

ICS 65.020.30
CCS B 50

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7243—2025

对虾玻璃苗弧菌病诊断方法

Diagnostic method for shrimp translucent post-larva vibriosis

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会水产养殖病害防治分技术委员会(SAC/TC 156/SC 11)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：张庆利、刘爽、杨冰、冯东岳、万晓媛、张翔、徐婷婷、余星潼、王伟、谢国骊。



对虾玻璃苗弧菌病诊断方法

1 范围

本文件描述了对虾玻璃苗弧菌病(translucent post-larva vibriosis, TPV)诊断的试剂和材料、仪器设备、临床症状、样品,以及组织病理学检测、荧光定量 PCR 检测和综合判定的方法。

本文件适用于致玻璃苗弧菌(*Vibrio* spp. causing TPV)引起的对虾玻璃苗弧菌病的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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 4789.7 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验
 GB/T 28630.2—2012 白斑综合征(WSD)诊断规程 第2部分:套式 PCR 检测法
 GB/T 28630.4—2012 白斑综合征(WSD)诊断规程 第4部分:组织病理学诊断法
 SC/T 7011 水生动物疾病术语与命名规则
 SC/T 7103—2008 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语与定义

SC/T 7011 界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- B-细胞:分泌细胞(blister cell)
 BC:细菌定殖(bacterial colonization)
 BHQ1:黑洞荧光淬灭剂(black hole quencher-1)
 bp:碱基对(base pair)
 Ct 值:阈值循环数,即实时荧光定量 PCR 检测中荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle-threshold value)
 DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
 dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)
 F-细胞:纤维细胞(fibrillar cell)
 FAM:羧基荧光素(6-Carboxyfluorescein)
 HE:苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining)
 PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)
 PFA:多聚甲醛固定液(paraformaldehyde fixative)
 qPCR:实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction)
 R-细胞:储存细胞(reserve cell)
 RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)
 Spv:沙门氏菌质粒毒力基因(*Salmonella plasmid virulence gene*)
 TAMRA:四甲基罗丹明叠氮化物(tetramethylrhodamine)
 Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)

TcdB:艰难梭菌杀虫毒素 B 基因(*Clostridium difficile* insecticide B gene)
TPD:对虾“玻璃苗”(shrimp translucent post-larva disease)
TPV:对虾玻璃苗弧菌病(shrimp translucent post-larva vibriosis)
VHVP:弧菌高毒力蛋白(*vibrio* high virulent protein)
VIC:多管水母维多利亚绿色荧光蛋白(*Aequorea victoria* green fluorescent protein)
 V_{TPV} :致对虾玻璃苗弧菌(*Vibrio* spp. causing TPV)
vhvp:弧菌高毒力蛋白基因(*vibrio* high virulent protein gene)
vhvp-2:弧菌高毒力蛋白基因-2(*vibrio* high virulent protein gene-2)

