

《国家水生动物疫病监测计划》
技术规范（2024年版）
（鱼类）

全国水产技术推广总站
二〇二四年三月

目 录

1.鲤春病毒血症监测技术规范.....	1
2.锦鲤疱疹病毒病监测技术规范.....	13
3.鲤浮肿病监测技术规范.....	26
4.草鱼出血病检测技术规范.....	35
5.鲫造血器官坏死病监测技术规范.....	51
6.传染性造血器官坏死病监测技术规范.....	59
7.传染性胰脏坏死病监测技术规范.....	67
8.罗非鱼湖病毒病监测技术规范.....	79
9.病毒性神经坏死病监测技术规范.....	94

鲤春病毒血症监测技术规范

1 范围

本文件界定了鲤春病毒血症（spring viraemia of carp, SVC）监测的术语与定义、缩略语，规定了SVC监测的通用要求，描述了相应的证实方法，给出了监测对象、监测点设置、采样、样品包装和运输、实验室检测和监测信息汇交等内容。

本文件适用于参与水生动物疫病监测计划的渔业主管部门、水生动物疫病预防控制机构、水生动物疫病检测机构等进行的SVC监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 15805.5 鲤春病毒血症诊断规程

GB/T 26544 水产品航空运输包装通用要求

SC/T 7011.1 水生动物疾病术语与命名规则 第1部分:水生动物疾病术语

SC/T 7011.2 水生动物疾病术语与命名规则 第2部分:水生动物疾病命名规则

SC/T 7015 病死水生动物及病害水生动物产品无害化处理规范

3 术语和定义

SC/T 7011.1、SC/T 7011.2界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 水生动物疫病监测计划 plan of aquatic animal disease surveillance

对水生动物疫病发生、流行等情况进行监测的工作任务，用以及时掌握我国重要水生动物疫病情况。国家级监测计划由农业农村部渔业主管部门制定，省级监测计划由省（自治区、直辖市）级渔业主管部门制定。

[来源：SC/T 7023-2021，3.1]

3.2 监测 surveillance

在一定范围内，针对某一特定水生动物群体，对于某种或多种疫病长期系统地观测，收集和分析疫病的动态分布和影响因素资料，跟踪疫病的发生、分布和

变化趋势，并将信息及时上报和反馈，以便进一步开展调查研究，对疫病进行预警预报，提出有效防控对策和措施，从而达到防控疫病的目的。

[来源：SC/T 7023-2021，3.2]

3.3 监测点 surveillance spot

需要监测的独立的流行病学单元。

[来源：SC/T 7023-2021，3.3]

3.4 哨兵动物 sentinel animals

被监测群体价值昂贵而不得采用破坏性方法取样时，选择特定病原的易感物种作为哨兵动物。在特定区域对一个或多个已知健康和暴露状况的哨兵动物进行监测，判定该特定区域疾病流行情况。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

SVC：鲤春病毒血症（spring viraemia of carp）

SVCV：鲤春病毒血症病毒（spring viraemia of carp virus）

5 监测对象

鲤及其变种。优先采集鲤 *Cyprinus carpio*、锦鲤 *Cyprinus carpio koi*、金鱼 *Carassius auratus* 和鲫 *Carassius carassius* 等。

6 监测点设置

6.1 监测点应包含以下 SVCV 易感鱼类养殖场：

- a) 国家级和省级原良种场、遗传育种中心和引育种中心；
- b) 近两年内 SVC 监测结果呈阳性的养殖场；
- c) 疑似发生 SVC 的养殖场。

6.2 监测点还可选择自繁自养或引种能溯源的苗种场和养殖场。

7 采样

7.1 要求

7.1.1 通用要求

采样应符合生物安全要求，避免交叉污染；所采样品应具有代表性，确保样品质量和相关信息的可追溯性。

7.1.2 人员

采样人员应通过省级及以上水生动物疫病研究机构、预防控制机构（水产技术推广机构）等组织的采样技术培训，或具备采样必须的技术能力。

7.1.3 水温

最佳采样水温为10℃~20℃。

7.1.4 规格

所有生长阶段均可采集。优先采集1龄以下或250g以下鱼苗和幼鱼，亲鱼采集精液、卵巢液或鱼卵。

7.1.5 数量

7.1.5.1 有临床症状的鱼

采集濒死或具有临床症状的样品，每个监测点不少于30尾。有临床症状的亲鱼采集3尾~5尾。

7.1.5.2 无临床症状的鱼

每个监测点随机采集150尾。鱼卵采集不少于200粒。

7.1.6 频次

符合6.1的监测点，每年采样2次，时间应间隔1个月以上。符合6.2的监测点，每年采样1次。

7.2 样品采集

7.2.1 准备

7.2.1.1 采样单位应提前与监测点及检测单位确定采样和送检时间，同时按附录A.1的要求填写《监测点备案表》。

7.2.1.2 按附录A.2的要求，确定采样人员、运载工具，准备采样工具、容器和《现场采样信息表》等。

7.2.2 采集

7.2.2.1 亲鱼养殖场

采集亲鱼精液、卵巢液或鱼卵。如养殖有哨兵动物，可直接采集哨兵动物进行检测。

7.2.2.2 育苗车间

按照7.1.5采样数量要求，样品来源应不少于10个育苗池（缸）。如果育苗池（缸）数量少于10个，则每个育苗池（缸）都要采集。

7.2.2.3 养殖场

按照7.1.5采样数量要求，样品来源不少于10个养殖单元（例如池塘）。若养殖单元数量少于10个，则每个养殖单元都要采集。

7.2.3 保存

7.2.3.1 活鱼样品

将活鱼样品以合适的密度置于活鱼运输袋中，加入原池水后充氧打包，24 h内运达检测单位。

7.2.3.2 组织样品

若无法送活鱼或24 h内无法将活鱼送达检测实验室，可在就近符合样品前处理要求的实验室对活鱼进行解剖，采集其靶器官。以15尾鱼的组织为一个混合小样。冰浴条件下，取脑、脾、肾、鱼卵等靶器官组织1.5g以上或卵巢液、精液1.5mL以上置于15 mL离心管，按1:5比例（W/V）向离心管加入M199等细胞培养液（含10%胎牛血清或小牛血清、1 000 IU/mL青霉素和1 000 μg/mL链霉素）。在离心管上标明样品编号和日期，置于0℃~10℃的低温保存箱，48 h内运达实验室。

7.3 采样记录

7.3.1 采样时，应留存标记有日期信息的影像资料，按附录 A.2 要求填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性和有效性。《现场采样记录表》一式三份，一份由监测点留存，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至检测单位。

7.3.2 采样过程中，应记录采样水温、水体 pH 值、样品规格、样品品种、运输方式等。

7.3.3 采样后，应立即在盛装样品的容器或样品袋上贴标签，标签应符合附

录 A.3 的要求，防止笔迹脱落或晕染。每件样品须标记清晰，注明被采样单位、样品编号、监测点名称、监测点备案编号、采样人和采样日期，并确保编号的唯一性。

8 样品包装和运输

8.1 通用要求

样本应独立包装，包装材料符合防水、防破损、耐低温。样品不应出现泄露，样品间不应出现交叉污染。《现场采样记录表》用封口塑料袋封好后放置包装箱内。

8.2 包装

8.2.1 活鱼样品

应用专用活鱼运输袋充氧并打包，在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封纸箱，按附录A.3的要求在其表面粘贴标签，标明样品编号。

8.2.2 组织样品

将含有组织样品的离心管置于自封袋，放入含有冰袋或冷冻瓶装水等冷媒的泡沫箱，再装入相应大小的纸箱，胶带封口后按附录A.3的要求在其表面粘贴采样标签。

8.3 运输

活鱼样品24 h内运达指定检测单位；在 0℃~10℃低温条件下，48 h内将组织样品运达检测单位。样品包装须符合GB/T 26544的规定。

8.4 样品接洽

运输样品前，采样单位应与检测单位联系，确保样品顺利接收。检测单位接到样品后，向采样单位出具接收回执。如发现样品不满足采样规范或检测方法要求的，应要求采样单位按规范重新采样或不予接收，并报告上级主管部门。

9 实验室检测

9.1 资质要求

检测单位应具备SVC检测资质。取得中国合格评定国家认可委员会认可等相应资质，或1年内至少参加1次本领域能力验证且获得满意结果。

9.2 样品处理

9.2.1 样品处理按照 GB/T 15805.5 的要求执行。

9.2.2 每份样品随机分成小样，每个小样由不多于 15 尾鱼来源的样品等量混合，各小样均需检测。

9.3 病原检测

按照GB/T15805.5的要求或监测计划制定部门指定方法进行检测和综合判定。

9.4 检毕样品处理

应做好实验室管理和留样等工作，并按SC/T 7015的要求对阳性样品等进行无害化处理。

9.5 检测记录

9.5.1 检测单位应对样品的处理、检测、保存和处置以及环境监控、消毒等影响结果有效性的环节进行实时记录，确保信息真实并满足可追溯要求。

9.5.2 检测单位应保存检测过程中形成的各种数据、文字、图表、声像等原始资料。

10 监测信息的汇交

10.1 采样单位应将监测点信息和采样信息提交至监测计划下达机构。承担国家水生动物疫病监测计划的采样单位应将《监测点备案表》、《现场采样记录表》上传至国家水生动物疫病监测信息管理系统。

10.2 检测单位应在接收样品后 30 d 内完成检测，按附录 A.4 的要求编制《检测报告》。委托检测单位收到报告后，按监测计划程序反馈至相应各级水生动物疫控机构和相关监测点。承担国家水生动物疫病监测计划的检测单位应将检测结果（含阳性样品核酸检测结果）以及其它相关信息上传至国家水生动物疫病监测信息管理系统。

10.3 检测结果为阳性时，水生动物疫控机构应按附录 A.5 的要求填写《阳性检测结果报告》，上报本级渔业主管部门，同时及时按照国家规定程序开展复核确诊、追溯分析和无害化处理。

附 录 A
(规范性)
监测工作相关表格

A.1 监测点备案表

监测点备案信息按表A.1填写。

表 A 1 监测点备案表

_____省（区、市）		_____病	
监测点名称		备案编号	
监测点地址			
联系人		电话	
监测点 基本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场	
	养殖品种		
	监测品种		
养殖基 本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水	
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input checked="" type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他	
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他	
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无	
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	

填报单位负责人：

（单位公章）

年 月

A.2 现场采样记录表

现场采样信息按表A.2填写。

表 A.2 现场采样记录表

病

监测点	名称			备案编号		
	通讯地址			邮编		
	联系人			电话		
采样单位	名称					
	通讯地址			邮编		
	联系人			电话		
样品信息	样品品种			样品编号		
	样品数量尾			样品规格 cm		
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡				
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它				
	采样时 环境条件	水温 °C		盐度		pH
监测点签署	本次采样始终在本人授权下完成，上述记录经核实无误，确认以上各项记录的准确性。 负责人签字： 年 月 日			采样 单 位 签 署	本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。 采样人签字： 年 月 日	

A.3 采样标签

采样标签信息按表A.3填写。

表 A.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

A.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表A.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字: 年 月 日

表 A.5 阳性检测结果报告

阳性检出监测点信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积亩		采样日期	年 月 日
发病情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积亩		
		经济损失元		

参 考 文 献

- [1] SC/T 7023-2021 草鱼出血病监测技术规范

锦鲤疱疹病毒病监测技术规范

1 范围

本规范规定了锦鲤疱疹病毒病监测的通用要求，描述了对应的试验方法，给出了监测对象、监测点的设置、采样、样品包装和送样、实验室检测和监测信息的汇交等内容。

本规范适用于参与水生动物疫病监测计划的渔业主管部门、水生动物疫病预防控制机构、水生动物疫病检测机构等进行锦鲤疱疹病毒病的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 26544-2011 水产品航空运输包装通用要求

SC/T 7212.1-2011 鲤疱疹病毒检测方法第1部分：锦鲤疱疹病毒

SC/T 7015-2022 病死水生动物及病害水生动物产品无害化处理规范

病原微生物实验室生物安全管理条例

中华人民共和国动物防疫法

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 锦鲤疱疹病毒病 KHVD, Koi hepesvirus disease

是我国二类动物疫病，由锦鲤疱疹病毒（Koi hepesvirus, KHV）引起的、具有高度传染性和致死性的病毒性疾病，可导致锦鲤和鲤鱼大量死亡，对锦鲤和鲤鱼养殖危害极大。临床表现包括鳃发白、两眼凹陷、体表粘液分泌过多、体表及鳍条基部出血、食欲不振、呼吸困难等（详见附录 A）。

3.2 监测 surveillance

在一定范围内，针对某一特定水生动物群体，对于某种或多种疫病长期、系统、连续和定期的观察，收集、分析疫病的动态分布和影响因素资料，跟踪疫病

的发生、分布和变化趋势，并将信息及时上报和反馈，以便进一步开展调查研究，对疫病进行预警预报，提出有效防控对策和措施，从而达到防控疫病的目的。

3.3 监测点 monitoring spots

需要监测的独立的流行病学单元。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

KHV：锦鲤疱疹病毒（Koi hepesvirus）

KHVD：锦鲤疱疹病毒病（Koi hepesvirus disease）

5 监测对象

锦鲤疱疹病毒病易感的主要养殖品种，包括锦鲤（*Cyprinus carpio haematopterus*）、鲤鱼（*Cyprinus carpio*）及其普通变种等。

6 监测点的设置

6.1 监测点应包括以下锦鲤和鲤鱼等易感种类的养殖场：

- a) 国家级和省级原良种场、遗传育种中心和引育种中心；
- b) 近两年内 KHV 监测结果呈阳性的养殖场。

6.2 监测点还应包括以下锦鲤和鲤鱼等易感种类的养殖场：

- a) 从单一苗种场引种或引种产地检疫证明完整或能溯源的观赏鱼或成鱼养殖场；
- b) 自繁自养或引种产地检疫证明完整的苗种场。

7 采样

7.1 采样要求

7.1.1 采样人员

采样人员须经过省级以上水生动物疫病预防控制机构（水产技术推广机构）组织的采样技术培训或了解相关采样要求。

7.1.2 采样水温

在水温 15℃~31℃期间采样。

7.1.3 采样规格

不同规格的苗种及成鱼均可。优先采集苗种。

7.1.4 采样数量

对于无临床症状的鱼，每个监测点随机采集 150 尾；具有疑似临床症状的鱼，不少于 30 尾。优先采集具有临床症状的鱼。

7.1.5 采样频次

符合 5.1 的监测点，每年采样 2 次，且 2 次采样应间隔 1 个月以上；符合 5.2 的监测点，每年采样 1 次~2 次，如果采样 2 次，2 次采样应间隔 1 个月以上。

