ICS 65.020.30
B 41

SC

# 中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7229—2019

# 鲤浮肿病诊断规程

**Code of diagnosis for carp edema virus disease(CEVD)**

行业标准信息服务平台

2019-08-01 发布　　2019-11-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

全国农产品标准公共服务平台

# 前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本标准起草单位:全国水产技术推广总站、北京市水产技术推广站。

本标准主要起草人:徐立蒲、余卫忠、张文、曹欢、王静波、王姝、潘勇、张锋、梁艳、王立新、李清。

行业标准信息服务平台

# 鲤浮肿病诊断规程

## 1 范围

本标准给出了鲤浮肿病的缩略语、试剂和材料、仪器和设备及临床症状，规定了采样、核酸检测及综合判定。

本标准适用于鲤浮肿病的流行病学调查、诊断、监测和检疫。

## 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 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

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CEV：鲤浮肿病毒(carp edema virus，CEV)；

CEVD：鲤浮肿病(carp edema virus disease，CEVD)。

## 4 试剂和材料

4.1 CEV 阳性物质：由农业农村部指定的水生动物病原微生物菌(毒)种保藏机构提供。

4.2 水：符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

4.3 无水乙醇：分析纯，使用前预冷到−20℃。

4.4 荧光 PCR 2×预混合液(2× probe master mix)，商业试剂，−20℃保存。

4.5 套式 PCR 2×预混合液(2× master mix)，商业试剂，−20℃保存。

4.6 环介导等温扩增 2×反应缓冲液，商业试剂，−20℃保存。

4.7 Bst 酶：−20℃保存，酶浓度为 8 U/μL，避免反复冻融。

4.8 引物：荧光 PCR 和套式 PCR 引物浓度为 10 μmol/L，LAMP 引物浓度为 100 μmol/L，−20℃保存。

### 4.8.1 荧光 PCR 引物

上游引物 qF1：5′-AGTTTTGTAKATTGTAGCATTTCC-3′；

下游引物 qR1：5′-GATTCCTCAAGGAGTTDCAGTAAA-3′；

探针：5′-FAM-AGAGTTTGTTTCTTGCCATACAAACT-BHQ1-3′；

扩增 CEV P4a 蛋白基因中 76 bp 的片段。

### 4.8.2 套式 PCR 引物

4.8.2.1 F1 和 R1 扩增 CEV P4a 蛋白基因中的 548 bp 片段，F2 和 R2 从该片段中再扩增 180 bp 片段。

上游引物 F1：5′-GCTGTTGCAACCATTTGAGA-3′；

下游引物 R1：5′-TGCAGGTTGCTCCTAATCCT-3′；

上游引物 F2：5′-GCTGCTGCACTTTTAGGAGG-3′；

下游引物 R2：5′-TGCAAGTTATTTCGATGCCA-3′。

4.8.2.2 BF 和 BR 扩增 CEV P4a 蛋白基因中的 528 bp 片段，IF 和 IR 从该片段中再扩增 478 bp 片段。

上游引物 BF：5′-ATGGAGTATCCAAAGTACTTAG-3′；

下游引物 BR：5′-CTCTTCACTATTGTGACTTTG-3′；
上游引物 IF：5′-GTTATCAATGAAATTTGTGTATTG-3′；
下游引物 IR：5′-TAGCAAAGTACTACCTCATCC-3′。

4.8.3 **LAMP 引物**

F3：TCCCACAGAATGTAATCTCAA；
B3：ACCTCATCCAAATTACGTAGT；
FIP：GTCTGTCTTCGATAAGACAATGACT-TGTGGAGTTTTTGAAGTATACTGT；
BIP：TCAATCTGAATTCCTTTCCAGAACA-CGTTGATACAATTCCAGAGC；
LF：TGCTCTAGTTCTAGGATTGT；
扩增 CEV P4a 蛋白基因片段。

## 5 仪器和设备

5.1 组织研磨器。
5.2 高压灭菌锅。
5.3 普通冰箱。
5.4 超低温冰箱。
5.5 低温离心机。
5.6 生物安全柜。
5.7 荧光 PCR 仪。
5.8 PCR 仪。
5.9 可控温水浴锅。

