



中华人民共和国水产行业标准

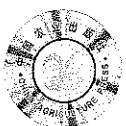
SC/T 7014—2006

水生动物检疫实验技术规范

The norm of experimental technique for quarantine of aquatic animals

2006-12-06 发布

2007-02-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部渔业局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：吉林农业大学、全国水产技术推广总站。

本标准主要起草人：夏艳洁、孙喜模、江育林、钱爱东、陈爱平、陈辉、张雅斌。

水生动物检疫实验技术规范

1 范围

本标准规定了水生动物检疫实验技术操作规范。
本标准适用于鲜活水生动物的检疫及初加工水产品的检疫。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

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 试剂、染色液与培养基

实验中所需试剂、染色液与培养基的配制均按 GB/T 4789.28 执行,GB/T 4789.28 中没有提及的试剂、染色液见附录 A。

4 仪器、设备

除有特殊要求外,均按微生物实验室要求准备。

5 实验室用水要求

5.1 制水浸片用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格。

5.2 病毒接种及细胞培养用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.3 聚合酶链式反应(PCR)测定用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格,且要用焦碳酸二乙酯(DE-PC)处理水(见附录 A.1)。

5.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)用水应符合 GB/T 6682 中二级水的规格。

6 采样

6.1 采样数量

对有症状的动物,挑选至少 10 条濒死的个体;对无症状的动物,应按 GB/T 18088 的规定,随机取一定数量的个体。

6.2 个体要求

活体或刚死不久的水生动物,新鲜的初加工水产品。

6.3 采集部位

已知有或怀疑有病原存在的组织或器官。

7 症状检查

7.1 水中活动情况

观察是否离群独游或有其他异样游动情况,对惊吓敏感程度,摄食是否正常等。必要时对饲养环境进行调查,如对水温(t)、溶解氧(DO)、酸碱度(pH)、氨氮(NH_3)、亚硝酸盐(NO_2^-)、化学耗氧量(COD)等理化指标进行测定。

