

ICS 65.150
CCS B 50

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7245—2025

细菌性肾病诊断方法

Diagnostic methods for bacterial kidney disease

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：北京市水产技术推广站、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：王静波、张文、潘勇、张翔、徐立蒲、王小亮、曹欢、王姝、吕晓楠、蔡晨旭、江育林。



细菌性肾病诊断方法

1 范围

本文件描述了细菌性肾病(bacterial kidney disease)诊断的试剂和材料、仪器设备、临床症状、样品,以及组织印片检查、套式 PCR 检测和综合判定的方法。

本文件适用于鲑肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*)引起的鲑科鱼类细菌性肾病的流行病学调查、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。

SC/T 7011.1 水生动物疾病术语与命名规则 第1部分:水生动物疾病术语

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

SC/T 7011.1 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细菌性肾病 bacterial kidney disease

由鲑肾杆菌感染引起的鲑科鱼类疾病。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BKD:细菌性肾病(bacterial kidney disease)

bp:碱基对(base pair)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸混合物(deoxy-ribonucleoside triphosphate mixture)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)

TE:Tris 盐酸和 EDTA 缓冲溶液(EDTA Tris · HCl)

Tris:三羟甲基氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane)

5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

5.1 dNTPs(A、T、G、C 四种碱基各 10 mmol/L):-20 °C 保存。

5.2 DNA 分子量标准溶液:-20 °C 保存。

5.3 核酸染料:4 °C 保存。

5.4 琼脂糖:电泳级。

5.5 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L):-20 °C 保存。

- 5.6 香柏油:常温保存。
- 5.7 无水乙醇:常温保存。
- 5.8 10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+} , 25 mmol/L): $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 5.9 革兰氏染色液:按 A.1 配制。
- 5.10 CTAB 溶液:按 A.2 配制。
- 5.11 抽提液 I:按 A.3 配制。
- 5.12 抽提液 II:按 A.4 配制。
- 5.13 TE 缓冲液:按 A.5 配置。
- 5.14 5×电泳缓冲液:按 A.6 配制。
- 5.15 6×上样缓冲液:按 A.7 配制。
- 5.16 阳性对照:已知感染鲑肾杆菌的鲑科鱼类组织样品, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 5.17 阴性对照:已知未感染鲑肾杆菌的鲑科鱼类组织样品, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 5.18 空白对照:蒸馏水。
- 5.19 第一轮 PCR 引物, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,引物序列如下:
引物 F1:5'-AGCTTCGCAAGGTGAAGGG-3';
引物 R1:5'-GCAACAGGTTTATTTGCCGGG-3'。
- 5.20 第二轮 PCR 引物, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,引物序列如下:
引物 F2:5'-ATTCTTCCACTTCAACAGTACAAGG-3';
引物 R2:5'-CATTATCGTTACACCCGAAACC-3'。

6 仪器设备

- 6.1 普通冰箱。
- 6.2 超低温冰箱: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下。
- 6.3 显微镜。
- 6.4 电子天平。
- 6.5 微量组织研磨仪(器)。
- 6.6 水浴锅。
- 6.7 高速冷冻离心机:最高转速 12 000 r/min 及以上,温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.8 微量移液器。
- 6.9 普通 PCR 仪。
- 6.10 水平电泳仪。
- 6.11 凝胶成像仪。

7 临床症状

患病鱼体色发黑,眼球突出。解剖后,肾脏出现直径 2 mm~4 mm 白色肉芽肿,见附录 B 中的图 B.1;严重时肝脏、脾脏中也出现白色肉芽肿,见图 B.2 和图 B.3。

8 样品

8.1 采样对象

鲑科鱼类。

8.2 采样部位

- 8.2.1 体长 $\geq 6\text{ cm}$ 的鱼,取肾脏、肝脏和脾脏。

8.2.2 体长 4 cm~6 cm 的鱼,取所有内脏。

8.2.3 体长 \leq 4 cm 的鱼,取整条鱼;带卵黄囊的鱼去掉卵黄囊。

8.3 采样数量

有临床症状的鱼采集 10 尾~20 尾,无临床症状的鱼采集数量按 SC/T 7103 的规定执行。

8.4 保存及运送

采样应加贴标签,标签上清楚标明样品编号、采样时间、采样地点。做组织印片检查的样品应鲜活(濒死)送达实验室,立即取样检测;不做组织印片的样品,冰鲜(冻)送达实验室。

