



团 体 标 准

T/XXX XXXX—2026

鲫鱼造血器官坏死病诊断和防治 技术规程

Technical specifications for diagnosis and prevention of herpesviral haematopoietic
necrosis in Crucian carp

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

2026-XX-XX 实施

江苏省渔业协会 发 布

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。

本文件由东台市渔业技术指导站提出。

本文件由江苏省渔业协会归口。

本文件起草单位：东台市渔业技术指导站、河海大学、江苏农牧科技职业学院、盐城市水产技术推广站、江苏沿海集团（东台）公司。

本文件主要起草人：刘晓倩、赵哲、袁圣、陈诚、史燕、郝凯、马鹏飞、赵悦、何小军、赵陆原、喻飞、黄颖、金兴坤。

鲫鱼造血器官坏死病诊断和防治技术规程

1 范围

本文件规定了鲫鱼造血器官坏死病诊断和防治技术规程,包括临床诊断要点,病原检测的技术原理、试剂材料、仪器耗材、操作步骤和结果判定,以及鲫鱼造血器官坏死病防治的技术流程。

本文件适用于鲫鱼造血器官坏死病的诊断、检疫和防治。

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

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

GB/T 36194-2018 金鱼造血器官坏死病毒检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 鲫鱼造血器官坏死病 Herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN

一种对鲫具有高度致命性的病毒性疾病,由鲤疱疹病毒Ⅱ型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)引起,该病毒于1992年秋季在日本爱知县和奈良县养殖的金鱼中首次发现。自2009年在中国江苏省部分地区养殖鲫中检测到CyHV-2以来,该病毒迅速在全国鲫主要养殖区传播,严重危害了我国的鲫养殖产业的发展。典型症状表现为鳃盖或鳍条基部出血,解剖可见肌肉点状出血、肝脾充血等病理特征。

3.2 实时荧光定量聚合酶链式反应 Quantitative real-time polymerase chain reaction. qPCR

是一种在DNA扩增反应中加入荧光化学物质,利用荧光信号累积实时监测整个聚合酶链式反应(PCR)进程,最后通过扩增曲线和Ct值对靶DNA模板进行定性和定量分析。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct值:达到阈值的循环数(Cycle threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(Dexyribonucleic Acid)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

CyHV-2:鲤疱疹病毒Ⅱ型(Cyprinid herpesvirus 2)

5 HVHN临床诊断要点

5.1 体表典型症状:濒死鱼在捞出水面时出现鳃丝流血,下颌有点状出血点,下腹部呈胭脂色发红;死鱼靠近水面一侧的鳃盖有胭脂色红斑。

5.2 内脏典型症状:肝胰脏黏连、出血;鱼鳔有点状出血点。

6 病原检测的技术原理

鲤疱疹病毒 II 型的 qPCR 检测方法是以待测样品的总 DNA 作为模板，以与目标序列两端序列互补的一对特异性寡核苷酸序列作为引物，在四种脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）存在下，利用 DNA 聚合酶的催化合成作用，经过变性、退火和延伸等数十次反应循环，使模板上位于两引物之间的目标 DNA 片段得到特异性扩增。反应体系中加入 SYBR Green 荧光染料，该染料在游离状态下荧光信号较弱，与双链 DNA 结合后荧光信号显著增强；随着 PCR 扩增产物的累积，体系荧光强度相应增加。通过实时荧光定量 PCR 仪在每个循环中收集荧光信号，并根据扩增曲线、Ct 值及熔解曲线判断是否扩增出目的片段及其特异性，从而判定待测样品是否感染鲤疱疹病毒 II 型。

7 病原检测的试剂和材料

- 7.1 除非另有说明，在检测中使用的试剂均为分析纯，实验室用水符合 GB/T 6882 的要求。
- 7.2 无水乙醇：-20℃普通冰箱中预冷。
- 7.3 70%乙醇：用无水乙醇和双蒸水配置，冷藏。
- 7.4 PBS：磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L pH 7.4）。
- 7.5 二氧化氯消毒剂。
- 7.6 Tris 平衡酚。
- 7.7 20 mg/mL 蛋白酶 K。
- 7.8 TE 缓冲液、抽提缓冲液。
- 7.9 10 mol/L 乙酸铵。
- 7.10 酚-三氯甲烷-异戊醇（25:24:1）。
- 7.11 氯仿/异戊醇（24:1）。
- 7.12 75%乙醇。
- 7.13 商品化的荧光定量 PCR 试剂盒（Realtime PCR premix 或 Realtime PCR Master Mix），包含反应所需的缓冲液、酶、dNTP、Mg²⁺等预混液：-20℃保存。
- 7.14 引物和探针序列。
上游引物（CyHV-F）5'-TCGGTTGGACTCGGTTTGTG-3'
下游引物（CyHV-R）5'-CTCGGTCTTGATGCGTTTCTTG-3'
- 7.15 阴性对照：已知感染 CyHV-2 的鲫鱼组织样品，-80℃保存。
- 7.16 阴性对照：已知未感染 CyHV-2 的鲫鱼组织样品，-80℃保存。
- 7.17 空白对照：无菌双蒸水为模板。