7.2 外部检查

7.2.1 鱼类

体形体色的变化,体表黏液的多少,有无充血、出血等症状,鳍条、鳞片等损伤情况,鳃黏液及颜色变化,有无竖鳞、疖疮等现象,有无胞囊及其他寄生虫寄生等情况。

7.2.2 虾类

体色及体表光滑情况,肠道食物的充盈程度,有无附着物,有无白斑、红体情况,肌肉丰满程度,有无附肢溃烂、断残等情况。

7.2.3 蟹类

甲壳光滑程度、硬度,有无损伤情况,壳面有无溃疡、红色或棕色斑点,附肢残断或再生情况,有无附着物或其他寄生虫寄生等情况。

7.2.4 贝类

贝壳关闭情况,贝壳有无剥落或穿孔情况,出水孔喷水情况,出水时斧足收缩入壳内情况。

7.2.5 蛙类

腿部及腹部等损伤情况,体表黏液情况,有无体表充血、出血情况,有无寄生虫寄生等情况。

7.2.6 龟、鳖类

甲壳圆滑、硬度情况,损伤情况,有无溃疡、红脖子情况,有无附着物或寄生虫寄生等情况。

7.3 解剖检查

7.3.1 鱼类

仔细观察有无腹水,肝、脂肪、脾、胆、鳔、性腺、肠道、肾、心脏、脑、脊髓、肌肉等的颜色、大小有无变化,有无寄生虫或胞囊及其他病理变化等。

7.3.2 虾类

仔细观察有无烂鳃、黄鳃及黑鳃情况,仔细观察胃、性腺、肝胰腺、心脏、肌肉等的颜色、大小有无变化,有无寄生虫或胞囊及其他病理变化等。

7.3.3 蟹类

仔细观察有无烂鳃、黑鳃情况,仔细观察肝胰腺、消化道、肌肉、生殖腺等的颜色,有无寄生虫或胞囊及其他病理变化等。

7.3.4 贝类

贝壳打开后黏液和分泌物情况及有无气味,足丝附着情况,外套膜发黑或肿胀情况,鳃颜色及腐烂情况,内脏团颜色及瘦弱情况,有无附着物、寄生虫或胞囊寄生及其他病理变化等。

7.3.5 蛙类

仔细观察胃、肠道、肝脏、胰脏、肺、心脏、肌肉、脑等的颜色、大小有无变化,有无寄生虫或胞囊及其他病理变化等。

7.3.6 龟、鳖类

仔细观察食道、心脏、肝脏、胃、肠道、鳃腺、性腺、肌肉、脑等的颜色、大小有无变化,有无寄生虫或胞囊及其他病理变化等。

7.4 制片镜检

7.4.1 将体外凡能接触到生活水体的各部位用弯头镊子刮取黏液,放在滴有水(海水动物用煮沸过滤海水)的载玻片上,涂沫均匀,盖上盖玻片,制成水浸片,显微镜下观察。

7.4.2 将体内各组织、器官用弯头镊子取少部分,放在滴有生理盐水(淡水动物用0.65%,海水动物用0.75%)的载玻片上,涂沫均匀,盖上盖玻片,制成水浸片,显微镜下观察。

8 病毒分离与鉴定

8.1 分离病毒

8.1.1 取样部位

有明显病灶的取病灶部位,无明显病灶的:幼苗取整体,若有卵黄则除去;全长4 cm~6 cm鱼取头部、所有内脏;全长6 cm以上鱼取脑、肝、肾、脾,若为怀卵鱼则包括卵巢液。

8.1.2 样品处理

8.1.2.1 将所采样切成小块用含双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)(见附录A.2)洗2次。

8.1.2.2 样品剪碎、匀浆,用10倍体积的199充分悬浮,25℃,1 h~2 h。

8.1.3 分离病毒

8.1.3.1 3 000 r/min,离心30 min,收集上清液,4℃过夜。

8.1.3.2 接种24 h以内的新鲜敏感细胞。

8.2 病毒鉴定

8.2.1 氯仿敏感试验

8.2.1.1 将1 mL病毒样品液加入一密封容器内,另取1 mL作对照。

8.2.1.2 加1 mL氯仿,对照加1 mL 199培养液于室温下间歇振荡10 min。

8.2.1.3 将氯仿处理样品及未处理对照样品同时于1 000 r/min,离心5 min,取上层水相。

8.2.1.4 测定处理样品和未处理对照样品中病毒的半数细胞培养感染量(TCID₅₀)(方法见附录B)。

8.2.1.5 如果病毒经过氯仿处理后比未处理对照降低2个滴度以上,则认为对脂溶剂敏感,病毒可能有囊膜。

8.2.2 吖啶橙(AO)试验

8.2.2.1 有接种了病毒样品的,附有敏感细胞的盖玻片,PBS蘸洗。

8.2.2.2 加Carnoy's固定液(见附录A.3),固定15 min。

8.2.2.3 依次于95%、75%、50%、25%乙醇中各2 min。

8.2.2.4 加McIlvain's缓冲液(见附录A.4),8 min。

8.2.2.5 加0.01%吖啶橙染色液(见附录A.5)5 min。

8.2.2.6 加McIlvain's缓冲液,3 min。

8.2.2.7 10%甘油缓冲液封片。

8.2.2.8 荧光显微镜镜检,吖啶橙染色后双链核酸经紫外光照射发出绿光,而单链核酸发出红光。

8.2.3 DNA抑制剂(5-碘脱氧尿苷,即IUDR)抑制试验

8.2.3.1 将细胞传入24孔板或96孔板,24 h内长成单层。

8.2.3.2 吸出培养液,加入含50 μg IUDR/mL的199与HEPES(4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸)混合液。

8.2.3.3 12 h后,将待测病毒液用上述含IUDR的培养液10倍系列稀释。

8.2.3.4 接种到细胞板,每稀释度接3孔,每孔0.1 mL,根据细胞不同,选择不同温度培养。

8.2.3.5 12 h~24 h后换入不含IUDR的培养液,继续培养观察7 d,计算TCID₅₀值。

8.2.3.6 IUDR的浓度对检验结果的影响很大,因为它对细胞和病毒都有毒性,所以要有以下对照:

——正常细胞,用无IUDR的培养液培养(正常对照);

——正常细胞,用含IUDR的培养液培养(IUDR毒性对照);

