



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7246—2025

蛙脑膜炎诊断方法

Diagnostic methods for frog meningitis

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：浙江省淡水水产研究所、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：潘晓艺、张翔、蔺凌云、沈锦玉、蔡晨旭、姚嘉赞、袁雪梅、黄雷、陈静、彭先启、黄小红、尹文林。



蛙脑膜炎诊断方法

1 范围

本文件描述了蛙脑膜炎(frog meningitis)诊断的试剂和材料、仪器设备、临床症状、样品,以及组织病理检测、套式 PCR 检测、染料法 qPCR 检测和综合判定的方法。

本文件适用于米尔伊丽莎白菌引起的蛙脑膜炎的流行病学调查、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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- 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 7011.2 水生动物疾病术语与命名规则 第 2 部分:水生动物疾病命名规则
- SC/T 7202.3—2007 斑节对虾杆状病毒诊断规程 第 3 部分:组织病理学诊断法

3 术语和定义

SC/T 7011.1 和 SC/T 7011.2 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蛙脑膜炎 frog meningitis

由米尔伊丽莎白菌(*Elizabethkingia miricola*)感染牛蛙(*Rana catesbeiana*)、黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)和棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)等蛙类,造成平衡机能失调、歪头、眼膜发白等症状的疾病。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- bp:碱基对(base pair)
- Ct:阈值循环数,即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)
- qPCR:实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR)
- Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)
- TE:Tris-EDTA
- Tris:三羟甲基氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane)

5 试剂和材料

- 5.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 5.2 乙醚:分析纯。
- 5.3 氯仿:分析纯。
- 5.4 异戊醇:分析纯。

- 5.5 二甲苯:分析纯。
- 5.6 石蜡:病理级。
- 5.7 粘片剂:生化试剂,避光室温保存。
- 5.8 中性树胶:生化试剂,室温保存。
- 5.9 琼脂糖:电泳级。
- 5.10 无水乙醇:分析纯。
- 5.11 乙酸铵:分析纯。
- 5.12 苏木精染色液:生化试剂,室温保存。
- 5.13 0.5%伊红染色液:生化试剂,室温保存。
- 5.14 4%多聚甲醛固定液:生化试剂,室温保存。
- 5.15 75%乙醇:生化试剂,室温保存。
- 5.16 Tris 饱和酚(pH>7.8):生化试剂,避光 4℃保存。
- 5.17 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L):商品化试剂,−20℃保存。
- 5.18 dNTPs(各 2.5 mmol/L):生化试剂,−20℃保存。
- 5.19 10× PCR 缓冲液(无 Mg^{2+}):生化试剂,−20℃保存。
- 5.20 $MgCl_2$ (25 mmol/L):生化试剂,−20℃保存。
- 5.21 DNA Marker:生化试剂,−20℃保存。
- 5.22 核酸染料:生化试剂,4℃保存。
- 5.23 2×SYBR Green qPCR 预混液:商品化试剂,−20℃保存。
- 5.24 酚/氯仿/异戊醇混合液:将 Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇按体积比 25:24:1 混匀,4℃保存。
- 5.25 氯仿/异戊醇混合液:将氯仿、异戊醇按体积比 24:1 混匀,4℃保存。
- 5.26 抽提缓冲液:按 A.1 配制。
- 5.27 蛋白酶 K(20 mg/mL):按 A.2 配制。
- 5.28 乙酸铵(10 mol/L):按 A.3 配制。
- 5.29 TE 缓冲液(pH 8.0):按 A.4 配制。
- 5.30 50×电泳缓冲液:按 A.5 配制。
- 5.31 1×电泳缓冲液:按 A.6 配制。
- 5.32 6×载样缓冲液:生化试剂,室温保存。
- 5.33 套式 PCR 引物:−20℃保存。第一轮 PCR 引物分别是 EMi-576F1 和 EMi-576R1,扩增 *E. miricola* *lepA* 基因中的 576 bp 片段(见附录 B 中的 B.1);第二轮 PCR 引物分别是 EMi-308F2 和 EMi-308R2,从该片段中再扩增 308 bp 的片段。引物序列如下:
EMi-576F1:5'-AACCGCAATATCAAAGTGTGTCTA-3';
EMi-576R1:5'-TGTGGATTCCTTGGAATGCTG-3';
EMi-308F2:5'-AACCGCAATATCAAAGTGTGTCTA-3';
EMi-308R2:5'-GTGAAATCGTTAACCAAAGTTATTTG-3'。
- 5.34 染料法 qPCR 引物:−20℃保存。扩增引物分别是 EMi-q137F 和 EMi-q137R,扩增 *E. miricola* *lepA* 基因中的 137 bp 片段(见 B.2):
EMi-q137F:5'-CTCCTTCACATGCAGCGATT-3';
EMi-q137R:5'-AATTACTATTAAAAGCCACGCAATTCAA-3'。
- 5.35 阳性对照:米尔伊丽莎白菌菌液,−20℃保存。
- 5.36 阴性对照:未感染伊丽莎白菌的蛙组织,−20℃保存。
- 5.37 空白对照:水。