## 6 临床症状

发病鱼行动迟缓，有时呈昏睡症状。病鱼的症状包括：烂鳃、眼球凹陷、体表糜烂、出血、皮下组织水肿、吻端和鳍的基部溃疡等。其中最常见的症状是包括烂鳃在内的鳃丝损害症状。鳃组织在低倍镜观察显示上皮细胞的过度增殖导致鳃丝肿胀；高倍镜下表现出鳃细胞水肿、重度增生、鳃小片相互融合以及上皮细胞脱落。参见附录 A 的 A.6。

## 7 采样

按 SC/T 7103 的规定执行。取样数量按 GB/T 18088 的规定执行。体长≤4 cm 的鱼取整条；带卵黄囊的鱼去掉卵黄囊；体长 4 cm～6 cm 的鱼苗取鳃及所有内脏；体长大于 6 cm 的鱼则取鳃、肾。

## 8 核酸检测

### 8.1 DNA 抽提

8.1.1 将样品匀浆后按 1∶10 比例添加 PBS 缓冲液或细胞培养液，冻融 1 次，1 000 r/min 离心 10 min 后，取 450 μL 上清液。加入到 1.5 mL 的离心管中。

8.1.2 加入 450 μL CTAB 溶液（见附录 B 的 B.1）混匀。25℃处理 2 h～2.5 h。

8.1.3 加入 600 μL 抽提液 1（见 B.2），混合混匀至少 30 s。12 000 r/min 离心 5 min，取上层水相（约 800 μL）置于新的 1.5 mL 离心管中。

8.1.4 加入 700 μL 抽提液 2（见 B.3），充分混匀至少 30 s。12 000 r/min 离心 5 min，取上层水相（约 600 μL）置于新的 1.5 mL 离心管中。

8.1.5 加入－20℃预冷的 1.5 倍体积的无水乙醇（约 900 μL），倒置数次混匀后，－20℃ 沉淀核酸 8 h 以上。

8.1.6 12 000 r/min 离心 30 min，小心弃去上清液。干燥 5 min～10 min 后加 11 μL DEPC 水溶解，用作 PCR 模板。

8.1.7 也可采用同等功效的核酸抽提试剂盒。

### 8.2 设立对照

设立阳性对照、阴性对照和空白对照。取已知含有 CEV 的阳性样品组织作为阳性对照；取 CEV 检测阴性的健康鱼组织作为阴性对照；取等体积的无菌去离子水代替模板作为空白对照。

### 8.3 荧光 PCR

#### 8.3.1 反应体系

2×预混合液(2×probe master mix)10 μL、引物 qF1 和 qR1 各 0.8 μL、探针 0.4 μL、模板 2.5 μL、加 DEPC 水至 20 μL。瞬时离心，将 PCR 管置于荧光 PCR 仪。

#### 8.3.2 反应条件

95℃ 2 min；95℃ 5 s、56℃ 31 s，共 40 个循环。

#### 8.3.3 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≤35 且出现典型扩增曲线，可判为 PCR 阳性；若待测样品无 *Ct* 值，或无扩增曲线，可判为 PCR 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。

### 8.4 套式 PCR

#### 8.4.1 引物 F1/R1 和 F2/R2 分别扩增 CEV P4a 蛋白基因中 548 bp 和 180 bp 的片段

反应体系(50 μL)为 2×预混合液(2×master mix)25 μL，引物 F1、R1 各 2 μL，模板 5 μL，DEPC 水补至 50 μL。反应条件为 95℃预变性 4 min，95℃变性 1 min，55℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，35 个循环后 72℃再延伸 10 min。如果第一步 PCR 后的产物在电泳时看不到特异的 DNA 带，取 5 μL 产物作模板；如果第一步 PCR 后的产物在电泳时能看到特异的 DNA 带，则需将产物按 1∶100 ～ 1∶1 000 稀释，取 5 μL 稀释后产物作模板，反应条件同上，加入引物 F2、R2 进行套式 PCR 扩增。

#### 8.4.2 引物 BF/BR 和 IF/IR 分别扩增 CEV P4a 蛋白基因中 528 bp 和 478 bp 的片段

反应体系(50 μL)为 2×预混合液(2×master mix)25 μL，引物 BF、BR 各 2 μL，模板 5 μL，DEPC 水补至 50 μL。反应条件为 95℃预变性 4 min，95℃变性 1 min，45℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，35 个循环后 72℃再延伸 10 min。如果第一步 PCR 后的产物在电泳时看不到特异的 DNA 带，取 5 μL 产物作模板；如果第一步 PCR 后的产物在电泳时能看到特异的 DNA 带，则需将产物按 1∶100 ～ 1∶1 000 稀释，取 5 μL 稀释后产物作模板，反应条件同上，加入引物 IF、IR 进行套式 PCR 扩增。

