

ICS 65.150
B 50
备案号: 19166-2006

DB

北京市地方标准

DB11/T 375—2006

水生动物检疫名录及病原检测方法

Aquatic Animal Quarantine Directory and Disease Inspection Method

2006-07-25 发布

2006-10-01 实施

北京市质量技术监督局 发布

前 言

本标准以《中华人民共和国动物防疫法》、《中华人民共和国渔业法》、《中华人民共和国动物防疫法一、二、三类动物疫病病种名录》、《中华人民共和国进境动物一、二类传染病、寄生虫病名录》、《国际水生动物卫生法典》为基础，参考中华人民共和国动物疫病的防疫检疫相关法律、法规和相关标准，并结合北京市水产养殖业的特点，强调了水产养殖生产和流通中，需要严格控制、检疫的疫病及其判定方法。

本标准的附录 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 均为资料性附录。

本标准由北京市农业局提出并归口

本标准起草单位：北京市水产技术推广站

本标准主要起草人：王姝、殷守仁、徐立蒲、盛竹梅、高南。

水生动物检疫名录及病原检测方法

1 范围

本标准规定了北京市二、三类水生动物疫病名录、病原检测方法和报告单形式。

本标准适用于北京地区各水产养殖单位、天然水域、垂钓休闲场所等，以及进出北京的鲜活水产品

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.7-2003 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验

GB/T 15805.1-1995 淡水鱼类检疫方法 第一部分

GB 15984-1995 霍乱诊断标准及处理原则

水生动物疾病诊断手册 世界动物卫生组织

3 检疫名录

具体见表1。

表1 检疫名录

疫病类别	疫 病 名 称
二类疫病 (10种)	1 病毒性出血性败血症 (VHS)
	2 鲤春病毒血症 (SVC)
	3 传染性胰脏坏死病 (IPN)
	4 草鱼出血病 (GCH)
	5 传染性造血器官坏死病 (IHN)
	6 斑点叉尾鮰病毒病 (CCVD)
	7 对虾白斑病 (WSS)
	8 对虾拖沓病 (TS)
	9 弧菌病 [霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholera</i>)、副溶血弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)]
	10 吸虫病 [华枝睾吸虫 (<i>Clonorchis sinensis</i>)、并殖吸虫 (<i>Paragonimus westermani</i>)]
三类疫病 (9种)	1 鲤痘疮病 (疱疹病毒) <i>H. cyprini</i>)
	2 鳃霉病 (鳃霉菌) <i>Branchiomyces</i> sp.)
	3 气单胞菌病 [嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)、灭鲑气单胞菌 (<i>Aeromonas salmonicida</i>)]
	4 小瓜虫病 [多子小瓜虫 (<i>Ichthyophthiriasis multifiliis</i>)、刺激隐核虫 (<i>Cryptocaryon irritans</i>)]
	5 绦虫病 [九江头槽绦虫 (<i>Bothriocephalus gowkongensis</i>)、阔节裂头绦虫 (<i>Diphyllobothrium latum</i>)]
	6 粘孢子虫 [碘泡虫 (<i>Myxobolus</i> spp)、单极虫 (<i>Thelohanellidae</i> spp)]
	7 原虫病 [斜管虫 (<i>Chilodonella cyprini</i>)、车轮虫 (<i>Trichodina</i> spp)]
	8 蠕虫病 [指环虫 (<i>Chilodonella cyprini</i>)、三代虫 (<i>Gyrodactylus</i> spp)]
	9 昏眩病 [脑粘体虫 (<i>Myxosoma cerebralis</i>)]

4 检测方法

检测方法具体见表 2 和表 3。

表 2 二类疫病检测方法

序号	疫病名称		检测方法
1	病毒性出血性败血症（VHS）		GB/T 15805.1-1995
2	鲤春病毒血症（SVC）		GB/T 15805.1-1995
3	传染性胰脏坏死病（IPN）		GB/T 15805.1-1995
4	草鱼出血病（GCH）		自行制定，见附录 A
5	传染性造血器官坏死病（IHN）		GB/T 15805.1-1995
6	斑点叉尾鮰病毒病（CCVD）		GB/T 15805.1-1995
7	对虾白斑病（WSS）		《水生动物疾病诊断手册》
8	对虾拖拉病（TS）		《水生动物疾病诊断手册》
9	弧菌病	霍乱弧菌（ <i>Vibrio cholera</i> ）	GB 15984-1995
		副溶血弧菌（ <i>vibrio arahaemolyticus</i> ）	GB/T 4789.7-2003
10	吸虫病	华枝睾吸虫（ <i>Clonorchis sinensis</i> ）	自行制定，见附录 B
		并殖吸虫（ <i>Paragonimus westermani</i> ）	

