



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2124—2013
代替 SN/T 2124—2008

大西洋鲑三代虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for infection with *Gyrodactylus salaris*

2013-03-01 发布

2013-09-16 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。

本标准参考了世界动物卫生组织(OIE)的《水生动物疾病诊断手册(2011 版)》中 2.3.03 大西洋鲑三代虫病的有关章节,并结合了国内外的文献资料报道以及起草单位多年的检疫工作经验。

本标准代替 SN/T 2124—2008《大西洋鲑鱼三代虫检疫技术规范》。

本标准与 SN/T 2124—2008 相比,主要技术变化如下:

- 简化了形态学鉴定方法,不再将其作为种类判定的主要依据;
- 删除了 IGS 序列 PCR 鉴定方法;
- 增加大西洋鲑三代虫结构图,标注其后吸器的结构,增加虫体消化及基于钩镰的种类鉴定方法。

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:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吴绍强、林祥梅、刘荭、王彩霞、吕继洲、岳志芹、刘建、王建峰、张永宁、贾广乐、张旻、邓俊花。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 2124—2008。

大西洋鲑三代虫病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了大西洋鲑三代虫病检疫时的样品采集、形态学检查、聚合酶链反应(PCR)初筛以及种类鉴定方法。

本标准适用于大西洋鲑三代虫病的检疫以及流行病学调查。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ITS:扩增内部转录间隔区(internal transcribed spacer)

CO I :线粒体细胞色素氧化酶 I 基因(mitochondrial cytochrome C oxidase I)

4 病原概述

大西洋鲑三代虫(*Gyrodactylus salaris*)是引起大西洋鲑三代虫病的一种淡水胎生寄生虫。从形态上看,大西洋鲑三代虫与同属三代虫 *G. teuchis* (主要寄生于褐鳟、大西洋鲑和虹鳟)和 *G. thymalli* (主要寄生于河鳟)十分相似,容易彼此混淆,具体情况参见附录 A。

5 材料

除另有规定外,所用化学试剂均为分析纯。试验用水要求达到 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.1 苦味酸铵-甘油(APG)溶液:配制方法见附录 B 的 B. 1。

5.2 软组织消化液、消化终止液:配制方法见 B. 2、B. 3。

5.3 裂解液:配制方法见 B. 4。

5.4 引物:浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,其序列如下:

ITS-up:5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3'

ITS-lp:5'-TCCTCCGCTTAGTGATA-3'

CO I -up:5'-TAATCGGCGGGTTCGGTAA-3'

CO I -lp:5'-GAACCATGTATCGTGTAGCA-3'

5.5 PCR 缓冲液、dNTP、DNA 聚合酶、DNA Marker、电泳上样缓冲液等,均为商品化试剂盒中成分。

5.6 电泳缓冲液:配制方法见 B. 5。

5.7 95%乙醇。

5.8 琼脂糖。

6 设备

6.1 解剖镜。

6.2 生物显微镜。

6.3 通风操作台。

6.4 PCR 仪。

6.5 电泳仪。

6.6 凝胶成像仪或紫外透射仪。

7 症状

鱼体表寄生一条至数十条大西洋鲑三代虫时多无临床症状表现。中度以上感染时,由于鱼在其他物质表面摩擦皮肤导致体表有闪光点。后期由于体表渗出附着黏液而体表灰白,鳍,特别是腹部、尾部及胸部的鳍出现坏死。严重感染的鱼,多在静水处不愿活动。

大西洋鲑三代虫病症状缺乏典型特征,不作为疫病判定依据。

8 大西洋鲑三代虫形态学检查

8.1 采样及固定

符合 GB/T 18088 的规定。

严重感染时,刮取鲑体表或鳍部位的坏死组织涂片镜检,可发现大量大西洋鲑三代虫。种类鉴定需要在实验室内结合镜检及 PCR 进行。

在实验室中检查大西洋鲑三代虫时,应采集活鱼并放在原生活的水中运输,且一个容器只装运一种鱼。在冰中运输的死鱼不适宜作为大西洋鲑三代虫的检查样品。

如没有对活鱼进行现场检查条件,宰杀后立即将整鱼置于 95%乙醇中固定保存(鱼和 95%乙醇比例不超过 1:9)。标本瓶应有足够大空间,同时瓶口足够开阔,以防放入、取出鱼时将虫体碰掉。瓶子应水平放置,以利于鱼体舒展至鱼体完全固定为止,镜下观察时可借助镊子翻转鱼体。固定好后,将瓶子竖直放置。