#### 8.4.3 琼脂糖电泳

用 1×电泳缓冲液(见 B.4)配制 2%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB，见 B.5，或其他等效商品化试剂)。将 5 μL 样品和 1 μL 6×上样缓冲液(见 B.6)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 0.5 h，当溴酚蓝到达底部时停止，将凝胶置于凝胶成像仪上观察。

#### 8.4.4 测序

取 PCR 产物进行基因序列测定，将测序结果与 GenBank 中参考序列(见附录 C)进行同源性比对。

#### 8.4.5 结果判定

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。待测样品第一步 PCR 扩增有特异的 DNA 带(548 bp 或 528 bp)，或第二步 PCR 扩增后有特异的 DNA 带(180 bp 或 478 bp)，并经基因测序确定是 CEV 的，可判为 PCR 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 CEV 的，判为 PCR 阴性。

### 8.5 LAMP 检测

#### 8.5.1 反应体系

LAMP 2×反应缓冲液(含 dNTP)12.5 μL，8 U Bst DNA polymerase 1 μL，钙黄绿素(FD) 1 μL(包含有

0.5 mmol/L 钙黄绿素和 10 mmol/L $MnCl_2$），FIP 0.4 μL，BIP 0.4 μL，F3 0.1 μL，B3 0.1 μL，LF 0.2 μL，模板 2 μL，DEPC 水补至 25 μL。

#### 8.5.2 反应条件

可控温水浴锅中，63℃恒温反应 60 min，80℃下恒温反应 5 min 以结束反应。轻轻混匀并在黑色背景下观察。

#### 8.5.3 结果判定

阴性对照及空白对照反应管液体呈橙色，阳性对照反应管液体呈绿色，则反应成立；待测样品反应管液体呈绿色，则判为核酸阳性；待测样品反应管液体呈橙色，则判为核酸阴性。

## 9 综合判定

### 9.1 可疑判定

养殖的鲤或锦鲤出现临床症状，或 CEV 核酸阳性时判定为疑似。

### 9.2 确诊判定

养殖的鲤或锦鲤出现临床症状，荧光 PCR、套式 PCR、LAMP 检测中任意一种方法检测结果阳性，判定为 CEVD 阳性。

养殖的鲤或锦鲤无临床症状，荧光 PCR、套式 PCR、LAMP 检测中任意一种方法检测结果阳性，判定为 CEV 核酸阳性。

行业标准信息服务平台

# 附 录 A
（资料性附录）
鲤浮肿病（CEVD）

## A.1 疾病描述

鲤浮肿病（carp edema virus disease，CEVD），也称锦鲤昏睡病（koi sleepy disease，KSD），是一种由鲤浮肿病毒（carp edema virus，CEV）引起鲤和锦鲤死亡的一种病毒性传染病。

## A.2 危害对象

各种规格的鲤、锦鲤。

## A.3 流行水温

该病在水温 7℃～27℃均有发生。

## A.4 临床症状

同池养殖的鲤或锦鲤行动迟缓，常聚集在池塘的水面或边缘处，或静置在池塘中，或在池底不动，呈昏睡状态。当受到触动时，病鱼会游动，但很快又继续处于昏睡状态。病鱼的症状包括：烂鳃、眼球凹陷、体表糜烂、出血、皮下组织水肿、吻端和鳍的基部溃疡等。其中最常见的症状是包括烂鳃在内的鳃丝损害症状。CEV 感染的鳃组织的病毒载量显著地高于肾、脾、表皮和肠腔等组织。鳃组织在低倍镜观察显示上皮细胞的过度增殖导致鳃丝肿胀；高倍镜下表现出鳃细胞水肿、重度增生、鳃小片相互融合以及上皮细胞脱落。

鲤浮肿病与锦鲤疱疹病毒病均具有烂鳃、眼凹陷等相似的症状，导致养殖者经常把 CEVD/KSD 误认为是锦鲤疱疹病毒病。因此在养殖生产中，当鲤或锦鲤出现烂鳃等症状，并有高死亡率时，应同时进行鲤浮肿病和锦鲤疱疹病毒病的检测，以确定病原。