表 3 三类疫病检测方法

序号	疫病名称		检测方法
1	鲤痘疮病（疱疹病毒） <i>H. cyprini</i>		自行制定，见附录 C
2	鳃霉病（鳃霉菌） <i>Branchiomyces sp.</i>		自行制定，见附录 D
3	气单胞菌病	嗜水气单胞菌 （ <i>Aeromonas hydrophila</i> ）	自行制定，见附录 E
		灭鲑气单胞菌 （ <i>Aeromonas salmonicida</i> ）	GB/T 15805.1-1995
4	小瓜虫病		自行制定，见附录 F
5	绦虫病		自行制定，见附录 G
6	粘孢子虫病		自行制定，见附录 H
7	原虫病		自行制定，见附录 I
8	蠕虫病		自行制定，见附录 J
9	昏眩病		GB/T 15805.1-1995

5 出具报告单

具体见表 4。

表 4 病原检测报告单

报检单位编号		送检单位编号	
实验室编号		送样单位	
样品名称		产地	
取样部位		送样日期	
病毒检测项目	☐ 病毒性出血性败血症 ☐ 鲤春病毒血症 ☐ 传染性胰脏坏死病 ☐ 草鱼出血病 ☐ 传染性造血器官坏死病 ☐ 斑点叉尾鮰病毒病 ☐ 对虾白斑病 ☐ 对虾拖拉病 ☐ 鲤痘疮病（疱疹病毒）	细菌检测项目	☐ 霍乱弧菌 ☐ 副溶血弧菌 ☐ 嗜水气单胞菌 ☐ 灭鲑气单胞菌
		霉菌检测项目	☐ 鳃霉病
寄生虫检测项目	☐ 华枝睾吸虫 ☐ 单极虫 ☐ 并殖吸虫 ☐ 斜管虫 ☐ 多子小瓜虫 ☐ 车轮虫 ☐ 刺激隐核虫 ☐ 指环虫 ☐ 九江头槽绦虫 ☐ 三代虫 ☐ 阔节裂头绦虫 ☐ 脑粘体虫 ☐ 碘泡虫		
结果报告			
备注			

附录 A

（资料性附录）

草鱼出血病的检测

A.1 病原

该病毒属呼肠孤病毒科，介于呼肠孤病毒属和轮状病毒属之间。

A.2 流行情况

此病在南方多个省市均有流行，草鱼、青鱼都可发病，特别是在苗种培育阶段危害性更大。它流行季节长，发病率高，往往造成大批草鱼鱼种死亡。

A.3 临床检查

A.3.1 活动情况及外部检查

鱼的体色变黑，离群独游，停止摄食，还伴有充血、出血症状。

A.3.2 剖检

病鱼各器官组织有不同程度的充血、出血。口腔、上下颌、头顶部、眼眶周围、鳃盖、鳃及鳍条基部充血，有时眼球突出；剥除鱼的皮肤，可见肌肉呈点状或块状充血、出血，严重时肌肉呈鲜红色，这时鳃常呈现“白鳃”；肠壁充血，但仍具韧性，肠内无食物；肠系膜、周围脂肪、鳔、胆囊、肝、脾、肾也有出血点或血丝。

A.4 实验室检验

A.4.1 病毒分离

A.4.1.1 细胞准备

A.4.1.1.1 设备及器械

无菌室、超净工作台、恒温培养箱、低温冰箱和 0.45um 混合纤维素酯微孔滤膜、细胞培养瓶、白色橡皮塞等。

A.4.1.1.2 培养基及试剂

细胞生长液、胰酶—EDTA 混合消化液、小牛血清、L-谷氨酰胺等。

A.4.1.1.3 接种前的细胞准备

草鱼出血病毒用草鱼肾细胞株（CIK）细胞分离。最适培养温度分别为 20℃左右。选择生长良好，形成单层的细胞培养物，倒出生长液加入适量胰酶—EDTA 混合消化液消化，然后补加生长液，按 1:2 或 1:3 的分种率将原瓶消化的细胞分装入 2 个或 3 个培养瓶中，置室温中继续培养，当单层致密度达 80%左右，即可用于病毒接种。

A.4.1.2 样品接种

A.4.1.2.1 设备及器械

除了 A.4.1.1.1 规定的设备及器械外，另增加冷冻离心机和 1.2mL 规格的移液管。

A.4.1.2.2 常用的溶液

细胞维持液、磷酸缓冲盐水等。

A.4.1.2.3 取样

有症状的鱼，取 10 尾以上样品作病毒分离用。

无症状的鱼，取 60 尾以上样品作病毒分离用。

对鱼卵，取 60~100 粒为样品作病毒分离用。

对于少量成鱼，从尾动脉抽 1~2mL 血液，其血浆作病毒分离用，血清作抗体检测。

A. 4. 1. 2. 4 样品处理

——较大的鱼取其肾、肝、脾等内脏器官。仔、稚鱼取鱼体全部。鱼卵必须去除卵黄囊。

——称重，加磷酸缓冲盐水（PBS）匀浆，并稀释成 10^{-1} ，离心 30min（4,000rpm），弃去沉淀物，将上清液通过 0.45um 微孔滤膜除菌，然后再用 PBS 进行 10 倍稀释，即成样品。