7.1.6 采样形式

7.1.6.1 活鱼样品

采集的活鱼样品装入活鱼运输袋，24 h 内送检。

7.1.6.2 组织样品

鳃、脾、肾和肝组织，每 15 尾鱼的组织等量混合在一起作为一个检测小样放置到 50mL 离心管中，按 1:10 的比例（W/V）加入含 50% 甘油的磷酸盐缓存液或含 50% 甘油的 M199、MEM、DMEM 等细胞培养液，再按 2% 比例加入浓度为 1000 IU/ml 的青霉素和 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素，并在离心管上标明样品编号和日期，在冷冻条件下 48 h 内运至检测实验室。

7.2 样品采集

7.2.1 准备

采样单位应提前与监测点及样品检测单位确定采样和送检时间，同时按附录 B.1 的要求填写《监测点备案表》（附录 B.1）。

确定采样人员、运载工具、准备采样工具、容器和《现场采样记录表》（附录 B.2）等。

7.2.2 采样实施

根据实际养殖及水域分布情况，合理布设采样点，随机抽取样品，优先采集苗种。

7.2.2.1 孵化车间

随机采集孵化池（缸）数量不少于 10 个，共采集 150 尾作为一个样。如果孵

化池（缸）数量小于或等于 10 个，则每个孵化池（缸）都要采集。

7.2.2.2 养殖场

随机采集养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量不少于 10 个，共采集 150 尾作为一个样。如果养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量小于或等于 10 个，则每个养殖单元都要采集。

7.2.3 采样记录

采样时需填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性。《现场采样记录表》一式三份，一份留被采样单位，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至承检单位。

同时，采样单位应将监测点信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

8 样品包装和送样

8.1 包装

8.1.1 活鱼样品

用活鱼运输袋充氧并打包，在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封，按附录 B.3 的要求在其表面粘贴采样标签，标明样品编号。

8.1.2 组织样品

用自封袋包装后放入泡沫箱中，同时在泡沫箱里加适量的冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封，并在其表面粘贴采样标签。

8.1.3 运输

活鱼样品 24h 内、组织样品 48h 内运达指定检测实验室。

8.1.4 样品接洽

运输样品前，采样单位应与检测单位联系，确保样品顺利接收。检测单位接到样品后，向采样单位出具接收回执。如发现样品不满足采样规范或检测方法要求的，应要求采样单位按规范重新采样或不予接收，并报告上级主管部门。

9 实验室检测

9.1 样品处理

检测单位收到活鱼样品后，将 150 尾鱼随机分成小样，每个小样取 15 尾鱼组织（鳃、肾、脾、肝），且每个小样均需检测。送检的组织样品可直接进行检测。如果不能在收到样品后立即进行检测，应及时将样品放置-20℃冷冻保存。

9.2 病原检测

参考鲤疱疹病毒检测方法第1部分：锦鲤疱疹病毒（SC/T 7212.1-2011）进行取样、检测。

9.3 测序

对阳性样品，检测单位应将阳性样品进行核酸测序。阳性样品保存应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》进行处理。

9.4 检毕样品处理

应做好实验室管理和留样等工作，并按SC/T 7015的要求对阳性样品等进行无害化处理。

9.5 检测记录

9.5.1 检测单位应对样品的处理、检测、保存和处置以及环境监控、消毒等影响结果有效性的环节进行实时记录，确保信息真实并满足可追溯要求。

9.5.2 检测单位应保存检测过程中形成的各种数据、文字、图表、声像等原始资料。

10 监测信息的汇交

10.1 采样单位应将监测点信息和采样信息提交至监测计划下达机构。承担国家水生动物疫病监测计划的采样单位应将《监测点备案表》、《现场采样记录表》上传至国家水生动物疫病监测信息管理系统。

10.2 检测单位应在接收样品后 30 d 内完成检测，按附录 B.4 的要求编制《检测报告》。委托检测单位收到报告后，按监测计划程序反馈至相应各级水生动物疫控机构和相关监测点。承担国家水生动物疫病监测计划的检测单位应将检测结果（含阳性样品核酸测序结果）以及其它相关信息上传至国家水生动物疫病监测信息管理系统。

10.3 检测结果为阳性时，水生动物疫控机构应按附录 B.5 的要求填写《阳性检测结果报告》，上报本级渔业主管部门，同时及时按照国家规定程序开展复核确诊、追溯分析和无害化处理。

附录 A

(资料性)

锦鲤疱疹病毒病简介

A.1 病原学

锦鲤疱疹病毒病的病原是锦鲤疱疹病毒 (Koi herpesvirus, KHV), 为疱疹病毒目 (*Herpesvirales*) 异样疱疹病毒科 (*Alloherpesviridae*) 鲤疱疹病毒属 (*Cyprinivirus*) 成员。KHV 病毒颗粒为直径 167nm~200nm 的二十面体, 有囊膜, 对乙醚、紫外线、温度 (50℃ 以上 1min 即可失活) 均较为敏感。KHV 为线性双股 DNA 病毒, 基因组全长为 295kbp, 基因组共编码 164 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 包含其中 8 个末端重复 ORF。目前, 已完成全基因组测序的分离株有日本株 (KHV-J)、美国株 (KHV-U)、以色列株 (KHV-I) 以及在我国分离的 KHV-GZ11。

A.2 流行病学

A.2.1 易感宿主

锦鲤疱疹病毒病主要发病于锦鲤、鲤鱼及其普通变种。此外, 有研究表明, KHV 可能感染金鱼、草鱼、异育银鲫等其他鱼类, 不发病但可能作为一种传染源传播病毒。

A.2.2 易感条件: 鱼龄、季节、水温等

锦鲤疱疹病毒病一般发病于春秋季节, 高温夏季、低温冬季一般不发病。病毒最适增殖温度为 15℃~25℃, 低于 10℃ 或大于 30℃, 病毒不复制或病毒量很低, 当恢复至适宜水温时, 病毒再次大量增殖导致发病, 鱼苗和成鱼均可感染。

A.2.3 传染源、传播途径

传染源主要是患病或带毒的鲤鱼或锦鲤, 传播途径主要是水平传播, 也可能通过鱼卵进行垂直传播。

A.3 临床症状

病鱼常表现出食欲不振、呼吸困难; 如果在水泥池中发病, 会发现很多病鱼侧卧在水底, 尤其是进、排水口较多; 发病鱼体表黏液明显增多, 眼球凹陷, 鳃

丝发白褪色，肛门红肿，全身体表多处出血，尤其是鳍条基部严重出血；剖检后可见病鱼脾脏、肾脏明显肿大、肝脏易碎。



图 1 病鱼鳃组织



图 2 病鱼体表



图 3 眼球凹陷



图 4 肝脾肿大

附录 B

(规范性)

监测工作相关表格

B.1 监测点备案表

监测点备案信息按表B.1填写。

表 B.1 监测点备案表

_____省(区、市) _____病

监测点名称		备案编号	
监测点地址			
联系人		电话	
监测点 基本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场	
	养殖品种		
	监测品种		
养殖基 本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水	
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他	
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他	
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无	
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	

填报单位负责人：

(单位公章)

年 月

B.2 现场采样记录表

现场采样信息按表B.2填写。

表 B.2 现场采样记录表

监测点	名称			备案编号			
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
采样单位	名称						
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
样品信息	样品品种			样品编号			
	样品数量 尾			样品规格 cm			
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡					
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它					
	采样时 环境条件	水温 °C		盐度		pH	
监测点 签署	本次采样始终在本人授权下完成，上述记录经核实无误，确认以上各项记录的准确性。 负责人签字： 年 月 日			采样 单 位 签 署	本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。 采样人签字： 年 月 日		

_____病

B.3 采样标签

采样标签信息按表B.3填写。

表 B.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

B.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表B.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字:

年 月 日

表 B.5 阳性检测结果报告

阳性检出监测点信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积亩		采样日期	年 月 日
发病情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积亩		
		死亡情况		
		经济损失元		

鲤浮肿病监测技术规范

第一部分 采样和阳性场处置

1 监测点的设置

监测点应为本辖区内的所有鲤、锦鲤的国家级水产原良种场、省级水产原良种场、遗传育种中心、引育种中心,鲤、锦鲤重点苗种场,近 2 年内鲤浮肿病(CEVD)监测结果呈阳性的养殖场,有增殖放流需求的养殖场,以及其它应纳入监测的养殖场。采样单位填写《监测点备案表》(见附录 A.1)。

本规范中的监测点指一个独立的养殖场。

2 采样

2.1 准备

采样单位提前与监测点以及检测单位取得联系确定采样和送检时间;确定运载工具;准备《现场采样记录表》(见附录 A.2)、苗种专用运输袋、封口用尼龙绳或者橡皮筋、小型氧气罐、记号笔、标签纸、温度计、直尺、秤、工作服、手套、鞋套、消毒液等;空运样品(苗种)应准备检疫证明和确定舱位。

2.2 采样人员

采样人员须经过省级以上组织的采样技术培训。

2.3 采样对象

鲤、锦鲤。

2.4 采样水温

6-33℃可采样,在 20-27℃间优先采集样品。

2.5 采样规格

采集鱼苗、鱼种。

2.6 采样数量

每个监测点随机采集苗种 150 尾(粒)。优先采集有疑似病症的鱼。

2.7 采样

优先采集孵化车间内的苗种(含受精卵)。

孵化车间内采样时，随机采集孵化池（缸）数量不少于 10 个，共采集 150 尾作为一个样。如果孵化池（缸）数量小于或等于 10 个，则每个孵化池（缸）都要采集。

静水池塘采样时，随机采集养殖池数量不少于 10 个，共采集 150 尾作为一个样。养殖池数量小于或等于 10 个，则每个养殖池都要采集。

网箱养殖模式采样时，需采集最下游（在河流）或随机（在大水面）10 个养殖网箱内苗种，共采集 150 尾作为一个样。网箱数量小于或等于 10 个，则每个网箱都要采集。

工厂化养殖模式采样时，随机采集养殖池数量不少于 10 个，共采集 150 尾作为一个样。养殖池数量小于或等于 10 个，则每个养殖池都要采集。

2.8 采样记录

采样时需填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性。《现场采样记录表》一式三份，一份留被采样单位，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至承检单位。

2.9 采样频次

对国家级原良种场、省级原良种场、遗传育种中心、引育种中心、前两年阳性场每年采样 1-2 次，且 2 次采样间隔至少 1 个月，对其它类型养殖场，每年采样 1 次。

2.10 采样信息录入

采样单位及时将监测点信息录入国家水生动物疫病监测信息管理系统。

3 样品包装和运输

3.1 包装

用苗种专用运输袋充氧并打包，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封，并在其表面粘贴标签（至少要标明样品编号）。气温高时，需要在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒。

3.2 标签

包装好后每份样品及时加贴样采样标签（见附录 A.3），确保样品编号的唯一性。

3.3 运输

24 小时内样品安全运达指定检测实验室。本规范中**运输的样品仅指活鱼或濒死鱼**。

4 阳性场处置

由县级及以上渔业行政主管部门负责组织阳性场处置工作。

水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照国家规定程序执行相关处理，并及时将处置情况、处理现场照片或视频、相关文件等上报给辖区渔业主管部门，同时组织开展流行病学调查和病原溯源，养殖尾水须经消毒后才能排放。

及时将上述所有信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

第二部分 实验室检测及结果报告

5 检测方法

5.1 样品处理

检测单位收到样品后，将150尾（粒）鱼（受精卵）随机平均分成10个小样，1个小样取15尾鱼组织（体长 $\leq 4\text{cm}$ 的鱼取整条；体长 $4\text{cm}-6\text{cm}$ 的鱼苗取鳃；体长 $\geq 6\text{cm}$ 的鱼取鳃、肾）或15粒受精卵卵膜，按照《SC/T 7229-2019 鲤浮肿病诊断规程》进行处理，且10个小样均需检测。

5.2 检测方法

按照《SC/T 7229-2019 鲤浮肿病诊断规程》，仅采用8.3荧光PCR方法检测。荧光PCR方法检测阳性可判定为PCR阳性。

检测单位按照以下方法判定，即：

养殖的鲤或锦鲤出现临床症状，荧光PCR检测结果阳性，判定为CEVD阳性。

养殖的鲤或锦鲤无临床症状，荧光PCR检测结果阳性，判定为CEV核酸阳性。

6 检测结果报告

检测单位在接到样品后2周内完成检测，并向委托检测单位（各省级疫控机构）提供《检测报告》（见附录A.4）。省级疫控机构收到阳性检测报告后，应立即将

《阳性检测结果报告》（见附录A.5）上报同级渔业主管部门，同时将检测结果再通知相关养殖场和县级水生动物疫控机构。

检测单位及时将检测结果以及其它相关信息上传至国家水生动物疫病监测信息管理系统。

阳性样品保存按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》进行处理。

附录 A
(规范性)
监测工作相关表格

A.1 监测点备案表

监测点备案信息按表A.1填写。

表 A.1 监测点备案表

_____省(区、市)		_____病	
监测点名称		备案编号	
监测点地址			
联系人		电话	
监测 点基 本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场	
	养殖品种		
	监测品种		
养殖基 本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水	
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他	
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他	
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无	
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	

填报单位负责人：

(单位公章)

年 月

A.3 采样标签

采样标签信息按表A.3填写。

表 A.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 月 日

A.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表A.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字:

年 月 日

表 A.5 阳性检测结果报告

阳性 检出 监测 点 信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积 亩		采样日期	年 月 日
发病 情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积 亩		
		死亡情况		
	经济损失 元			

草鱼出血病检测技术规范

1 范围

本文件规定了草鱼出血病监测工作的通用要求，描述了对应的试验方法，给出了监测对象、监测点的设置、采样、样品包装和送样、实验室检测、检测结果报告和阳性场处置等内容。

本文件适用于参与水生动物疫病监测计划的渔业主管部门、水生动物疫病预防控制机构、水生动物疫病检测机构等进行草鱼出血病的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB/T 36190 草鱼出血病诊断规程

SC/T 7015 病死水生动物及病害水生动物产品无害化处理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 水生动物疫病监测计划 plan of aquatic animal disease surveillance

对水生动物疫病发生、流行等情况进行监测的工作任务，用以及时掌握我国重要水生动物疫病情况。国家级监测计划由农业农村部渔业主管部门制定，省级监测计划由省（自治区、直辖市）级渔业主管部门制定。

3.2 监测 surveillance

在一定范围内，针对某一特定水生动物群体，对于某种或多种疫病长期系统地观测，收集和分析疫病的动态分布和影响因素资料，跟踪疫病的发生、分布和变化趋势，并将信息及时上报和反馈，以便进一步开展调查研究，对疫病进行预警预报，提出有效防控对策和措施，从而达到防控疫病的目的。