在鱼体较大或运输不方便时,也可采取鳍置于乙醇中保存送样。

8.2 活鱼的检查

采用针刺鱼脑杀死鱼。将鱼放在盛有运输时所用水的容器中,水完全淹没鱼体;采用双筒解剖镜对活鱼逐条检查。检查时,避免鱼体表受折射光线的干扰;当采用上光源解剖镜进行检查时,容器底部宜为黑色,增加反差便于寄生虫的监测。

检查整个鱼体表、特别是鱼鳍部位,使用 2 把镊子检查鳃和口腔、鼻腔。当检查体长大于 10 cm、没有被固定的小鱼鳍条时,采用下光源解剖镜,容易观察到鳍条上的大西洋鲑三代虫。

8.3 固定的鱼标本的检查

采用上光源解剖镜对乙醇保存的鱼或鳍进行检查。

检查前需经自来水漂洗,将装有鱼的容器接在自来水水龙头下,让水流轻轻通过容器浸泡约 2 h。

冲洗前应检查保存液和容器底部的沉淀物中是否有大西洋鲑三代虫。

也可直接取乙醇保存的鱼或者鱼鳍进行镜检。检查时,可佩戴手套,将解剖镜放在具有下出风口的通风操作台上进行。

8.4 虫体标本制作和形态观察

8.4.1 操作步骤

8.4.1.1 加一滴水到载玻片上,然后将待检虫体放到水滴上,盖上盖玻片,用一块滤纸在盖玻片的边缘慢慢吸水,直到水基本吸干为止。

8.4.1.2 滴一小滴苦味酸铵-甘油(APG,见 B.1)溶液到盖玻片的边缘,使其浸满盖玻片与载玻片之间的空隙。

8.4.1.3 在玻片上做好标签,标签上注明宿主种类、虫体的寄生部位、采集地点、采集日期和水温。

8.4.1.4 用生物显微镜观察玻片中的虫体。

8.4.2 形态特征

为便于种类鉴定,宜用活的虫体制作标本。甲醛固定的鱼,大西洋鲑三代虫标本呈白色;而乙醇固定的鱼,大西洋鲑三代虫则呈轻微的灰暗颜色。

大西洋鲑三代虫属寄生虫体小而延伸,体长 0.7 mm~1.0 mm。后吸器有 1 对中央大钩及背联结片与腹联结片各一,16 个边缘小钩(参见附录 C 的图 C.1)。其种类鉴定的依据是后吸器(即固着器)上边缘小钩、锚钩和联结棒的形态和大小(参见图 C.2)。

在进行种类鉴定时需采用软组织消化液(见 B.2)对虫体进行消化处理,只剩下硬的部分检查。消化步骤可在显微镜下进行,当观察到软组织消化完全后,加入终止液(见 B.3)。

大西洋鲑三代虫在形态上与褐鳟、大西洋鲑和虹鳟身上的 *G. teuchis* 以及河鳟身上的 *G. thymalli* 十分相似。但 *G. teuchis* 的钩镰要长而且更弯,*G. thymalli* 的镰杆的角度要小一些。后吸器各部件形态虽相对较为固定,但大小差异较大,故大小不足作为种类鉴定依据。

9 PCR 检测及鉴定

9.1 样品制备

采用从新鲜鱼体表采集的可疑虫体。用乙醇保存的样品,去掉多余的乙醇。

将虫体放在 0.5 mL 的离心管里。加入 7.5 μ L 裂解液(见 B.4),65 $^{\circ}$ C 作用 20 min,再 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min。该裂解产品不需要进一步纯化就可以用作为 PCR 模板。除检测样品外,还应设立以下对照:

- 取已知大西洋鲑三代虫样品作为阳性对照;
- 取健康鱼组织样品作为阴性对照。

9.2 大西洋鲑三代虫 ITS 序列 PCR 检测方法

9.2.1 反应体系

在 PCR 管内加入 10 $\times$ 缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μ L,dNTP(各 2.5 mmol/L)2.5 μ L,ITS-up 0.5 μ L,ITS-lp 0.5 μ L,rTaq(5 U/ μ L)0.5 μ L,模板 DNA 2 μ L,ddH₂O 将反应体系补充至 25 μ L。

9.2.2 反应程序

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C,1 min;55 $^{\circ}$ C,1 min;72 $^{\circ}$ C,2 min;35 个循环;72 $^{\circ}$ C,延伸 7 min。

9.2.3 琼脂糖电泳

取 5 μL PCR 扩增产物,进行 1%~2%的琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后,用凝胶成像仪或者紫外透射仪观察结果。

9.2.4 结果判定

只有阳性对照有 1 300 bp 的扩增条带,同时阴性对照没有相应片段的 PCR 产物时,才可判定 PCR 扩增试验成立,否则本次试验无效,需分析并排除引起试验无效的因素,并重新试验。若样品在 1 300 bp 处有目的条带,可将扩增获得的 ITS 序列进行测序;若样品在 1 300 bp 处无目的条带,则判定样品为大西洋鲑三代虫阴性。

将测序获得序列与已知的大西洋鲑三代虫及其近似种的 ITS 序列进行多重序列比对。(参见附录 D),如果与其同源性最近的序列属于大西洋鲑三代虫或 *G. thymalli*,可判定为大西洋鲑三代虫或 *G. thymalli*,并进行 CO I 序列 PCR 检测分析;否则,判定为大西洋鲑三代虫阴性。

在比对过程中,如果同源性最近的大西洋鲑三代虫不是来源于大西洋鲑鱼,则判定为大西洋鲑三代虫阴性。

9.3 大西洋鲑三代虫 CO I 基因 PCR 检测方法

9.3.1 反应体系

在 PCR 管内加入 10 $\times$ 缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μL ,dNTP(各 2.5 mmol/L)2.5 μL ,CO I -up 0.5 μL ,CO I -lp 0.5 μL ,rTaq(5 U/ μL)0.5 μL ,模板 DNA 2 μL ,ddH₂O 将反应体系补充至 25 μL 。

9.3.2 反应程序

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$,1 min;50 $^{\circ}\text{C}$,1 min;72 $^{\circ}\text{C}$,2 min;35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

9.3.3 琼脂糖电泳

取 5 μL PCR 扩增产物,进行 1%~2%的琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后,用凝胶成像仪或者紫外透射仪观察结果。

9.3.4 结果判定

只有阳性对照有 893 bp 的扩增条带,同时阴性对照没有相应片段的 PCR 产物时,才可判定大西洋鲑三代虫特异 PCR 扩增试验成立,否则本次试验无效,需分析并排除引起试验无效的因素,并重新试验。阴阳性对照成立的前提下,若样品在 893 bp 处有目的条带,可将扩增获得的 CO I 序列进行测序;若样品在 893 bp 处无目的条带,则判定样品为大西洋鲑三代虫阴性。

将测序获得序列与已知的大西洋鲑三代虫及其近似种的 CO I 序列进行多重序列比对,如果与其同源性最近的序列属于大西洋鲑三代虫可判定为大西洋鲑三代虫;否则,判定为大西洋鲑三代虫阴性。

在比对过程中,如果同源性最近的大西洋鲑三代虫不是来源于大西洋鲑鱼,则判定为大西洋鲑三代虫阴性。

10 结果综合判定

10.1 初检

如果在鲑科鱼的体表或鳍条肉眼观察到虫体,显微镜检,根据后吸器的形态确定为大西洋鲑三代虫

病可疑,判定标准见 8.4.2。

10.2 确诊

对于大西洋鲑三代虫病可疑的样品,进行大西洋鲑三代虫 ITS 序列和 CO I 基因序列的 PCR 扩增与序列分析,判定标准见 9.2.4 与 9.3.4,最终确诊。