——血液样品置于常温下 1h 后，再放在 4℃ 下 12h 以上，以析出血清。然后低速离心，其沉淀作待检样品，按上述方法制备样品液，血清作中和试验。

A. 4. 1. 2. 5 接种细胞

倒出细胞瓶中的培养液，然后接种样品液，接种量为维持液量的 10^{-1} ，吸附 1h 后，加细胞培养液培养，同时设对照。

A. 4. 1. 3 病毒培养

草鱼出血病毒培养温度是 15℃~20℃。在培养过程中每日观察细胞变化情况，观察 7d 后，盲传二代。

A. 4. 1. 4 结果观察

若接种样品含有病毒，培养 2d~5d 后，即出现明显细胞致病作用（CPE），主要特征为细胞崩解，细胞单层破坏。收集阳性细胞悬液，冻融一次后，低速离心除去细胞碎片，上清液作病毒鉴定用。

若接种后 7d 仍未见 CPE，则判断为阴性结果。

若 7d 内出现可疑 CPE 现象，则需将该细胞瓶培养液作为接种材料再接种一次，以判断是否有 CPE。

A. 4. 2 病毒鉴定

A. 4. 2. 1 中和试验 I（固定血清用量——稀释病毒法）

本试验用于鉴定在细胞培养中出现了 CPE 的样品是否含有草鱼出血病毒。

A. 4. 2. 1. 1 试验准备

——细胞 CIK 细胞培养于 96 孔微量细胞培养板上。

——病毒 用草鱼出血病毒标准毒株，传代后制成病毒悬液。

——标准抗血清 抗草鱼出血病毒的标准血清，使用前于 56℃ 灭活 60min。

——待检样品（出现了 CPE 的细胞培养物）冻融一次，除去细胞碎片后使用。

A. 4. 2. 1. 2 操作步骤

A. 4. 2. 1. 2. 1 将待检样品用 Hanks 液作系列稀释，使其稀释度由 10^{-1} 到 10^{-3} ，每管含量为 0.5mL。

A. 4. 2. 1. 2. 2 取两排试管，分别从上述各稀释度的待检样品中取出 0.2mL 于两排试管中，然后第一排试管加入 0.2mL 抗草鱼出血病毒标准血清，第二排试管加入 0.2mL 维持液，充分混合均匀。

A. 4. 2. 1. 2. 3 30℃ 温育 60min。

A. 4. 2. 1. 2. 4 温育后分别将第一排管和第二排管的样品接种于已长满草鱼出血病毒细胞单层的 96 孔微量细胞培养板，每个稀释度 4 孔，每孔 0.1mL。

A. 4. 2. 1. 2. 5 将抗草鱼出血病毒标准血清倍比稀释后（1: 8 至 1: 64）接种于上述培养板，每个稀释度 4 孔，每个孔 0.05mL，作为标准血清对照。将标准草鱼出血病毒接种 8 孔，每孔 0.05mL，作为病毒对照，其余 8 孔作为正常细胞对照。

A. 4. 2. 1. 2. 6 每孔加入维持液至总量 0.2mL。

A. 4. 2. 1. 2. 7 放入 20℃ 培养箱中培养，逐日观察病变，记录结果（按附表 A. 1 填写）。

表 A.1 中和试验 I 结果记录表

行 列		待检样品-标准血清				待检样品-维持液				标准血清		草鱼出血病毒对照	细胞对照	
		1	2	3	4	5	6	7	8		9	10	11	12
A	10 ⁻¹									1:8				
B	10 ⁻²													
C	10 ⁻³									1:16				
D	10 ⁻⁴													
E	10 ⁻⁵									1:32				
F	10 ⁻⁶													
G	10 ⁻⁷									1:64				
H	10 ⁻⁸													

A.4.2.1.3 结果判定

按 Reed 和 Muench 法分别结算出待检样品——标准血清与待检样品——维持液的细胞半数致死量 (TCID₅₀)，二者的滴度指数之差的反对数即为中和指数。若正常细胞与标准血清对照为阴性，标准毒对照为阳性，按表 A.2 判定结果。

表 A.2 结果判定

中和指数	结果判定
<10	阴性（待检者不带毒）
10~50	可疑
>50	阴性

A.4.2.2 中和试验 II（固定病毒——稀释血清法）

本试验用于鉴定鱼血清中是否含有抗草鱼出血病毒的中和抗体。

A.4.2.2.1 试验准备

- 细胞 CIK 细胞培养于 96 孔微量细胞培养板上。
- 病毒 标准草鱼出血病毒，使用前用 Hanks 液稀释至 50TCID₅₀/0.1mL。
- 血清 待检血清和正常血清（阴性血清）用等量的 Hanks 液（每毫升含青霉素 200IU、链霉素 200mg）稀释后，于 45℃ 灭活 30min，待冷却后使用。