- 已知 DNA 病毒,用无 IUDR 的培养液培养;
- 已知 DNA 病毒,用含 IUDR 的培养液培养(应受到抑制);
- 已知 RNA 病毒,用无 IUDR 的培养液培养;
- 已知 RNA 病毒,用含 IUDR 的培养液培养(应不受抑制)。

8.2.3.7 当待测病毒滴度用含 IUDR 的培养液培养时下降 2 个滴度以上判定为可被 IUDR 抑制,可能是 DNA 病毒,RNA 病毒的增值不受到 IUDR 的抑制。

8.2.4 免疫荧光试验(IF)

8.2.4.1 有接种了待测病毒样品的细胞培养的盖玻片,用室温的 PBS 蘸洗。未接种病毒的细胞培养的盖玻片做阴性对照,接种了已知病毒的细胞培养的盖玻片做阳性对照。

8.2.4.2 吸干水,晾干。

8.2.4.3 90%冷丙酮固定,10 min。

8.2.4.4 将一定稀释度的已知病毒的抗血清铺在玻片表面,湿盒 37℃,保温 1 h~3 h。用已知的阴性血清做对照。

8.2.4.5 用含吐温磷酸盐缓冲液(PBST)(见附录 A.6)洗 3 次,每次 3 min~5 min。

8.2.4.6 将标有荧光素(通常是 FITC)的抗体铺在表面。

8.2.4.7 湿盒 37℃,保温 1 h。

8.2.4.8 用 PBST 洗 3 次,每次 3 min~5 min。

8.2.4.9 9 份甘油,1 份 PBS 封片。

8.2.4.10 紫外波长 520 nm~530 nm,荧光显微镜观察。

8.2.4.11 荧光显微镜下,如用已知病毒的抗血清处理后,未接种病毒的细胞培养的盖玻片无荧光,接种了已知病毒的细胞培养的盖玻片出现强烈的荧光;而用已知的阴性血清处理后,均无荧光出现,则判定实验有效。如果待测样品出现荧光,即可判定为阳性。

8.2.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)

8.2.5.1 包被

将羊抗待检病毒的 IgG 用包被稀释液(见附录 A.7)稀释成工作浓度后包被 96 孔酶标板,每孔 0.1 mL,4℃ 过夜。

8.2.5.2 洗涤

将 PBST 加入小孔,2 min 后倒出,拍干。如此重复 3 次。

8.2.5.3 加入待测样品

每个样品二孔,每孔 0.1 mL。另将已知标准的病毒(阳性对照),正常组织样品(阴性对照)和细胞培养液(见附录 A.8)(空白对照)也各加二孔。37℃,1.5 h~2 h。倒出孔内液体。用 PBST 洗 3 次,方法同 8.2.5.2。

8.2.5.4 加入兔抗待检病毒血清

每孔加 0.1 mL 稀释到工作浓度的兔抗待检病毒血清。37℃,1.5 h~2 h。倒出孔内液体。用 PBST 洗 3 次,方法同 8.2.5.2。

8.2.5.5 消除非特异性过氧化物酶

每孔加 0.1 mL 0.1% 的 H₂O₂(用双蒸水稀释),37℃,15 min。倒出孔内液体。用 PBST 洗 2 次,方法同 8.2.5.2。

8.2.5.6 加入酶标羊抗兔 IgG 结合物(酶标二抗)

每孔加入 0.1 mL 稀释到工作浓度的酶标羊抗兔 IgG。37℃,1.5 h~2 h,倒出孔内液体,用 PBST 洗 3 次,方法同 8.2.5.2。

8.2.5.7 加底物

每孔加入 0.1 mL 底物邻苯二胺(OPD)溶液(见附录 A.9),室温下避光反应显色,根据室温,时间在 1 min~20 min 之间。

8.2.5.8 终止反应

当阳性对照出现明显棕黄色,阴性对照无色时,立即每孔加入 0.2 mL 浓度为 2 mol/L 硫酸终止反应。10 min 内测定。

8.2.5.9 结果判定

用酶标仪 490 nm 波长测量各孔光密度值(OD 值),以空白对照的 OD 值为零。先计算阳性对照和阴性对照的光密度值(即 OD 值)之比。如果阳性对照孔的 OD 值(P)与阴性对照孔的 OD 值(N)之比大于或等于 2.1(即 $P/N \geq 2.1$),表明对照成立,再计算待测样品孔和阴性对照孔的 OD 值之比。当样品孔的 OD 值(Pi)与阴性对照孔的 OD 值(N)之比大于或等于 2.1(即 $P/N \geq 2.1$)时,定为 ELISA 检测阳性。