5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用蒸馏水、去离子水或相当纯度的水。

- 5.1 中性树胶。
- 5.2 二甲苯:分析纯。
- 5.3 95%乙醇:分析纯。
- 5.4 dNTPs(各 2.5 mmol/L):dATP、dUTP、dGTP、dCTP 各 2.5 mmol/L 的混合物,−20 °C 保存。
- 5.5 MgCl₂ (25 mmol/L), −20 °C 保存。
- 5.6 10×PCR 缓冲液,无 Mg²⁺ 离子,−20 °C 保存。
- 5.7 *Taq* 酶(5 U/μL), −20 °C 保存。
- 5.8 PFA 固定液:按 A. 1 配制。
- 5.9 苏木精染色液:按 A. 2 配制。
- 5.10 1%伊红储存液:按 A. 3 配制。
- 5.11 1%焰红储存液:按 A. 4 配制。
- 5.12 伊红-焰红染色液:按 A. 5 配制。
- 5.13 粘片剂:按 A. 6 配制。
- 5.14 85%乙醇:按 A. 7 配制。
- 5.15 80%乙醇:按 A. 8 配制。
- 5.16 75%乙醇:按 A. 9 配制。
- 5.17 70%乙醇:按 A. 10 配制。
- 5.18 50%乙醇:按 A. 11 配制。
- 5.19 组织病理学检测阳性对照:受 V_{TPV} 感染且显示明显病理变化的对虾仔虾肝胰腺组织切片。
- 5.20 组织病理学检测阴性对照:未受 V_{TPV} 感染的健康对虾仔虾肝胰腺组织切片。
- 5.21 第一套引物和探针:引物与探针 −20 °C 保存;引物和探针序列为:
vhvp_SpvB-F1:5'-AGTCGTTTGGAGTATTGGGTG-3';
vhvp_SpvB-R1:5'-GCCATCAGAGGTGTAGATCAC-3';
vhvp_SpvB-P1:5'-6-FAM-TCTTCGAGTGCTGCGACCACTTT-TAMRA-3'。
- 5.22 第二套引物和探针:引物与探针 −20 °C 保存;引物和探针序列为:
vhvp_TcdB-F2:5'-GTAATCGTTTGGTTAGCACCG-3';
vhvp_TcdB-R2:5'-ACCAAACCCACGGAAGTC-3';
vhvp_TcdB-P2:5'-VIC-CACGGCCATCCCAGACTCCAT-BHQ1-3'。
- 5.23 荧光定量 PCR 检测阳性对照:已知受 V_{TPV} 感染的对虾肝胰腺组织 DNA,或 V_{TPV} 菌液 DNA,或含有 *SpvB*、*TcdB* 基因的质粒 DNA, −20 °C 以下保存。
- 5.24 荧光定量 PCR 检测阴性对照: V_{TPV} 检测阴性对虾组织 DNA, −20 °C 以下保存。

5.25 荧光定量 PCR 检测空白对照:灭菌双蒸水。

6 仪器设备

- 6.1 切片机。
- 6.2 组织脱水机。
- 6.3 包埋机。
- 6.4 染色机。
- 6.5 展片水浴锅。
- 6.6 平板烘片机。
- 6.7 封片机。
- 6.8 光学显微镜。
- 6.9 荧光定量 PCR 仪:具有 FAM 和 VIC 荧光通道。
- 6.10 高速离心机:最高转速不低于 12 000 r/min。
- 6.11 微量移液器。

7 临床症状

患病的仔虾个体,空肠空胃、肝胰腺颜色变淡,幼体从头胸甲到腹节的体色由此变得通透和半透明。见附录 B 中的 B.1。

8 样品

8.1 采样对象和要求

凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)、中国对虾(*P. chinensis*)和斑节对虾(*P. monodon*)等易感品种,优先选择濒死虾或具有 TPV 典型临床症状的个体。易感宿主种类和临床症状见附录 B。

8.2 采样数量、方法和保存运输

应符合 GB/T 28630.4—2012 中附录 B 的规定。

8.3 样品采集

8.3.1 选取待分析的对虾样本,切取其肝胰腺和中肠组织,快速浸入 4% PFA 固定液中固定,12 h~24 h 后,换入 70%乙醇中长期保存。

8.3.2 开展荧光定量 PCR 检测采样时,按照 SC/T 7103—2008 中 8.2 和 8.3 的要求,幼虾或养成期对虾应选取其肝胰腺、胃、中肠及后肠等组织样本,亲虾的非致死检测取粪便,仔虾或未达到 0.5 g 的样品可合并样本。所取样品立即进行 DNA 提取,或暂存于 95%乙醇中,或保存于 -20 ℃。

8.3.3 对于待分离细菌的对虾样品,用无菌牙签从肝胰腺或中肠蘸取微量液体,按 GB 4789.7—2013 进行分离和培养。

9 组织病理学检测

9.1 修块

对组织样品进行修整,按照 GB/T 28630.4—2012 中附录 B 的要求,保证病灶部位能被有效地切片。

9.2 脱水

将修块后的组织样品置于不同浓度乙醇溶液中,按照如下步骤所示时间依次进行脱水操作:75%乙醇(1 h 45 min)→85%乙醇(1 h 45 min)→85%乙醇(1 h 45 min)→95%乙醇(45 min)→95%乙醇(45 min)→无水乙醇(45 min)→无水乙醇(45 min)。