A.4.2.2.2 操作步骤

- A.4.2.2.2.1 将已灭活处理的待检血清，用 Hanks 液作系列倍比稀释，使其稀释度由 1:4 到 1:256，每管含量为 0.2mL。
- A.4.2.2.2.2 分别在上述各管中加 0.2mL（即为待检血清等量）的 TCID₅₀ 0.1mL 的草鱼出血病毒悬液，充分摇匀混合。
- A.4.2.2.2.3 于 30℃ 温育 60min。
- A.4.2.2.2.4 取出后分别接种于长满 RTG-2 细胞单层的 96 孔微量细胞培养板，每个稀释度 4 孔，每孔 0.1mL。
- A.4.2.2.2.5 按上述步骤设立正常血清对照；将标准草鱼出血病毒悬液连续 10 倍稀释后（ 10^{-1} ~ 10^{-7} ）接种上述培养板，每个稀释度 4 孔，每孔 0.1mL，作为病毒悬液毒力滴度对照；96 孔微量细胞培养板 H 排 12 孔作为正常细胞对照。
- A.4.2.2.2.6 各孔加入细胞维持液至总量 0.2mL。
- A.4.2.2.2.7 放入 20℃ 培养箱培养，逐日观察病变，记录结果（按表 A.3 填写）。

表A.3 中和试验II结果记录表

行 列		待检血清				正常血清对照				病毒滴度对照				
		1	2	3	4	5	6	7	8		9	10	11	12
A	1:4													
B	1:8									10 ⁻¹				
C	1:16									10 ⁻²				
D	1:32									10 ⁻³				
E	1:64									10 ⁻⁴				
F	1:128									10 ⁻⁵				
G	1:256									10 ⁻⁶				
H	细胞对照									10 ⁻⁷				

A.4.2.2.3 结果判定

根据病变用Reed—Muench法或Karber法计算出血清中抗体效价（即能保护50%的细胞培养孔不产生病变的最高血清稀释度）。血清中和抗体效价大于或等于1:6者为阳性，小于1:6者为阴性。

A.4.3 综合判定

- 若出现上述临床症状，经细胞培养又出现CPE，并经中和试验为阳性者判定为草鱼出血病阳性。
- 若无临床症状，但经细胞培养出现CPE，并经中和试验为阳性者判定为草鱼出血病毒携带者。
- 若中和试验可疑，则判定为可疑。
- 若仅有临床症状，经细胞培养也不出现CPE，但鱼血清中抗草鱼出血病毒中和抗体为阳性者，则判定在近期内患过草鱼出血病。
- 若仅有临床症状，或仅能在细胞培养中出现CPE，但不能被抗草鱼出血病毒中和抗体中和者，则不能称患有草鱼出血病，需进一步做其他病检查。

附 录 B
(资料性附录)
吸虫病的检测

B.1 并殖吸虫的检测

B.1.1 病原

卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*)。

B.1.2 流行情况及生活史

并殖吸虫寄生于人、犬、猫及多种野生动物的肺组织内。本虫主要分布于东亚和东南亚诸国, 在我国的东北、华北、华南、中南及西南等地区的18个省与自治区均有报道, 是一种重要的人畜共患吸虫病。卫氏并殖吸虫的发育需要两个中间宿主: 第一中间宿主是淡水螺类, 第二中间寄主是甲壳类。终宿主 (比如人、猫、犬、等) 吃下含囊蚴的溪蟹及刺蛄等, 囊蚴便在肠内破囊而出。

B.1.3 实验室检查

B.1.3.1 配制试剂

B.1.3.1.1 生理盐水的配制

称取氯化钠8.5g, 溶于1000ml蒸馏水中即可。

B.1.3.1.2 碘液的配制

分别称取4g碘化钾和2g碘, 并量取蒸馏水100ml, 先将碘化钾溶于水, 然后再加碘, 溶解后贮存于棕色瓶中备用。

B.1.3.2 制片

B.1.3.2.1 剪取甲壳动物的头胸部软组织和肌肉, 匀浆, 加入少量生理盐水, 并混合均匀, 静置或微离心以除去杂质。取上清液再次轻微离心, 将包囊沉淀下来, 去掉上清液, 用生理盐水重悬沉淀。

B.1.3.2.2 在洁净的载玻片上滴加1滴上述的样品液, 在其上滴1滴碘液, 涂布均匀, 覆以盖玻片。

B.1.3.3 镜检

在碘液涂片中, 包囊的胞浆被染成黄色或浅褐色, 糖原泡为棕色, 囊壁、核仁和拟染色体均不着色。可以看到包囊内的锥形虫体。虫体肥厚, 腹面扁平, 背面隆起, 体表被有小棘, 以单生棘为主。口、腹吸盘大小略同, 腹吸盘位于体中横线稍前, 两盲肠形成3-4个弯曲, 终于体末端。尚无繁殖系统。