8.2.6 中和试验(VN)

8.2.6.1 免疫血清 56℃,30 min 恒热,灭活。

8.2.6.2 病毒用含双抗和 HEPES 的 199 培养液 10 倍系列稀释,每稀释度 0.2 mL。

8.2.6.3 不同稀释度的病毒液与等量(0.2 mL)抗血清混合,25℃,1 h(对照是病毒加 199 培养液)。

8.2.6.4 混合液加入长有新鲜细胞单层的 24 孔板,每稀释度 3 孔,每孔 0.1 mL。

8.2.6.5 在适当温度下培育,每天观察细胞病变(CPE),7 d 后计数 TCID₅₀值。

8.2.6.6 用 36% 甲醛固定 30 min,后用 0.5% 的结晶紫酒精溶液(见附录 A.10)染色计数。

8.2.6.7 结果判断:根据染色结果计算中和指数。

示例:当对照病毒 TCID₅₀为 10^{6.5},加抗血清后 TCID₅₀为 10^{4.5},则中和指数为:10^{6.5-4.5} = 10² = 100

由于不同的病判断标准是不同的,根据不同要求判定为阳性、阴性或可疑。例如中和指数大于 50 为阳性,小于 10 为阴性,10~50 之间为可疑或重新测定。

8.2.7 聚合酶链式反应(PCR)检测

8.2.7.1 样品处理

8.2.7.1.1 取组织,剪碎,加 400 μL CTAB(见附录 A.11)振荡、摇匀。或 450 μL 细胞病变悬液加入 450 μL CTAB 液,混匀。

8.2.7.1.2 加 CTAB 至 800 μL,25℃,2 h。

8.2.7.2 DNA 抽提

8.2.7.2.1 加 350 μL 重蒸酚(取下层)和 350 μL 氯仿/异戊醇(24:1),用力混合 30 s。

8.2.7.2.2 12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相约 600 μL。

8.2.7.2.3 加 600 μL 氯仿/异戊醇(24:1),用力混合 30 s。

8.2.7.2.4 12 000 r/min 离心 5 min,取上层水相约 400 μL。

8.2.7.2.5 加 1.5 倍体积的无水乙醇,混均,-20℃过夜。

8.2.7.2.6 15 000 r/min 离心 30 min,小心弃上清,立即用滤纸吸干,37℃干燥 30 min。

8.2.7.2.7 加 10 μL 水溶解,吹打 20 次,-80℃10 min 保存,使用时再吹打 20 次,作为 PCR 扩增模板。

8.2.7.3 PCR 扩增 DNA

8.2.7.3.1 在 PCR 管中加水 62 μL、10×Buffer 10 μL、10×Mg²⁺ 1 μL、Taq 酶 1 μL(5 U/μL)、dNTP 2 μL、上、下游引物(不同病毒需采用不同的特异引物)5 μL(各 2.5 μL),模板 10 μL、矿物油 50 μL、混匀,离心片刻。

8.2.7.3.2 将反应管置于 PCR 扩增仪中,按下列程序进行 PCR 扩增,首先 94℃变性 4 min;再运行

94℃变性 1 min、视引物决定退火温度 1 min,72℃延伸 1 min,循环 35 次;再 72℃延伸 10 min(不同病毒及不同引物,PCR 程序可不同)。

8.2.7.4 电泳

8.2.7.4.1 用电泳缓冲液(TBE)(见附录 A.12)配制 2%的琼脂糖[含 0.5 μg/mL 核酸染色剂(EB)](见附录 A.13)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 样品和 2 μL 样品缓冲液(见附录 A.14)混匀后加入样品孔,同时标准样品对照。

8.2.7.4.2 5 V/cm 电泳约 0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。

8.2.7.5 结果判定

必须设置阳性样品对照、阴性样品对照、空白对照。在紫外灯下观察:阳性样品可见特异的核酸带,阴性和空白无特异的核酸带,如果待测样品可见特异的核酸带,则判为 PCR 阳性(注意不是阳性,而是 PCR 阳性,具体对病原如何判断要以不同病原而定,有的要测序,有的要分离病毒,有的就可以了)。

