

江苏省渔业协会团体标准

《鲫鱼造血器官坏死病诊断与防治技术规程》

编制说明

一、工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准主要起草人及其所做的工作等。

1.1 任务来源

本标准由东台市渔业技术指导站提出，经江苏省渔业协会批准立项，于2026年6月2日《关于2026年江苏省渔业协会团体标准（第一批）立项的公告》下达（苏渔协[2026]6号）。任务来源于江苏省鲫鱼养殖主产区近年来频繁爆发的鲫鱼造血器官坏死病（Herpesviral haematopoietic necrosis, HVHN）对产业造成严重经济损失，急需统一、科学的诊断与防治技术规范。

1.2 协作单位

本标准由东台市渔业技术指导站牵头起草，参与单位包括河海大学、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。

1.3 主要起草人

主要起草人有刘晓倩、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。起草人员负责标准制定工作的组织、协调，相关资料的查阅、收集，标准文本及编制说明的起草、撰写，组织召开多次研讨会，通过电子邮件、传真等方式，征集、整理和归纳相关的意见和建议。

1.4 主要工作过程

2025 年 6 月-12 月：成立标准起草组，开展鲫鱼造血器官坏死病诊断与防治技术的文献调研和疫病流行情况调查，并形成研究方案。

2026 年 1 月-6 月：根据方案，建立病原诊断方法，总结临床诊断要点及防治技术方案；研究标准的相关内容并起草组完成标准草案初稿，组织专家讨论，提出修改意见。

2026 年 7 月-9 月：针对标准草案中的技术内容开展验证试验，征集部分养殖企业和检测机构的试用反馈。

2026 年 10 月：根据意见反馈对标准文本进行改进并进行试验验证，形成标准文本和编制说明送审稿；

2026 年 11 月：对标准文本和编制说明进行专家论证，并形成终稿，报送江苏省渔业协会审查，完成报批稿。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的论据

2.1 编制原则

科学性：基于国内外对 **CyHV-2** 的最新研究成果和检测方法。

实用性：结合江苏省鲫鱼养殖实际，突出可操作性。

规范性：严格遵循 **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》。

2.2 技术指标与操作要求依据现行国家、行业及江苏省地方标准制定主要引用：

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

2.3 标准主要内容确定依据

临床诊断要点：基于江苏省主产区数百例临床病例的总结，归纳出典型体表和内脏症状。

病原检测方法：采用基于荧光染料 **SYBR Green** 的实时荧光定量 PCR（qPCR）方法，参考 **SC/T 7237-2020** 及相关文献，具有高灵敏度和特异性。

防治技术流程：结合养殖实践与病害控制经验，提出停料、免疫增强、中药辅助等保守治疗方案，避免滥用消毒剂诱发病情。

三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

3.1 综述报告

鲫鱼是盐城市池塘养殖的主导品种之一，也是渔农民增收致富的重要品种选择。近年来，由于鲫鱼池塘养殖的病害日趋严重，养殖的产量效益很不稳定，并有逐年下降的趋势。其中以鲤疱疹病毒 II 型引起的鲫鱼造血器官坏死病（HVHN，俗称“鲫鱼鳃出血”）危害最为严重。该病的病原为鲤疱疹病毒 II 型（CyHV-2），属于双链 DNA 病毒，具有囊膜，可在鲫鱼的造血器官、鳃、肝、脾、肾等组织中复制。该病流行具有明显的水温相关性，10–33℃ 范围内均可发病，其中 22–28℃ 为发病高峰期，主要集中在 5 月、

8—9 月；传播途径包括水平传播（通过水体、渔具、饵料、野杂鱼等）和垂直传播（亲鱼携带病毒传递给鱼卵），且病毒可在鱼体内潜伏感染，当养殖环境恶化、鱼体应激时易暴发流行，发病后死亡率可达 70%—100%，给养殖户造成巨大经济损失。

因此，针对鲫鱼养殖中频发高发，危害严重的鲤疱疹病毒 II 型病原，建立其发病典型症状和病原核酸分子检测技术相结合的鲫鱼造血器官坏死病的诊断与防治技术规程，对于规范盐城市的鲤疱疹病毒 II 型诊断技术方法具有重要的指导意义，而且本规程的制定在鲫鱼养殖过程中的环境条件、鱼种放养、投喂管理、质量安全控制、捕捞运输等方面减少疾病的发生，实现鲫鱼养殖的全流程，全周期疾病精准防控具有重要意义。