B.2 华枝睾吸虫的检测

B.2.1 病原

华枝睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)。

B.2.2 流行情况及生活史

华枝睾吸虫寄生于人、犬、猫、猪等的肝胆管和胆囊内, 可使肝脏肿大并导致其它肝病变, 是一种重要的人畜共患吸虫病。主要分布于东亚诸国, 在我国的流行也极为广泛。华枝睾吸虫的虫卵随粪便排出后, 被第一中间宿主淡水螺吞食后, 在螺体内孵出毛蚴, 继续发育成胞蚴、雷蚴和尾蚴。尾蚴自螺体逸出后, 侵入第二中间寄主鱼体, 并发育为囊蚴。囊蚴分布在鱼体的肉、头、皮、鳍及鳞等处, 其中的鱼肉及鱼头最多。可被囊蚴感染的主要是青、草、鲤、鲫、鳊、鲢、鳙等。终宿主 (比如人、猫、犬、猪等) 吃下含囊蚴的鱼肉, 外囊膜溶化后, 蚴虫由内囊膜逸出, 然后在胆道内发育为成虫。

B.2.3 临床检查

病鱼活动异常, 摄食减少。解剖后能在头部和肌肉内发现硬硬的包囊。

B.2.4 实验室检查

B. 2. 4. 1 配制试剂

B. 2. 4. 1. 1 生理盐水的配制

称取氯化钠8.5g，溶于1000ml蒸馏水中即可。

B. 2. 4. 1. 2 碘液的配制

分别称取4g碘化钾和2g碘，并量取蒸馏水100ml，先将碘化钾溶于水中，然后再加碘，溶解后贮存于棕色瓶中备用。

B. 2. 4. 2 制片

B. 2. 4. 2. 1 将鱼的肌肉和头部剪成小块，匀浆，加入少量生理盐水，并搅拌均匀，静置或微离心以除去杂质。取上清液再次轻微离心，将包裹沉淀下来，去掉上清液，用生理盐水重悬沉淀。

B. 2. 4. 2. 2 在洁净的载玻片上滴加1滴上述的样品液，在其上滴1滴碘液，涂布均匀，覆以盖玻片。

B. 2. 4. 3 镜检

在碘液涂片中，包裹的胞浆被染成黄色或浅褐色，糖原泡为棕色，囊壁、核仁和拟染色体均不着色。可以看到包裹内的雏形虫体。虫体背腹扁平，呈叶状，前端稍尖，后端较钝，体被无棘，透明。口吸盘略大于腹吸盘，腹吸盘位于体前端1/5处，消化器官包括口、咽和短食道及两肠支，肠支伸达虫体后端。尚无繁殖系统。

附 录 C

(资料性附录)

鲤痘疮病的检测

C.1 病原

鲤疱疹病毒 (H. cyprini)。

C.2 流行情况

此病流行于欧洲, 现在日本及我国均有病例发生, 主要危害鲤鱼、鲫鱼等, 影响鱼的生长及降低鱼的商品价值, 在越冬后期可引起病鱼死亡。

C.3 临床检查

早期病鱼的体表出现小的斑点, 以后变厚、增大, 其形状及大小各异, 直径可从1厘米左右到数厘米, 厚1-5厘米左右, 严重时可融合成一片。增生物表面原为光滑, 后来变得有些粗糙, 玻璃样或蜡样, 有时不透明; 颜色为浅乳白色、奶油色, 以至褐色。

C.4 实验室检查

C.4.1 石蜡组织切片

将分离的体表增生物进行固定、脱水、透明等处理后, 石蜡切片, H. E. 染色, 镜下观察。可以看到增生物为上皮细胞和结缔组织增生, 有些上皮细胞的核内有包涵体。

C.4.2 透射电镜观察

增生物超薄切片, 在透射电镜下可见在严重变性的细胞内有疱疹病毒, 内质网扩张粗糙, 线粒体肿胀, 嵴不清楚, 核糖体增多, 核内仅显示少量周边染色质。

附 录 D
(资料性附录)
鳃霉菌的检测

D.1 病原

鳃霉菌 (Branchiomyces sp.)