8 病原检测的仪器和耗材

- 8.1 荧光定量 PCR 仪。
- 8.2 组织研磨仪或研钵。
- 8.3 微量离心机。
- 8.4 高速台式离心机：可控温至 4℃，离心速度可达 12000r/min 以上。
- 8.5 普通冰箱。
- 8.6 -80℃超低温冰箱。
- 8.7 移液器。

- 8.8 无 DNA 酶的 1.5 mL 离心管。
- 8.9 PCR 反应管或八联管或 96 孔反应板。
- 8.10 移液器枪头：与各种规格的移液器配套使用，经高压蒸汽灭菌，并一次性使用。
- 8.11 乳胶手套：一次性使用。

9 病原检测的操作步骤

9.1 采样对象

临床诊断发现具有体表和内脏典型症状或疑似症状的鲫（学名：Carassius auratus subsp. auratus）等。

9.2 采样数量、方法和保存运输

应符合 GB/T 28630.4-2012 中附录 B 的要求。

9.3 样品采集

将所取待检样品分别置于灭菌 1.5 mL 离心管中，避免样品间交叉污染。所有非一次性使用的器具应经清洗，浸于新配制的有效氯 3.0×10^{-3} 的二氧化氯消毒剂中 5 min，经无 PCR 产物污染的蒸馏水或超纯水充分淋洗干净后方可用于检测。

9.4 核酸的提取

样品 DNA 的提取参照 SC/T 7237-2020 执行或可采用同等抽提效果的其他方法或使用商品化 DNA 抽提试剂盒。

9.5 实时荧光定量 PCR 检测

9.5.1 反应体系准备

qPCR 扩增试剂可采用 Vazyme AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix。按照表 1 的要求，配制成大体积的预混液，配制反应体系建议在冰盒中进行；配置好的反应液充分混匀后，按照每管 13.5 μL 分装于 PCR 反应管内，保存于 -20 °C。临用前加入样品模板 DNA 1.5 μL，同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

表 1. 实时荧光定量 PCR 反应体系组成

组分	加样体积
2× SYBR Green Master Mix	7.5 μL
CyHV-F (10 μmol/L)	0.3 μL
CyHV-R (10 μmol/L)	0.3 μL
DNA 模板	1.5 μL
ddH ₂ O	5.4 μL
总反应体积	15.0 μL

9.5.2 扩增程序设置

将上述加有 DNA 模板的 PCR 管按照以下程序进行 PCR 扩增：第一阶段，95℃预变性 5 min；第二阶段，95℃变性 30 s，60℃退火延伸 30 s，40 个循环，在该阶段采集荧光信号，最后于 4℃结束反应。根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

9.5.3 荧光通道设定

Reporter Dye 设定为 FAM(或 SYBR Green)，Quencher Dye 设定为 None；参比染料(ROX)设为 None 或关闭。

10 病原检测的结果判定

10.1 结果判定前设置

基线以仪器给出的默认参考值为参考，阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准。

10.2 试验成立判定

选用 SYBR Green 通道进行分析，阳性对照样品出现典型的“S”型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 30 ，阴性对照和空白对照无典型的扩增曲线，且 Ct 值无，二者均成立才可判定试验成立，否则试验无效。

10.3 阳性判定

出现典型的“S”型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 30 的样本为阳性，表明 II 型鲤疱疹病毒核酸阳性。

10.4 阴性判定

无典型的扩增曲线，且 Ct 值显示无的样本为阴性样本，表明 II 型鲤疱疹病毒核酸阴性。

10.5 可疑判定

如果 $30 < \text{Ct} \leq 40$ ，判定为可疑，此时重复扩增检测，如果重复扩增曲线为典型的“S”型扩增曲线且 $\text{Ct} \leq 40$ ，判定为阳性样本，表明 II 型鲤疱疹病毒核酸阳性，否则判定为阴性样本。

10.6 结果表述

该待检样品经检测为 II 型鲤疱疹病毒核酸阳性；该待检样本经检测为 II 型鲤疱疹病毒核酸阴性。

11 HVHN 防治技术流程

11.1 预防方法

①水质调控：维持水质的稳定尤其是溶解氧稳定（重点要提高投饵区溶解氧），避免低溶解氧胁迫的发生；同时，应避免 pH 长期高于 9.0。

②营养强化：开春后适当提高饲料档次，快速提升越冬后鱼的体质；当上半年水温 16℃或下半年水温 30℃时建议加量投喂免疫增强剂，投喂时间不低于 10 天，以提高鱼体免疫力。