3.3 监测点 surveillance spot

需要监测的独立的流行病学单元。

3.4 草鱼出血病 GCHD, grass carp haemorrhagic disease

由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)引起的、具有高度传染性和致死性的病毒性疾病。临床表现包括体色发黑,肌肉有点状或块状出血,口腔、鳃盖和鳍条基部出血(见附录A)。当前我国草鱼呼肠孤病毒流行毒株为基因型II型 GCRV。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMEM: 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

GCRV: 草鱼呼肠孤病毒 (Grass Carp Reovirus)

M199: M199 培养基 (M199 Medium)

MEM: 基础必须培养基 (Minimum Essential Medium)

RT-PCR: 逆转录-聚合酶链反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

5 监测对象

草鱼、青鱼等易感种类。

6 监测点设置

6.1 监测点应包括以下草鱼和青鱼等易感种类的养殖场:

- a) 国家级、省级原良种场和引育种中心;
- b) 近两年内GCRV监测结果呈阳性的养殖场。

6.2 监测点还可选择以下草鱼和青鱼等易感种类的养殖场:

- a) 从单一苗种场引种或引种产地检疫证明完整或能溯源的成鱼养殖场;
- b) 自繁自养或引种产地检疫证明完整的苗种场。

7 采样

7.1 采样要求

7.1.1 采样人员

应经过省级以上水生动物疫病预防控制机构（水产技术推广机构）组织的采样技术培训或了解相关采样要求的人员。

7.1.2 采样水温

20℃~33℃，优先选择25℃~28℃。

7.1.3 采样规格

应选择体长20 cm以下的草鱼或青鱼鱼种。

7.1.4 采样数量

依据GB/T 18088的规定，无临床症状的鱼，每个监测点随机采集苗种150尾；具有疑似临床症状的鱼，不少于30尾。优先采集具有临床症状的鱼。

7.1.5 采样频次

符合6.1的监测点，每年采样2次，且2次采样应间隔1个月以上；符合6.2的监测点，每年采样1次~2次，如果采样2次，2次采样应间隔1个月以上。

7.1.6 采样形式

7.1.6.1 活鱼样品

采集的活鱼样品装入活鱼运输袋，24 h内送检。

7.1.6.2 组织样品

脑、肝、脾和肾组织，每15尾鱼的组织等量混合在一起作为一个检测小样放置到50 mL离心管中，按1:5的比例（W/V）加入含50%甘油的磷酸盐缓存液或含50%甘油的M199、MEM、DMEM等细胞培养液，按2%比例加入浓度为1 000 IU/mL的青霉素和1 000 μg/mL的链霉素，并在离心管上标明样品编号和日期，在0℃~10℃ 48 h内运至检测实验室。

也可以采用质量相当的商品化组织保存液，按照试剂盒说明书操作。

7.2 采样程序

7.2.1 采样准备

采样单位应提前与监测点及样品检测单位确定采样和送检时间，同时按附录B.1的要求填写《监测点备案表》，承担国家水生动物疫病监测计划的采样单位应将监测点信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

按附录B.2的要求，确定采样人员、运载工具、准备采样工具、容器和《现场采样记录表》等。

7.2.2 采样实施

7.2.2.1 孵化车间

随机采集孵化池（缸）数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。如果孵化池（缸、环道）数量小于或等于10个，则每个孵化池（缸、环道）都要采集。

7.2.2.2 养殖场

随机采集养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。如果养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量小于或等于10个，则每个养殖单元都要采集。

7.2.3 采样记录

采样时需按附录B.2的要求填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性，并提供采样影像资料。《现场采样记录表》一式三份，一份由监测点留存，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至检测单位。

同时，采样单位应将采样信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

8 样品包装和送样

8.1 包装

8.1.1 活鱼样品

用活鱼运输袋充氧并打包，在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封。

8.1.2 组织样品

用自封袋包装后放入泡沫箱中，同时在泡沫箱里加适量的冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封。

8.2 标签

包装好后每份样品及时加贴采样标签，标签应符合附录B.3的要求。

8.3 运输

活鱼样品24h内，组织样品48h内运达指定检测实验室。

9 实验室检测

9.1 样品处理

活鱼样品，将样品随机分成小样，每个小样取15尾鱼组织（脑、肝、脾、肾），且每个小样均需检测；组织样品，直接进行检测。

9.2 病原检测

检测单位按附录 C 的要求进行检测和鉴定。

检测单位应做好实验室管理、病原体保存和无害化处理等工作。

10 检测结果报告

10.1 检测单位在接到样品后3周内完成检测，按附录B.4的要求向委托检测单位（各省级水生动物疫控机构）提供《检测报告》，并将检测结果、阳性样品核酸序列以及其它相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

10.2 省级水生动物疫控机构应将检测结果上报本级渔业主管部门，并及时反馈相关养殖场和县级水生动物疫控机构。如果检测结果为阳性，应按附录B.5的要求填写《阳性检测结果报告》，并上报本级渔业主管部门。

11 阳性场处置

省级水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照 SC/T 7015 的规定执行相关处理，组织开展流行病学调查和病原溯源工作，及时将相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

附录 A
(资料性)
草鱼出血病简介

A.1 病原学

草鱼出血病的病原为草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus, GCRV), 属呼肠孤病毒科、刺突病毒亚科、水生呼肠孤病毒属。GCRV基因组由11条分节段的双链RNA组成, 11个片段可分为3组, 即3条大片段 (L1、L2、L3)、3条中等片段 (M4、M5、M6) 和5条小片段 (S7、S8、S9、S10、S11)。GCRV病毒粒子为二十面体和5: 3: 2对称的球形颗粒, 直径为60 nm~80nm, 具双层衣壳, 无囊膜; 病毒耐酸 (pH3)、耐碱 (pH10)、耐热 (56℃), 对氯仿不敏感。GCRV不同分离株表现出基因组带型、基因组序列、宿主致病性、细胞敏感性等方面的明显差异。由于水生呼肠孤病毒至今尚未建立标准血清型, 还无法进行血清学分型。根据基因组带型和序列差异, GCRV至少分成三个基因型, 代表株分别是873 (I型)、HZ08 (II型) 和104 (III型)。目前我国能够引起草鱼出血病, 造成重大经济损失的流行毒株为基因II型GCRV, 对宿主致病性强, 但对细胞敏感性较差, 在已有细胞中增殖不产生明显的细胞病变。

A.2 流行病学

A.2.1 易感宿主

自然情况下, 养殖草鱼、青鱼都可发病, 尤其是草鱼苗种和当年龄的小草鱼; GCRV也可感染稀有鮡鲫和麦穗鱼, 导致其发病并大量死亡; 此外, GCRV还能感染鲢、鳙、鲫、鲤等淡水鱼类, 不发病但携带病毒, 可能作为一种传染源传播病毒。

A.2.2 易感条件: 鱼龄、季节、水温等

每年4月下旬至10月底是草鱼出血病主要流行季节。草鱼出血病主要危害两个阶段的草鱼, 第一个发病高峰期是5月初到7月初 (南方部分地区提前到4月下旬), 主要危害前一年春季投放的夏花鱼种经过一年饲养并越冬以后的春片鱼种, 并造

成大量死亡；第二个高峰期是9月份到10月份，主要侵害当年草鱼种，死亡率可达90%以上。发病水温在20℃~30℃，25℃~28℃为流行高峰。

A. 2.3 传染源、传播途径

传染源是已经患病的或带毒的草鱼，主要传播途径是水平传播，也可能通过卵进行垂直传播。

A. 3 临床症状

患病初期，病鱼离群独游水面，反应迟钝，摄食减少或停止。从外表症状上看，病鱼体色一般暗黑色或微红。按其症状表现和病理变化的差异，大致可分为三个类型，病鱼可以有其中一种或几种临床症状。①红肌肉型（见图A.1）：主要症状为肌肉明显出血，全身肌肉呈鲜红色，鳃丝因严重出血而苍白，多见于5cm~10cm的小草鱼种；②红鳍红鳃盖型（见图A.2）：主要症状为鳍基、鳃盖严重出血，头顶、口腔、眼眶等处有出血点，多见于10cm以上的较大草鱼种；③肠炎型（见图A.3）：主要症状为肠道严重充血，肠道全部或局部呈鲜红色，内脏点状出血，体表亦可见到出血点，在各种规格的草鱼种中均可见到。



图A.1红肌肉型



图A.2 红鳍红鳃盖型



图A.3 肠炎型

附录 B
(规范性)
监测工作相关表格

B.1 监测点备案表

监测点备案信息按表B.1填写。

表 B.1 监测点备案表

_____省(区、市)		_____病	
监测点名称		备案编号	
监测点地址			
联系人		电话	
监测点基本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场	
	养殖品种		
	监测品种		
养殖基本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水	
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他	
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他	
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无	
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	

填报单位负责人：

(单位公章)

年 月

B.3 采样标签

采样标签信息按表B.3填写。

表 B.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

B.4 检测报告

B.4规定了检测报告至少应包含的要素，格式见示例1。

示例1：

检测报告

[报告编号、报告版次、页码]

声明：

- 1.本检测报告经批准人、审核人、编制人签字并加盖本单位检测专用章后生效。
- 2.未经本单位书面批准，不得复制本报告。
- 3.委托检测结果仅对收到样品负责。
- 4.对检测报告如有异议，请在收到报告之日起十五日内向本单位提出，逾期不予受理。

1.委托检测单位

单位名称：

单位地址：

2.样品信息

监测点名称：

监测点地址：

采样日期：

样品状态：活体 冷冻 冰鲜 乙醇 其它

样品品种：

样品编号：

样品规格：

样品数量：

注：监测点名称、监测点地址、采样日期、样品品种及样品编号等信息均由委托检测单位提供。

3.检测信息

收样日期：

检测日期：

检测项目及方法：

4.检测结果：

*注：测序工作分包给****公司完成。

编制人：

审核人：

×××检测机构名称（章）

批准人：

年 月 日

B.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表B.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)_____

负责人签字: _____ 年 月 日

表 B.5 阳性检测结果报告

阳性 检出 监测 点 信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积 亩		采样日期	年 月 日
发病 情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积 亩		
		死亡情况		
		经济损失 元		

附录 C

(规范性)

草鱼呼肠孤病毒实验室检测流程

C.1 总则

基因II型草鱼呼肠孤病毒采用套式PCR方法进行检测和序列分析。上述检测和序列分析确认为阳性的样品，可出具检测报告。

C.2 样品处理

按 GB/T 36190 的规定执行，体长 ≤ 4 cm 的鱼苗去尾后取整条（尾）鱼；体长为 4cm ~ 6cm（含）的鱼，取脑、内脏（包括肾）；体长 > 6 cm 的鱼，则取脑、心脏、肾、脾、鳃、肠道、肌肉等组织。

C.3 套式RT-PCR检测

C.3.1 套式RT-PCR引物

GCRV-II Nest-SP: 5'-CGC GAT TTC ATA CCC TTT CT-3'

GCRV-II Nest-OutP: 5'-TAG CTG CCG TAC TTG GGA TGA-3'

GCRV-II Nest-InP: 5'-CAT ACG ATC GCT CCC AAC TCC-3'

C.3.2 核酸提取

取不超过 100 mg 待检组织样品置于匀浆器中，加入 1 mL Trizol 试剂，充分研磨，室温放置 5 min；加入 200 μ L 三氯甲烷，旋涡振荡 30 s 混匀，室温放置 15 min；12 000 g 离心 10 min；取上层水相至一新的离心管中，加等体积异丙醇，上下颠倒数次混匀， -20 $^{\circ}$ C 放置 20 min；12 000g 离心 10 min；弃上清液，沉淀用 1 mL 75%乙醇清洗；8 000 g 离心 10 min，弃上清液，沉淀室温干燥 5 min；加 20 μ L DEPC 水溶解 RNA 沉淀。 4° C 冰箱保存备用，RNA 溶液应避免反复冻融，并尽快用于检测。

也可以采用质量相当的商品化 RNA 提取试剂盒，按照说明书进行操作。

C.3.3 cDNA模板制备

逆转录时取 6 μ L RNA，加入 20 μ mol/L 下游引物 Nest-OutP 1 μ L， 70° C 水浴 5 min。冰浴 2 min 后，依次加入 5 \times 逆转录酶缓冲液 4 μ L，dNTPs（10 n mol/L）

1 μ L, DTT (0.1 mol/L) 2 μ L, M-MLV 逆转录酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, DEPC 水 5 μ L。混匀后, 置 PCR 仪上 37 °C 反应 30 min 合成 cDNA, 85°C 灭活 5 min 后进行 PCR 或置-20°C 保存。

cDNA 模板制备也可以根据不同商品化试剂盒说明书操作。

C. 3. 4 套式RT-PCR反应

第一步反应: 在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中, 按每个样品25 μ L 扩增体系配置, 包括10 \times 缓冲液2.5 μ L、10 mmol/L 的dNTPs 0.5 μ L、5 U/ μ L Taq酶0.5 μ L、20 μ mol/L上游引物(GCRV-II Nest-SP)和下游引物(GCRV-II Nest-OutP)各0.5 μ L、双蒸水18 μ L、cDNA模板2.5 μ L。同时设置不含cDNA模板的空白对照、阳性对照和阴性对照, 检测体系配制方法相同。扩增程序: 95°C 3min; 95°C30s, 56°C 30s, 72°C 30s, 共35个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保存。

第二步反应: 在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中, 按每个样品25 μ L 扩增体系配置, 包括10 \times 缓冲液2.5 μ L、10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L、5 U/ μ L Taq酶0.5 μ L、20 μ mol/L上游引物 (GCRV-II Nest-SP) 和下游引物 (GCRV-II Nest-InP) 各0.5 μ L、模板加第一步反应产物1-5 μ L, 双蒸水补齐到25 μ L。扩增程序: 95°C 3min; 95°C 30s, 56°C 30s, 72°C 30s, 共35个循环; 72°C 10 min, 4 °C保存。

具有同样扩增效率的商业化一步法RT-PCR试剂盒也同样适用。

C. 3. 5 琼脂糖电泳

用TBE电泳缓冲液配制1.5%的琼脂糖平板。将平板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将5 μ L扩增产物和适量加样缓冲液混合后加入孔内。在电泳时使用核酸分子量标准参照物作对照。110 V恒压下电泳30 min~45 min。当溴酚兰到达琼脂糖凝胶的底部时停止。将电泳好的凝胶放到紫外投射仪或凝胶成像系统上观察结果并拍照, 进行判定并记录。