D.2 流行情况

通过孢子与鳃直接接触而感染。主要在夏秋季流行，当水质恶化时易暴发此病。该病出现往往是急性的，如条件合适一两天内即可大量繁殖，鱼苗即出现暴发性急性死亡。

D.3 症状

病鱼不喜摄食，游动缓慢，呼吸困难。鳃出血或失血，鳃上粘液增多，部分鳃丝发白并腐烂。

D.4 实验室检查

先用肉眼观察鱼的鳃部，如出现上述症状则必须进行镜检。剪少许鳃丝，盖上盖玻片在显微镜下检查。当发现鳃上有大量分枝状菌丝寄生时即可做出诊断。

附录 E

(资料性附录) 嗜水气单胞菌的检测

E.1 病原

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)

E.2 流行情况

该细菌能危害多种淡水、海水鱼类，还感染一些软体动物和两栖动物。本菌在世界各地广泛存在，它是条件性致病菌，鱼类感染后一般不发病，一旦环境污染，鱼体抵抗力降低，就会爆发性发病。

E.3 临床检查

病鱼皮肤出血、腹部膨大，鳞片外竖，眼球突出。慢性的表现为皮肤溃疡。剖检后可见肝、肾苍白或因胆汁浸润而变绿，肾肿大发脆。由于细菌毒素的作用而肝、肾内部结构遭到破坏。鱼的鳃、腹膜和肌肉呈点状出血。体腔充满血样渗出液，后肠和肛门肿大、发炎、出血。肛门外翻，肠道内充满粘液样物质。

E.4 实验室检验

E.4.1 病料的采集和处理

采取病鱼的肾、肝、脾、鳃、腹膜等。

E.4.2 病原菌分离

病鱼的肾、肝、脾等研碎，制成混悬液，接种血琼脂或添加 10mg/L 氨苄青霉素的血琼脂、脑心浸液或胰酪胨大豆琼脂培养基，放于 28℃ 条件下培养 24h，挑选革兰氏阴性菌落，接种细菌快速诊断系统 API-50E 试剂盒，进行确诊。

E.4.3 病原鉴定

E.4.3.1 显微镜检查

取培养的菌落或直接取病料涂片，革兰氏染色，镜检。可见革兰氏阴性短杆菌，单个或成对排列，长约 0.5 μm -1 μm。极端单鞭毛，有运动性。无荚膜，不产生芽胞。

E.4.3.2 生化试验

取培养的菌落进行生化试验，革兰氏染色阴性，有鞭毛，能运动。氧化酶试验阳性，发酵葡萄糖产酸产气，对新霉素或弧菌抑制剂 0/129 不敏感。生长 pH 5.5-9.0，多数菌株具有血凝性，在甘露糖存在的条件下 7.4℃ 或 22℃ 均能凝集牛、鸡、人型及豚鼠的红细胞。

E.4.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

将一定浓度的嗜水气单胞菌抗原溶于包被缓冲液中，加入微量滴定板，每孔 100 μl，放于 4℃ 条件下作用 12h，然后用 PBS 液洗涤 3 次，甩干。接着各孔加入包被物相对应的待检血清 100 μl，37℃ 条件下作用 1h -2h，同上用 PBS 液洗涤 3 次，根据试验可加入 1 层、2 层或更多层次，每加一层需同上用 PBS 液洗涤。最后一层必须加入与前一层相对的酶标记抗体，在 37℃ 条件下作用 1h -2h，再用 PBS 液洗涤 3 次，最后各孔加入底物邻苯二胺溶液 100 μl，放于室温 20min -30min，加入 2M H₂SO₄ 50 μl 终止反应，进行观察，判定。

E.5 结果判定

在 ELISA 检测仪上指定波长测定吸光值，用邻苯二胺做底物，所用波长为 490nm，用肉眼进行判断，呈橙色或黄色为阳性（+）；浅黄色或接近无色，与对照无显著差异，可判定为阴性（-）。

附 录 F

(资料性附录)

小瓜虫病的检测

F.1 病原体

多子小瓜虫 (*Ichthyophthiriasis multifiliis*)、刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*)。

F.2 流行情况

小瓜虫寄生在淡水、海水鱼的鳃、皮肤、鳍、口腔等处，对鱼的种类及年龄均无严格选择性，分布很广，几乎遍及全国各地，尤以不流动的小水体、高密度养殖的幼鱼及观赏鱼类为严重，常引起大批死亡。国外也很普遍。小瓜虫的繁殖适温为 15℃-25℃，因此流行于春、秋季。小瓜虫借助胞囊及幼虫传播，刚孵出的幼虫侵袭力较强。

F.3 临床检查

小瓜虫寄生处形成 1mm 以下的小白点，故叫白点病。当病情严重时，躯干、头部、鳃、口腔等处都布满小白点，并同时伴有大量粘液，表皮糜烂、脱落；病鱼体色发黑，消瘦，游动异常，最后病鱼呼吸困难而死。

F.4 实验室检验

F.4.1 初诊

病鱼体表、鳃上布满白色点状的虫体、胞囊，肉眼可见一个个小白点。体表粘液明显增多，与虫体混在一起，似有一层薄膜。

F.4.2 确诊

刮取少量粘液或将胞囊挑破后在镜下观察，可见小瓜虫身体柔软，可以任意变形，全身密布纤毛，纤毛不断波动，运动随意，体内有一个呈马蹄形的大核。

附 录 G

(资料性附录)