9.3 透明

将脱水后的组织样品依次置于无水乙醇和二甲苯的混合溶液以及二甲苯溶液中,按照如下步骤所示

时间依次进行透明操作:无水乙醇:二甲苯(体积比 1 : 1)(25 min)→二甲苯(20 min)→二甲苯(20 min)。

9.4 浸蜡

将透明处理后的组织样品置于纯石蜡中进行浸蜡操作:纯石蜡(1 h 20 min)→纯石蜡(1 h 20 min)。

9.5 包埋

利用包埋机对浸蜡后的样品进行石蜡包埋。

9.6 切片

利用切片机对包埋后的组织样品进行切片,切片厚度 3 μm 。对每个石蜡包埋块至少切取两片不连续的切片。

9.7 展片

宜 40 $^{\circ}\text{C}$ 展片,用涂有一层粘片剂的载玻片捞出,置于平板烘片机上于 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘片 2 h。

9.8 染色

利用染色机对切片进行脱蜡、脱水与组织染色处理,步骤如下:二甲苯(5 min)→二甲苯(5 min)→无水乙醇(2 min)→无水乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→80%乙醇(2 min)→80%乙醇(2 min)→50%乙醇(2 min)→蒸馏水(2 min)→蒸馏水(2 min)→蒸馏水(2 min)→苏木精染色液(5 min)→缓慢流动的自来水(6 min)→伊红焰红染色液(2 min)→95%乙醇(1 min 20s)→95%乙醇(2 min)→无水乙醇(2 min)→无水乙醇(2 min)→二甲苯(2 min 30 s)→二甲苯(2 min 30 s)→二甲苯(2 min 30 s)。

9.9 封片

滴加 2 滴中性树胶封片于载玻片的组织切片上,利用封片机进行封片。也可委托合格第三方机构完成 9.1~9.9 中的内容。

9.10 观察

在光学显微镜下观察。

9.11 结果判定

V_{TPV} 感染对虾仔虾引起其消化腺出现急性坏死。根据仔虾的肝胰腺和中肠病理变化情况,将 V_{TPV} 感染分为早期、中期和后期。

肝胰腺小管上皮的分泌细胞(B-细胞)内出现嗜碱性的细菌定殖区域,细菌定殖区随着感染进程而不断扩大;中肠上皮细胞出现明显破损,少量上皮细胞从肠道基底膜上部分脱落;判定为感染早期。

病原菌开始侵染肝胰腺小管的纤维细胞(F-细胞)与储存细胞(R-细胞),在肝胰腺小管中以及其上皮细胞内形成大量细菌集群,肝胰腺上皮部分细胞脱落至肝胰腺小管管腔内;中肠上皮伴随明显的上皮细胞圆化和脱落,细胞脱落至中肠管腔内;判定为感染中期。

肝胰腺小管大部分上皮细胞脱落至管腔内,小管间血细胞浸润明显、可见大量的继发性细菌感染;中肠的上皮细胞也几乎脱落殆尽,肠道基底膜塌陷,塌陷的管腔内、管腔外可见大量细菌定殖,光学显微镜高倍放大倍数(100 倍)下,可见高密度的、清晰的细菌个体;判定为感染后期。

凡纳对虾 TPV 的组织病理学图例见图 B. 2~图 B. 7。

若组织样品切片中观察到上所述感染早期、感染中期或感染后期的组织病理特征,则判定为组织样品具有 TPV 典型的组织病理学特征。若组织样品切片中没有上述感染早期、感染中期或感染后期的组织病理特征,则判定为组织样品不具有 TPV 典型的组织病理学特征。