C. 3. 6 结果判定

用紫外照射仪或用凝胶成像仪观察扩增带并判断结果。

若阳性对照出现一条相对应大小的DNA条带, 阴性对照和空白对照无扩增条带, 实验有效。

待测样品第一步扩增出现408 bp或第二步扩增出现363 bp大小条带, 并经测序验证, 结果判定为阳性; 待测样品第二次PCR扩增无条带或者在363 bp大小位置上无条带, 则判定为阴性。

鲫造血器官坏死病监测技术规范

第一部分 采样和阳性场处置

1 监测点的设置

监测点（养殖场）应为本辖区内所有金鱼、鲫及其变种鱼类的国家级原良种场、省级原良种场、县级以上苗种场、观赏鱼苗种场、遗传育种中心、引育种中心、近两年内鲤疱疹病毒II型（Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2）监测结果呈阳性的养殖场以及其他应纳入监测的养殖场。监测点填写《监测点备案表》（附录 A.1）本规范中的监测点指一个独立的养殖场。

2 采样

2.1 准备

采样单位提前与监测点以及检测单位取得联系确定采样和送样时间；确定运载工具；准备《现场采样记录表》（附录 A.2）、苗种专用运输袋、封口用尼龙绳或橡皮筋、小型氧气罐、记号笔、标签纸、温度计、直尺、秤、pH 计、工作服、手套、鞋套、消毒液等；空运样品（苗种）应准备检疫证明和确定舱位。

2.2 采样人员 采样人员应经过省级以上水生动物疫病预防控制机构（水产技术推广机构）组织的采样技术培训或了解相关采样要求的人员。

2.3 采样对象 金鱼、鲫及其变种鱼类。

2.4 采样水温 10℃~33℃，优先选择 22℃~28℃。

2.5 采样规格 采集鱼苗或鱼种。

2.6 采样数量 每个监测点随机采活鱼150尾，优先采集有疑似病症个体。

2.7 采样

2.7.1 活鱼采集

在孵化池内采样，每个池都要采集，一个监测点共采集150尾作为一个样。

在孵化桶（缸）内采样时，随机采集孵化桶（缸）数量不少于20个，共采集150尾作为一个样；如果孵化桶（缸）数量少于或等于20个，则每个孵化桶（缸）都要采集。

2.7.2 组织样采集

有条件的省市可在当地实验室取150尾活鱼的脾和肾，按1: 5 PBS的比例研磨后，分装离心管中进行干冰运输，确保在72小时内送至检测实验室。

也可以采用质量相当的商品化组织保存液，按照试剂盒说明书操作。

2.8 采样记录 采样时需填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性。《现场采样记录表》（附录 A.2）一式三份，一份留被采样单位，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至承检单位。

2.9 采样频次 对国家级原良种场、省级原良种场、遗传育种中心、引育种中心、县级以上苗种场前两年阳性场每年采样2次，且2次采样间隔至少一个月，对其他类型养殖场，每年监测1次。

2.10 采样信息录入 采样单位及时将监测点信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

3 样品包装和送样

3.1 包装 用苗种专用运输袋充氧并打包，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封，并在其表面粘贴标签（至少要表明样品编号）。气温高时，需要在包装袋外加冰袋或冰冻瓶装水等冷媒。

最终目的以不泄漏、不交叉污染、保证样品的存活为基本原则。包装内的《现场采样记录表》要用聚乙烯袋封装防水。空运包装应符合《GB/T 26544-2011 水产品航空运输包装通用要求》要求。

3.2 标签 包装好后每份样品及时加贴采样标签（附录A.3），确保样品编号的唯一性。

3.3 运输 24小时内样品安全运达指定检测实验室。

4 阳性场处置

由县级及以上渔业行政主管部门负责组织阳性场处置工作。

水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照国家规定程序执行相关处理，并及时将处置情况、处理现场照片或视频、相关文件等上报给辖区渔业主管部门，同时组织开展流行病学调查和病原溯源，养殖尾水须经消毒后才能排放。

及时将上述所有信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

第二部分 实验室检测及结果报告

5 检测方法

5.1 样品处理

检测单位收到样品后，将150尾鱼随机平均分成10-15个小样，一个小样取10-15尾鱼相应病毒敏感性组织（脾脏、肾脏），小计10-15个小样，按照《GB/T 36194-2018 金鱼造血器官坏死病毒检测方法》进行处理，且10-15个小样均需检测。

5.2 检测方法

按照《GB/T 36194-2018 金鱼造血器官坏死病毒检测方法》中8-9步骤进行检测和结果判定。

对阳性样品，检测单位需将阳性样品进行核酸测序并上传国家水生动物疫病监测信息管理系统。

6 检测结果报告

在接到样品后2周内完成检测，并向委托检测单位（各省级疫控机构）提交《检测报告》（见附录A.4）。省级疫控机构收到阳性检测报告后，应立即将《阳性检测结果报告》（附录A.5）上报同级渔业主管部门，同时将检测结果再通知相关养殖场和县级水生动物疫控机构。

检测单位及时将检测结果、阳性样品核酸序列以及其它相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

阳性样品保存按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》进行处理。

附 录 A
(规范性)
监测工作相关表格

A.1 监测点备案表

监测点备案信息按表A.1填写。

表 A.1 监测点备案表

_____省（区、市） _____病

监测点名称			备案编号	
监测点地址				
联系人			电话	
监测点基 本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种			
	监测品种			
养殖基 本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水		
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他		
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他		
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无		
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购		
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购		

填报单位负责人：

（单位公章）

年 月

A.2 现场采样记录表

现场采样信息按表A.2填写。

表 A.2 现场采样记录表

		_____病					
监测点	名称			备案编号			
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
采样单位	名称						
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
样品信息	样品品种			样品编号			
	样品数量 尾			样品规格 cm			
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡					
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它					
	采样时 环境条件	水温 ℃		盐度		pH	
监测点签署	本次采样始终在本人授权下完成，上述记录经核实无误，确认以上各项记录的准确性。 负责人签字：_____ 年 月 日			采样单位签署 采样人签字：_____ 年 月 日	本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。		

A.3 采样标签

采样标签信息按表A.3填写。

表 A.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

A.4 检测报告

A.4规定了检测报告至少应包含的要素，格式见示例1。

示例1：

检测报告

[报告编号、报告版次、页码]

声明：

- 1.本检测报告经批准人、审核人、编制人签字并加盖本单位检测专用章后生效。
- 2.未经本单位书面批准，不得复制本报告。
- 3.委托检测结果仅对收到样品负责。
- 4.对检测报告如有异议，请在收到报告之日起十五日内向本单位提出，逾期不予受理。

1.委托检测单位

单位名称：

单位地址：

2.样品信息

监测点名称：

监测点地址：

采样日期：

样品状态：活体 冷冻 冰鲜 乙醇 其它

样品品种：

样品编号：

样品规格：

样品数量：

注：监测点名称、监测点地址、采样日期、样品品种及样品编号等信息均由委托检测单位提供。

3.检测信息

收样日期：

检测日期：

检测项目及方法：

4.检测结果：

*注：测序工作分包给****公司完成。

编制人：

审核人：

×××检测机构名称（章）

批准人：

年 月 日

A.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表A.5填写。

阳性检测结果报告

（渔业行政主管部门名称）：

我省（××市××区）××养殖场，由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病（或近年国内新发疫病）；详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

（机构名称）

负责人签字：

年 月 日

表 A.5 阳性检测结果报告

阳性 检出 监测 点 信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积 亩		采样日期	年 月 日
发病 情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积 亩		
		死亡情况		
		经济损失 元		

传染性造血器官坏死病监测技术规范

第一部分 采样和阳性场处置

1 监测点的设置

监测点（养殖场）应为本辖区内所有鲑鳟鱼类的国家级原良种场、省级原良种场、遗传育种中心、引育种中心、年产卵 20 万粒或鱼苗 10 万尾的苗种场、近两年内传染性造血器官坏死病毒（IHNV）监测结果呈阳性的养殖场以及其它应纳入监测的养殖场。抽样单位填写《监测点备案表》（见附录 A.1）

本规范中的监测点指一个独立的养殖场。

2 采样

2.1 准备

采样单位提前与监测点以及检测单位取得联系确定采样和送检时间；确定运载工具；准备《现场采样记录表》（见附录 A.2）、苗种专用运输袋、封口用尼龙绳或者橡皮筋、小型氧气罐、记号笔、标签纸、温度计、直尺、秤、工作服、手套、鞋套、消毒液等；空运样品（苗种）应准备检疫证明和确定舱位。

2.2 采样人员 采样人员须经过省级以上组织的采样技术培训。

2.3 采样对象 鲑鳟鱼。若一个监测点养殖多种鲑鳟鱼，优先采集虹鳟（含金鳟）。

2.4 采样水温 4-18℃。

2.5 采样规格 6月龄以内的苗种（含受精卵）。

2.6 采样数量 每个监测点随机采集苗种150尾（粒）。优先采集有疑似病症的鱼。

2.7 采样 优先采集孵化车间内的苗种（含受精卵）。

孵化车间内采样时，随机采集孵化池（缸）数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。如果孵化池（缸）数量小于或等于10个，则每个孵化池（缸）都要采集。

工厂化养殖模式采样时，随机采集养殖池数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。养殖池数量小或等于10个，则每个养殖池都要采集。

流水养殖模式采样时，需采集最下游10个养殖池的苗种，共采集150尾作为一个样。如果养殖池数量小于或等于10个，则每个养殖池都要采集。

网箱养殖模式采样时，需采集最下游（在河流）或随机（在大水面）10个养殖网箱内苗种，共采集150尾作为一个样。如果网箱数量小于或等于10个，则每个网箱都要采集。

本规范中采样仅指采集活鱼或濒死鱼。

2.8 采样记录 采样时需填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性。《现场采样记录表》一式三份，一份留被采样单位，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至承检单位。

2.9 采样频次 对国家级原良种场、省级原良种场、遗传育种中心、引育种中心、前两年阳性场每年采样1-2次，且2次采样间隔至少1个月，对其它类型养殖场，每年采样1次。

2.10 采样信息录入 采样单位及时将监测点信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

3 样品包装和送样

3.1 包装 用苗种专用运输袋充氧并打包，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封，并在其表面粘贴标签(至少要标明样品编号)。气温高时，需要在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒。

3.2 标签 包装好后每份样品及时加贴样采样标签（见附录A.3），确保样品编号的唯一性。

3.3 运输 24小时内样品安全运达指定检测实验室。本规范中样品仅指采集的活鱼或濒死鱼；不得采集鱼组织运输。

4 阳性场处置

由县级及以上渔业行政主管部门负责组织阳性场处置工作。

水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照国家规定程序执行相关处理，并及时将处置情况、处理现场照片或视频、相关文件等上报给辖区渔业主管部门，同时组织开展流行病学调查和病原溯源，养殖尾水须经消毒后才能排放。

及时将上述所有信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

第二部分 实验室检测及结果报告

5 检测方法

5.1 样品处理

检测单位收到样品后，将150尾（粒）鱼（受精卵）随机平均分成10个小样，1个小样取15尾鱼组织（肝、脑、脾、肾）或15粒受精卵卵膜，按照《GB/T15805.2-2017 传染性造血器官坏死病诊断规程》进行处理，且10个小样均需检测。

5.2 检测方法

按照《GB/T15805.2-2017 传染性造血器官坏死病诊断规程》中8.1和8.2进行检测和结果判定。

对阳性样品再进行核酸测序。

6 检测结果报告

检测单位在接到样品后3周内完成检测，并向委托检测单位（各省级疫控机构）提供《检测报告》（见附录A.4）。省级疫控机构收到阳性检测报告后，应立即将《阳性检测结果报告》（见附录A.5）上报同级渔业主管部门，同时将检测结果再通知相关养殖场和县级水生动物疫控机构。

检测单位及时将检测结果、阳性样品核酸序列以及其它相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

阳性样品保存按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》进行处理。

附录 A
(规范性)
监测工作相关表格

A.1 监测点备案表

监测点备案信息按表A.1填写。

表 A.1 监测点备案表

省（区、市）		病
监测点名称		备案编号
监测点地址		
联系人		电话
监测点 基本 信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场
	养殖品种	
	监测品种	
养殖基 本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购

填报单位负责人：

（单位公章）

年 月

A.2 现场采样记录表

现场采样信息按表A.2填写。

表 A.2 现场采样记录表

病

监测点	名称		备案编号	
	通讯地址		邮编	
	联系人		电话	
采样单位	名称			
	通讯地址		邮编	
	联系人		电话	
样品信息	样品品种		样品编号	
	样品数量 尾		样品规格 cm	
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡		
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它		
	采样时 环境条件	水温 ℃	盐度	pH
监测点 签署	本次采样始终在本人授权下完成，上述记录经核实无误，确认以上各项记录的准确性。 负责人签字： 年 月 日		采样 单 位 签 署 本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。 采样人签字： 年 月 日	

A.3 采样标签

采样标签信息按表A.3填写。

表 A.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

A.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表A.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字:

年 月 日

表 A.5 阳性检测结果报告

阳性检出监测点信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积亩		采样日期	年 月 日
发病情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积亩		
		死亡情况		
	经济损失元			

传染性胰脏坏死病监测技术规范

第一部分 采样和阳性场处置

1 监测点的设置

监测点（养殖场）应为本辖区内所有鲑鳟鱼类的国家级原良种场、省级原良种场、引育种中心、年产卵 20 万粒或鱼苗 10 万尾以上的苗种场、近两年内传染性胰脏坏死病毒（IPNV）监测结果呈阳性的养殖场以及其它应纳入监测的养殖场。抽样单位填写《监测点备案表》（附录 A.1）。

本规范中的监测点指一个独立的养殖场。

2 采样

2.1 准备

采样单位提前与监测点以及检测单位取得联系确定采样和送检时间；确定运载工具；准备《现场采样记录表》（附录 A.2）、苗种专用运输袋、封口用尼龙绳或者橡皮筋、小型氧气罐、记号笔、标签纸、温度计、直尺、秤、工作服、手套、鞋套、消毒液等；空运样品（苗种）应准备水产苗种产地检疫证明和确定舱位。

2.2 采样人员

采样人员须经过省级以上组织的采样技术培训。

2.3 采样对象

鲑鳟鱼。若一个监测点养殖多种鲑鳟鱼，优先采集虹鳟（含金鳟）。

2.4 采样水温

4°C~18°C。

2.5 采样规格

6月龄以内的苗种（含受精卵）。

2.6 采样数量

每个监测点随机采集苗种150尾（粒）。优先采集有疑似病症的鱼。

2.7 采样

优先采集孵化车间内的苗种（含受精卵）。

孵化车间内采样时，随机采集孵化池（缸）数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。如果孵化池（缸）数量小于或等于10个，则每个孵化池（缸）都要采集。

工厂化养殖模式采样时，随机采集养殖池数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。养殖池数量小或等于10个，则每个养殖池都要采集。