3.2 主要验证试验

本标准共涉及两种诊断技术：HVHN 临床诊断和 CyHV-2 的 qPCR 检测。两种技术适用范围有所不同。其中临床诊断操作简便，适用于有经验技术人员对 HVHN 的初步诊断；但有部分疾病的症状跟 HVHN 有相似之处，无法准确鉴定。因此，只能对 HVHN 做出初步判断；qPCR 检测法可以对 CyHV-2 进行准确鉴定，因此适用于 HVHN 的确诊。

3.2.1 体表典型症状：标准起草组根据采集的 100 份病样，观察总结，发现患 HVHN 的濒死鱼眼球突出，眼球及下颌、胸鳍基部点状充血，部分鱼有身体出血现象；在捞出水面时出现鳃丝流血，下颌有点状出血点（图 1A），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（俗称“一点红”）（图 1B）。

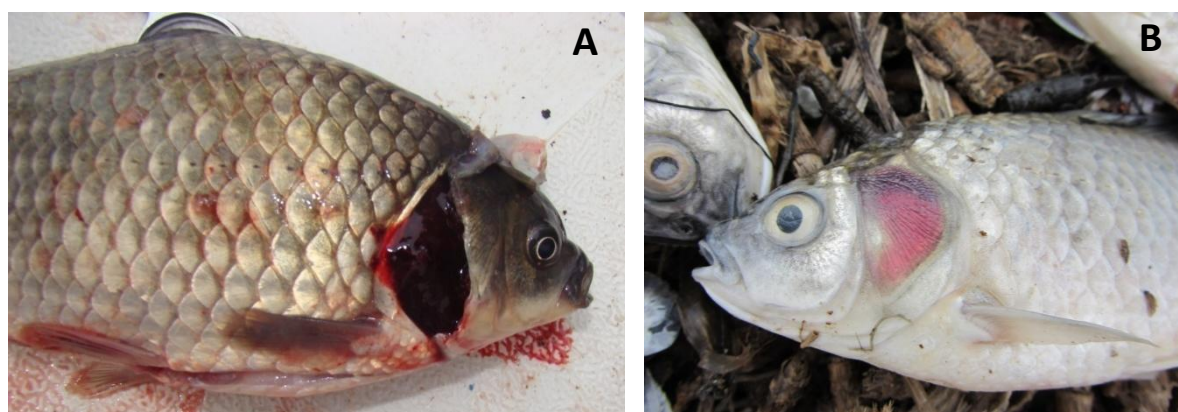


图 1. 鲫鱼造血器官坏死症的典型临床症状

3.2.2 内脏典型症状：对患 HVHN 的濒死鱼解剖发现，肝胰脏黏连、出血；鱼鳔有点状出血点（图 2），部分鱼有黄色半透明腹水。

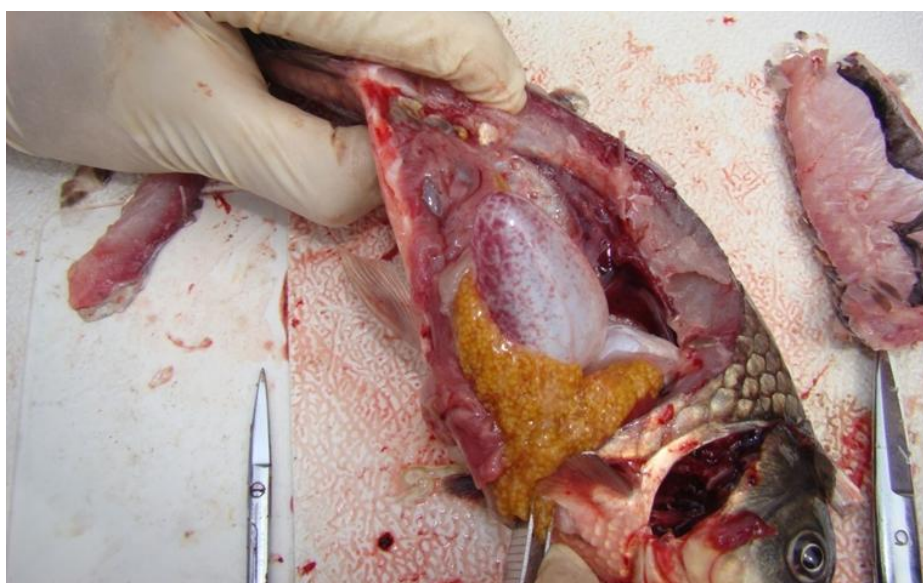


图 2. 鲫鱼造血器官坏死症的鱼鳔点状出血

3.2.3 qPCR 诊断

基于基因扩增的核酸诊断技术已被广泛地应用于人类和动植物的病原检测中。其中 qPCR 技术被证明是最准确、灵敏、简

便、快速的检测技术之一，越来越多地用于人类和动物传染病、的诊断，成为当前病原检测最有效的方法之一。应用 CyHV-2 的保守基因序列设计特异性引物，建立 qPCR 检测和鉴定 CyHV-2 的方法，对鲫鱼 HVHN 的确诊和水产品安全具有十分重要的意义。

1) 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。

2) 样品 DNA 制备：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。比如：使用 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0、天根生化科技（北京）有限公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、CTAB 裂解液消化抽提。试剂盒按照试剂盒说明书抽提，CTAB 按照下列方法抽提：