9 组织印片检查

9.1 制片、染色与观察

取出有临床症状鲜活(濒死)鱼的肾(肝、脾)脏的病变组织,用解剖刀切开一个断面,用镊子夹着切开后的组织,将断面置于洁净的载玻片上轻轻印一下,制成组织印片,自然晾干,革兰氏染色,晾干后,置于显微镜载物台,滴加香柏油于印片,100 \times 物镜下观察。

9.2 结果判定

观察到大量形态一致的革兰氏阳性小短杆菌,判定为疑似 BKD。

革兰氏染色后,菌体呈紫色,判定为革兰氏阳性菌;革兰氏染色后,菌体呈红色,判定为革兰氏阴性菌。染色后鲑肾杆菌菌体形态见图 B.4。

10 套式 PCR 检测

10.1 第一轮 PCR

10.1.1 DNA 提取

10.1.1.1 电子天平称取 25 mg~100 mg 组织样品,加入 150 μ L CTAB 溶液,用微量组织研磨仪(器)将样品匀浆成糊状,转入 1.5 mL 灭菌离心管中。提取过程同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

10.1.1.2 加入 CTAB 溶液至 900 μ L,上下颠倒混匀后置于 25 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 2 h~2.5 h。

10.1.1.3 加入 600 μ L 抽提液 I (5.11),充分混匀 30 s。置于高速冷冻离心机中,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min。

10.1.1.4 吸取上层水相转移至新的 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 700 μ L 抽提液 II (5.12),充分混匀 30 s。置于高速冷冻离心机中,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min。

10.1.1.5 吸取上层水相转移至新的 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 1.5 倍体积的无水乙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷)倒置数次混匀,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱放置 8 h。

10.1.1.6 采用高速冷冻离心机,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min,沉淀 DNA,倾去上清液,室温晾干。

10.1.1.7 向 DNA 沉淀中加 TE 缓冲液 100 μ L,待沉淀溶解,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

10.1.1.8 可采用同等抽提效果的其他方法或商品化 DNA 提取试剂盒。

10.1.2 反应体系

反应体系的配制应在洁净区完成。根据检测工作量需要配置 100 份~1 000 份反应预混液,100 份体系组成见表 1。加入除 *Taq* DNA 聚合酶和模板以外的各项试剂,在冰盒上配制成套式 PCR 中第一轮 PCR 的无酶大体积预混物,充分混匀,分装保存于-20 $^{\circ}$ C。临用前,加入相应体积的 *Taq* DNA 聚合酶,混匀,按 1 份/支分装到 0.2 mL PCR 管中。反应前,加入相应体积的模板量,混匀。其中,25 μ L 体系加模板量 2.5 μ L/反应管;50 μ L 体系加模板量 5.0 μ L/反应管;100 μ L 体系加模板量 10.0 μ L/反应管。

表 1 第一轮 PCR 反应预混液所需试剂组成

成分	25 μ L 体系	50 μ L 体系	100 μ L 体系	试剂终浓度
10 \times PCR 缓冲液(Mg ²⁺)	250.0 μ L	500.0 μ L	1 000.0 μ L	1 \times

表 1 (续)

成分	25 μL 体系	50 μL 体系	100 μL 体系	试剂终浓度
dNTPs(各 10 mmol/L)	50.0 μL	100.0 μL	200.0 μL	0.2 mmol/L
引物 F1(10 $\mu\text{mol/L}$)	50.0 μL	100.0 μL	200.0 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
引物 R1(10 $\mu\text{mol/L}$)	50.0 μL	100.0 μL	200.0 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
蒸馏水	1 825 μL	3 650 μL	7 300 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	25.0 μL	50.0 μL	100.0 μL	0.05 U/ μL
100 份反应预混物总体积	2 250 μL	4 500 μL	9 000 μL	—

10.1.3 扩增程序

利用普通 PCR 仪进行 PCR 扩增,设置扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 次循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

10.1.4 琼脂糖电泳

配制 1%~2% 的琼脂糖凝胶并加入核酸染料,待胶凝固后置于含有 1 \times 电泳缓冲液的水平电泳仪中,取 5 μL PCR 扩增产物与 1 μL 6 \times 上样缓冲液混匀后加入加样孔中,同时取 5 μL DNA 分子质量标准溶液加入加样孔中,5 V/cm 电压下电泳约 0.5 h,电泳结束,在凝胶成像仪下观察。