6 仪器设备

- 6.1 包埋机。
- 6.2 切片机。
- 6.3 展片机。
- 6.4 烤片机。
- 6.5 光学显微镜。
- 6.6 高速冷冻离心机:4℃离心力12 000 g 以上。
- 6.7 PCR 仪。
- 6.8 荧光定量 PCR 仪:具有 SYBR Green I 荧光检测通道。
- 6.9 水平电泳仪。
- 6.10 紫外观察仪或凝胶成像仪:波长范围 280 nm~320 nm。
- 6.11 水浴锅或金属浴。
- 6.12 -20℃普通冰箱。
- 6.13 电炉或微波炉。
- 6.14 微量移液器。

7 临床症状

病蛙反应迟钝离群独游,典型临床症状有头部歪斜、身体失衡、浮于水面打转、眼膜发白、眼球晶状体不透明(见附录 C 中的图 C.1)等。

8 样品

8.1 对象

蝌蚪、幼蛙、稚蛙和成蛙,优先采集眼膜发白、歪头或打转症状的蛙(见图 C.1),并做好采样记录。

8.2 数量

无症状的蝌蚪或蛙,采集至少 150 尾或只;有疑似临床症状的蝌蚪或蛙,不少于 30 尾或只。

8.3 器官或组织

体表用清水冲洗,再用 75%乙醇擦拭体表后,无菌操作方式,取脑、眼膜和心脏组织。

8.4 运输保存条件

样品冷藏运送至实验室。

9 组织病理检测

9.1 取材与固定

将活蛙置于密闭容器中,再放入浸过乙醚或氯仿的脱脂棉。待麻醉后,取出用清水冲洗体表后,迅速取脑和眼组织,切成厚度不超过 3 mm 的组织块,用 10 倍体积以上的 4%多聚甲醛(5.14)进行组织固定 24 h;同时,取健康蛙组织作为阴性对照。

9.2 样品处理和观察

将固定后的样品转移至 70%乙醇中保存。切片制备程序按 SC/T 7202.3—2007 中 6.2~6.9 的规定执行。封片后,置于光学显微镜下观察组织病理变化。

蛙脑膜炎组织病理特征示例见附录 C。

9.3 结果判定

若脑膜组织出现脑膜炎(见图 C.2),或眼睛出现眼内炎,或角膜上皮增生(见图 C.3),则判定典型组织病理特征为蛙脑膜炎阳性。

10 套式 PCR 检测

10.1 DNA 提取

- 10.1.1 取 30 mg~50 mg 组织样品,加入抽提缓冲液(5.26)500 μ L,充分研磨,37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h。提取过程同时设置阳性对照(5.35)和阴性对照(5.36)。
- 10.1.2 加入 2.5 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K(5.27),混匀后置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。
- 10.1.3 将溶液冷却至室温,加入等体积 Tris 饱和酚(5.16),颠倒混合 10 min,于 10 000 r/min 离心 3 min,上层水相移至 1.5 mL 新离心管中。
- 10.1.4 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇混合液(5.24),颠倒混合 10 min,于 10 000 r/min 离心 1 min,上层水相移至新离心管中。
- 10.1.5 加入等体积的氯仿/异戊醇混合液(5.25),颠倒混合 10 min,于 10 000 r/min 离心 1 min,上层水相移至新离心管中。
- 10.1.6 加入 100 μ L 10 mol/L 乙酸铵(5.28),混匀后,再加入两倍体积预冷无水乙醇(-20 $^{\circ}$ C)混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清。
- 10.1.7 加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀,10 000 r/min 离心 5 min,倾去上清,沉淀于室温晾干。加入 100 μ L TE 缓冲液(5.29)溶解后于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。
- 10.1.8 也可采用等效的商品化 DNA 提取试剂或 DNA 提取试剂盒。

10.2 第一轮 PCR

每个样品按照表 1 的要求,加入除 *Taq* DNA 聚合酶以外的各项试剂,在冰盒上配制成预混物,保存于-20 $^{\circ}$ C。临用前,加入相应体积的 *Taq* DNA 聚合酶(5.17),混匀,按 24 μ L/反应分装到 PCR 管中,然后分别加入 1 μ L 10.1 步骤保存的 DNA,置于 PCR 仪(6.7)中,按以下程序进行第一轮 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、66 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保存。