挑取疑似组织样品放入含 700 μ L CTAB 溶液，充分混匀，65℃ 作用 2h 至 2.5h。在含有样品的离心管中加入 700 μ L 的抽提液 I，充分混匀不少于 30s，12 000rpm，离心 10min；取上层水相至另一离心管，加入等体积的抽提液 II，充分混匀不少于 30s，12 000rpm，离心 10min；取上层水相至另一离心管，加入 1.5 倍体积的预冷的无水乙醇，颠倒数次混匀，-20℃ 放置 8h 以上。12 000rpm，4℃ 离心 15min，小心弃上清液。干燥后加入 50 μ L 溶解，做 qPCR 反应模板。

3) qPCR 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 ℃。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。

具体反应体系如下：

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

选取 DNA 聚合酶基因（NC_019495.1，ORF79）作为分子检测靶标，参考序列：GTCTGACATGCTGGGAATGGCAGAGTGTATCCTCAACAGGTTCTCTGTTGTCACTTTTACCGAGCTCCCTCCTTTGTGCTCTCTGAATCGG。特异性引物序列如下：上游引物（CyHV-F）5′ - TCGGTTGGACTCGGTTTGTG-3′；下游引物（CyHV-R）5′ - CTCGGTCTTGATGCGTTTCTTG-3′；预期扩增产物长度为 92 bp。

4) 扩增程序设置：荧光定量 PCR 采用 LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪进行，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。

5) 扩增曲线分析：不同浓度梯度标准模板均呈现典型的实时荧光扩增曲线，随着初始模板拷贝数逐级降低，各梯度扩增曲线按照模板量由高到低依次向右移动（图 3）。不同浓度梯度之间具有较为清晰的层次关系，指数扩增阶段整体平行，同一浓度技术重复间曲线聚集程度较好，表明该体系能够对模板初始拷贝数的变化产生规律性的 C_q 响应。上述扩增动力学特征说明，所建立的 CyHV-2 qPCR 体系具有较好的反应稳定性，并具备进一步开展绝对定量分析的基础。