10 qPCR 检测

10.1 DNA 提取

10.1.1 对于组织样品,取 30 mg~50 mg,按 GB/T 28630.2—2012 中 6.3 提取总 DNA。

10.1.2 对于按照 GB 4789.7 方法培养的细菌样品,取 1 mL 培养菌液置于 1.5 mL 无菌离心管中,7 000 r/min离心 5 min,尽量弃掉上清液,加入 1 mL 灭菌双蒸水清洗 1 次后离心,沉淀加入 100 μL 灭菌双蒸水充分混匀,煮沸 10 min,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至新管备用。

10.1.3 可采用具有同等 DNA 抽提效果的其他方法或使用商品化 DNA 提取试剂盒。

10.2 qPCR 反应体系配制

qPCR 反应体系的配制应在洁净区完成。根据检测样本量需要,在冰盒上配制 100 份~1 000 份反应预混液,充分混匀后,按 1 份/支分装到 0.2 mL PCR 管中,保存于-20 ℃备用。临用前,加入相应体积的模板,混匀,其中 20 μL 体系加模板量为 2.0 μL /反应管,25 μL 体系加模板量为 2.5 μL /反应管。100 份体系组成见表 1。

表 1 反应预混液(100 份)所需试剂

成分	20 μL 体系	25 μL 体系	试剂终浓度
qPCR 2 \times 预混液	1 000.0 μL	1 250.0 μL	1 \times
引物 vhvp_SpvB-F1(10 $\mu\text{mol/L}$)	20.0 μL	25.0 μL	0.1 $\mu\text{mol/L}$
引物 vhvp_SpvB-R1(10 $\mu\text{mol/L}$)	20.0 μL	25.0 μL	0.1 $\mu\text{mol/L}$
探针 vhvp_SpvB-P1(10 $\mu\text{mol/L}$)	40.0 μL	50.0 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
引物 vhvp_TcdB-F2(10 $\mu\text{mol/L}$)	20.0 μL	25.0 μL	0.1 $\mu\text{mol/L}$
引物 vhvp_TcdB-R2(10 $\mu\text{mol/L}$)	20.0 μL	25.0 μL	0.1 $\mu\text{mol/L}$
探针 vhvp_TcdB-P2(10 $\mu\text{mol/L}$)	40.0 μL	50.0 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	640 μL	800 μL	—
100 份反应预混物总体积	1800 μL	2250 μL	—
注 1:qPCR 2 \times 预混液(100 mmol/L KCl,20 mmol/L Tris HCl(pH 9.0),0.2% Triton X,0.4 mmol/L dNTPs,10 mmol/L MgCl ₂);			
注 2:模板 DNA 浓度:50 ng/ μL ~100 ng/ μL 。			

检测待检样品的同时,设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

qPCR 反应体系配制可采用同等效果的商品化探针法 qPCR 试剂盒。

10.3 qPCR 反应程序

将上述 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪中。按以下反应程序进行扩增:95 ℃预变性 1 min 20 s;45 个循环(95 ℃ 10 s、59 ℃ 30 s),在每个循环结束后收集 FAM 和 VIC 荧光信号。

10.4 qPCR 检测结果判定

10.4.1 阴性对照和空白对照应无 C_t 值,阳性对照 C_t 值 \leq 35,且出现“S”形典型扩增曲线,实验有效。

10.4.2 检测样品有典型的“S”形扩增曲线且 FAM 荧光通道与 VIC 荧光通道的 C_t 值均 \leq 35 时,判定为 V_{TPV} qPCR 结果阳性;检测样品无扩增曲线,或 C_t 值 \geq 40,判定为 V_{TPV} qPCR 结果阴性;检测样品有典型的“S”形扩增曲线且 FAM 荧光通道与 VIC 荧光通道的 C_t 值为 $35 < C_t \text{ 值} < 40$ 时,应进行重复检测,若复检后, C_t 值 \leq 35 且出现典型扩增曲线,判定为 V_{TPV} qPCR 结果阳性,否则判定为 V_{TPV} qPCR 结果阴性。