也可采用等效的商品化 PCR 试剂盒。

表 1 第一轮 PCR 预混物试剂组成

试剂	加样量, μ L	试剂终浓度
10 $\times$ PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})	2.5	1 $\times$ PCR 缓冲液
$MgCl_2$ (25 mmol/L)	2.0	2.0 mmol/L
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	2.0	200 μ mol/L
EMi-576F1(10 μ mol/L)	0.5	0.2 μ mol/L
EMi-576R1(10 μ mol/L)	0.5	0.2 μ mol/L
灭菌双蒸水	16.0	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.5	2.5 U

10.3 第二轮 PCR

每个样品按照表 2 的要求,在冰盒上配制除 *Taq* DNA 聚合酶以外的预混物,保存于-20 $^{\circ}$ C。临用前,加入相应体积的 *Taq* DNA 聚合酶(5.17),混匀,按 24 μ L/反应分装到 PCR 管中。然后分别加入 1 μ L 第一轮 PCR 反应产物为模板,加入前可根据第一轮 PCR 产物浓度,做 100 倍~1 000 倍稀释。置于 PCR 仪(6.7)中,按以下程序进行第二轮 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、66 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保存。

也可采用等效的商品化 PCR 试剂盒。

表 2 第二轮 PCR 预混物试剂组成

试剂	加样量, μ L	试剂终浓度
10 $\times$ PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})	2.5	1 $\times$ PCR 缓冲液
$MgCl_2$ (25 mmol/L)	2.0	2.0 mmol/L

表 2（续）

试剂	加样量, μL	试剂终浓度
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	2.0	200 $\mu\text{mol/L}$
EMi-308F2(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
EMi-308R2(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	16.0	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.5	2.5 U

10.4 琼脂糖凝胶电泳

配制 2% 的琼脂糖凝胶,待凝胶冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右,按比例加入核酸染料(5.22),摇匀,待其凝固。将其放入水平电泳槽中,使 1 $\times$ 电泳缓冲液(5.31)刚好淹没胶面,将 5 μL PCR 扩增产物和 1 μL 6 $\times$ 载样缓冲液(5.32)混匀后加入到加样孔中,同时设立 DNA Marker(5.21)标准对照。5 V/cm 电压下电泳约 30 min,当载样缓冲液中的溴酚蓝指示剂色带迁移至琼脂糖凝胶 2/3 处时停止电泳,在紫外透射仪或凝胶成像仪下观察并拍照记录。

如果观察到预期大小扩增片段,对 PCR 扩增产物进行测序,并对测序结果进行 Blastn 序列比对。

10.5 结果判定

10.5.1 若阳性对照第一轮 PCR 后在 576 bp 附近有特异性目的条带,且第二轮 PCR 后在 308 bp 附近有特异性目的条带,同时阴性对照和空白对照均无上述特异性目的条带,则判定检测有效;否则检测无效,应重新进行检测。

10.5.2 若检测样品第一轮 PCR 后在 576 bp 附近有特异性目的条带,或第一轮 PCR 后在 576 bp 附近无特异性目的条带而第二轮 PCR 后在 308 bp 附近有特异性目的条带,且 PCR 产物测序结果与 B.1 的参考序列一致性(Identities) $\geq 96\%$,则判定套式 PCR 检测结果为阳性。

10.5.3 若检测样品第一轮 PCR 后在 576 bp 附近无特异性目的条带且第二轮 PCR 后在 308 bp 附近无特异性目的条带,或 PCR 产物测序结果与 B.1 的参考序列一致性(Identities) $< 96\%$,则判定套式 PCR 检测结果为阴性。

11 染料法 qPCR 检测

11.1 DNA 提取

按 10.1 操作。

11.2 qPCR 反应

每个样品按照表 3 的要求,在冰盒上配制成染料法 qPCR 预混物,混匀后,按 23 μL /反应分装到 PCR 管中,然后按空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对照的次序分别加入总量为 10 ng~100 ng 的 DNA 模板 2 μL 。置于 qPCR 仪(6.8)中,按以下程序进行 qPCR 扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环,每次循环收集一次荧光信号;熔解曲线测定,结束后,确定 C_t 值。

表 3 染料法 qPCR 预混物所需试剂

试剂	加样量, μL	试剂终浓度
2 $\times$ SYBR Green qPCR 预混液(5.23)	12.5	1 $\times$ qPCR 预混液
EMi-q137F(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
EMi-q137R(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	9.5	—