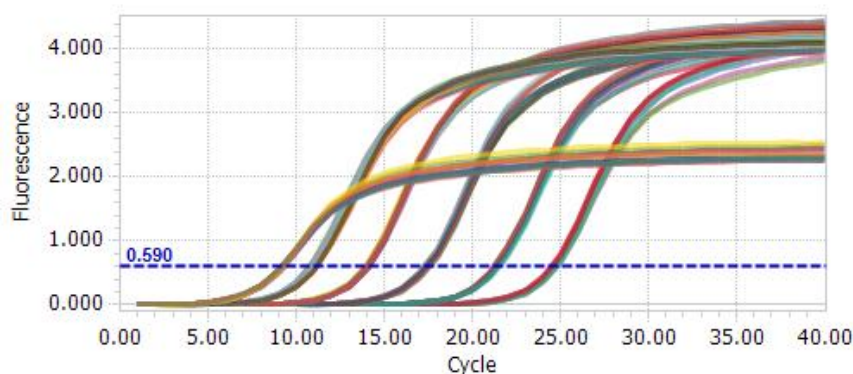


图 3. CyHV-2 扩增曲线

6) 熔解曲线分析：熔解曲线结果显示，各扩增产物均形成单一、尖锐且较为集中的主熔解峰，主峰 T_m 约为 82.6°C ，不同浓度梯度及技术重复间峰位总体一致，未观察到明显独立的第二主峰（图 4）。该结果表明，在所建立的扩增条件下，CyHV-2 引物主要形成单一特异性扩增产物，未见明显非特异性扩增产物形成独立熔解峰，说明该体系具有良好的扩增产物单一性及稳定性。

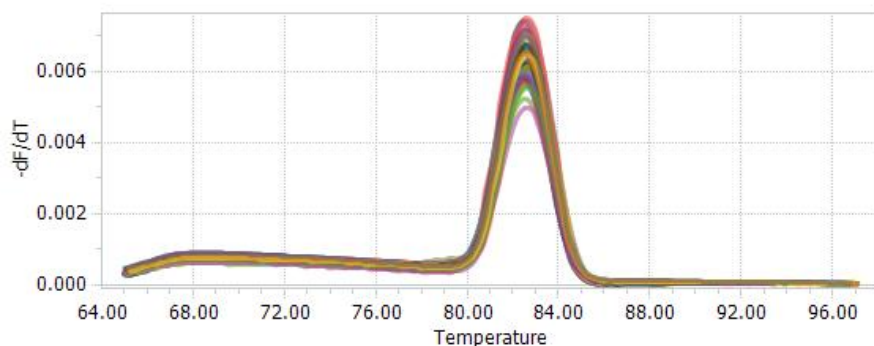


图 4. CyHV-2 熔解曲线

7) 标准曲线及扩增效率分析：采用系列梯度稀释标准质粒建立 CyHV-2 绝对定量标准曲线。结果显示，Cq 值与反应体系中初始模板拷贝数的对数之间具有良好的线性关系（图 5），线性回归方程为： $Cq = -3.2144 \times \log(\text{quantity}) + 33.2045$

决定系数 R^2 为 0.9913，扩增效率（E）为 104.7%。扩增效率处于实时荧光定量 PCR 通常接受的 90%~110% 范围内，表明该体系具有较高的扩增效率；同时， R^2 高于 0.99，说明在所检测模板浓度范围内，初始拷贝数与 Cq 值之间具有较好的线性定量关系，表明该体系能够满足 CyHV-2 定量检测的基本方法学要求。

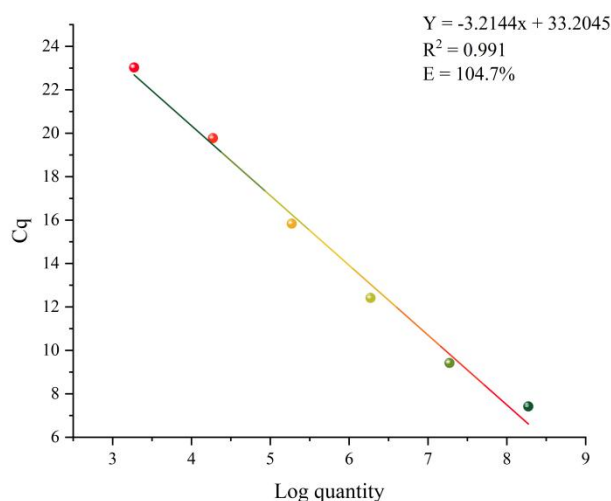


图 5. CyHV-2 绝对定量标准曲线

8) 结果判定前设置及结果判断：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。

选用 SYBR 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 的样本为阳性（图 6），表明 II 型鲤疱疹病毒核酸阳性。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。如果 $30 < \text{Ct 值} \leq 40$ ，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。