8.2.8 逆转录—聚合酶链式反应(RT—PCR)检测

8.2.8.1 样品处理

按 8.2.7.1 执行。

8.2.8.2 RNA 抽提

按 8.2.7.2 执行。

8.2.8.3 变性和退火

8.2.8.3.1 在 PCR 管中加模板(病毒悬液)10 μL、上、下游引物(不同病毒需采用不同的特异引物)3 μL(各 1.5 μL)、水 2 μL,70℃,5 min。

8.2.8.3.2 立即冰浴,离心收集。

8.2.8.4 cDNA 合成

8.2.8.4.1 在上述反应管中加 AMV 5X Buffer 5 μL(1 μm)、dNTP 2 μL(各 10 mmol/L)、RNA 抑制剂 1 μL(20 U)、AMV 反转录酶 1 μL、水 1 μL,离心片刻。

8.2.8.4.2 将 PCR 管置于 PCR 扩增仪中,42℃,60 min。

8.2.8.5 PCR 扩增 DNA

8.2.8.5.1 上述反应管中加 10×Buffer 10 μL、10×Mg²⁺ 8 μL(0.2 mmol/L)、引物(10.8 mmol/L,40 pmol)4 μL、dNTP(各 10 mmol/L)2 μL、Taq 酶 1 μL、水 50 μL、矿物油 50 μL,混匀,离心片刻。

8.2.8.5.2 PCR 扩增 DNA

按 8.2.7.3 执行。

8.2.8.6 电泳

按 8.2.7.4 执行。

8.2.8.7 结果判定

按 8.2.7.5 执行。

9 细菌分离与鉴定

9.1 细菌分离

9.1.1 用无菌方法在发病动物体用接种环采样,或以棉签采取分泌物。

9.1.2 选适宜培养基直接进行分离培养。

9.1.3 必要时进行增菌,不同种菌选择不同增菌培养基。

9.2 目检菌落特征

9.2.1 颜色:黄色、金黄色、灰色、乳白色、红色、粉红色等。

- 9.2.2 干湿情况:干燥、湿润、黏稠。
- 9.2.3 形态:圆形、不规则等。
- 9.2.4 形状:扁平、隆起、凹下。
- 9.2.5 透明程度:透明、半透明、不透明。
- 9.2.6 边缘:整齐、不整齐。
- 9.2.7 液体培养基培养特征:培养基是否呈混浊,管底有无沉淀,液面有无菌膜,是否产气等。
- 9.2.8 半固体培养基培养特征:细菌是否沿着接种线生长,是呈毛刷样生长还是均匀生长,上下生长是否一致。

9.3 显微镜观察

- 9.3.1 准备载玻片 载玻片应洁净、无油渍。
- 9.3.2 涂片 将细菌纯培养物或被检查物涂抹在滴有生理盐水的载玻片上。涂抹直径为1 cm左右。
- 9.3.3 干燥 一般采用放在室温下自然干燥。
- 9.3.4 固定 将干燥的涂片,涂面向上在酒精灯火焰上缓慢通过2次~3次。
- 9.3.5 染色 滴加染色液(配制方法见GB 4789.28中染色液的配制)于覆盖涂抹处,染色方法见表1。

表1 细菌染色方法

内 容	步 骤	结 果
革兰氏染色法	1. 滴加草酸铵结晶紫染色液,1 min~2 min; 2. 水洗; 3. 加革兰氏碘溶液,1 min~3 min; 4. 水洗; 5. 加95%酒精,30 s~1 min; 6. 水洗; 7. 加稀释石炭酸复红(或沙黄水溶液)10 s~30 s。	革兰氏阳性菌呈蓝紫色,革兰氏阴性菌呈红色。
姬姆萨氏染色法	1. 滴加甲醇,2 min~3 min; 2. 干燥; 3. 滴加姬姆萨氏染色液30 min以上。	荚膜呈淡紫色,菌体呈蓝色,视野常呈红色。
鞭毛染色法(刘荣标氏鞭毛染色法)	滴加刘荣标氏鞭毛染色液,2 min~3 min。	菌体和鞭毛均呈紫色。
芽孢染色法	1. 滴加5%孔雀绿水溶液,加热30 s~60 s,使生蒸气3次~4次; 2. 水洗30 s; 3. 加0.5%沙黄水溶液30 min。	菌体呈红色,芽孢呈绿色。