11.3 结果判定

11.3.1 若阳性对照 C_t 值 ≤ 35 且有典型的“S”形扩增曲线,熔解曲线具有单一(81.0 $\pm$ 0.8) $^{\circ}\text{C}$ 的峰,同时阴性对照和空白对照无 C_t 值或 C_t 值 > 35 但无典型的“S”形扩增曲线,则判定检测有效;否则检测无效,应重新进行检测。

11.3.2 若样品的 C_t 值 ≤ 35 且有典型的“S”形扩增曲线,熔解曲线具有单一(81.0 $\pm$ 0.8) $^{\circ}\text{C}$ 的峰,则判

定染料法 qPCR 检测结果为阳性。

11.3.3 若样品无 C_t 值或无典型的“S”形扩增曲线,则判定染料法 qPCR 检测结果为阴性。

11.3.4 若 $35 < \text{样品的 } C_t \text{ 值} < 40$ 时,且熔解曲线具有一个单一 $(81.0 \pm 0.8)^\circ\text{C}$ 的峰,应重新检测。再次检测时加入 $5\ \mu\text{L}$ 模板,并相应减少水的体积,若重新检测结果 $C_t \text{ 值} \leq 35$ 且有典型的“S”形扩增曲线,且熔解曲线具有一个单一 $(81.0 \pm 0.8)^\circ\text{C}$ 的峰,则判定染料法 qPCR 检测结果为阳性,否则判定染料法 qPCR 检测结果为阴性。

12 综合判定

12.1 疑似病例的判定

检测结果符合以下任何一项,判定为疑似病例:

- 出现典型的临床症状;
- 组织病理检查为阳性;
- 套式 PCR 检测结果阳性;
- 染料法 qPCR 检测结果阳性。

12.2 确诊病例的判定

套式 PCR 和/或染料法 qPCR 检测结果为阳性,且符合以下任何一项,判定为确诊病例:

- 出现典型的临床症状;
- 组织病理检查为阳性。

12.3 阴性病例的判定

不具有典型临床症状和组织病理学特征,且套式 PCR 和/或染料法 qPCR 检测结果为阴性,判定为阴性病例。

附 录 A
(规范性)
试 剂 配 方

A.1 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/mL 胰 RNA 酶	2 mL
10% SDS	5 mL
加水定容至 100 mL,混匀,室温储存。	

A.2 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℃下保存。	

A.3 10 mol/L 乙酸铵

乙酸铵	77 g
水	30 mL
加水定容至 100 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤除菌,4℃储存。	

A.4 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,高压蒸气灭菌,4℃储存。	

A.5 50×电泳缓冲液

Tris	242 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL
冰乙酸	57.1 mL
加水定容至 1 000 mL,室温储存。	

A.6 1×电泳缓冲液

50×电泳缓冲液	20 mL
加水定容至	1 000 mL
室温储存。	

附 录 B

(资料性)

蛙脑膜炎诊断引物在靶基因中的位置

B.1 套式 PCR 引物在靶基因中的位置 (GenBank 登录号:CP040516)

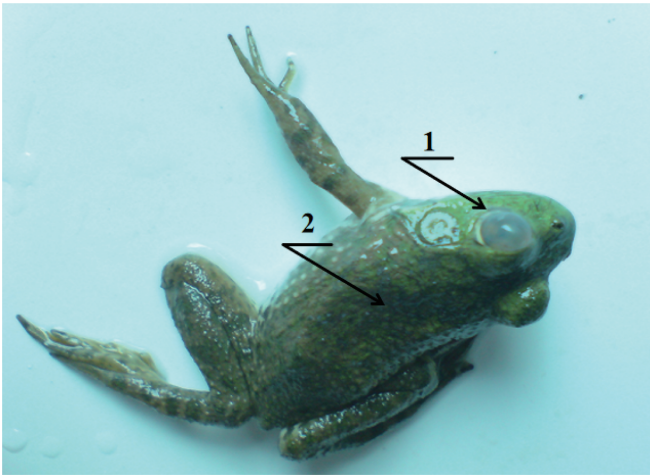
AACTTTCGTTCTTAATGCTGCCTG AACCGCAATATCAAACCTGTTGTCTAGGGATCAGTTCACGCAACTTCT
EMI-576F1/EMI-308F2
CACACATTTTCTTTCCGATGTGGTATGCGTTACTATCGTGAATCAATGAAGATAAGGCATCCACCATATCACCA
TTGATCAGAATATCCATTTTACAAGCTTAGAAGCTCTGAATCCAATTGGATGGTAATCGAATGAGGCATAAC
CTTTAGAAATTGATTTTCAGACGGTCGTAGAAGTCAAATACAACCTCTGCCAATGGCATATTGAAGATTAGCTCA
ACTCGCTCTGAAGT CAAATAACTTTGGTTAACGATTTCACCTCTTTTCTCAATACATAGAGTCATTACTGAAC
EMI-308R2
CTACAAAATCCGATTTAGTAATGATAGATGCCTTAATATAAGGCTCTTCTACCCTGTCCATAATCGATGGGTCC
ATCATTTCCGAAGGGTTATTAATCAGAATCGGAACCTCAGGCTCCTTTTTAGAAATATCCAAAATAAGACACGTT
CGGAACCGTAGTAATAACGTTTCATATTAACTCCCTATCTAAACGCTCCTGAACAATTTCCATGTG CAGCATT
CCAAGGAATCCACATCGGAAACCAAAACCTAAT
EMI-576R1