11 综合判定

11.1 疑似病例的判定

符合以下一条及以上,判定为疑似病例:

- 易感宿主在仔虾期出现 TPV 临床症状;
- 具有 TPV 典型的组织病理学特征;
- qPCR 检测结果为 V_{TPV} 阳性。

11.2 确诊病例的判定

具有 TPV 临床症状或组织病理学特征,且 TPV qPCR 检测结果阳性,判定为确诊病例。

11.3 阴性病例的判定

不具有 TPV 临床症状和组织病理学特征,且 qPCR 检测结果阴性,判定为 TPV 阴性病例。

附 录 A
(规范性)
试 剂 配 方

A.1 4% PFA 固定液

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.9 g
磷酸二氢钾	0.24 g

用纯水定容至 1 000 mL,调整 pH 至 7.4;取 4 g 多聚甲醛加入 100 mL 上述溶液中,60 °C 水浴过夜,使试剂溶解彻底,0.22 μm 滤膜过滤后,置于-20 °C 密封储存。

A.2 苏木精染色液

温水(50°C~60°C)	1 000 mL
苏木素	1 g
碘酸钠	0.2 g
钾明矾	90 g
柠檬酸	1 g
水合三氯乙醛	50 g

按上述顺序混合,溶解后即可使用,室温储存。

A.3 1% 伊红储存液

伊红 Y(水溶性)	5 g
水	500 mL

溶解后置于棕色瓶中,室温贮存。

A.4 1% 焰红储存液

焰红 B(水溶性)	1 g
水	100 mL

溶解后置于棕色瓶中,室温储存。

A.5 伊红-焰红染色液

1%伊红储存液	100 mL
1%焰红储存液	10 mL
95%乙醇	780 mL
冰醋酸	4 mL

混匀后即可使用,室温储存。

A.6 粘片剂

明胶	1 g
热水	100 mL

溶解后,加入:

苯酚	2 g
甘油	15 mL

混匀,在棕色瓶中室温储存。

A.7 85%乙醇

95%乙醇	850 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.8 80%乙醇

95%乙醇	800 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.9 75%乙醇

95%乙醇	750 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.10 70%乙醇

95%乙醇	700 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

A.11 50%乙醇

95%乙醇	500 mL
加水定容至	950 mL

混匀,室温储存。

附录 B (资料性) 对虾玻璃苗弧菌病

B.1 对虾玻璃苗弧菌病

对虾玻璃苗弧菌病(translucent post-larva vibriosis, TPV)是由携带沙门氏菌质粒毒力基因与艰难梭菌杀虫毒素基因的弧菌(*Vibrio* spp. causing TPV, V_{TPV})引起的对虾细菌性疫病。已报道可引起该病的弧菌种类包括副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、新喀里多尼亚弧菌(*V. neocaledonicus*)等。

该病害多发生于对虾仔虾期的 P5~P7 阶段,发病期短,第一天极少部分个体出现症状,第二天发病率可达 60%,第三天发病率和死亡率超过 90%,病害表现出明显和极快的传染性,发病个体空肠空胃、肝胰腺颜色变淡,幼体从头胸甲到腹节颜色变得通透和半透明(见图 B.1),因而被称作“玻璃苗”(translucent post-larva disease, TPD 或 glass post-larvae disease, GPD)。为了规范玻璃苗病害及其病原名称,根据 SC/T 7011《水生动物疾病术语与命名规则》,结合 TPD 的致病原类型,“玻璃苗”病害被正式命名为“玻璃苗弧菌病(translucent post-larva vibriosis, TPV)”,其病原也被命名为“致玻璃苗弧菌(V_{TPV})”。流行病学研究揭示该疫病最早于 2019 年前后出现于我国华南对虾养殖地区,2020 年随对虾苗种运输快速传播、扩散至我国华东、华北等沿海地区,导致当年全国 80% 以上凡纳对虾育苗场关闭,造成了重大经济损失。