附 录 A
(资料性附录)
大西洋鲑三代虫简介

大西洋鲑三代虫(*Gyrodactylus salaris*)隶属于吸虫纲、单殖亚纲、三代虫目、三代虫科,是常见的鲑类体外寄生虫。其主要寄生于大西洋鲑的鳃,严重时可见于体表其他部位以及鼻腔、口腔等处,很少寄生于鳃。三代虫主要感染 2 龄以内野生和养殖鲑,还能感染其他的鲑鳟鱼类,如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)、溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)、北极鲑(*Thymallus thymallus*)、湖红点鲑(*Salvelinus namaycush*)及褐鳟(*Salmo trutta*)(按易感性从强到弱排列)。

大西洋鲑三代虫身体细小延伸,具一对头器,没有眼点;有单细胞腺的头腺一对;口位于头器下方中央;体后端的后吸器发育良好,有一对中央大钩及背连结片与腹连结片各一,8 对边缘小钩有秩序地排列着。大西洋鲑三代虫用后吸器的大钩和小钩固着在寄主的身体上,同时前端的头腺也分泌黏液,用以黏着在寄主体上或慢慢爬行。边缘小钩刺入鱼体表,引起宿主鱼皮肤损伤,降低鱼体抵抗力,继而引发疾病。

大西洋鲑三代虫以多胚同体的胎生方式进行繁殖,种群增长速度快,传播迅速。

大西洋鲑三代虫适宜的生存环境温度为 0℃~25℃。相对而言,较耐低温,温度越高,存活时间越短,从鲑体表分离下来的虫体 19℃时只能生存 24 h,但在 3℃可存活 132 h。附着于死亡的鲑体表的虫体可存活 365 h。

大西洋鲑三代虫对挪威鲑科鱼的危害最为严重和典型。大西洋鲑三代虫是 20 世纪 70 年代从瑞典引种鲑时带进挪威的,仅 2 年就使挪威野生大西洋鲑科鱼幼鱼数量下降了 50%,1994 年调查显示该三代虫已遍及挪威 37 条河流,37 个渔场,挪威河的鲑几乎全军覆没,鲑养殖业遭到毁灭性打击。大西洋鲑三代虫在瑞典本土并未影响鲑养殖业,而被引入挪威后,却对野生及养殖鲑都造成了严重危害,因此,引起人们对鱼类三代虫病的口岸检疫的普遍关注。

我国关于三代虫的报道始于 1948 年,该病在我国各养鱼地区都有发生,主要危害鲢、鳙、草鱼、青鱼、鲫鱼、鲤鱼、团头鲂和鲇等多种淡水鱼,其中尤其是对鱼苗、鱼种的危害较大。大量寄生时,常引起病鱼大批死亡。我国目前尚无大西洋鲑三代虫的报道。

大西洋鲑三代虫的寄生数量很少时不导致任何临床症状。这种情况在鲑中不多见;但在其他鲑鳟鱼中,特别是虹鳟鱼中则很常见,单个寄生虫的感染也是常见的,在这种情况下,它可以寄生在鱼体表的任何一个部位。因此在监测无症状鱼(即健康鱼)上的大西洋鲑三代虫时,需要采取特别的步骤。

通常情况下可以根据形态学,主要依据是形态、后吸器上钩及联结棒的形态和大小来对大西洋鲑三代虫进行诊断。近年来,随着分子生物学技术的发展,分子标记对于检测和控制所有致病性种类,如在大西洋鲑三代虫的传播研究中是必不可少的,可结合 PCR、序列在线 BLAST 分析确定虫体种类。

附录 B
(规范性附录)
试剂及其配制

B.1 苦味酸铵-甘油(APG)溶液

将饱和的苦味酸铵溶液和甘油按照 1 : 1 的比例混合即成。

B.2 软组织消化液

75 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, 5% SDS 及 100 mg/mL 蛋白酶 K, pH 8.0。

B.3 消化终止液

B.3.1 中性福尔马林

含 10% 福尔马林的饱和碳酸钙溶液。

B.3.2 消化终止液

1 : 1 的甘油和中性福尔马林。

B.4 裂解液

0.45% NP40, 0.45% 吐温-20, 高压灭菌后冷冻储存, 临用前加入蛋白酶 K 使其终浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 。