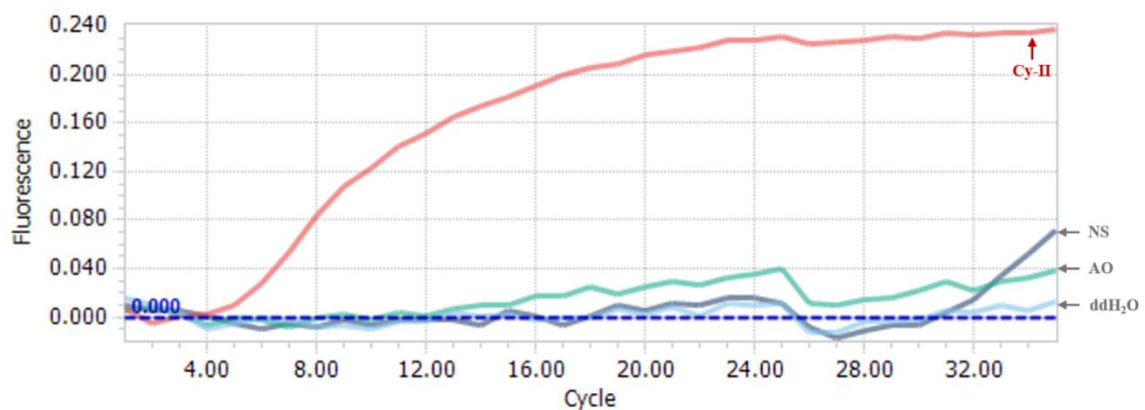


图 6. CyHV-2 的实时 qPCR 检测图例

6) 检测重复性分析：根据临床症状特征共采集 20 个疑似

HVHN 样品，来源地分别大丰、射阳和连云港等地。本标准的 qPCR 诊断方法的阳性检出率为 90%，检测时间缩短至 2 小时内，适用于现场快速诊断。

3.3 技术经济论证

本规程的推广应用可显著降低因误诊、滥用药导致的损失。

此外，规程的推广将带动苗种培育、饲料供应、冷链物流等配套产业的协同发展，预计带动相关产业就业岗位增加 200 余个，为区域乡村振兴注入持续动力

3.4 预期的经济效果

提高诊断准确率，减少无效治疗投入；

规范用药行为，降低药残风险；

提升江苏省鲫鱼养殖的整体健康水平和市场竞争力。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对接情况

目前国际上尚无针对鲫鱼造血器官坏死病的专门标准。本标准在病原检测方法上参考了《WOAH 水生动物诊断试验手册（第 8 版）》中关于疱疹病毒类疾病的检测原则，并结合国内实际进行了优化。基于荧光染料 SYBR Green 的 qPCR 法与国际主流方法一致，具备国际先进水平。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

本标准内容符合《中华人民共和国渔业法》《水产苗种管理

办法》《兽药管理条例》等法律法规要求。检测方法与 GB/T 36194-2018《金鱼造血器官坏死病毒检测方法》等相关标准协调一致。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在起草过程中未出现重大分歧意见。部分专家对“停料治疗”提出异议,认为可能影响鱼体恢复。经多次讨论和现场验证,确认在死鱼数量快速上升阶段停料可降低消化负担和病原传播,最终保留该条款。

七、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

建议本标准作为**推荐性团体标准**实施,供鲫鱼养殖企业、病害检测机构、技术推广部门等单位自愿采用。当前阶段不宜强制推行,以免影响养殖户接受度。

八、贯彻标准的要求和措施建议

宣传培训: 依托江苏省渔业协会、水产技术推广站组织开展规程宣贯培训活动,通过线下培训班、现场观摩会、线上微课等形式,对养殖主体、基层技术骨干进行系统培训,确保相关人员准确理解、熟练掌握规程内容。

试点推广: 在东台、大丰等地设立示范点,开展标准应用示范,同时组建技术服务团队,深入养殖一线开展常态化技术指导,及时解决养殖户在规程实施过程中遇到的问题,确保规程操作要求落到实处。

配套工具: 开发标准操作视频、检测记录模板,降低基层使

用门槛。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

本标准中涉及的引物和探针序列为自主研发，将提交专利保护申请。标准发布后，相关检测方法将向社会公开，鼓励第三方检测机构应用。