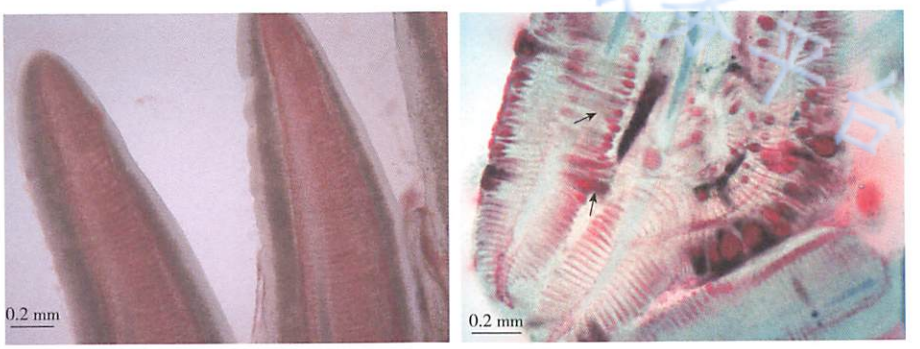
人工感染试验的结果显示：感染后到鱼发病，体内各组织内的病毒量达到最大值，然后逐渐下降，12d 后几乎为零。在流行病学调查中也发现，不久前刚发病恢复不久的渔场，即便在发病时显示有典型的 CEVD 临床症状，但在恢复期也很难检测到病毒。因此，在采样时需要注意这个问题。

## A.5 病原

鲤浮肿病毒（carp edema virus，CEV），隶属于痘病毒科（Poxviridae），其基因是线性双链 DNA（dsDNA）。目前已知痘病毒科分为脊椎动物痘病毒亚科和昆虫痘病毒 2 个亚科，而 CEV 属于未定亚科的痘病毒，其大小约 200 nm×400 nm。

## A.6 鳃丝显微镜观察

见图 A.1。




a） 正常锦鲤鳃丝　　b） 发病锦鲤，鳃丝变粗并相互黏附、末端充血膨大成球状（箭头）

图 A.1 正常和发病锦鲤鳃丝显微镜观察

农业标准信息服务平台

# 附 录 B
（规范性附录）
试剂及其配制

## B.1 CTAB 溶液(hexadecyl trimethy ammonium bromide，十六烷基三甲基溴化铵)

CTAB：按 CTAB 2%，NaCl 1.4 mol/L，EDTA 20 mmoL/L，Tris-HCl 20 mmoL/L pH 7.5 配制。配制时在 60 mL 水中顺序加入：8.19 g NaCl，0.744 g EDTA，1.21 g Tris，0.25 mL～0.3 mL 浓 HCl，调整 pH 为 7.5～8.0，再加入 2 g CTAB，搅拌待完全溶解后加水到 100 mL。使用前，需加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

## B.2 抽提液 1

1 moL/L Tris 饱和酚：氯仿：异戊醇按 25：24：1 混合，密闭避光保存。

## B.3 抽提液 2

将氯仿：异戊醇按 24：1 的比例混合，密闭避光保存。

## B.4 5×电泳缓冲液

| | |
|---|---|
| Tris | 54 g |
| 硼酸 | 27.5 g |
| EDTA | 2.922 g |
| 水 | 1 000 mL |