流水养殖模式采样时，需采集最下游10个养殖池的苗种，共采集150尾作为一个样。如果养殖池数量小于或等于10个，则每个养殖池都要采集。

网箱养殖模式采样时，需采集最下游（在河流）或随机（在大水面）10个养殖网箱内苗种，共采集150尾作为一个样。如果网箱数量小于或等于10个，则每个网箱都要采集。

本规范中**采样仅指采集活鱼或濒死鱼**。

2.8 采样记录

采样时需填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性。《现场采样记录表》一式三份，一份留被采样单位，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至承检单位。

2.9 采样频次

对国家级原良种场、省级原良种场、引育种中心、前两年阳性场每年采样2次，且2次采样间隔至少1个月，对其它类型养殖场，每年采样1次。

2.10 采样信息录入

采样单位及时将监测点信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

3 样品包装和送样

3.1 包装

用苗种专用运输袋充氧并打包，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封，并在其表面粘贴标签（至少要标明样品编号）。气温高时，需要在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒。

3.2 标签

包装好后每份样品及时加贴采样标签（见附录A.3），确保样品编号的唯一性。

3.3 运输

尽快将样品安全运达指定检测实验室。本规范中样品仅指采集的活鱼或濒死鱼；不得采集鱼组织运输。

4 阳性场处置

省级水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照国家规定程序执行相关处理，组织开展流行病学调查和病原溯源，养殖尾水消毒后方可排放。及时将上述所有信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

第二部分 实验室检测及结果报告

5 检测方法

5.1 样品处理

检测单位收到样品后，将150尾（粒）鱼（受精卵）随机平均分成10个小样，1个小样取15尾鱼组织（体长大于6cm取：肝、脑、脾、肾。体长4-6cm取：包括肾在内的内脏。体长小于4cm取：整条。成熟雌鱼取：卵巢液）或15粒受精卵卵壳。且10个小样均需检测。

应在10℃以下进行。将样品组织研磨匀浆后，和细胞培养液（含1000单位双抗/ml）按1:10混合，调pH值到8以释放病毒。2-8℃下孵育过夜。4℃下8000rpm离心15min，收集上清液。卵巢液则不必匀浆，稀释2倍以上。用相同的方法离心卵巢液样品，并在以后的步骤中直接用其上清液。

5.2 细胞分离病毒

对上述1:10的组织匀浆上清液用细胞培养液继续再做2次10倍稀释。然后将这1:10、1:100、1:1000的三种稀释度的上清液，用无菌操作方法，分别接种到生长12h-24h的CHSE-214、RTG-2或PG细胞单层中，应优先选用CHSE-214细胞。每孔细胞单层以接种100μl为宜。置于18±2℃培养。

阳性对照组、阴性对照组和待测样品都接种细胞后，7d内每天用40倍倒置显微镜观察是否出现细胞病变（CPE）。如果除阳性对照细胞外，没有CPE出现，则在培养7d后还要用敏感细胞进行再传代培养（盲传）。传代时，冻融并收集接种了组织匀浆上清稀释液的细胞单层培养物。4℃下8000rpm离心15min，收集上

清液，接种到新鲜细胞单层，培养7d。每天用40倍倒置显微镜观察是否出现细胞病变（CPE）。如样品经过接种细胞和盲传后均没有CPE出现，则结果判为阴性。如有CPE出现，按5.3中规定的任一方法进一步鉴定是否由IPNV引起。

如果阳性对照组也未出现CPE，则试验无效，应采用敏感细胞和一批新的组织样品重新按上述方法进行检测。

5.3 IPNV鉴定

5.3.1 中和试验

按《GB/T15805.1-2008 鱼类检疫方法 第1部分：传染性胰脏坏死病毒（IPNV）》中“6 IPNV的鉴定I：中和试验”。

5.3.2 ELISA法

按《GB/T15805.1-2008 鱼类检疫方法 第1部分：传染性胰脏坏死病毒（IPNV）》中“7 IPNV的鉴定II：ELISA法”。

5.3.3 RT-PCR检测

5.3.3.1 引物序列

F: 5'-CAAGGCAACCGCAACYTACT-3'

R: 5'-ATKGCAGCTGTGCACCTCAT-3'

扩增IPN病毒株中的585bp片段。

5.3.3.2 核酸提取

取待测的细胞悬液；或不超过100mg待测组织样品置于匀浆器中，加入1ml Trizol试剂，充分研磨，静置5min；加入200μl氯仿，颠倒混匀，静置15min，4℃12000rpm离心15min；小心取上层水相，体积不少于500μl；加入等体积异丙醇，颠倒混匀，-20℃下静置5min~10min，4℃12000rpm离心15min；弃上清，加入1ml 75%的乙醇，颠倒混匀，4℃，12000rpm离心10min；弃上清，室温干燥5min，加入10μl DEPC水，吹打数次后室温下溶解5min，作为RT-PCR扩增模板，同时取正常阴性组织作为阴性对照。

也可采用等效的商品化RNA提取试剂盒。

5.3.3.3 cDNA合成

在 PCR 管中，加入 10 μ l 模板、2.5 μ l 反向引物 R（40pmol/ μ l）、2.5 μ l DEPC 水，总体积为 15 μ l，70 $^{\circ}$ C 反应 5min，立即冰浴，低速离心约 5s，使液体集中在底部。冰上操作：在上述反应管中继续加入 5 μ l 逆转录酶缓冲液（5 倍浓缩液）、2 μ l dNTP（10mmol/L）、0.5 μ l RNA 酶抑制剂（20U）、1 μ l AMV 逆转录酶（10U/ μ l）和 1.5 μ l DEPC 水，总体积为 25 μ l。42 $^{\circ}$ C 反应 60min 以合成模板的 cDNA。同时取 DEPC 水作为空白对照。

也可采用等效的商品化 cDNA 合成试剂盒，或在 5.3.3.4 中采用等效的商品化一步法 RT-PCR 试剂盒，省略 cDNA 合成步骤。

（备注：IPNV 是双链 RNA 病毒，解链时需特别注意，否则易造成假阴性）

5.3.3.4 PCR 扩增

在上述反应管中加入 8 μ l Taq 酶浓缩缓冲液（10 倍浓缩液）、8 μ l 氯化镁溶液（25mmol/L）、2 μ l dNTP（10mmol/L）、2 μ l 正向引物 F（40pmol/ μ l）、2 μ l 反向引物 R（40pmol/ μ l）、1 μ l Taq 酶（5U/ μ l），加 DEPC 水至总体积为 100 μ l。混匀后短时间低速离心使试剂集中在底部，将反应管置于 PCR 扩增仪。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min；94 $^{\circ}$ C 1min，50 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 1min，35 循环；72 $^{\circ}$ C 8min，最后 4 $^{\circ}$ C 保温。

也可采用等效的商品化 PCR 试剂盒。

5.3.3.5 结果判定

用 TBE 电泳缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖平板。将 5 μ L 扩增产物和适量上样缓冲液混匀后加入样品孔，在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照。5 V/cm 电泳约 0.5h，当溴酚兰到达底部时停止，将凝胶置于凝胶成像仪上观察。

RT-PCR 扩增后，阳性对照会出现特异的 DNA 带，阴性对照和空白对照均没有该条带，反应成立。待测样品经 RT-PCR 扩增有特异的 DNA 带（585bp），并经基因测序并比较后确定是 IPNV 的，可判为阳性；未扩增出条带的，或条带大小与特异的 DNA 带大小不一致，或经基因测序确定不是 IPNV 的，判为阴性。

5.3.4 RT-qPCR 检测

5.3.4.1 引物探针序列

qF:5'-ATACGTCCGCCTDGAGGA-3';

qR:5'-GGATGGGAGGTCGATYTC-3';
探针: 5'-FAM-GATGAGGTGCACAGCTGC-BHQ1-3';

5.3.4.2 核酸提取

按 5.3.3.2 操作。

5.3.4.3 cDNA合成

按 5.3.3.3 操作。

也可采用等效的商品化 cDNA 合成试剂盒，或采用等效的商品化一步法 RT-qPCR 试剂盒，省略 cDNA 合成步骤。

5.3.4.4 qPCR扩增

qPCR 反应管中加入:双蒸水 9.5 μ l、10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液(不含 Mg²⁺) 2 μ l、dNTPs(各 10mmol/L) 1 μ l、MgCl₂(25mmol/L) 1 μ l、引物 qR(20 μ mol/L) 1 μ l、引物 qF(20 μ mol/L) 1 μ l、探针(10 μ mol/L) 1.5 μ l、合成的 cDNA 2 μ l、Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l) 1 μ l。混匀，置于荧光定量 PCR 仪中。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 10min; 95 $^{\circ}$ C 10s、54 $^{\circ}$ C 35s, 40 个循环。每次循环收集一次荧光信号。

也可采用等效的商品化 qPCR 试剂盒或一步法 RT-qPCR 试剂盒。

5.3.4.5 结果判定

阴性对照和空白对照应无Ct值; 阳性对照Ct值<35, 且出现典型扩增曲线, 反应成立。待测样品Ct值 \leq 35且出现典型扩增曲线, 可判为阳性; 若待测样品无Ct值, 或无扩增曲线, 可判为阴性。待测样品Ct值>35, 应进行一次重复检测。若重复检测后结果相同, 可判为PCR阳性; 否则判为PCR阴性。

5.4 综合判定

经细胞培养出现CPE, 并经中和试验、ELISA、RT-PCR、RT-qPCR任一方法检测为阳性者, 判定为IPN阳性。

或直接用组织样品检测, 经中和试验或ELISA检测阳性, 同时RT-PCR或RT-qPCR检测阳性, 判定为IPN阳性。

6 检测结果报告

检测单位在接到样品后3周内完成检测, 并向委托检测单位(各省级疾控机构)提供《检测报告》(见附录A.4)。省级疾控机构收到阳性检测报告后, 应立即将

《阳性检测结果报告单》（见附录A.5）上报同级渔业主管部门，同时将检测结果再通知相关养殖场和县级水生动物疫控机构。

检测单位及时将检测结果、阳性样品核酸序列以及其它相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

阳性样品保存按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》进行处理。

备注：经细胞培养出现CPE，但中和试验、ELISA、RT-PCR、RT-qPCR检测为阴性者（IPN、IHN），送往农业农村部指定实验室进一步鉴定。

附录 A
(规范性)
监测工作相关表格

A.1 监测点备案表

监测点备案信息按表A.1填写。

表 A.1 监测点备案表

_____省（区、市）		_____病	
监测点名称		备案编号	
监测点地址			
联系人		电话	
监测点基本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场	
	养殖品种		
	监测品种		
养殖基本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水	
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他	
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他	
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无	
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购	

填报单位负责人：

（单位公章）

年 月

A.2 现场采样记录表

现场采样信息按表A.2填写。

表 A.2 现场采样记录表

_____病

监测点	名称			备案编号			
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
采样单位	名称						
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
样品信息	样品品种			样品编号			
	样品数量 尾			样品规格 cm			
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡					
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它					
	采样时 环境条件	水温 °C		盐度		pH	
监测点 签署	本次采样始终在本人授权下完成，上述记录经核实无误，确认以上各项记录的准确性。 负责人签字：_____ 年 月 日			采样 单 位 签 署	本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。 采样人签字：_____ 年 月 日		

A.3 采样标签

采样标签信息按表A.3填写。

表 A.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 月 日

A.4 检测报告

A.4规定了检测报告至少应包含的要素，格式见示例1。

示例1：

检测报告

[报告编号、报告版次、页码]

声明：

- 1.本检测报告经批准人、审核人、编制人签字并加盖本单位检测专用章后生效。
- 2.未经本单位书面批准，不得复制本报告。
- 3.委托检测结果仅对收到样品负责。
- 4.对检测报告如有异议，请在收到报告之日起十五日内向本单位提出，逾期不予受理。

1.委托检测单位

单位名称：

单位地址：

2.样品信息

监测点名称：

监测点地址：

采样日期：

样品状态：活体 冷冻 冰鲜 乙醇 其它

样品品种：

样品编号：

样品规格：

样品数量：

注：监测点名称、监测点地址、采样日期、样品品种及样品编号等信息均由委托检测单位提供。

3.检测信息

收样日期：

检测日期：

检测项目及方法：

4.检测结果：

*注：测序工作分包给****公司完成。

编制人：

审核人：

×××检测机构名称（章）

批准人：

年 月 日

A.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表A.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字: 年 月 日

表 A.5 阳性检测结果报告

阳性 检出 监测 点 信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积 亩		采样日期	年 月 日
发病 情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积 亩		
		死亡情况		
		经济损失 元		

罗非鱼湖病毒病监测技术规范

1 范围

本文件规定了罗非鱼湖病毒病监测工作的通用要求，描述了对应的试验方法，给出了监测对象、监测点的设置、采样、样品包装和送样、实验室检测、检测结果报告和阳性场处置等内容。

本文件适用于参与水生动物疫病监测计划的渔业主管部门、水生动物疫病预防控制机构、水生动物疫病检测机构等进行罗非鱼湖病毒病的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文本中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

SC/T 7015 病死水生动物及病害水生动物产品无害化处理规范

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 水生动物疫病监测计划 plan of aquatic animal disease surveillance

对水生动物疫病发生、流行等情况进行监测的工作任务，用以及时掌握我国重要水生动物疫病情况。国家级监测计划由农业农村部渔业主管部门制定，省级监测计划由省（自治区、直辖市）级渔业主管部门制定。

3.2 监测 surveillance

在一定范围内，针对某一特定水生动物群体，对于某种或多种疫病长期系统地观测，收集和分析疫病的动态分布和影响因素资料，跟踪疫病的发生、分布和变化趋势，并将信息及时上报和反馈，以便进一步开展调查研究，对疫病进行预警预报，提出有效防控对策和措施，从而达到防控疫病的目的。

3.3 监测点 surveillance spot

需要监测的独立的流行病学单元。

3.4 罗非鱼湖病毒病 tilapia lake virus disease

罗非鱼湖病毒病是由罗非鱼湖病毒（Tilapia lake virus, TiLV）引起的一种罗非鱼急性病毒性传染病，主要症状为昏睡、游动异常、食欲不振，体色发黑、体表充血糜烂、腹部肿胀、眼球凸出、鳃丝苍白等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMEM：改良 Eagle 培养基（Dulbecco's Modified Eagle Medium）