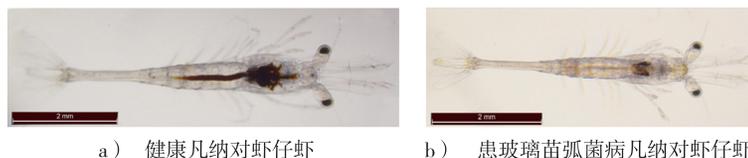


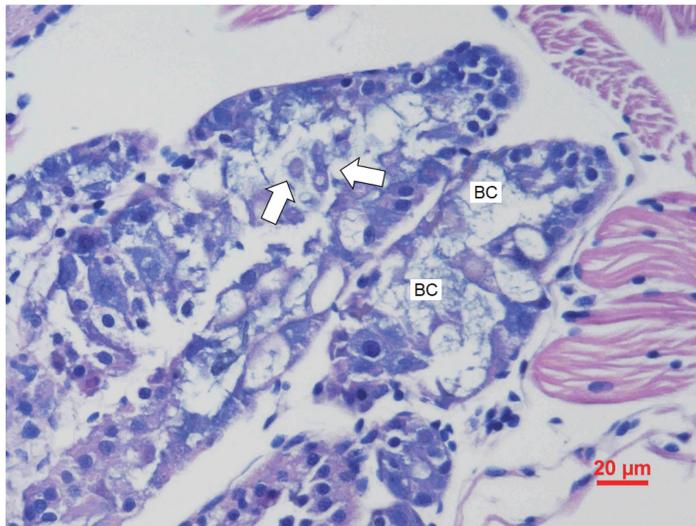
图 a) 健康仔虾肠道和肝胰腺食物充盈。
图 b) 染病仔虾肝胰腺和消化道颜色变淡并呈透明状。

图 B.1 TPV 患病对虾临床表现

V_{TPV} 主要通过水平方式传播,最早可在糠虾幼体中出现,危害仔虾最为严重,常发生在仔虾的第 3 d 至 7 d,尤其是当仔虾进行标粗、淡化的环节。 V_{TPV} 流行株对 20 余种常见抗生素具有耐药性。

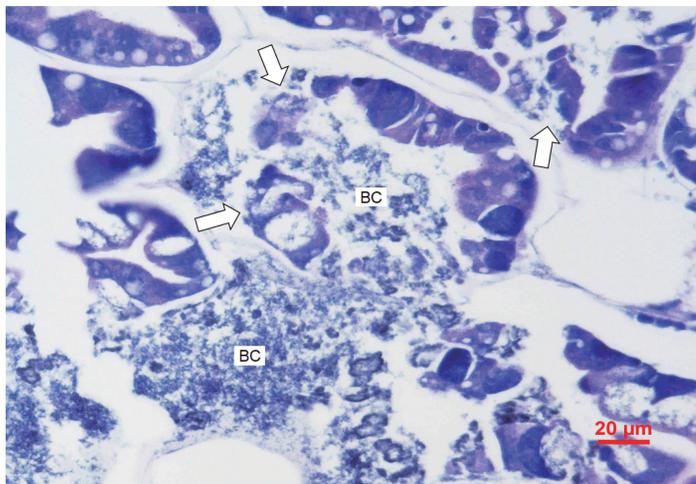
B.2 病原和病理学特征

TPV 由特定弧菌毒力株(V_{TPV})引起,致病毒株携带一个约 187 kbp 的质粒。该质粒中含有编码 V_{TPV} 关键毒力蛋白(VHVP)的毒力基因 *vhvp-2*, *vhvp-2* 编码了沙门氏菌质粒毒力蛋白(SpV)、艰难梭菌杀虫毒素 B(TcdB),同时质粒中也携带一个接合转移相关的基因簇,意味着该质粒具有转移到其他细菌的潜在能力。 V_{TPV} 的双毒力蛋白 SpV、TcdB 均对对虾的肝胰腺和中肠上皮细胞具有急性毒性,在短期内(12 h~24 h 后)即可引起两个组织器官发生病理改变。 V_{TPV} 感染早期、中期和后期,对虾肝胰腺和中肠所呈现的典型组织病理改变如图 B.2~图 B.7 所示。