③科学投喂：将传统的抛投式投饵机更换为风送投饵机，提高投饵区溶解氧，降低抢食时鱼群的密度，降低病原的传播速度。

④清塘管理：发过病的池塘养殖结束后彻底清塘，清除病原。

11.2 治疗方法

当按照本规程诊断方法确诊为 HVHN 时，应按以下流程进行病情的控制：

①在死鱼数量迅速上升时（成倍增长时）应立即停料，停至死鱼数量下降到稳定（不再下降）后恢复投料，投饵率从停料前的 1/3 逐渐恢复到正常投喂量；同时在饲料中加量添加板蓝根、免疫制剂、维生素，如果有细菌的继发感染，建议添加敏感抗生素。

②死鱼数量稳定时应保守治疗，不宜使用消毒剂（包括碘制剂）及杀虫剂，否则可能诱使本病快速暴发。

③五倍子具有消炎、止血、收敛等作用，可清除体表粘液，促进伤口恢复。五倍子末加盐一起泼洒可用于鳃出血病暴发后的处理，对抑制疾病的发展有一定的作用。

附录 A

(规范性)

试剂配方

A.1 70%乙醇

无水乙醇	70 mL
加 30 mL 水，混匀定容至	100 mL
分装后，室温保存。	

A.2 75%乙醇

无水乙醇	75 mL
加 30 mL 水，混匀定容至	100 mL
分装后，室温保存。	

A.3 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS)

氯化钠 (NaCl)	8 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	1.44 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.24 g
800 mL 水溶解，调 pH 至 7.4，加水至 1000 mL，高压蒸汽灭菌 20 min，室温保存。	

A.4 20 mg/mL 蛋白酶 K

蛋白酶 K	20 mg
水	1 mL
溶解后分装于无菌离心管中 (0.25 mL/管)， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。	

A.5 TE 缓冲液 (pH 8.0)

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	20 mg
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	1 mL
加水定容至	1000 mL
高压蒸汽灭菌 20 min，低温保存。	

A.6 抽提缓冲液

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	1 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	20 mL
1 mg/L 胰 RNA 酶	2 mL
10% SDS	5 mL
加水定容至	100 mL

混匀，室温保存。

A.7 10 mol/L 乙酸铵

乙酸铵

77 g

水

30 mL

加水定容至 100 mL，用 0.45 μm 滤膜过滤除菌，4 °C 保存。

A.8 酚-三氯甲烷-异戊醇（25:24:1）

Tris 平衡酚

50 mL

三氯甲烷

48 mL

异戊醇

2 mL

0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)

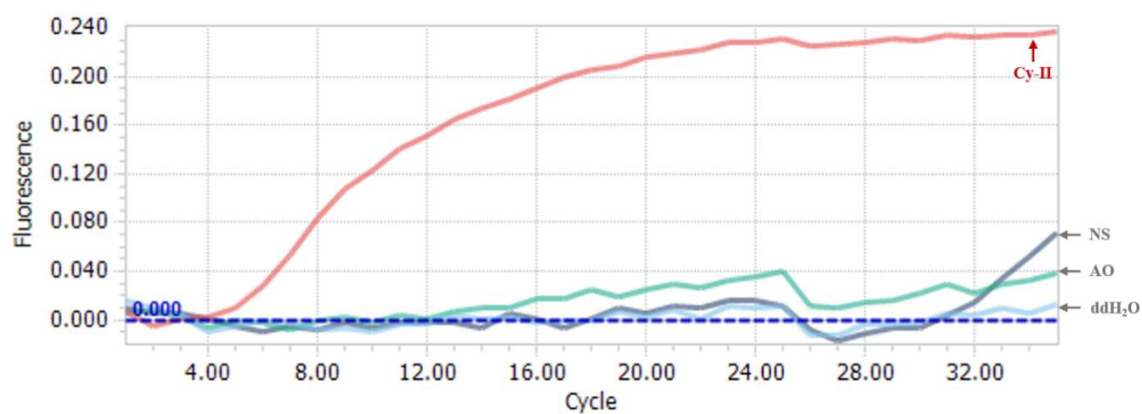
100 mL

混匀后，自然分层。置于棕色瓶内，4°C 保存，1 个月内使用。

附录 B
(资料性)

II 型鲤疱疹病毒的 qPCR 检测图例

选用 SYBR Green 通道进行分析，阳性对照样品有典型“S”型扩增曲线，且 Ct 值≤30，阴性对照和空白对照无典型的扩增曲线，且 Ct 值无。



Cy-II : II 型鲤疱疹病毒核酸；AO: 淀粉卵甲藻核酸；NS: 诺卡氏菌核酸

附录 C
(资料性)

qPCR 检测靶标: DNA 聚合酶基因 (NC_019495.1, ORF79) 片段

GTCTGACATGCTGGGAATGGCAGAGTGATCCTCAACAGGTTCTCTGTTGTCACTTTTACCGAGCTCCCTC
CTTTGTGCTCTCTGAATCGG