- 9.3.6 水洗 用水冲洗载玻片,冲掉多余染色液,直至冲洗水滴无色或浅色为止。
- 9.3.7 干燥 染色后一般用吸水纸吸干,或自然干燥。
- 9.3.8 镜检 用光学显微镜的油镜检查,观察菌体形态和染色特性(见表2)。

9.4 生化特性鉴定

生化特性鉴定操作与结果见表2。

表2 生化特性鉴定操作与结果

内 容	步 骤	结 果
糖类分解试验	1. 将被检菌接种到糖发酵培养基中; 2. 30℃培养 18 h~24 h。	培养基变黄为产酸;变黄又有气泡为产酸又产气;培养基蓝色为未产酸。
吲哚(靛基质)试验	1. 将被检菌接种于邓亨氏蛋白胨溶液中; 2. 30℃培养 24 h; 3. 培养液中加入戊醇或二甲苯 2 mL~3 mL, 摇匀, 静止片刻; 4. 沿管壁加入欧立希氏(Ehrlich's)吲哚试剂 2 mL。	红色为阳性。
淀粉水解试验	1. 将细菌划线接种于淀粉琼脂平板上; 2. 30℃培养 24 h, 生长后取出; 3. 在菌落处滴加少许革兰氏碘液, 培养基是深蓝色。	细菌菌落周围有透明环, 说明能水解淀粉。
乙酰甲基甲醇试验(V~P)试验	1. 将被检菌接种于葡萄糖蛋白胨液体培养基中; 2. 30℃培养 1 d~2 d, 培养物中加入 1 mL 10%的 NaOH, 混匀, 再加入 3 滴~4 滴 2% 氯化铁溶液; 3. 数小时后观察。	培养基表面的下层出现红色为阳性。
甲基红(M.R)试验	1. 将被检菌接种于葡萄糖蛋白胨液体培养基中; 2. 30℃培养 1 d~2 d; 3. 培养物中加入几滴甲基红酒精溶液。	红色为阳性。
柠檬酸盐利用试验	1. 将被检菌接种到 Simmons 固体柠檬盐培养基上; 2. 30℃培养 1 d~2 d。	培养基蓝色为阳性。
溴甲酚紫牛乳试验	将被检菌接种到溴甲酚紫牛乳培养基上。	培养基变黄为产酸为阳性。
凝固血清液化试验	1. 将被培养物在血清培养基斜面上作划线接种; 2. 37℃培养 1 周。	培养基液化为阳性。
硝酸盐还原试验	1. 将被检菌接种于硝酸盐培养基中; 2. 37℃培养 1 d~2 d; 3. 加入甲试剂 0.1 mL; 4. 加入乙试剂数滴。	红色为阳性。
尿素酶试验	1. 被检菌接种于尿素酶试验用培养基中; 2. 室温下, 5 h~24 h	红色为阳性。
接触酶试验	将 1 mL 3% 的 H ₂ O ₂ 倾注于被检菌落或菌苔上。	有气泡为阳性。
氧化酶试验	用四甲基对苯二胺的 1% 水溶液滴在细菌的菌落上。	菌落呈玫瑰红色, 然后变为深紫色者均为阳性。
苯丙氨酸脱氨酶试验	1. 将被检菌接种在苯丙氨酸脱氨酶试验用培养基上; 2. 30℃培养 18 h~24 h; 3. 加入 0.2 mL 10% 的氯化铁水溶液于生长面上。	变绿色为阳性。
氨基酸脱羧酶试验	1. 被检物接种于氨基酸脱羧酶试验用培养基中, 上面滴加一层无菌液体石蜡; 2. 30℃培养 1 d~2 d。	培养液先呈黄色变为蓝色为阳性; 蓝色为阴性。
氰化钾试验	1. 将被检物接种到氰化钾培养基中, 立即用软木塞塞紧; 2. 37℃培养 2 d。	细菌生长为阳性。
注: 结果判定可依据伯杰细菌学鉴定手册的有关章节。		