M199：M199 培养基（M199 Medium）

MEM：基础必须培养基（Minimum Essential Medium）

RT-PCR：逆转录-聚合酶链反应（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）

TiLV：罗非鱼湖病毒（Tilapia Lake Virus）

5 监测对象

罗非鱼湖病毒易感种类，包括罗非鱼及其变种（见附录A）。

6 监测点设置

6.1 监测点应包括以下罗非鱼养殖场：

- a) 国家级、省级原良种场和引育种中心；
- b) 近两年内TiLV监测结果呈阳性的养殖场。

6.2 监测点还可选择以下罗非鱼的养殖场：

- a) 从单一苗种场引种或引种产地检疫证明完整或能溯源的成鱼养殖场；
- b) 自繁自养或引种产地检疫证明完整的苗种场。

7 采样

7.1 采样要求

7.1.1 采样人员

应经过省级以上水生动物疫病预防控制机构（水产技术推广机构）组织的采样技术培训或了解相关采样要求的人员。

7.1.2 采样水温

宜在水温22℃~30℃时进行采样。

7.1.3 采样规格

各种规格的罗非鱼均可采集，优先采集鱼苗和鱼种。

7.1.4 采样数量

依据SC/T 7103的规定，无临床症状的鱼，每个监测点随机采集150尾；具有疑似临床症状的鱼（见附录A.3），不少于30尾。优先采集具有临床症状的鱼。

7.1.5 采样频次

符合6.1的监测点，每年采样2次，且2次采样应间隔1个月以上；符合6.2的监测点，每年采样1次~2次，如果采样2次，应间隔1个月以上。

7.1.6 采样形式

7.1.6.1 活鱼样品

采集的活鱼样品装入活鱼运输袋，24h内送检。

7.1.6.2 组织样品

按附录B.2的要求取组织样品，每15尾鱼的组织样品等量混合在一起作为一个检测小样放置到50 mL离心管中，按1:5的比例(W/V)加入磷酸盐缓存液或含1 000 IU/mL的青霉素和1 000 µg/mL的链霉素的M199、MEM、DMEM等细胞培养液，并在离心管上标明样品编号和日期，在0℃~10℃ 48 h内运至检测实验室。

7.2 采样程序

7.2.1 采样准备

采样单位提前与监测点以及具有罗非鱼湖病毒检测资质的单位取得联系确定采样和送检时间。同时按附录C.1填写《监测点备案表》，承担国家水生动物疫病监测计划的采样单位应将监测点信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

按附录C.2的要求确定采样人员、运载工具、准备采样工具、容器和《现场采样记录表》等。

7.2.2 采样实施

7.2.2.1 孵化车间

随机采集孵化池（缸）数量不少于 10 个，共采集 150 尾作为一个样。如果孵化池（缸、环道）数量小于或等于 10 个，则每个孵化池（缸、环道）都要采集。

7.2.2.2 养殖场

若养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量不少于 10 个，则随机选取 10 个养殖单元采集，共采集 150 尾作为一个样；若养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量小于或等于 10 个，则每个养殖单元都要采集，共采集 150 尾作为一个样。

7.2.3 采样记录

采样时需按附录 C.2 的要求填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性，并提供采样影像资料。《现场采样记录表》一式三份，一份由监测点留存，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至承检单位。

同时，采样单位应将采样信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

8 样品包装和送样

8.1 包装

8.1.1 活鱼样品

用活鱼运输袋充氧并打包，在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封。

8.1.2 组织样品

用自封袋包装后放入泡沫箱中，同时在泡沫箱里加适量的冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封。

8.2 标签

包装好后每份样品应及时加贴采样标签，标签应符合附录C.3的要求。

9.3 运输

活鱼样品 24 h 内，组织样品 48h 内运达指定检测实验室。

9 实验室检测

9.1 样品处理

活鱼样品，将样品随机分成小样，每个小样取 15 尾鱼组织（肝、脑、脾、肾），且每个小样均需检测；组织样品，直接进行检测。

9.2 病原检测

检测单位按附录B进行检测和鉴定，先用实时荧光RT-PCR方法进行检测，检测结果为阴性的，可直接出具阴性结果报告；检测结果为阳性的，用套式RT-PCR方法进行确认。

检测单位应做好实验室管理、病原体保存和无害化处理等工作。

10 检测结果报告

10.1 检测单位在接到样品后3周内完成检测，按附录C.4向委托检测单位（各省级水生动物疫控机构）提供《检测报告》，并将检测结果、阳性样品核酸序列以及其它相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

10.2 省级水生动物疫控机构应将检测结果上报本级渔业主管部门，并及时反馈相关养殖场和县级水生动物疫控机构。如果检测结果为阳性，按附录C.5的要求填写《阳性检测结果报告》，并上报本级渔业主管部门。

11 阳性场处置

省级水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照SC/T 7015 的规定执行相关处理，组织开展流行病学调查和病原溯源工作，及时将相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

附录 A

(资料性)

罗非鱼湖病毒病简介

A.1 病原学

罗非鱼湖病毒病是由罗非鱼湖病毒 (Tilapia Lake Virus, TiLV) 引起的一种罗非鱼急性病毒性传染病。TiLV 是一种新型的 RNA 病毒, 国际病毒分类委员会 (ICTV) 于 2019 年将其单独列为罗非鱼病毒科 (Amnoonviridae), 罗非鱼病毒属 (*Tilapinevirus*), 罗非鱼病毒种 (*Tilapia tilapinevirus*)。TiLV 基因组是分段、单链的负链 RNA, 由 10 个基因片段组成。TiLV 病毒粒子具包膜, 二十面体结构, 大小为 55 nm~75 nm, 病毒颗粒对有机溶剂 (乙醚和氯仿) 敏感。在一般养殖条件下, 大多数常用消毒剂对 TiLV 均有较好的灭活效果, 如 5000 ppm Virkon® 消毒粉可在 1 min 灭活病毒, 2.5 ppm 碘、10 ppm 次氯酸钠、300 ppm 过氧化氢可在 10 min 灭活病毒。

A.2 流行病学

A.2.1 易感宿主

TiLV 主要感染罗非鱼及其变种, 也有感染实验表明 TiLV 能感染丝足鲈 (*Osphronemus goramy*)、施氏高体鲃 (*Barbonymus schwanefeldii*)、大鲮 (*Osphronimus goramy*) 以及斑马鱼 (*Danio rerio*)。

A.2.2 易感阶段、水温、季节等

TiLV 能够感染罗非鱼的所有生命阶段, 包括受精卵、卵黄囊幼体、鱼苗和成鱼等。感染主要在高温季节暴发, 发病水温为 22 °C~32 °C。

A.2.3 传染源、传播途径

目前, 尚不清楚 TiLV 的最初来源, 野生或养殖的受 TiLV 感染的鱼群是目前已知的唯一传染源。有证据表明, 病鱼的眼睛、大脑和肝脏常常含有高浓度的病毒, 其肌肉组织也存在病毒。因此, 发病死亡的罗非鱼可能是重要的病毒污染源。

直接水平传播是其主要传播途径，罗非鱼的活体交易和运输最有可能传播疾病。此外，在罗非鱼早期发育阶段的受精卵和卵黄囊幼体中检测到TiLV病毒核酸，表明该病毒可能存在垂直传播的情况。

A.3 临床症状

主要表现为昏睡、游动异常、食欲不振，体色发黑、体表充血糜烂、腹部肿胀、眼球凸出、鳃丝苍白等，肝脏和肾脏出血等。

附录 B
(规范性)
罗非鱼湖病毒实验室检测流程

B.1 总则

罗非鱼湖病毒检测,先用实时荧光RT-PCR方法进行检测,检测结果为阴性的,可直接出具阴性结果报告;检测结果为阳性的,再用套式RT-PCR方法进行确认。

B.2 取组织样品

体长 ≤ 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的鱼则取肝、脑、肾和脾;鱼卵则取卵膜。

B.3 检测方法

B.3.1 实时荧光RT-PCR

B.3.1.1 实时荧光RT-PCR引物:

TILV-F1: 5'-CGAACTGTTGCCTTTGGAATT-3'

TILV-R1: 5'-TGAAGAATAAGTGGATTGCCTTTG-3'

TILV-P1: 5'-FAM-CCGCGGCTGGCCTTCCAG-BHQ1-3'

B.3.1.2 核酸提取

取20 mg ~50 mg待检样品组织,加入1 mL Trizol试剂,用移液器充分吹打10次~20次,室温放置5 min;加入200 μ L三氯甲烷,旋涡振荡30 s混匀,室温放置15 min;12 000 g离心10 min;取上层水相至一新的离心管中,加等体积异丙醇,上下颠倒数次混匀,-20 $^{\circ}$ C放置20 min;12 000g 离心10 min;弃上清液,沉淀用1 mL 75%乙醇清洗;8 000 g离心10 min,弃上清液,沉淀室温干燥5 min;加20 μ L DEPC水溶解RNA 沉淀。4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用, RNA溶液应避免反复冻融,并尽快用于检测。提取后的RNA应尽快用于逆转录合成cDNA模板。

具备同样抽提效率的商品化RNA抽提试剂盒也同样适用。

B.3.1.3 cDNA模板制备

取18.5 μL RNA溶液,加10倍逆转录酶浓缩缓冲液2.5 μL 、dNTPs 1 μL 、40 U/ μL 的RNA酶抑制剂1 μL 、5 U/ μL 的AMV逆转录酶1 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物(TILV-R1) 1 μL 。混匀后,置PCR仪上50 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B. 3. 1. 4 核酸扩增

在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中,按每个样品10倍Taq酶浓缩缓冲液2.5 μL 、10 mmol/L的dNTPs 0.5 μL 、5 U/ μL 的Taq酶0.5 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的上游引物和下游引物各0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ TaqMan探针0.5 μL 、双蒸水17.5 μL 、cDNA模板2.5 μL ,配制反应体系。同时设置不含cDNA模板的空白对照、阳性对照和阴性对照,检测体系配制方法相同。95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40个循环。

具有同样扩增效率的商品化一步法荧光RT-PCR试剂盒也同样适用。

B. 3. 1. 5 结果判定

若阳性对照Ct值小于或等于35,阴性对照和空白对照Ct值大于或等于40,实验有效;检测样品的Ct值 ≤ 35.0 ,判断为阳性;无典型“S”型扩增或Ct值 > 35.0 ,判断为阴性。

B. 3. 2 套式RT-PCR

B. 3. 2. 1 套式RT-PCR方法引物序列

F1: 5'-TATGCAGTACTTTCCCTGCC-3'

F2: 5'-TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT-3'

R: 5'-GTTGGGCACAAGGCATCCTA-3'

引物F1和R扩增415 bp目的基因;引物F2和R扩增250 bp目的基因。

B. 3. 2. 2 RNA提取

参照B.3.1.2。

B. 3. 2. 3 cDNA模板制备

参照B.3.1.3。

B. 3. 2. 4 核酸扩增

第一步反应:在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中,按每个样品10倍Taq酶浓缩缓冲液2.5 μL 、10 mmol/L的dNTPs 0.5 μL 、5 U/ μL Taq酶0.5 μL 、20 $\mu\text{mol/L}$ 上游引

物（F1）和下游引物（R）各0.5 μL、双蒸水18 μL、cDNA模板2.5 μL，配制反应体系。同时设置不含cDNA模板的空白对照、阳性对照和阴性对照，检测体系配制方法相同。扩增程序为95℃ 2 min；95℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 30s，共35个循环，72℃ 10 min，4℃ 保存。

第二步反应：在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中，按每个样品10倍Taq酶浓缩缓冲液2.5 μL、10 mmol/L dNTPs 0.5 μL、5 U/μL Taq酶0.5 μL、20 μmol/L上游引物（F2）和下游引物（R）各0.5 μL、双蒸水18 μL、模板加第一步反应产物2.5 μL，配制反应体系。扩增程序为95℃ 2 min；95℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 30s，共35个循环，72℃ 10 min，4℃ 保存。

具有同样扩增效率的商品化一步法RT-PCR试剂盒也同样适用。

B. 3. 2. 5 琼脂糖电泳

用TBE电泳缓冲液配制1.5%的琼脂糖平板。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扩增产物和2 μL溴酚蓝指示剂溶液混匀后加入孔内。在电泳时使用核酸分子量标准参照物作对照。5 V/cm 电泳约0.5 h，当溴酚兰到达琼脂糖凝胶的底部时停止。

B. 3. 2. 6 结果判定

用紫外照射仪或用凝胶成像仪观察扩增带并判断结果。若阳性对照出现一条相对应大小的DNA条带，阴性对照和空白对照没有该扩增带，实验有效；

若检测样品电泳后在相应DNA位置上，第一步反应出现415 bp或第二步反应出现250 bp大小条带，取PCR扩增产物进行测序，测序结果需与GenBank收录的TiLV序列进行比较确认，相似性达到95%以上的判定为阳性；

若检测样品在第二步反应后电泳在相应DNA位置上无扩增，则判定为阴性。

附 录 C
(规范性)
监测工作相关表格

C.1 监测点备案表

监测点备案信息按表C.1填写。

表 C.1 监测点备案表

_____省（区、市）		_____病
监测点名称		备案编号
监测点地址		
联系人		电话
监测点基 本信息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场
	养殖品种	
	监测品种	
养殖基本 信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购

填报单位负责人：

（单位公章）

年 月

C.2 现场采样记录表

现场采样信息按表C.2填写。

表 C.2 现场采样记录表

病

监测点	名称		备案编号			
	通讯地址		邮编			
	联系人		电话			
采样单位	名称					
	通讯地址		邮编			
	联系人		电话			
样品信息	样品品种		样品编号			
	样品数量 尾		样品规格 cm			
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡				
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它				
	采样时 环境条件	水温 ℃		盐度		pH
监测点 签署	本次采样始终在本人授权下完成，上述记录经核实无误，确认以上各项记录的准确性。 负责人签字： 年 月 日		采样 单 位 签 署	本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。 采样人签字： 年 月 日		

C.3 采样标签

采样标签信息按表C.3填写。

表 C.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____ 年 _____ 月 _____ 日

C.4 检测报告

C.4规定了检测报告至少应包含的要素，格式见示例1。

示例1:

检测报告

[报告编号、报告版次、页码]

声明:

- 1.本检测报告经批准人、审核人、编制人签字并加盖本单位检测专用章后生效。
- 2.未经本单位书面批准，不得复制本报告。
- 3.委托检测结果仅对收到样品负责。
- 4.对检测报告如有异议，请在收到报告之日起十五日内向本单位提出，逾期不予受理。

1.委托检测单位+++++

单位名称:

单位地址:

2.样品信息

监测点名称:

监测点地址:

采样日期:

样品状态: 活体 冷冻 冰鲜 乙醇 其它

样品品种:

样品编号:

样品规格:

样品数量:

注: 监测点名称、监测点地址、采样日期、样品品种及样品编号等信息均由委托检测单位提供。

3.检测信息

收样日期:

检测日期:

检测项目及方法:

4.检测结果:

*注: 测序工作分包给****公司完成。

编制人:

审核人:

xxx检测机构名称(章)

批准人:

年 月 日

C.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表C.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称):

我省(××市××区)××养殖场,由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病);详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字: 年 月 日

表 C.5 阳性检测结果报告

阳性 检出 监测 点 信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积亩		采样日期	年 月 日
发病 情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积亩		
		死亡情况		
	经济损失元			

病毒性神经坏死病监测技术规范

1 范围

本文件给出了病毒性神经坏死病监测的术语与定义、缩略语，描述了监测对象、监测点设置、采样、样品包装和送样、实验室检测、检测结果报告和阳性场处置。

本文件适用于参与水生动物疫病监测计划的渔业主管部门、水生动物疫病预防控制机构、水生动物疫病检测机构等进行病毒性神经坏死病的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

GB/T 27531 病毒性脑病和视网膜病病原逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法

SC/T 7014 水生动物检疫实验技术规范

SC/T 7015 病死水生动物及病害水生动物产品无害化处理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 水生动物疫病监测计划 plan of aquatic animal disease surveillance

对水生动物疫病发生、流行等情况进行监测的工作任务，用以及时掌握我国重要水生动物疫病情况。国家级监测计划由农业农村部渔业主管部门制定，省级监测计划由省（自治区、直辖市）级渔业主管部门制定。

3.2 监测 surveillance

在一定范围内，针对某一特定水生动物群体，对于某种或多种疫病长期系统地观测，收集和分析疫病的动态分布和影响因素资料，跟踪疫病的发生、分布和变化趋势，并将信息及时上报和反馈，以便进一步开展调查研究，对疫病进行预警预报，

提出有效防控对策和措施，从而达到防控疫病的目的。

3.3 监测点 surveillance spot

需要监测的独立的流行病学单元。

3.4 病毒性神经坏死病 viral nervous necrosis

又称病毒性脑病和视网膜病（viral encephalopathy and retinopathy），是由鱼类神经坏死病毒感染而致的传染病，感染特征为中枢神经组织和视网膜组织出现空泡化。

3.5 鱼类神经坏死病毒 nervous necrosis virus

一种 RNA 病毒，属诺达病毒科， β 诺达病毒属，是已知最小的动物病毒之一，该病毒主要感染海水鱼苗。

4 缩略语

NNV：鱼类神经坏死病毒（Nervous necrosis virus）

RT-PCR：逆转录-聚合酶链反应（Reverse transcription polymerase chain reaction）

5 监测对象

石斑鱼、海鲈、卵形鲳鲹、河鲀等易感海水鱼类苗种和幼体，牙鲆、大菱鲆、鳎、大黄鱼等当地主养的海水鱼类苗种和幼体，以及大口黑鲈等其它易感淡水鱼类苗种和幼体。

6 监测点设置

6.1 监测点应覆盖国家级和省级原良种场、遗传育种中心、引育种中心，同时应覆盖近两年检出阳性样品的监测点。

6.2 从单一苗种场引种或引种产地检疫证明完整或能溯源的成鱼养殖场；自繁自养或引种产地检疫证明完整的苗种场。

7 采样

7.1 采样要求

7.1.1 采样人员

应经过省级以上水生动物疫病预防控制机构（水产技术推广机构）组织的采样技术培训或了解相关采样要求的人员。

7.1.2 采样水温

一般为每年3月~11月，采样水温一般高于25°C。

7.1.3 采样规格

主要采集15cm以下的苗种和幼体，亲鱼可采集卵、性腺、卵巢液、精液和血液。

7.1.4 采样数量

有临床症状的鱼体10尾以上；有疑似临床症状的鱼不少于30尾；无症状样品采样数量按SC/T 7103 规定每个监测点随机采集苗种150尾以上。优先采集具有临床症状的鱼。

在同一时间、同一监测点原则上只采集1个样品（样品属不同品种或不同来源的情况除外）。

7.1.5 采样频次

符合6.1的监测点，每年采样2次，且2次采样应间隔1个月以上；符合6.2的监测点，每年采样1次~2次，如果采样2次，2次采样应间隔1个月以上。

7.1.6 采样形式

根据苗种的不同孵化批次，每个孵化批次随机采集150尾作为一个样。

采样时，体长≤1 cm的苗种取整条；体长1cm~6 cm的苗种取取包括脑和眼在内的整个头部；体长>6 cm的幼鱼则取脑和眼。对于只能用非致死性方式取样的亲鱼，可采集卵、性腺、卵巢液、精液和血液。

7.2 采样程序

7.2.1 采样准备

采样单位应提前与监测点及样品检测单位确定采样和送检时间，同时按附录B.1的要求填写《监测点备案表》，承担国家水生动物疫病监测计划的采样单位应将监测点信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

按附录B.2的要求，确定采样人员、运载工具、准备采样工具、容器和《现场采样记录表》等。

7.2.2 采样实施

7.2.2.1 孵化车间

随机采集孵化池（缸）数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。如果孵化池

（缸、环道）数量小于或等于10个，则每个孵化池（缸、环道）都要采集。

7.2.2.2 养殖场

随机采集养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量不少于10个，共采集150尾作为一个样。如果养殖单元（池塘、水泥池、网箱等）数量小于或等于10个，则每个养殖单元都要采集。

7.2.3 采样记录

采样时需按附录B.2的要求填写《现场采样记录表》，相关人员签字确认采集样品的真实性，并提供采样影像资料。《现场采样记录表》一式三份，一份由监测点留存，一份由采样单位留存，一份随同样品转运至检测单位。

同时，采样单位应将采样信息录入《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

8 样品包装和送样

8.1 包装

8.1.1 活鱼样品

用活鱼运输袋充氧并打包，在包装袋外加冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，装入泡沫箱后，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封。

8.1.2 组织样品

用自封袋包装后放入泡沫箱中，同时在泡沫箱里加适量的冰袋或冷冻瓶装水等冷媒，再装入相应大小的纸箱中，用胶带密封。

8.2 标签

包装好后每份样品及时加贴采样标签，标签应符合附录B.3的要求。

8.3 运输

活鱼样品24 h内，组织样品48 h内运达指定检测实验室。

9 实验室检测

9.1 样品处理

活鱼样品，将样品随机分成小样，每个小样不多于15尾鱼，按要求取相应组织后进行检测，且每个小样均需检测；组织样品，直接进行检测。

9.2 病原检测

检测单位按附录C的要求进行检测和结果判定，优先使用GB/T 27531 规定的RT-qPCR方法检测。

检测单位应SC/T 7014 要求，做好实验室管理、病原体保存和无害化处理等工作。

10 检测结果报告

检测单位在接到样品后2周内完成检测，按附录B.4的要求向委托检测单位（各省级水生动物疫控机构）提供《检测报告》，并将检测结果、阳性样品核酸序列以及其它相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

省级水生动物疫控机构应将检测结果上报本级渔业主管部门，并及时反馈相关养殖场和县级水生动物疫控机构。如果检测结果为阳性，应按附录B.5的要求填写《阳性检测结果报告》，并上报本级渔业主管部门。

11 阳性场处置

省级水生动物疫控机构指导阳性养殖场按照SC/T 7015的规定执行相关处理，组织开展流行病学调查和病原溯源工作，及时将相关信息上传至《国家水生动物疫病监测信息管理系统》。

附录A

(资料性)

病毒性神经坏死病简介

A1. 病原学

病毒性神经坏死病(Viral nervous necrosis, VNN)又称病毒性脑病和视网膜病(Viral encephalopathy and retinopathy, VER),是鱼类神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV)感染引起的一种鱼类传染病。NNV是一种 RNA 病毒,病毒粒子呈二十面体,无囊膜,晶格状排列在细胞质中,大小约25 nm~30nm。病毒基因组大小约4.5kb,主要由RNA1和RNA2两条单链正义RNA组成。RNA1长约3.0kb~3.2kb,编码的蛋白A为病毒依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp),分子量约为110kd;RNA2长约1.3kb~1.4kb,编码病毒衣壳蛋白,分子量约为42kd。另外,在NNV复制过程中, RNA1的3'端会合成出一个亚基因组RNA3(长约0.4 kb),编码B1和B2两个非结构蛋白。根据RNA2基因序列不同,现有的鱼类神经坏死病毒主要分为4种基因型,分别为红鳍东方鲀神经坏死病毒(tiger puffer NNV,TPNNV)、黄带拟鲈神经坏死病毒(striped jack NNV,SJNNV)、条斑星鲈神经坏死病毒(barfin flounder NNV,BFNNV)和赤点石斑鱼神经坏死病毒(red-spotted grouper NNV,RGNNV)

A2. 流行病学

A2.1 易感宿主

NNV的宿主十分广泛,到目前为止,已知有120余种鱼类可被NNV感染,主要为海水鱼类。常见海水养殖经济鱼类如石斑鱼、鲈鱼、牙鲆、大菱鲆、鳕鱼、鲷、鲟鲙、鲑鱼、欧洲鳗、石首鱼、东方鲀等均有感染发病病例,淡水养殖鱼类如欧洲鳗鲡、鲟鱼等也有发病的记录。另外,有研究表明虾类等无脊椎动物也有可能被NNV感染。

A2.2 易感阶段、水温、季节等

NNV能感染宿主鱼的各个生命阶段,包括受精卵、仔鱼、稚鱼、幼鱼和成鱼等,

在亲鱼的性腺中亦可检测到病毒。对成鱼的危害相对较小，对仔鱼和稚鱼的危害最大，仔鱼最早发病时间是孵化后1天，一般在孵化后1周~3周开始发病，仔稚鱼感染后病死率达90%以上，甚至100%，存活鱼可被NNV持续感染而不发病，成为NNV终身携带者。VNN一般在4月~11月流行，其中6月~8月易暴发，且有较高的死亡率，低温季节一般较少发生。不同基因型的鱼类神经坏死病毒最佳增殖温度不同，如RGNNV最佳温度为25℃~30℃，SJNNV为20℃~25℃，BFNNV为15℃~20℃，TPNNV为20℃。因此，NNV感染的宿主不同，发病水温也有明显的不同。

A2.3 传染源、传播途径

NNV 能通过水平方式和垂直方式传播.在养殖场病毒通过水体、饵料、养殖工具等进行水平传播,是该病主要的传播方式。

A3. 临床症状

病鱼通常食欲下降或厌食，行为表现出与神经相关异常。不同种类的病鱼临床表现存在差异，如石斑鱼病鱼常表现为体色变黑，鳃盖张开，头部出血，鱼体出现畸形，或因鳔肿胀导致腹部膨大；鲆鲽类病鱼会滞留在池塘底部，身体蜷曲，头和尾向上翘。小规格苗种多表现为螺旋式、涡旋状或静止腹部朝上漂浮，触碰后立即游动；大规格苗种主要为向前窜动后沉入水底，集中于池底中央。

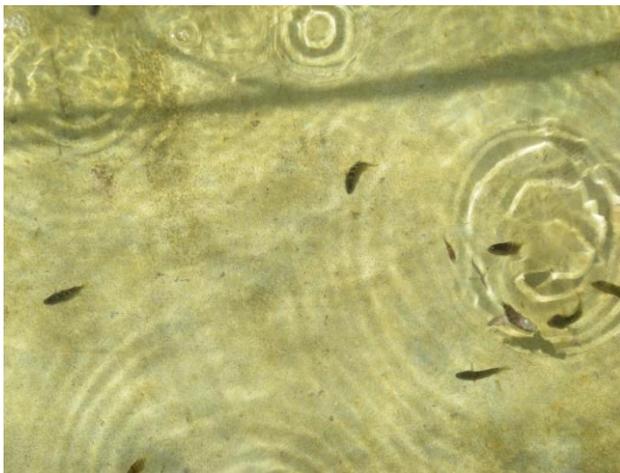


图1 患病苗种在水中打转、螺旋状游泳



图2 患病苗种鳔胀气，漂浮水面



图3 患病鱼苗沉底、体色发黑

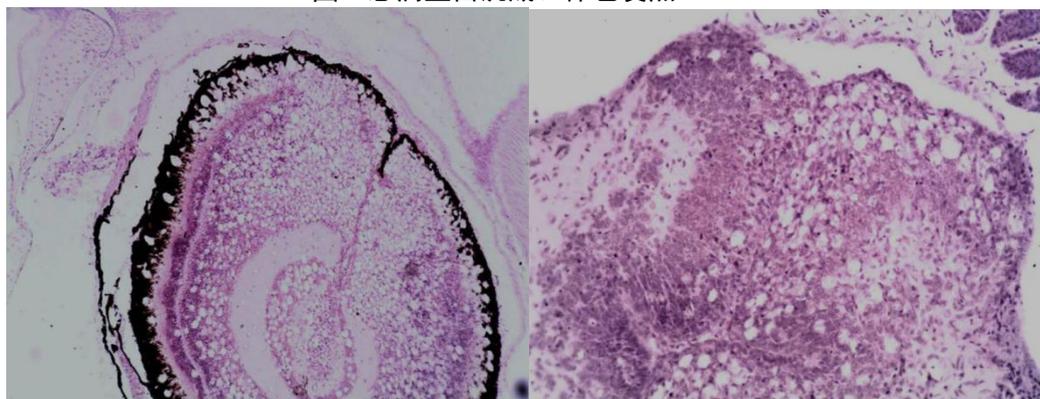


图4 患病石斑鱼视网膜和脑上皮组织空泡化

附录B
(规范性)
监测工作相关表格

B.1 监测点备案表

监测点备案信息按表 B.1 填写。

表 B.1 监测点备案表

_____省(区、市) _____病

监测点名称			备案编号	
监测点地址				
联系人			电话	
监测点 基本信 息	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种			
	监测品种			
养殖基 本信息	养殖条件	<input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 淡水 <input type="checkbox"/> 半咸水		
	养殖模式	<input type="checkbox"/> 池塘 <input type="checkbox"/> 网箱 <input type="checkbox"/> 工厂化 <input type="checkbox"/> 稻鱼种养 <input type="checkbox"/> 其他		
	养殖场水源	<input type="checkbox"/> 地下水 <input type="checkbox"/> 湖水 <input type="checkbox"/> 河水 <input type="checkbox"/> 海水 <input type="checkbox"/> 其他		
	进排水系统	<input type="checkbox"/> 独立 <input type="checkbox"/> 不独立 <input type="checkbox"/> 无		
	亲本来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购 是否检疫： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	苗来源	<input type="checkbox"/> 自繁 <input type="checkbox"/> 外购 是否检疫： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		

填报单位负责人：

(单位公章)

