,5 min/次)→中性树脂封片。

### 7.2.5 结果判定

器官中结缔组织以及脑神经节和周围神经中的神经组织坏死性病变可初步判定 AbHV 阳性(参见附录 C)。

## 7.3 以聚合酶链式反应为基础的检测方法

### 7.3.1 取样

取脑和神经节等神经组织,用 95% 的乙醇保存。

### 7.3.2 提取核酸

将组织匀浆。取 25 mg~50 mg,加入 500  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液(见第 A.2 章)、蛋白酶 K(见第 A.3 章)至终浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,上下颠倒混匀,混合液置于 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴,孵育 1 h~3 h;向匀浆液中按 1:1 比例加入酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1)混合液,上下颠倒混匀,12 000g 离心 5 min;转移上层水相,加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1)混合液,上下颠倒混匀,12 000g 离心 5 min;转移上层水相,加入两倍体积的无水乙醇,−20  $^{\circ}\text{C}$  放置至少 30 min;14 000g 离心 15 min,沉淀 DNA,倾去上清液;于沉淀中加入 75%乙醇溶液 500  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀后 14 000g 离心 15 min,倾去上清液,室温晾干。用 30  $\mu\text{L}$  水溶解 DNA 沉淀,冰上保存备用。若需长期保存应放置在一 20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。组织 DNA 提取也可采用等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行操作。

SN/T 4050—2014

### 7.3.3 实时 PCR 检测

#### 7.3.3.1 反应体系与反应条件

实时 PCR 反应体系为 TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 探针 0.5  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 模板 2  $\mu\text{L}$ , 补水至 25  $\mu\text{L}$  终体积。反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  59 s 后 95  $^{\circ}\text{C}$  3 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  30 s 反应 45 个循环。若采用其他实时 PCR 检测试剂盒, 反应体系需参照说明书修改。反应过程中应设立阳性对照、阴性对照。阴、阳性对照由指定单位提供。ORF66 引物组和 ORF77 引物组均可用于 AbHV 的检测, 18S 探针和引物是用来检测核酸提取效率和实时 PCR 过程中有无抑制剂成分。

#### 7.3.3.2 结果判定

在 18 s 内扩增正常的情况下, 检测样品的 Ct 值大于或等于 40 时, 即判定阴性; 检测样品的 Ct 值小于或等于 35 时, 即判定阳性; 检测样品的 Ct 值大于 35 而小于 40 时, 判为可疑, 应重新进行检测, 重新检测 Ct 值大于或等于 40 时, 即判定阴性; Ct 值小于 40 时, 即判定阳性。

### 7.3.4 PCR 检测

#### 7.3.4.1 反应体系与反应条件

PCR 方法反应体系为上/下游引物 AbHV-16/17 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , Taq® 酶反应预混液 12.5  $\mu\text{L}$ , 加水补足至总体积 25  $\mu\text{L}$ , 或参照商业化试剂盒规定适当修改反应体系。反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 而后 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 74  $^{\circ}\text{C}$  45 s 反应 40 个循环, 而后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。PCR 反应条件可根据商业化酶的最适反应条件进行适当调整。反应过程中应设立阳性对照、阴性对照。阴、阳性对照由指定单位提供。

#### 7.3.4.2 结果判定

反应结果通过琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段大小根据病毒变异株不同而有所差异, 大小为 522 bp~588 bp。

### 7.4 原位杂交法

#### 7.4.1 杂交探针的制备

首先用 PCR 方法扩增 AbHV DNA。在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 加入 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  的 Taq® DNA 聚合酶 0.25  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的引物 ORF66f1 和 ORF66r2 各 1  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L 的 dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$  的 AbHV DNA 1  $\mu\text{L}$ , 补充水至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预热 5 min; 之后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 再利用地高辛标记试剂盒进行标记, 得到地高辛标记的 DNA 探针。