9.5 凝集反应

9.5.1 在玻片一端滴一滴生理盐水, 另一端滴一滴已知被测细菌的免疫血清。

9.5.2 用接种环挑取被测细菌,分别混入生理盐水及血清内。

9.5.3 将玻片略为摆动后静置于室温内,数分钟后观察结果。

9.5.4 50%以上凝集,既有可见的凝集片或凝集块,液体不甚透明或完全清亮透明为凝集反应阳性(需设立阳性和空白对照)。

9.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

按 8.2.5 执行。

9.7 聚合酶链式反应(PCR)检测

9.7.1 样品处理

放入 1.5 mL 离心管中的菌悬液(3 mL 生理盐水加 4 个菌落)或增菌液冻融或煮沸 10 min,加 CTAB 800 μ L,25 $^{\circ}$ C,2 h。

9.7.2 DNA 提抽

按 8.2.7.2 执行。

9.7.3 PCR 扩增 DNA

按 8.2.7.3 执行。

9.7.3.1 电泳

按 8.2.7.4 执行。

9.7.3.2 结果判定

按 8.2.7.5 执行。

10 真菌鉴定

取可疑寄生部位的组织器官,制水浸片,在显微镜下观察后确诊。

11 寄生虫鉴定

11.1 目检

通过系统解剖和器官分离,观察各组织、器官的变化及虫体有无的情况。

11.2 显微镜观察

11.2.1 原生动物的检查

鞭毛虫、变形虫,先以 10 \times 10 倍以上的显微镜进行镜检,再换 10 \times 40 倍的显微镜镜头观察,无法判断种类时,涂片染色后再镜检、鉴定;孢子虫类,需将胞囊压碎后制片,先以 10 \times 10 倍以上的显微镜进行镜检,再换 10 \times 40 倍的显微镜镜头观察,无法判断种类时,涂片染色后再镜检、鉴定;纤毛虫、毛管虫,以 10 \times 10 倍以上的显微镜镜头进行镜检,无法判断种类时,涂片染色后再镜检、鉴定。

11.2.2 蠕虫类检查

单殖吸虫、复殖吸虫、绦虫、线虫、棘头虫等先用肉眼检查,再用 10 \times 2 倍以上的解剖镜进行镜检,无法判断种类时,虫体需收集起来,经染色(单殖吸虫、复殖吸虫、绦虫、棘头虫等)或甘油酒精透明(线虫)后再以 10 \times 10 倍以上的显微镜镜头进行镜检、鉴定;环节动物用肉眼进行检查,在具上光源的解剖镜下鉴定。

11.2.3 甲壳动物检查

鳃尾类、桡足类、等足类等先用肉眼进行检查,再用 10 \times 2 倍以上的解剖镜进行镜检,无法判断种类时,虫体需染色后再以 10 \times 10 倍以上的显微镜镜头进行镜检、鉴定。

11.2.4 钩介幼虫检查

用肉眼进行观察,再用 10 \times 2 倍以上的解剖镜进行镜检、鉴定。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水

0.1%DEPC处理一级水(见 GB/T 6682—1992),剧烈振荡后,放置数小时,121℃,30 min 灭菌除去 DEPC,分装。

A.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

A.2.1 A液:

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
氯化钙	0.132 g
氯化镁	0.1 g
双蒸水	800 mL

A.2.2 B液:

磷酸氢二钠	1.15 g
磷酸二氢钾	0.2 g
双蒸水	200 mL

A.2.3 制作步骤按下列程序进行:

- a) 依次称取各试剂并依次溶解在双蒸水中;
- b) 0.104 MPa~0.112 MPa,15 min 灭菌 A 液和 B 液;
- c) 冷却后将 B 液缓慢倒入 A 液,并不断搅拌,最终 pH 7.0;
- d) 分装于 500 mL~1 000 mL 灭菌瓶中;
- e) 取 1 mL~5 mL 接于 T.G 中进行灭菌检验;
- f) 贮存于普通冰箱。