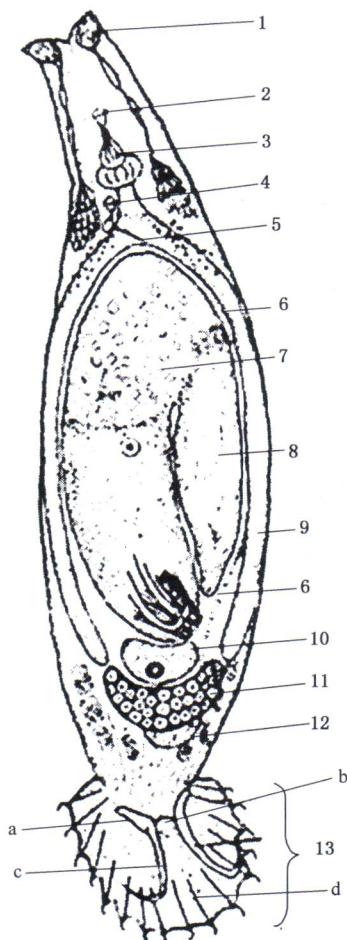
B.5 电泳缓冲液

取 Tris 碱 242 g、冰醋酸 57.1 mL、0.5 mol/L EDTA 10 mL、用 5 mol/L 的 HCl 调至 pH 8.0, 定容至 1 000 mL, 即为 50 倍 TAE 电泳浓缩缓冲液, 用前采用蒸馏水稀释 50 倍即可。

附录 C

(资料性附录)

大西洋鲑三代虫的基本形态结构及边钩形态



说明：

- 1 ——头器；
- 2 ——口；
- 3 ——咽；
- 4 ——交配囊；
- 5 ——贮精囊；
- 6 ——输精管；
- 7 ——第三代胎儿；
- 8 ——第二代胎儿；
- 9 ——肠；
- 10 ——成熟的虫卵；
- 11 ——卵巢；
- 12 ——睾丸；
- 13 ——后吸器(a——背联结片；b——腹联结片；c——锚钩；d——边缘小钩)。

图 C. 1 大西洋鲑三代虫的基本形态结构

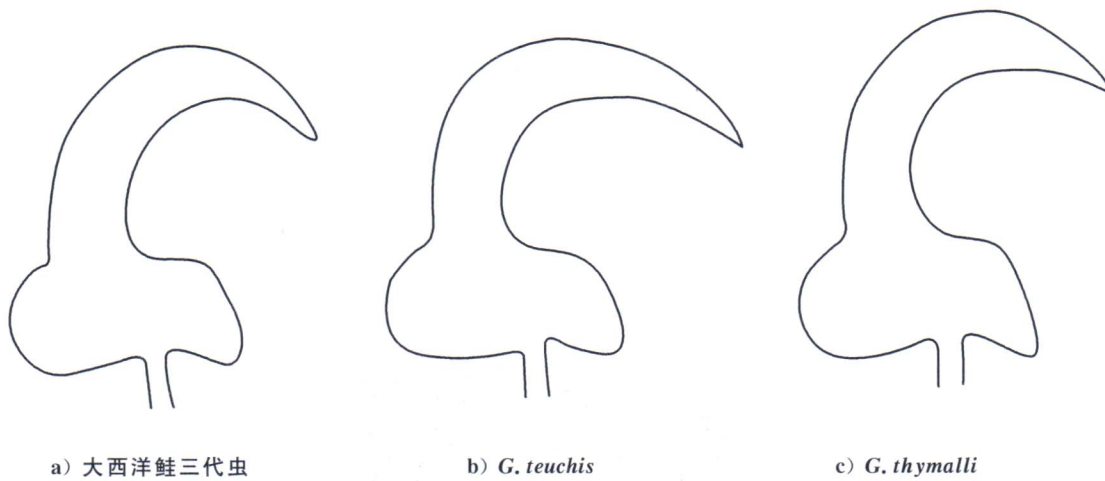


图 C.2 边钩形态

附录 D (资料性附录)