10.2 第二轮 PCR

在凝胶成像仪下,若看不到特异的 DNA 条带,取 5 μL 产物做模板;若看到特异的 DNA 条带,将 DNA 扩增产物按 1:(100~1 000) 稀释,取 5 μL 稀释后产物做模板;反应体系按 10.1.2 规定的步骤配制,100 份体系组成见表 2;按 10.1.3 规定的程序进行扩增;按 10.1.4 规定的步骤进行琼脂糖电泳。反应前,加入相应体积的模板量,混匀。其中,25 μL 体系加模板量 2.5 μL /反应管;50 μL 体系加模板量 5.0 μL /反应管;100 μL 体系加模板量 10.0 μL /反应管。

表 2 第二轮 PCR 反应预混液所需试剂组成

成分	25 μL 体系	50 μL 体系	100 μL 体系	试剂终浓度
10 \times PCR 缓冲液(Mg^{2+})	250.0 μL	500.0 μL	1 000.0 μL	1 \times
dNTPs(各 10 mmol/L)	50.0 μL	100.0 μL	200.0 μL	0.2 mmol/L
引物 F2(10 $\mu\text{mol/L}$)	50.0 μL	100.0 μL	200.0 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
引物 R2(10 $\mu\text{mol/L}$)	50.0 μL	100.0 μL	200.0 μL	0.2 $\mu\text{mol/L}$
蒸馏水	1 825 μL	3 650 μL	7 300 μL	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	25.0 μL	50.0 μL	100.0 μL	0.05 U/ μL
100 份反应预混物总体积	2 250 μL	4 500 μL	9 000 μL	—

10.3 套式 PCR 检测结果判定

10.3.1 检测成立的条件

若阳性对照第一轮 PCR 后在 383 bp 处有扩增条带,且第二轮 PCR 后在 320 bp 处有扩增条带,阴性对照第一轮 PCR 后在 383 bp 和第二轮 PCR 后在 320 bp 处均无扩增条带,空白对照无任何条带,则检测有效。

10.3.2 结果判定

若待检测样品第一轮 PCR 后在 383 bp 处有条带;或第一轮 PCR 后在 383 bp 处无条带,但第二轮 PCR 后在 323 bp 处有条带,则判定为套式 PCR 检测核酸阳性。

若待检测样品第一轮 PCR 后在 383 bp 处无条带,且第二轮 PCR 后在 323 bp 处无扩增条带,则判定为套式 PCR 检测核酸阴性。

10.3.3 序列分析

对核酸阳性样品的 PCR 产物进行测序,测序结果与 C.1 参考序列一致性 $>98\%$,则判断套式 PCR 检测结果为鲑肾杆菌核酸阳性。

11 综合判定

11.1 疑似判定

符合以下任何一项,判定为疑似病例:

- 表现出典型的临床症状;
- 组织印片检查为疑似;
- 套式 PCR 检测核酸阳性。

11.2 阳性判定

套式 PCR 检测为鲑肾杆菌核酸阳性,且符合以下任何一项,判定为确诊病例:

- 表现出典型的临床症状;
- 组织印片检查为疑似。

11.3 阴性判定

未表现出典型的临床症状,且套式 PCR 检测为鲑肾杆菌核酸阴性的,判定为 BKD 阴性。

附 录 A
(规范性)
试剂及其配制

A.1 革兰氏染色液

A.1.1 结晶紫溶液

结晶紫	2 g
95%乙醇	20 mL

将二者混合,充分溶解后装入试剂瓶内备用。

A.1.2 草酸铵溶液

草酸铵	0.8 g
蒸馏水	80 mL

将二者混合,充分溶解后装入试剂瓶内备用。

结晶紫和草酸铵分别配制,在使用前 24 h 将二者混合,过滤后装入试剂瓶内备用。

A.1.3 碘液

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾混合并研磨,加入少量蒸馏水,使其逐渐溶解,然后研磨,继续滴加蒸馏水至完全溶解,最后补足水量。

A.1.4 脱色液

95%乙醇

A.1.5 复染液(储存液)

番红	2.5 g
95%乙醇	100 mL

复染液应用液:取 10 mL 储存液,加入 90 mL 蒸馏水。

A.2 CTAB 溶液

NaCl	8.19 g
EDTA	0.744 g
Tris	1.21 g
浓 HCl	0.25 mL~0.3 mL

配制时在 60 mL 水中依次加入上述试剂,调整 pH 为 7.5~8.0,再加入 CTAB 2.0 g,搅拌待完全溶解后,定容至 100 mL。

使用前,加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

A.3 抽提液 I

1 mol/L Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇按体积比 25:24:1 的比例混合,密闭避光保存。