#### 7.4.2 设立对照

7.4.2.1 阳性对照: 用感染了 AbHV 的鲍鱼作为阳性对照。

7.4.2.2 阴性对照: 要设两个阴性对照, 原位杂交过程中不加入探针; 用非感染的鲍鱼进行原位杂交。

#### 7.4.3 样品处理

7.4.3.1 取脑神经组织用 Davidson's 固定液固定, 常规石蜡包埋, 切片厚 4  $\mu\text{m}$ ~6  $\mu\text{m}$ , 粘附于涂有粘



附剂氨基烷基硅烷(aminoalkylsilane)粘附剂的载玻片上,40℃过夜,使切片更紧贴玻片。

7.4.3.2 组织切片(包括阳性对照和阴性对照)依次通过二甲苯(3次,5 min/次)→无水乙醇(2次,1 min/次)→95%乙醇(2次,1 min/次)→85%乙醇(2次,1 min/次)→50%乙醇(约1 min)→水冲洗6次(勿让切片干燥)。

7.4.3.3 组织切片平放在湿盒中,吸500 mL蛋白酶K工作液于每张组织切片上,37℃下温浴15 min。

7.4.3.4 把组织切片上的蛋白酶K工作液吸干,然后将其放入0.4%的冷甲醛溶液(见附录A.4)中室温浸洗5 min。

7.4.3.5 室温下,用2×SSC(见附录A.5)浸洗组织切片5 min。

#### 7.4.4 杂交

7.4.4.1 将上述组织切片平放在湿盒中,加入500 mL杂交缓冲液(见附录A.6)于每张组织切片上,42℃孵育30 min。

7.4.4.2 按每张切片需要25 ng核酸探针计算,取出总核酸探针需用量,置于一只微量离心管中,100℃煮沸10 min,再快速置于冰水中。

7.4.4.3 取核酸探针与相应量(每张切片需500 mL)的杂交缓冲液充分混合,吸500 mL溶有核酸探针的杂交缓冲液,滴加于每张组织切片上,然后将组织切片置于85℃切片烘片机上孵育6 min~7 min,使组织DNA变性。

7.4.4.4 将组织切片放在冰上快速冷却5 min后,在湿盒内42℃孵育过夜(16 h~18 h)。

#### 7.4.5 杂交后漂洗

7.4.5.1 吸去组织切片上多余的杂交缓冲液,然后在染色缸中依次用2×SSC(15 min,室温)→1×SSC(5 min,室温)→0.5×SSC(2次,15 min/次,42℃)→缓冲液I(见附录A.7)(1次,15 min,室温)浸洗组织切片。

7.4.5.2 吸取500 mL/片缓冲液II(见附录A.8)封闭组织,37℃温浴30 min。

7.4.5.3 吸去组织切片上的缓冲液II,用缓冲液II按1:1 000(1 mL/mL)稀释碱性磷酸酶标记的DIG抗体(anti-DIG-AP),把组织切片平放在湿盒中,每片组织切片上加250 mL稀释的Anti-DIG-AP,37℃下孵育30 min。

7.4.5.4 吸去组织切片上的缓冲液II,在染色缸中,依次用1×缓冲液I(2次,10 min/次,室温)和缓冲液III(见附录A.9)(5 min,室温)浸洗组织切片。

#### 7.4.6 显色

7.4.6.1 每片组织切片上加500 mL显色液(见附录A.10),室温避光温浴1 h~3 h。在显色过程中,可短时间取出组织切片在显微镜下观察,当阳性对照明显显色时可终止反应。

7.4.6.2 吸去组织切片上多余的显色液,室温下把组织切片置于1×缓冲液IV(见附录A.11)中5 min,以终止反应。

7.4.6.3 在染色缸中,组织切片依次通过蒸馏水(1 min)→0.5%俾斯麦棕-Y(见附录A.12)(2 min~5 min)→95%乙醇(3次,1 min/次)→无水乙醇(3次,1 min/次)→二甲苯(4次,1 min/次)。

7.4.6.4 用中性树胶封片。

7.4.6.5 在明视野下,用显微镜观察有无蓝黑色或黑色细胞沉淀物并拍照。

#### 7.4.7 结果判定

7.4.7.1 阳性对照组织切片在显微镜下观察有紫黑色的杂交信号,阴性对照无紫黑色的杂交信号。在阳性对照、阴性对照成立的条件下,检测样品通过探针杂交染色后有紫黑色信号的切片被认为阳性