B.2 染料法 qPCR 引物在靶基因中的位置 (GenBank 登录号:CP040516)

TCTGAGCCTGAATACTCTGTGCGGCGTCTACAATAAGCAATG CTCCTTCACATGCAGCGATTGAACGGGAA
EMI-q137F
ACTTCATATGAAAAATCCACGTGCCCCGAGTATCAATAAGATTAAGGATAAACTTTTCCCCCTTATACTCATA
GTCCAT TTGAATTGCGTGGCTTTTAATAGTAATTCCACGCTCTTTTCAAGGTCCATATCAT
EMI-q137F

附 录 C
(资料性)
蛙脑膜炎临床症状与组织病理特征示例

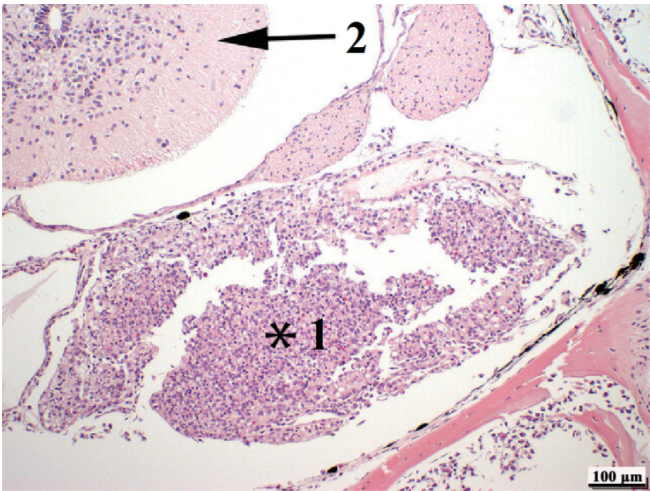
C.1 病蛙临床症状见图 C.1。



标引序号说明：
1——眼球晶状体不透明；
2——脊柱歪斜、歪头。

图 C.1 病蛙临床症状

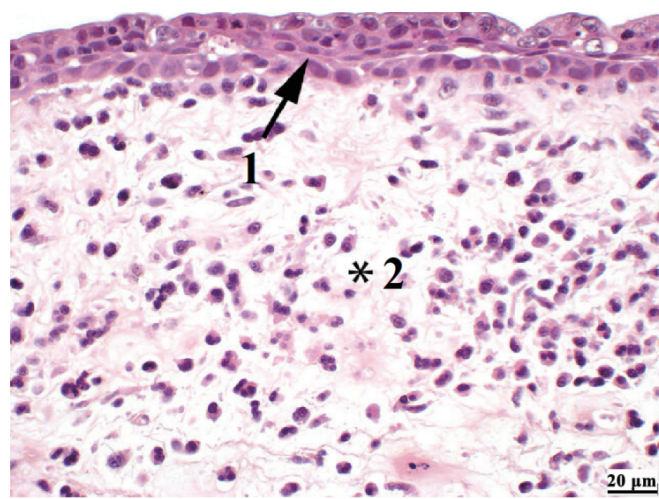
C.2 病蛙脑组织病理特征见图 C.2。



标引序号说明：
1——亚急性脑膜炎；
2——脑干。
注：病蛙脑组织 HE 染色，标尺 100 μm。

图 C.2 病蛙脑组织病理特征

C.3 病蛙眼组织病理特征，见图 C.3。



标引序号说明：

1——角膜上皮增生；

2——慢性角膜炎。

注：病蛙眼膜组织 HE 染色，标尺 20 μm。

图 C.3 病蛙眼组织病理特征