大西洋鲑三代虫 PCR 扩增产物的参考序列

D.1 大西洋鲑三代虫基因内部转录间隔区(ITS)扩增产物的参考序列

```

1      ttccgtagg tgaacctgcg aaggatcatt aaacatcggt tccttacttt gtggtgactc agtgggtgca
71     ttgcctaaaa tcaaaggatt ttaaagaatt aaaagcagtt aatggtgatt cgtttgttat tgcattggta
141    cgggtataatg atataccttg aagaataaag aataagggig gtggcgcacc tattctacaa gcagaactgg
211    ttaataagat cgattccgag tgacgatcgt ggggcaaaat aaatecagct tggggaactg gtaaacatg
281    gcattatacg agcaagatga ttccgaacga gattctttta acatageaat gaacacacgc tgtttcatgc
351    gcaaccaate tgcctataa aattggagag tgattagatt gtcacccac cgtcgtttag atggttgaca
421    ttaaaacgct cattggagtg aaciggtagt ctccgagct aaaatggtaa tggctagtct cggtaaggtc
491    tgactatcgg ttccgctacg gccagctcaa ttagtatcc getattaccg aaacatacac tacagtggtt
561    cgatagagtt ccacactcac tgcctctgca ccttcgggtg aacagtcagt agtcttagc gccccgtcaa
631    aagggaagaa gctttggttt attacaactc catgtgggtg atcactcgge tcacgtgacg atgaagagtg
701    cagcaaactg tgtaaccaa tgtgaaacgc aaactgcttc gatcatcgtt ctctgaacg caaatggcgg
771    ctaagggctt gctcttagcc acgttcgac gagtgctggc ttitactat cgtaacgctt aattagttac
841    ggattgggaa gtataccatg gctatgcgat taacttgttg ttgaaagttg aaacacgggg tattacacgg
911    cctttacggt ttgccctgtg gtgttctgat tctggtatta caccgacttt acggtttgct agatgaagtt
981    cacattcgat gagtatgcgg ctctcgagta ttacacggac ttacggttt gctcggaagt taaagacat
1051   tctttcatac acggccttta cggtttgata gaatgagaaa tagctctagt ggttcttccc ttaattgctt
1121   gggtagtatt gttgtgtact ttatggtctg ctctgcacag ggtgcgtggc ttagttcgtt ttgtaacgt
1191   gtactgaagt agagatagat ttgtgcatga tataccoagt gaaaataagt ccctgacctc gattcgagcg
1261   tgaatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga
    
```

D.2 大西洋鲑三代虫线粒体细胞色素氧化酶 I(CO I)基因扩增产物的参考序列

```

1      taatcggcgg gttcggtaat atacttttac caatcttact aaacttaaac gatcttaacc taccgcgcct
71     aaatgcttta agggcttggc tattgatgcc atcaatgggt ctagtattcg ctagtatgtg gttcggcagt
141    gggacaggat gaacatttta cccaccactg tccggggcca ggtttagtcc aagcattggt accgactttt
211    tgatgttttc gcttcacctg tctggtatct ccagtatatt cagctcatta aactttatat gtaccattat
281    aagagcttga ggtgtgtccg tgaatattaa ggacactgct atagtatat gggttactt gtttacgtcc
351    atcttactta tactgtccct accagtgcta gccgctggga taacaatgct gttatttgac cggaacttca
421    actcatcctt ctttgaccca gtgggcggag gggaccagct cctattccaa cacttatctt ggttctttgg
491    ccaccagag gtgtacgtac taatactccc agcattcggt atgattagtc acatctgtat aacgttaagt
561    aaaggagagc aaccatttgg ttactacggt atgggtgttc ccatgttctc tatagtctgc ttaggtaggg
631    tagtatgagc ccacatattg ttctctatag gtatggatgt aaagacttca gtcttttca ggtctgtaac
    
```

701 tatgataatt gcggtacca cgggtatcaa gatcttcacg tgactttaca tgctaaccag aagctcaaaa
771 aaggccaata acccaatcgt gtggtgggtg tacggcttca taatactggt tactatcgga ggagtgcag
841 ggatagtgt atcctcatca gttctagatg tgatgctaca cgatacctgg ttc