SN/T 4050—2014

结果。

7.4.7.2 若阳性对照样品不出现紫黑色沉淀物,或阳性和阴性对照样品均出现显色反应相当的明显非特异性反应,判断检测结果无效,应重新取样检测。

## 8 综合判定

8.1 当存在下列情况之一时可判断为鲍鱼疱疹病毒感染可疑:

- 在养殖温度为 18℃左右,鲍鱼出现高死亡率(大于 90%)并且出现临床症状;
- 显微镜观察到鲍鱼脑神经组织病变;
- 实时 PCR 或者 PCR 检测结果阳性。

8.2 在样品可疑的情况下,若存在下列情形之一可确诊鲍鱼疱疹病毒感染:

- PCR 检测结果为阳性,并通过 PCR 产物的测序分析判定为 AbHV 阳性,参考核酸序列参见附录 D;
- 原位杂交结果为阳性。



附 录 A  
(规范性附录)  
试 剂 配 制

**A.1 Davidson's 固定液**

95%乙醇	330 mL
福尔马林	200 mL
冰乙酸	115 mL
蒸馏水	335 mL

**A.2 裂解缓冲液**

10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% (质量浓度) SDS, 4 °C 保存。

**A.3 蛋白酶 K (Proteinase K) 工作液 (100 µg/mL)**

1×TNE Buffer	10 mL
10 mg/mL 蛋白酶 K 原液	0.1 mL

将 100 mg 蛋白酶 K 加入 10 mL 双蒸水中溶解, 并在 -20 °C 保存备用, 使用时再配制成 100 µg/mL 的工作液。

**A.4 0.4% 甲醛溶液 (Formaldehyde)**

37% 甲醛 (Formaldehyde)	5.4 mL
双蒸水	500 mL

4 °C 保存, 可重复使用 5 次, 或保存 3 个月。

**A.5 20×SSC**

氯化钠	175.32 g
柠檬酸三钠 2H <sub>2</sub> O	88.23 g
加双蒸水定容至	1 000 mL

0.45 µm 滤膜过滤除菌后 4 °C 贮存备用, 实际使用时再根据需要浓度稀释。

**A.6 杂交缓冲溶液 (Hybridization Buffer) (终体积 50 mL)**

20×SSC	10 mL
100% 甲酰胺 (Formamide)	25 mL
20×Denhardt's solution	2.5 mL
10 mg/mL 鲑鱼精 DNA 溶液	2.5 mL

25%硫酸葡聚糖(Dextran sulfate) 10 mL  
4 °C 保存。

#### A.7 10×缓冲液 I (10×buffer I)

Tris base	121.1 g
氯化钠	87.7 g
加双蒸水溶解,定容至	1 000 mL

用浓盐酸调节 pH 至 7.5,0.45 μm 滤膜过滤除菌贮存备用,实际使用时再根据需要浓度稀释。

#### A.8 缓冲液 II (1×buffer II) 封闭和抗体稀释液

Blocking Reagent II	10 mg
1×缓冲液 I	1 mL

低温搅拌 30 min,直至无颗粒物,4 °C 保存 2 周。

#### A.9 缓冲液 III (1×buffer III)

Tris	12.11 g
氯化钠	0.58 g

加双蒸水定容至 1 000 mL,用浓盐酸调节 pH 至 9.5  
氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 16.10 g  
0.45 μm 滤膜过滤除菌,4 °C 贮存。

#### A.10 显色液(Development Solution)

缓冲溶液 III(Buffer III)	90 mL
10%PVA	10 mL

4 °C 保存,使用前在每 1 mL 加入 4.5 mL NBT(75 mg/mL 70% nitroblue tetrazolium)和 3.5 mL BCIP(50 mg/mL bromochloro-indoyl phosphate)。

#### A.11 10×缓冲液 IV (10×buffer IV)

Tris Base	1.21 g
EDTA · 2H <sub>2</sub> O	3.7 g

加双蒸水定容至 1 000 mL,用浓盐酸调 pH 至 8.0,高压灭菌。4 °C 保存备用。  
实际使用时再根据需要浓度稀释,0.45 μm 滤膜过滤除菌后使用。