A.4 抽提液 II

氯仿:异戊醇按体积比 24:1 的比例混合,密闭避光保存。

A.5 TE 缓冲液(pH 8.0)

1 mol/L Tris · HCl(pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	2 mL
加水定容至	1 000 mL

高压灭菌(121 °C, 15 min), 4 °C 储存。

A.6 5×电泳缓冲液

Tris	54 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.922 g
水	1 000 mL

用 5 mol/L 的 HCl 调到 pH 为 8.0。

A.7 6×上样缓冲液

蔗糖	40 g
加水溶解,定容至	100 mL
溴酚蓝	0.25 g

溶解后, 4 °C 保存。

附 录 B
(资料性)
细菌性肾病(BKD)

B.1 疾病描述

细菌性肾病(BKD)是由鲑肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*)引起的鲑科鱼类疾病,是一种典型的慢性传染病。因其危害性较大,曾被列入世界动物卫生组织必须申报疫病。2022年,被农业农村部列入《一、二、三类动物疫病病种名录》中的三类水生动物疫病。

B.2 病原

鲑肾杆菌,是革兰氏阳性杆菌中肾杆菌属的唯一一种,属细胞内寄生菌。肾杆菌为形状规则的短杆菌,菌体大小在(0.3 μm~1.0 μm)×(1.0 μm~1.5 μm),常成双排列,有时呈短链状;无荚膜;是鲑科鱼类的专性病原菌。

B.3 流行特点

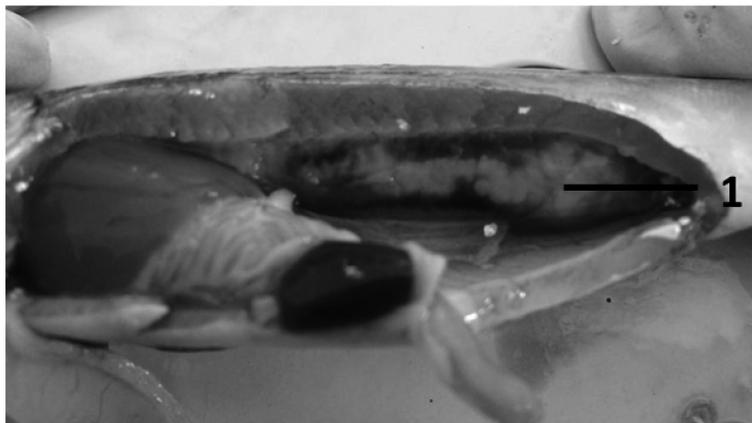
该病多呈较长的潜伏期,从感染到死亡需要较长的时间。水温在4℃~20℃均可发病,但7℃以下不易发病,18℃以上时的死亡率明显降低。病原可感染鲑科鱼类,尤其是大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)。可通过精、卵垂直传播。

B.4 地理分布

20世纪30年代,美国首次报道褐鳟(*Salmo trutta*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和红点鲑(*Salvelinus leucomaenis*)中发生BKD。此后,在加拿大、智利、英国、法国、德国、冰岛、意大利、西班牙、南斯拉夫等地养殖的14种鲑科鱼类均发生了BKD,给当地鲑科鱼类养殖业造成了巨大的损失。我国于2015年首次报道。