用 5 moL/L 的 HCl 调到 pH 8.0。

## B.5 EB(ethidium bromide，核酸染色剂)

用水配制成 10 mg/mL 的浓缩液。使用时，每 10 mL 电泳液或琼脂中加 1 μL。

## B.6 6×上样缓冲液

| | |
|---|---|
| 蔗糖 | 40 g |
| 加水溶解，定容至 | 100 mL |
| 溴酚蓝 | 0.25 g |

溶解后，4℃保存。

行业标准信息服务平台

# 附 录 C
## （规范性附录）
## PCR 扩增的序列

### C.1 荧光 PCR 扩增产物的参考序列(76 bp)

AGTTTTGTATATTGTAGCATTTCCTAGTTTGTATGGCAAGAAACAAACTCTCTTTACTGTAA
CTCCTTGAGGAATC

注：划线处为引物序列，其中荧光 PCR 扩增产物引物序列依次是 qF1、探针、qR1。

### C.2 套式 PCR 扩增产物的参考序列(548 bp)

GCTGTTGCAACCATTTGAGAATGAACTGAATCAACAAGTTGATATGCTTTGCATTTGCATCA
AAAGCAACAACTTGACGAGGGAATGATTGAGACAAAGTAGAGCTTCTTGTGTAATGCATAT
CTTGAGAAGCACGCTGCTCCACCTGCTACAATTCCAAGAGCATAATGATATTCAAGATCTAG
TCTAATTTGATCTGGAGAATAAGTATATGCTTTGATTCCATACAGTTTAATGAAATGCTCA
TAATTACCTTGTCCAAACAAAGTTAGATAAAATAGTTTTAGGATTGAAGCAAGAGCTGCTG
CACTTTTAGGAGGACAAGTAAAGTTACCACCAGCTCCTACAAGGAAAGCAATTGATTTTAT
ACTTGAAGAACATTCAAGAAGATTAGAGAAATTCTCAAGAATTAGAATTGCAACTTCTAGT
CTCTCTAGTTTTTCTAGATTTAGATTTAGGTTGGCATCGAAATAACTTGCATAATCTAGAA
GTTCATCAACATCAAATGTACTTACATCAAATAGGAAAGGATTAGGAGCAACCTGCA

注：划线处为引物序列，其中套式 PCR(548 bp)扩增产物引物序列依次是 F1、F2、R2、R1。

### C.3 套式 PCR 扩增产物的参考序列(528 bp)

ATGGAGTATCCAAAGTACTTAGATTAATGTTATCAATGAAATTTGTGTATTGTGTTTT
TGTTAGTCCAAGAGTTTTCTTTTCGTCATTTGTTACTTTTTGTAGTTGTTTAATATTTGTGA
TAAGATTTCCATTGGCATAAAATCCTTCCCAGATTTGGGTTGAAACATGTTTTAGAGTTTTG
TATATTGTAGCATTTCCTAGTTTGTATGGCAAGAAACAAACTCTCTTTACTGTAACTCCTTG
AGGAATCTGATCTAGAATTCCACAATATGTAATCTCAAATTTGTTTGTGGAGTTTTTGAAA
TATACTACTTCATCATACAATCCTAGAACTAGAGCAAGATTAGAAGTCATTGTCTTGTCAAA
GACAGACATCTTATTCCAATCATCAATCTGGATTCCTTTCCAGAACATAACATTTGCAATTT
TAACTTGCTCTGGAATTGTATCAACGTATCCAATATCTTTCTTTACTACGTAATTTGGATGA
GGTAGTACTTTGCTAACAAAGTCACAATAATGAAGAG

注：划线处为引物序列，其中套式 PCR(528 bp)扩增产物引物序列依次是 BF、IF、IR、BR。

### C.4 LAMP 检测扩增产物的参考序列(300 bp)

TCTTTACTGAAACTCCTTGAGGAATTTGATCTAGAATCCCACAGAATGTAATCTCAAAT
TTGTTTGTGGAGTTTTTGAAGTATACTGTTTCATCATACAATCCTAGAACTAGAGCAAGAT
TAGAAGTCATTGTCTTATCGAAGACAGACATCTTATTCCAATCATCAATCTGAATTCCTTTC
CAGAACATAACATTTGCAATTTTAACTTGCTCTGGAATTGTATCAACGTATCCAATATCTTT
CTTTACTACGTAATTTGGATGAGGTAGTACTTTGCTAACAAAGTCACAATAGTGAA

注：划线处为引物序列，其中 LAMP 检测扩增产物引物序列依次是 F3、IF2、LF、IF1、B1、B2、B3。

全国农业产品标准公共服务平台

中华人民共和国
水产行业标准
**鲤浮肿病诊断规程**
SC/T 7229—2019
* * *
中国农业出版社出版
（北京市朝阳区麦子店街18号楼）
（邮政编码：100125　网址：www.ccap.com.cn）
中农印务有限公司印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经销
* * *
开本 880mm×1230mm 1/16　印张 0.75　字数 15千字
2019年10月第1版　2019年10月北京第1次印刷
书号：16109·4861
定价：20.00元

版权专有　侵权必究
举报电话：(010) 59194261

SC/T 7229—2019

行业标准信息服务平台