A.3 Carnoy's 固定液

无水乙醇	600 mL
氯仿	300 mL
冰醋酸	100 mL
按顺序加入,混匀,室温保存	

A.4 Mcilvain's 缓冲液

A.4.1 A液:

柠檬酸	19.2 g
25%的甲醇(0.1 mol/L)	1 000 mL

A.4.2 B液:

磷酸氢二钠	71 g
-------	------

25%的甲醇(0.2 mol/L) 1 000 mL

A.4.3 pH3.8的缓冲液

A液 71 mL

B液 129 mL

A液加B液混匀。

A.5 0.01%吖啶橙(AO)染色液

0.03g 吖啶橙用少量 Mcilvain's 缓冲液研磨后溶于 300 mL 缓冲液。

A.6 含吐温磷酸盐缓冲液(PBST)(pH7.4)

氯化钠 8 g

氯化钾 0.2 g

磷酸二氢钾 0.2 g

磷酸氢二钠 2.9 g

蒸馏水 1 000 mL

吐温-20 0.005 mL

摇匀后,4℃保存。

A.7 包被稀释液(pH9.6)

碳酸钠 1.59 g

碳酸氢钠 2.93 g

蒸馏水 1 000 mL

充分搅拌溶解后,4℃保存。

A.8 细胞培养液

199 培养基,加入 10%的胎牛血清

抽滤除菌,-20℃保存。

A.9 底物溶液(OPD)pH5.0

0.1 mol/L 磷酸氢二钠 600 mL

0.1 mol/L 柠檬酸 300 mL

在 100 mL 底物稀释液中溶入 80 mg 的邻苯二胺(OPD),然后加入 80 μ L 的 H_2O_2 ,放 5 min 不变色即可使用(使用前配制)。

A.10 0.5%结晶紫酒精溶液

结晶紫 0.5 g

无水酒精 100 mL

A.11 CTAB 溶液

CTAB 按 2% CTAB,1.4 mol/L 氯化钠,20 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),pH 7.5 配制。用前加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

A.12 电泳缓冲液(TBE)(5倍浓缩液)

三羟甲基氨基甲烷-盐酸 54 g

SC/T 7014—2006

硼酸	27.5 g
乙二胺四乙酸	2.922 g
水	1 000mL

用 5 mol/L 的盐酸调到 pH 8.0。

A.13 核酸染色剂(EB)

用水配制成 10 mg/mL 的浓缩液,用时每 10 mL 电泳液或琼脂中加 1 μ L。

A.14 样品缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g
水	100 mL

附 录 B

(规范性附录)

病毒半数细胞培养感染量(TCID₅₀)测定B.1 TCID₅₀测定方法

TCID₅₀测定过程按下列顺序进行:

- 细胞传到 96 孔板,24h 长满单层;
- 用含 10 倍双抗的 TC199 加 10% FCS 将待测病毒样品,10 倍系列稀释($10^{-1} \sim 10^{-7}$);
- 样品接种于 96 孔板,每稀释度 3 孔,每孔 0.1 mL;
- 在适当温度下培养,每天观察 CPE,待 CPE 完全后计算 TCID₅₀值或者 36% 甲醛固定后用 1% 的结晶紫酒精溶液染色计数。

B.2 TCID₅₀值的计算

见示例。

示例:表 B.1 TCID₅₀的测定举例(假定每孔接种 0.1 mL)

病毒稀 释 度	每组产生 CPE 孔数与每组 接种孔数比	累计产生 CPE 孔数	累计不产生 CPE 孔数	累计 CPE 孔数与 CPE 孔数 和无 CPE 孔数之和的比	
				比率	百分率, %
10^{-3}	4/4	9	0	9/9	100
10^{-4}	3/4	5	1	5/6	83
10^{-5}	2/4	2	3	2/5	40
10^{-6}	0/4	0	7	0/7	0

从表 B.1 中可见,50%感染终点在 10^{-4} 至 10^{-5} 之间,50%感染细胞的确切稀释倍数可按下列方法计算:(超过 50% 感染的百分比 - 50%)与(超过 50% 感染的百分比 - 低于 50% 感染的百分比)之比,即(83 - 50)与(83 - 40)之比,结果为 0.7。

所以,该病毒悬液的 TCID₅₀值为 $10^{-4.7}/0.1$ mL。