B.5 解剖后临床症状

患病鱼肾脏出现直径2 mm~4 mm白色肉芽肿,见图B.1;严重时,肝脏、脾脏中也出现白色肉芽肿,见图B.2和图B.3。



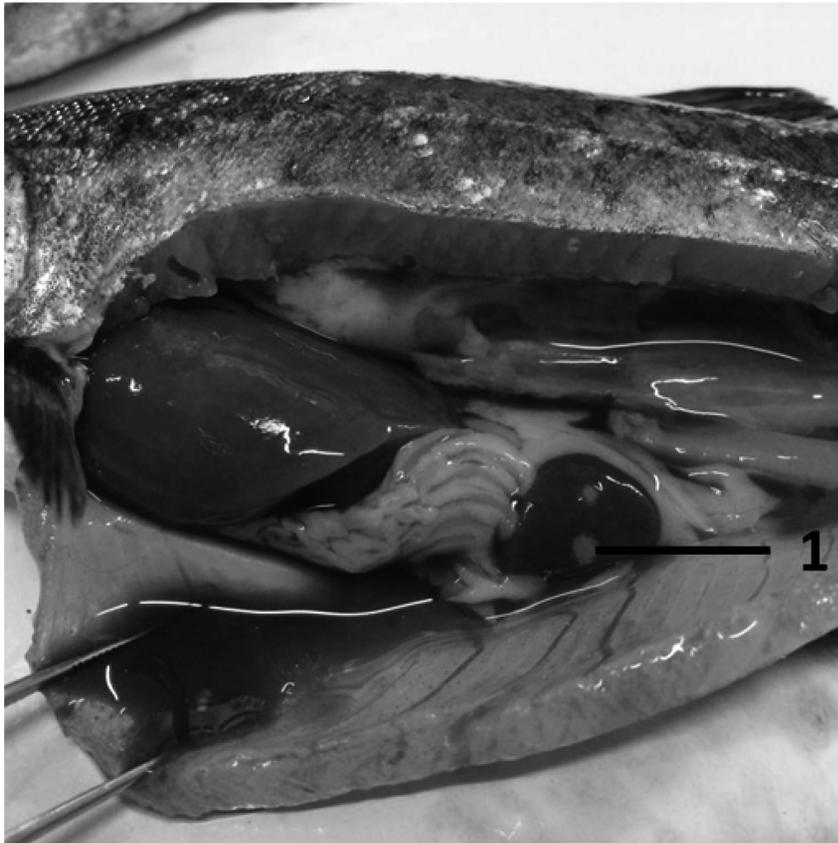
标引序号说明:
1——白色肉芽肿。

图 B.1 患病鱼肾脏白色肉芽肿



标引序号说明：
1——白色肉芽肿。

图 B. 2 患病鱼肝脏白色肉芽肿

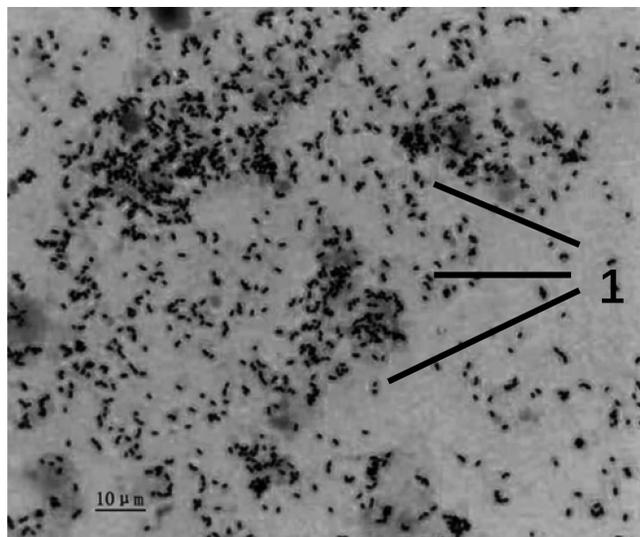


标引序号说明：
1——白色肉芽肿。

图 B. 3 患病鱼脾脏白色肉芽肿

B.6 组织印片检查

取患病鱼病变肾脏组织印片,革兰氏染色,观察到大量革兰氏阳性小短杆菌,且常成对或短链状排列并能呈现出多形性的特点,见图 B.4。



标引序号说明:

1——革兰氏阳性小短杆菌。

图 B.4 肾脏组织印片中大量革兰氏阳性小短杆菌

附 录 C
(资料性)
套氏 PCR 扩增序列及引物位置

C.1 套式 PCR 扩增序列及引物位置(含有第一轮 PCR383 bp, 第二轮 320 bp)

```

1   AGCTTCGCAA GGTGAAGGGA ATT C TTCCAC TTCAACAGTA CAAGGCTTCA GCA GTGTTAA
      F1                               F2
61  CTTTTTCAA CAGGGTGGTT ATTCTGCTTC TTTCACGAGT TAAGGCCTGA CGGGACCTCC
121 AGCGCCGAG GAGGACCAGT TGCAGCTGGT GGCTCTTATA GTTCTGGTGA TTTAGGTAAA
181 AAGGGCTTCG AAGACGGAGA TCTTGTGTTT CCCGTAGTAA ACGCGGTTTT TGGAATGAG
241 CAAAAAGGAA GTCCTTTGT TTATAACAAA GATGGTCCTG CCAAGGA ACT GAAAGTCTGG
301 GGGACGACTC TAAACGTAGG T TTTCGGGTGT AACGATAATG CGCCATCC CC AATGGGATGT
      R2
361 GG CCCGGCAA ATAAACCTGT TGC
      R1

```

注:划线处为引物位置,依次是 F1、F2、R2、R1。