#### A.12 0.5%俾斯麦棕-Y(Bismark Brown Y)

俾斯麦棕-Y(Bismark Brown Y)	2.5 g
双蒸水	500 mL

把染料溶于水,过滤,室温保存。

**A.13 10×TNE Buffer**

三羟甲基氨基甲烷(Tris Base)	60.57 g
氯化钠(NaCl)	5.84 g
乙二胺四乙酸(EDTA)	3.72 g
双蒸水	900 mL

用 5 mmol/L 盐酸调 pH 至 7.4。定容至 1 000 mL 配制成 TNE 工作液。高压灭菌, 4 ℃ 保存, 实际使用时再根据需要浓度稀释。

**A.14 20×Denhardt's 溶液**

牛血清白蛋白(BSA)	0.4 g
水溶性聚蔗糖 400(Ficoll 400)	0.4 g
聚乙烯吡咯烷酮 360(PVP 360)	0.4 g
双蒸水	100 mL

0.45 μm 滤膜过滤, 4 ℃ 保存。

**A.15 75 mg/mL NBT 溶液**

四氮唑蓝(NBT)	100 mg
二甲基甲酰胺(DMF)	0.933 mL
双蒸水	0.4 mL

−20 ℃ 保存。

**A.16 50 mg/mL BCIP 溶液**

5-溴-4-氯-3 吡啶磷酸-甲苯胺盐(BCIP)	100 mg
二甲基甲酰胺(DMF)	2 mL

−20 ℃ 保存。

**A.17 硫酸葡聚糖**

硫酸葡聚糖	25 g
双蒸水定容至	100 mL

低热搅拌片刻, 使之溶解, −20 ℃ 保存。

**A.18 鲑鱼精 DNA 溶液, 10 mg/mL**

鲑鱼精 DNA	0.25 g
双蒸水	25 mL

将 DNA 慢慢加入水中, 加热并搅拌, 直至完全溶解。高压灭菌。分装于无菌离心管中, −20 ℃ 保存。



附 录 B  
(资料性附录)  
鲍鱼疱疹病毒简述

### B.1 病原

鲍鱼疱疹样病毒(AbHV)被认为是鲍鱼神经节神经炎(AVG)的病原,该病是一种感染澳大利亚和其他一些国家鲍鱼的传染性疾病。鲍鱼疱疹病毒感染症也叫九孔鲍裂壳症(Crack-shell disease of *Haliotis hannai*),杂色鲍病毒病(*Haliotis diversicolor* viral disease)、鲍鱼疱疹病毒样病毒感染(*Abalone herpes-like virus*),澳洲叫鲍鱼病毒性神经节细胞炎症(*Abalone viral ganglioneuritis*)。AbHV 是一种 20 面体,径为 100 nm~110 nm 的球形,有二层 8 nm~10 nm 厚的囊膜和光滑的表面,核衣壳直径约 70 nm~100 nm,在感染细胞的核内复制并在细胞质中成熟。

### B.2 宿主

#### B.2.1 可疑的宿主

该病感染的主要对象有 *Haliotis hannai* (九孔鲍), *H. Diversicolor* (杂色鲍), *H. laevigata* (绿鲍), *H. rubra* (红鲍)从苗种到成鲍都能生病。病毒影响鲍鱼的所有生长阶段,24 ℃ 以下才表现临床症状。

#### B.2.2 宿主的可能感染阶段

整个生长阶段。

### B.3 目标器官和感染组织

感染 AVG 后的组织病理学观察的主要病变部位是神经节:炎症仅限于神经组织。脑、围心肌、颊神经节脑沟和其他周边神经都能被感染。

### B.4 致死性

在澳大利亚野生的和养殖的鲍鱼,在整个生长阶段,感染 AVG 均会出现快速、高死亡率(高达 90%)。同样,在中国台北,在该病的流行季节,养殖鲍鱼中(水温在 16 ℃~19 ℃),成年鲍和幼年鲍均会患病,累计死亡率达 70%~80%。据报道,在同一个池塘养殖的鲍鱼 3 d 内将会出现临床症状并全部死亡。据澳大利亚统计,该病在鲍鱼的生活过程中的致死率为 90%,实验室研究表明,感染该病后的致死率是 100%。多数情况下,鲍鱼在出现临床症状 1 d~2 d 死亡。