年 月 日

B.2 现场采样记录表

现场采样信息按表B.2填写。

表 B.2 现场采样记录表

_____病

监测点	名称			备案编号			
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
采样单位	名称						
	通讯地址			邮编			
	联系人			电话			
样品信息	样品名称			采样编号			
	样品数量 (尾)			样品规格 (cm)			
	样品状态	<input type="checkbox"/> 无病症 <input type="checkbox"/> 有病症 <input type="checkbox"/> 濒死 <input type="checkbox"/> 死亡					
	保存方式	<input type="checkbox"/> 活体 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> 冰鲜 <input type="checkbox"/> 乙醇 <input type="checkbox"/> 其它					
	采样时 环境条件	水温℃		盐度		pH	
监测点 签署	本次采样始终在本人陪同下完成，上述记录经核实无误，承认以上各项记录的合法性。 负责人签字： 年 月 日			采样单位签署	本次采样已按要求及产品标准执行完毕，样品经双方人员共同封样，并做记录如上。 采样人签字： 年 月 日		

B.3 采样标签

采样标签信息按表B.3填写。

表B.3 采样标签

采样单位： _____
样品编号： _____
监测点名称： _____
监测点备案编号： _____
采样人： _____
采样日期： _____年_____月_____日

B.4 检测报告

B.4规定了检测报告至少应包含的要素，格式见示例1。

示例 1:

检测报告

[报告编号、报告版次、页码]

声明:

- 1.本检测报告经批准人、审核人、编制人签字并加盖本单位检测专用章后生效。
- 2.未经本单位书面批准，不得复制本报告。
- 3.委托检测结果仅对收到样品负责。
- 4.对检测报告如有异议，请在收到报告之日起十五日内向本单位提出，逾期不予受理。

1. 委托检测单位

单位名称:

单位地址:

2. 样品信息

监测点名称:

监测点地址:

采样日期:

样品状态: 活体 冷冻 冰鲜 乙醇 其它

样品品种:

样品编号:

样品规格:

样品数量:

注: 监测点名称、监测点地址、采样日期、样品品种及样品编号等信息均由委托检测单位提供。

3. 检测信息

收样日期:

检测日期:

检测项目及方法:

4. 检测结果

*注: 测序工作分包给****公司完成。

编制人:

审核人:

批准人:

XXX检测机名称 (章)

年 月 日

B.5 阳性检测结果报告

阳性检测结果报告信息按表B.5填写。

阳性检测结果报告

(渔业行政主管部门名称)：

我省(××市××区)××养殖场，由××实验室采用××标准××方法检出××疫病病原阳性。该疫病为××类疫病(或近年国内新发疫病)。详见下表及××检测机构名称的检测报告。

特此报告。

(机构名称)

负责人签字： 年 月 日

B.5 阳性检测结果报告

阳性检出监测点信息	监测点名称			
	监测点地址			
	监测点联系人		联系电话	
	监测点类型	<input type="checkbox"/> 国家级原良种场 <input type="checkbox"/> 省级原良种场 <input type="checkbox"/> 遗传育种中心 <input type="checkbox"/> 引育种中心 <input type="checkbox"/> 苗种场 <input type="checkbox"/> 观赏鱼养殖场 <input type="checkbox"/> 成鱼养殖场		
	养殖品种		养殖方式	
	养殖面积(亩)		采样日期	年 月 日
发病情况	有无临床症状	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无		
	发病概况	发病面积(亩)		
		死亡情况		
	经济损失(元)			

附录 C (规范性)

鱼类神经坏死病毒实验室检测流程

C.1 总则

鱼类神经坏死病毒检测，先用实时荧光RT-PCR方法进行检测，检测结果为阴性的，可直接出具阴性结果报告；检测结果为阳性的，再用套式RT-PCR方法进行确认后出具检测报告。

C.2 取样

体长 ≤ 1 cm的苗种取整条；体长1cm~6 cm的苗种取取包括脑和眼在内的整个头部；体长 > 6 cm的幼鱼则取脑和眼。对于只能用非致死性方式取样的亲鱼，可采集卵、性腺、卵巢液、精液和血液。

将样品置于预冷的无菌研钵中研磨，或者使用样品研磨仪匀浆，用预冷的PBS以1: 10 (m/v) 重悬， $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4°C 离心10min，取上清液待检。

C.3 检测方法

C.3.1 实时荧光 RT-PCR

C.3.1.1 实时荧光RT-PCR引物

NNV-F1: 5' -CAA CTG ACA RCG AHC ACA C-3'

NNV-R1: 5' -CCC ACC AYT TGG CVA C-3'

NNV-P1: 5' -FAM-TYC ARG CRA CTC GTG GTG CVG-BHQ1-3'

C.3.1.2 RNA 提取

取200 μL 待检样品组织匀浆上清液，加入1 mL Trizol试剂，用移液器充分吹打混匀，室温放置5 min；加入200 μL 三氯甲烷，旋涡振荡30 s混匀，室温放置15 min； 4°C 12 000g离心10 min；取上层水相至一新的离心管中，加等体积异丙醇，上下颠倒数次混匀， -20°C 放置20 min； 4°C 12 000g离心10 min；弃上清液，沉淀用1 mL 75%乙醇清洗； 4°C 8 000 g离心10 min，弃上清液，沉淀室温干燥5 min；加20 μL DEPC水溶解RNA 沉淀， -20°C 冰箱保存备用，避免反复冻融。提取后的RNA应尽快用于逆转录合成cDNA模板。

具备同样抽提效率的商品化RNA抽提试剂盒也同样适用。

C. 3. 1. 3 cDNA 合成

取不多于5 μg 的模板RNA，加50 μM的Oligo dT引物1 μL、dNTPs 1 μL，RNase free dH₂O加至10 μL，冰上混匀后置于65 °C反应5 min，置于冰上冷却；继续在上述反应液中加入5×逆转录酶浓缩缓冲液4 μL、40 U/μL的RNA酶抑制剂 0.5 μL、200 U/μL的逆转录酶1 μL，RNase free dH₂O加至20 μL。混匀后，置PCR仪上42 °C反应30~60 min，95 °C反应5 min，-20 °C保存。

具备同样合成效率的商品化cDNA合成试剂盒也同样适用。

C. 3. 1. 4 qPCR 扩增

在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中，按每个样品10×Taq DNA聚合酶缓冲液（不含Mg⁺）2 μL、dNTPs（各10 mmol/L）1 μL、MgCl₂（25mmol/L）1 μL、Taq酶（5 U/μL）1 μL、20 μmol/L上游引物（NNV-F1）和下游引物（NNV-R1）各1 μL、探针（10 mmol/L）1.5 μL、双蒸水9.5 μL、cDNA模板2 μL，配制反应体系。同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照，检测体系配制方法相同。扩增程序为95 °C 10 min；95 °C 10 s、58 °C 35 s，40个循环。

具有同样扩增效率的商品化实时荧光RT-PCR试剂盒也同样适用。

C. 3. 1. 5 结果判定

若阳性对照Ct值<36且有典型的S形扩增曲线，同时阴性对照和空白对照无Ct值或Ct值≥36，但无典型的S形扩增曲线，实验有效；否则实验无效，应重新进行实验。检测样品Ct值<36且有典型的S形扩增曲线，判定RT-qPCR检测结果为阳性；当36≤样品的Ct 值<40时，Ct 值位于“灰区”，应对样品再次检测，再次检测后Ct值仍处于灰区，但出现典型的S形扩增曲线，判定RT-qPCR检测结果为阳性，否则为阴性；检测样品无典型S型扩增曲线，判定为RT-qPCR检测结果阴性。

C. 3. 2 套式 RT-PCR

C. 3. 2. 1 套式 RT-PCR引物

NNV-1F: 5'-ACA CTG GAG TTT GAA ATT CA-3'

NNV-1R: 5'-GTC TTG TTG AAG TTG TCC CA-3'

NNV-2F: 5'-ATT GTG CCC CGC AAA CAC-3'

NNV-2R: 5'-GAC ACG TTG ACC ACA TCA GT-3'

C.3.2.2 RNA 提取

参照C.3.1.2。

C.3.2.3 cDNA 合成

参照C.3.1.3。

C.3.2.4 PCR 扩增

第一步反应：在0.2 mL PCR薄壁管或8联管中，按每个样品10×Taq DNA聚合酶缓冲液（不含Mg⁺）5 μL、dNTPs（各10 mmol/L）1 μL、MgCl₂（25mmol/L）3 μL、Taq酶（5 U/μL）1 μL、10 μmol/L上游引物（NNV-1F）和下游引物（NNV-1R）各1 μL、双蒸水33 μL、cDNA模板5 μL，配制反应体系。同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照，检测体系配制方法相同。扩增程序为94℃ 2 min；94℃ 30s，57℃ 30s，72℃ 45s，共35个循环，72℃ 10 min，4℃ 保存。

第二步反应：在0.2 mL PCR薄壁管或八联管中，按每个样品10×Taq DNA聚合酶缓冲液（不含Mg⁺）5 μL、dNTPs（各10 mmol/L）1 μL、MgCl₂（25mmol/L）3 μL、Taq酶（5 U/μL）1 μL、10 μmol/L上游引物（NNV-2F）和下游引物（NNV-2R）各1 μL、双蒸水33 μL、第一轮PCR产物或其稀释液5 μL，配制反应体系。扩增程序为94℃ 2 min；94℃ 30s，57℃ 30s，72℃ 30s，共35个循环，72℃ 10 min，4℃ 保存。

具有同样扩增效率的商品化PCR试剂盒或一步法RT-PCR试剂盒也同样适用。

C.3.2.5 琼脂糖凝胶电泳

用1×TAE电泳缓冲液配制1.5%琼脂糖凝胶，加入适量的电泳核酸染料。将制备好的凝胶放入电泳槽内，添加1×TAE电泳缓冲液至没过凝胶，将PCR产物加入凝胶孔中，每孔点样量5μl，120V恒压电泳约30min，凝胶成像仪下观察PCR扩增结果。同时，设立DNA marker对照。

C.3.2.6 结果判定

阳性对照第一步PCR后在610bp处和/或第二步PCR后在255bp处有特异性目的条

带，且阴性对照和空白对照无上述特异性条带，实验有效。检测样品第一步PCR后在610bp处有条带和/或第二步PCR后在255bp处有特异性目的条带，且PCR产物测序结果同参考序列（附录D）进行比较，结果符合的可判定套式RT-PCR检测结果阳性；检测样品第一步PCR后在610bp处无特异性目的条带且第二步PCR后在255bp处无特异性目的条带，判定套式RT-PCR结果阴性。

附录 D

(资料性)

鱼类神经坏死病毒扩增产物参考序列

D.1 RGNNV 扩增产物的参考序列(GenBank登录号:NC_008041)

acactggagtttgaattcagccaatgtgccccgaaacacgggcggtggttacgttgctggcttcctgcctg
atccaactgacaacgatcacaccttcgacgcgttcaagcaactcgtggtgcagtcgttgccaaatggtgggaaagc
agaacagtcgcacctcagtacacccgcacgctcctctggacctcgtcgggaaaggagcagcgtctcacgtcacctgg
tcggctgatactcctgtgtgctggcaacaacactgatgtggtcaactgtcagtcgtgtgctggagtgttcgac
tgagcgttccatctcttgagacacctgaagagaccaccgctcccatcatgacacaaggttccctgtacaacgattcc
ctttccacaaatgacttcaagtccatcctcctaggatccacaccactggacattgccctgatggagcagctttcca
gctggaccgtccgctgtccattgactacagccttggaaactggagatgttgaccgtgctgtttattggcacctcaaga
agtttgctggaaatgctggcacacctgcaggctggtttcgtggggcatctgggacaactcaacaagac

D.2 SJNNV 扩增产物的参考序列(GenBank登录号:NC_003449)

acactggagttcgaattcagccaatgtgccccgaaacacgggcggtggttacgttgctggcttcctgcctg
atccaactgacaacgaccacaccttcgatgcgtccaagcaactcgtggtgcagtcgtcgccaaatggtgggaaagt
cgaacagtcggccccagttatactcgaacgcttctctggacctcaaccgggaaggagcagcgattgacatcacctgg
ccgctggtactcctgtgtgttggcagcaaacactgatgttgtcaactgtcagtcagtcgtgctggagcgttcgcc
ttagtgtcccgctcccttgagacacctgaggacaccaccgctccaattactaccaggcgccactccacaacgattcc
attaacaacggttacactggatttcgttccattctcttgggcgcgaccaactcgacctcgtcctcgaaacgctgt
ctttgtcactgacaaccgttgcctattgattacaatcttggagtgggcgacgtcgaccgggcccgtgtactggcacc
tgccgaagaaagctggagacactcaggtacctgctgggtactttgactggggactgtgggatgactttaacaagac

D.3 BFNNV 扩增产物的参考序列(GenBank登录号:NC_013459)

acactggagttcgaattcagccaatgtgccccgaaacacgggcggtggttacgttgctggcttcctgcctg

atccaactgacagcgaccacaccttcgacgcaattcaagcgaactcgtggtgcggtcgttgccaaatggtgggaaagc
agaacaatccgaccccagtatgcccgcgactcctctggacctcggtcgggaaggagcagcgtttgacatccccggg
ccggttgatactcctgtgtgctggcaacaacactgacgtcgtcaacgtgtcagtgctatgtcgtggagtgtgcgtc
tcagtgttccatctctcgagacacctgaagatacattcgctccaatcctaaccttgggaccactctacaacgactcc
cttcagccaatgatttcaaatcaatacttcttggctctaccagcttgacatcgcacctgaaggagccgtctattc
attagatcgcccgctgtccattgactacagctctgggcactggtgatgtcgacctgcccgtttactggcatgtgaaga
aagttgctggcaatgtgggaacacctgcggggtggttccattggggctatgggataatttcaacaaaac

D.4 TPNNV 扩增产物的参考序列(GenBank登录号:NC_013461)

acactggagttcgacattcagccaatgtgccccgaaacacgggcggcggttacgttgcttgcttctgcctg
atccagctgacaacgaccacaccttcgacgcaattcaagcaactcgtggtgcagtcgttgccaagtgggtgggaaagc
agaacagtcggccccaatgatgctcgaacgcttctctggacctcaaccggcaaggagcagcgcttgacctctcggg
ccggttgatactcctgtgtgctggcagcaaacactgatgtggtcaacgtgtcgggtgctgtgtcgtggagtgtgcgc
ttagtgtcccttcttggaaacacctgaggaaacattcgctccaatcacaagccagggaccgctgtacaacgattcc
atcacaactgccacttctgggtttcgttccatcctccttggctctggtcagcttgacatcgtcctccaggcactgt
ctattcgattgacagaccactgtctatcgattacaacctgggagttggtgacgttgacctgctgtgtactggcacc
tgctcaagaagaaagtgatccaacaacctgcaggcttcttggattggggattgtgggatgatttcaataaagt