绦虫病的检测

G.1 病原

九江头槽绦虫 (*Bothriocephalus gowkongensis*)、阔节裂头绦虫 (*Diphyllbothrium latum*)。

G.2 流行情况

九江头槽绦虫原是两广的地方性鱼病,现已传播到其他地区,东欧一些国家也有它的报道。该虫寄生在草鱼、青鱼、鲢、鳙、鲮的肠内,以草鱼鱼种受害最为严重。草鱼在育苗初期即开始感染,而且在短期内大部分能发展到严重阶段。阔节裂头绦虫主要对人类造成危害。流行于欧洲一些国家,如芬兰、法国、意大利等国,在我国和日本也有少数病例。该虫可寄生于多种淡水鱼类,如狗鱼、江鳕、鲑鱼等。

G.3 临床检查

鱼体重减轻,非常瘦弱,不喜摄食,体色发黑,离群独游,口常张开,伴有恶性贫血现象。当严重寄生时,鱼肠前端第一盘曲膨大成胃囊状,直径较正常增大约 3 倍,并使前肠壁异常扩张,形成皱襞萎缩。此外,肠前端还出现慢性炎症。由于肠内密集虫体,造成机械堵塞。阔节裂头绦虫的裂头蚴寄生在鱼的结缔组织、肌肉、性腺、肝等处,当哺乳动物吞食感染裂头蚴的淡水鱼就受其感染。

G.4 实验室检验

九江头槽绦虫虫体带状,体长 20mm -250mm。头节有 1 明显的顶盘和 2 个较深的吸沟。精巢球形,每个节片内有 50 个-90 个,分布在节片的两侧。阴道和阴茎共同开口在生殖腔内。生殖腔开口在节片背面中线后 1/3 的任何一点上。卵巢双瓣翼状,开口于节片后端 1/4 的中央腹面,在生殖孔之前。卵黄腺比精巢小,散布在节片的两侧。梅氏腺位于卵巢的前侧。

阔节裂头绦虫体长 2m -20m,有 4000 多个节片;头节长圆形,背腹各有 1 条深裂的吸沟。每个节片内有 1 套生殖器官;精巢圆形,泡沫状,很多,散布在节片背面两侧,肌肉质的阴茎囊包含有阴茎,它开口于节片中央的上方,雌雄生殖孔在它的后方,卵巢两瓣状,位于节片后端 1/3 的腹面,阴道开口于生殖腔的生殖孔,子宫开口于生殖孔后方不远的腹中线。卵黄腺呈小圆粒状,散布在节片的两侧精巢的腹面。

附 录 H

(资料性附录) 粘孢子虫病的检测

H.1 病原

碘泡虫 (*Myxobolus* spp)、单极虫 (*Thelohanellidae* spp)。

H.2 流行情况

碘泡虫的种类比较多,包括鲢碘泡虫、饼形碘泡虫、鲫碘泡虫、圆形碘泡虫、异形碘泡虫等。它能感染多种鱼类,寄生在鱼的鳃、皮肤、脑、肝胆、脾等处。一般无明显的季节性,全年均可发生。它能造成鱼的死亡,也能使鱼因外观丑陋而失去商品价值。单极虫寄生于鲤鱼、鲫鱼的鳞下或肠壁上,全国流行。

H.3 临床检查

被碘泡虫寄生的鱼体表有大小不一、肉眼可见的白色胞囊,手摸患处很柔软,好象要涨破一样。严重时病鱼离群独游,体瘦弱,活动异常,肠内无食,鳃呈红色,粘液增多,呼吸困难。鲢单极虫病在鳞下形成许多淡黄色大胞囊,寄生处的鳞片竖起。吉陶单极虫病形成很多大胞囊突出于肠腔内,将肠管堵塞胀粗,肠壁变薄而透明,腹腔积水,肝苍白。

H.4 实验室检验

将胞囊压成薄片,用显微镜进行检查、确诊。

粘孢子虫的共同特征:(1)每一孢子有2块-7块几丁质壳片,两壳连接处叫缝线,缝线由于粗厚或突起呈脊状结构。缝脊大多数种类是直的,少数种类弯曲成“S”形;(2)有些种类的壳上有条纹、褶皱或尾状突起;(3)每孢子有1个-7个球形、梨形、瓶形的极囊,通常位于孢子前端。极囊里有极丝,作螺旋状盘曲,受刺激后能通过极囊射出;(4)极囊以外充满胞质,内有2个胚核,有的种类在胞质里还有1个嗜碘泡。