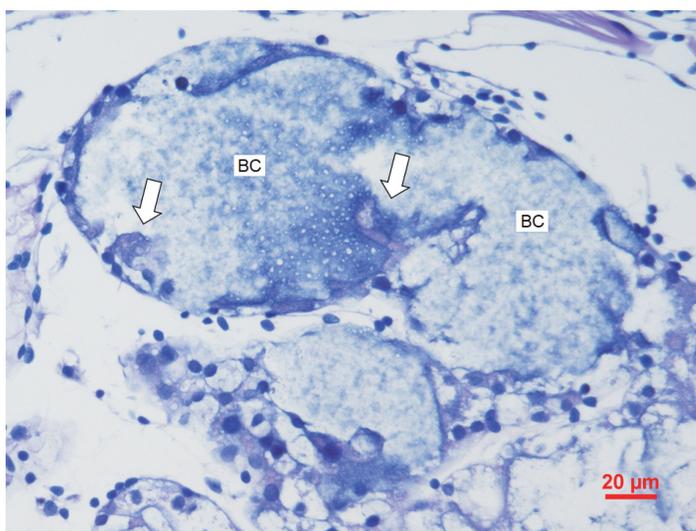
注：白色箭头示脱落的肝胰腺上皮细胞；“BC”示 V_{TPV} 定殖。

图 B.2 V_{TPV} 感染早期凡纳对虾仔虾肝胰腺的病理变化



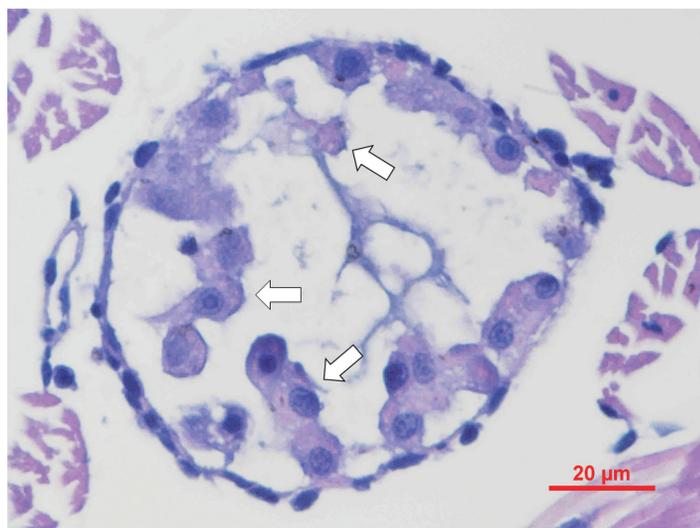
注：白色箭头示脱落的肝胰腺上皮细胞；“BC”示 V_{TPV} 定殖。

图 B.3 V_{TPV} 感染中期凡纳对虾仔虾肝胰腺的病理变化



注：白色箭头示脱落的肝胰腺上皮细胞；“BC”示 V_{TPV} 定殖。

图 B.4 V_{TPV} 感染后期凡纳对虾仔虾肝胰腺的病理变化



注：白色箭头示脱落的中肠上皮细胞。

图 B.5 V_{TPV} 感染早期凡纳对虾仔虾中肠的病理变化



注：白色箭头示脱落的中肠上皮细胞。

图 B.6 V_{TPV} 感染中期凡纳对虾仔虾中肠的病理变化



注：“BC”示 V_{TPV} 定殖。

图 B.7 V_{TPV} 感染后期凡纳对虾仔虾中肠的病理变化

B.3 易感宿主

易感宿主种类:凡纳对虾(*P. vannamei*)、斑节对虾(*P. monodon*)和中国对虾(*P. chinensis*)。另外,有报道在日本对虾(*P. japonicus*)的 PCR 检测结果中出现阳性,但其易感性尚未明确。
