

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXX—XXXX

本尼登虫病诊断技术规范

Technical Specification for Neobenedenia mellen illness

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任

本文件由广州双螺旋基因技术有限公司以及华南农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

中国兽医协会
CVMA

本尼登虫病诊断技术规范

1 范围

本文件规定了本尼登虫病临床检查、样品采集与病原鉴定等诊断技术要求。
本文件适用于本尼登虫病的检疫和诊断。

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 1.1-2020 标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则

GB/T 6682 分析实验室用水和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语简介

下列缩略语适用于本文件

荧光PCR: 实时荧光聚合酶链式反应

Ct: 扩增循环次数

5 流行病学

本尼登虫病由本尼登虫寄生所引起，主要危害海水养殖鱼类。该病全年均可发生，主要流行季节为春末、夏初和秋季。

6 临床检查

6.1 临床特征

6.1.1 患病部位

本尼登虫主要寄生于鱼的体表以及眼睛等部位，通常以宿主鱼的黏液和上皮组织为食，在鱼体上通过前后吸盘爬行运动。

6.1.2 病变

寄生数量多时，患病鱼体表可见乳白色半透明的椭圆形虫体；病鱼狂躁不安，游泳异常，常常向网箱等养殖设施摩擦身体；体表黏液增多，鱼鳞脱落，体表受伤，易引起继发性感染。

6.2 初步判定

6.2.1 将患病鱼捞起置于盛有淡水的容器中，如能观察到椭圆形的虫体从鱼体表脱落，可做出初步判定。

6.2.2 当发现可疑病鱼时，需继续观察或采样进行病原学鉴定。

7 采样

7.1 对象

患病鱼应符合5的临床症状。

7.2 器官或组织

对鱼的体表黏液进行采集。

8 病原学鉴定

8.1 设备、器械与试剂

8.1.1 设备与器械

荧光PCR检测仪、离心机、微量移液器、棉拭子、ep管等。

8.1.2 试剂

8.1.2.1 水生动物病原体基因组提取试剂盒

8.1.2.2 本尼登虫检测引物和荧光探针，序列如下：

上游引物：5'-AGAGTGCTGCAAAACGTGATATTT-3'

下游引物：5'-GACATGTGCGTTCAAGATTTCG-3'

荧光探针：5'-FAM-TGCGAATTGCACACTGCTTCGAACA-BHQ1-3'

8.1.2.3 荧光PCR反应液：

应按照不同的实时荧光PCR平台的说明书选取推荐的实时荧光PCR扩增试剂，除另有规定外，所用生化试剂均为分析纯，试验用水符合GB/T 6682的要求。

8.1.2.4 阳性对照

包含本尼登虫特异性片段（附录A）的合成质粒。

8.1.2.5 阴性对照

已被确认为本尼登虫病阴性的样品。

8.1.3 荧光PCR操作程序

8.1.3.1 样品DNA提取

在核酸提取区进行。取鱼的体表黏液放至ep管，使用商品化的水生动物病原体基因组提取试剂盒进行提取。

8.1.3.2 反应体系的配置

反应配置应在专门的区域进行。采取25 μ L的反应体系，扩增体系配制如下：

2X 荧光PCR反应液	12.5 μ L
上游引物（10 μ mol/L）	1 μ L
下游引物（10 μ mol/L）	1 μ L
探针（10 μ mol/L）	0.5 μ L
样品DNA或对照	5 μ L
超纯水	5 μ L

8.1.3.3 荧光PCR反应

在检测处进行。设置如下反应参数：

95 $^{\circ}$ C变性5 min，然后40个循环（95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 30s），并在循环反应60 $^{\circ}$ C采集荧光信号。

8.1.4 结果判定

8.1.4.1 质量结果判定

阴性对照： Ct 值 $>$ 40，无“S”型扩增曲线。

阳性对照： Ct 值 \leq 30，曲线呈“S”型扩增曲线。

上述两项若有一项不符合，应重新进行扩增；如重复检测结果仍为无效。

8.1.4.2 结果描述及判定

被检样品Ct值 $<$ 37，而且曲线呈“S”型扩增曲线，可判定为阳性。

被检样品Ct值 $>$ 40，无“S”型扩增曲线，可判定为阴性。

被检样品曲线呈“S”型扩增曲线，且 $37 < \text{Ct值} < 40$ ，判定为可疑，可疑样品需进行重新检测。如重新检测后仍出现上述结果，可判定为阳性；如重复检测后无Ct值或者无“S”型扩增曲线，可判定为阴性。

9 结果综合判定

9.1 如果在淡水浸泡病鱼后的水体中观察到疑似虫体，则判定为可疑。

9.2 如观察到疑似虫体，并用实时荧光定量 PCR 方法检测黏液呈阳性，则可确诊为本尼登虫。病鱼同时符合 6.1 中的症状，则确诊为本尼登虫病。

附录 A

本尼登虫特异性片段

AGAGTGCTGCAAAACGTGATATTTATTGCGAATTGCACACTGCTTCGAACATCGAAATCTTG
AACGCACATGTC

中国兽医协会
CVMA