附 录 I

(资料性附录) 原虫病的检测

I.1 病原

斜管虫 (*Chilodonella cyprini*)、车轮虫 (*Trichodina* spp)。

I.2 流行情况

国内外斜管虫病都有发生,对温水性及冷水性淡水鱼都可造成危害,主要危害鱼苗、鱼种,流行于春秋季节。当水质恶劣、鱼体衰弱时,在夏季及冬季冰下也会发生斜管虫病,引起鱼大量死亡。车轮虫寄生在多种淡水鱼、海水鱼的鳃和体表,主要危害鱼苗、鱼种,严重感染时可引起病鱼大批死亡,但一般危害不大。全国各地均有发生。引起病鱼大批死亡主要是在热天。车轮虫在水中可生活 1 天-2 天,通过直接与鱼体接触而感染,可随水、水中生物及工具等传播。

I.3 临床检查

斜管虫寄生在鱼的鳃和皮肤上,有大量粘液,表皮发炎,坏死脱落,呼吸困难。少量寄生时没有明显症状;严重感染时,可引起寄生处粘液增多。病鱼游动缓慢,呼吸困难,鱼成群结队围绕池边狂游,呈“跑马”症状;车轮虫在鱼的鳃及体表各处不断爬动,损伤上皮细胞,上皮细胞及粘液细胞增生,分泌亢进,鳃上的毛细血管充血、渗出。严重时一大片上皮细胞坏死。

I.4 实验室检验

刮取鳃和体表粘液,制片,镜下观察。

斜管虫虫体侧面观背面隆起,腹面平坦,前端较薄,后端较厚;一般腹面观呈卵形,左边较直,右边稍弯,后端往往稍凹,将死或已死的个体则变成近圆形。活体大小为 (40-60) × (25-47) μm。在背面的前端左侧有 1 行刚毛,其余部分也均裸露;腹面左侧有 9 条纤毛线,右侧有 7 条纤毛线,其余部分也均裸露。腹面有 1 胞口,有 16 根-20 根刺杆作圆形围绕成漏斗状的口管,呈喇叭状,末端弯转处为胞咽。在虫体后部有 1 近圆形的大核,苏木精染色,核膜明显,在其周围分布着很多大小不同、形状不规则的染色质块,中间有 1 较大的核内体;小核球形,一般在大核的一侧或后面;有 2 个伸缩泡,分别位于虫体前部偏左及后部偏右。

车轮虫侧面观象毡帽或菜碟;虫体隆起的一面叫口面,和口面相对而凹入的一面叫反口面;口面有 1 口沟,下接胞口、前腔及胞咽,口沟两侧各有 1 排纤毛,形成口带,直达前腔;在胞咽附近有 1 个伸缩泡;有 1 个大核和 1 个小核;反口面环生 1 圈较长的纤毛,叫后纤毛带,在后纤毛带的上、下各有 1 圈较短的纤毛,分别称上缘纤毛和下缘纤毛,有的种类在下缘纤毛之后还有 1 圈透明的缘膜;反口面观,最显著的构造是齿环和辐线环,齿环由许多齿体衔接而成,齿体由齿钩、锥部和齿棘组成,常作车轮般旋转运动。

附 录 J

(资料性附录)

蠕虫病的检测

J.1 病原

指环虫 (*Chilodonella cyprini*)、三代虫 (*Gyrodactylus spp*)。

J.2 流行情况

指环虫病是种常见多发病，主要靠虫卵和幼虫传播，多数种类的适宜温度为 20℃-25℃，流行于春末夏初。大量寄生时可引起苗种大批死亡，尤其是在开始解冻时的 3 月至 6 月。指环虫病在全国各地都有发生，危害各种淡水鱼。三代虫的繁殖适宜水温为 20℃，所以同样流行于春末夏初。该虫在苗种和成鱼的体表、鳃都可寄生，主要危害苗种，金鱼也常受其害。

J.3 临床检查

病鱼体表失去光泽，游动不正常。食欲减退，鱼体瘦弱，呼吸困难。被指环虫寄生的鱼鳃丝肿胀，贫血，呈花瓣状，鳃上有大量粘液。将被三代虫寄生的鱼放在盛有清水的培养皿中，用放大镜可见虫体在体表作蛭状运动。

J.4 实验室检验

用显微镜检查鳃的临时压片来确诊。

指环虫体扁平，具 4 个眼点，2 对头器，肠支末端连成环。后固着器上有 1 对中央大钩，中央大钩具 1 对三角形附加片，边缘小钩 7 对。精巢 1 个，在虫体中部稍后，贮精囊附近有摄护腺；卵巢 1 个，位于精巢之前；生殖孔在腹面，近肠管分枝处。咽的两侧分布有两对呈方形排列的褐色眼点是其重要特征。

三代虫有 1 对头器，没有眼点，后固着器有 1 对中央大钩、8 对边缘小钩、有 2 根联结片，副联结片具有延膜；咽由 16 个细胞组成，呈葫芦状。胎生，一般为三代同体，所以叫三代虫，有时甚至可看到第四代。交配囊卵圆形，由 1 根大而弯曲的大刺和 8 根小刺组成。