### B.5 传播途径

水平传播。

## B.6 地理分布

该病目前主要分布在亚洲(中国台北)、远东和大洋洲(在澳洲的东南部)。

## B.7 临床症状

鲍鱼活力很低,无食欲,怕光,生长速度变慢,粘液增多,足变黑变硬,死亡的鲍显示肝胰腺和消化道肿大。口部肿胀和突出,如图 B.1;踏板肌肉活力下降;足边缘向内卷曲,导致暴露出清洁光亮的壳。



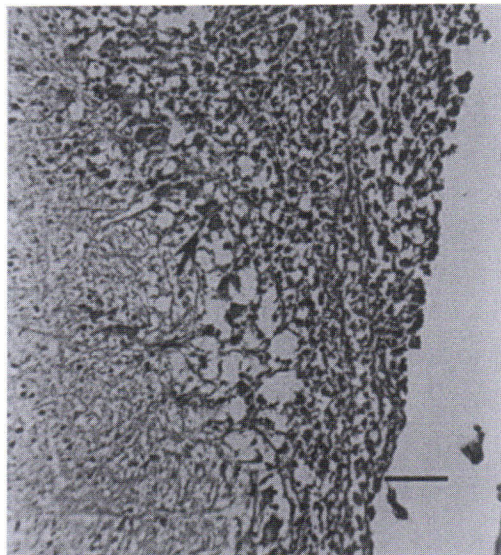
(C HOOPER, 2007)

注: 鲍鱼感染鲍鱼类疱疹病毒后出现唇部凸出,并位于足肌前方,如箭头所示,齿舌清晰可见。

图 B.1 鲍鱼类疱疹病毒症状

附 录 C  
(资料性附录)  
组织病理切片图

普通显微镜观察,观察到九孔鲍器官中结缔组织以及脑神经节和周围神经中的神经组织坏死性病变,如图 C.1。



(Pen Heng Chang,2005)

注:组织学观察病变的脑神经节和周围神经。弥漫性坏死,伴有渗血细胞是突出的组织。退化的神经分泌细胞(箭头)。比例尺=50  $\mu\text{m}$ 。

图 C.1 组织病理切片图



# 附录 D

## (资料性附录)

### PCR 方法检测目的基因参考序列

常规 PCR 方法检测目的基因参考序列如下：

GGCTCGTTCGGTCGTAGAAATGAAAATCTATCTGGAAGTAATCTACTTTATACTCTCGTG  
 AGTTACAAGTCCTTGTTCAATCGAGTTACAAGACCTTGTTCAATCGAGTTACAAGACCT  
 TGTTCAATCGAGGTACAAGACCTTGTTCAATTGAGTTACAAGACCTTGTTCAATCGAGT  
 TACAAGACCTTGTTCCCTTTTCGTACCACACCTCTATCATCATGCAAAGAAGACAAGAAAA  
 AAATAATAAAAATTTACATTCACTTTTATTTTTTCAATTTTTTTTCACTTCGCTTCTCCTTCA  
 CCAACAAGCCCTTCTTCCTCGTCATTGGCCTCTTCCATGTAAGCCTTCTGAGCGTTTAC  
 CACCTCTACCGTCTGCCCCGTCCATCTCGCGCATAATCGTCGCGATTTCATCAACCCGCT  
 TTATGTCGATAAAGTTCTGCATGTACTCCACCTCAAAGCCTCCACGAACATGGTAGAA  
 TTGACACAAGCGAAGGCTTGCATGAGTCCGTCCTTGTCACTGGCCAGCATCACGATCT  
 TGTGTTGACATGGATCTGTACACGCTGA(558 bp)

下划线所标示部分为引物序列，核酸参考序列病毒株：Abalone herpesvirus Victoria/AUS/2009，  
 GenBank：JX453331.1。