

附录 A  
(规范性附录)  
试剂配制

标准中所有试剂,除特别注明外,全部采用分析纯的试剂。

A.1 培养液

199 培养基,按说明书的要求配制。然后加入 10% 的胎牛血清,抽滤除菌, -20 °C 保存。

A.2 细胞消化液(胰酶-EDTA 混合消化液)

氯化钠(NaCl)	0.8 g
氯化钾(KCl)	0.02 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.02 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.115 g
EDTA	0.02 g
胰酶	0.1 g
水	100 mL

过滤除菌后分装备用。



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 15805.3—2008  
部分代替 GB/T 15805.1—1995

## 鱼类检疫方法 第 3 部分:病毒性出血性败血症病毒 (VHSV)

Quarantine methods of fish—  
Part 3: Viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV)



GB/T 15805.3—2008

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-34022

定价: 10.00 元

2008-07-31 发布

2008-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

表 1 中和试验结果记录表

项 目	待检样品+参考血清				待检样品+细胞培养液				参考病毒+参考血清		参考血清	对照
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 <sup>-1</sup>										1 : 8	细胞 对照
B	10 <sup>-2</sup>										1 : 8	
C	10 <sup>-3</sup>										1 : 16	
D	10 <sup>-4</sup>										1 : 16	
E	10 <sup>-5</sup>										1 : 32	病毒 对照
F	10 <sup>-6</sup>										1 : 32	
G	10 <sup>-7</sup>										1 : 64	
H	10 <sup>-8</sup>										1 : 64	

6.3 结果计算

按 Reed 和 Muench 法分别计算出“待检样品+参考血清”与“待检样品+培养液”的组织培养半数细胞病变感染剂量(TCID<sub>50</sub>),二者的滴度指数之差的反对数即为中和指数。若正常细胞与参考血清对照为阴性,参考毒对照为阳性,按表 2 判定结果。

表 2 中和试验结果判定表

中和指数	结果判定
<10	阴性(待检查不带毒)
10~50	可疑
>50	阳性

6.4 结果判定

- 6.4.1 若出现临床症状,经细胞培养又出现 CPE,并经中和试验为阳性者可判定患有病毒性出血性败血症。
- 6.4.2 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 VHSV 携带者。
- 6.4.3 若中和试验为可疑,需重复一次,仍为可疑者则判定为可疑。
- 6.4.4 若仅有临床症状,或仅能在细胞培养中出现 CPE,但不能被抗 VHSV 中和抗体中和者则不能称患有 VHS,需进一步作其他病检查。

中 华 人 民 共 和 国  
 国 家 标 准  
 鱼 类 检 疫 方 法  
 第 3 部 分 : 病 毒 性 出 血 性 败 血 症 病 毒  
 (VHSV)  
 GB/T 15805.3—2008  
 \*  
 中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行  
 北 京 复 兴 门 外 三 里 河 北 街 16 号  
 邮 政 编 码 : 100045  
 网 址 www.spc.net.cn  
 电 话 : 68523946 68517548  
 中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷  
 各 地 新 华 书 店 经 销  
 \*  
 开 本 880×1230 1/16 印 张 0.5 字 数 9 千 字  
 2008 年 10 月 第 一 版 2008 年 10 月 第 一 次 印 刷  
 \*  
 书 号 : 155066 · 1-34022 定 价 10.00 元  
  
 如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换  
 版 权 专 有 侵 权 必 究  
 举 报 电 话 : (010)68533533

无症状的鱼取肝、肾、脾；成熟雌鱼还需取卵巢液；鱼卵则取卵壳。

## 5.2 样品处理

应在 10℃ 以下进行。先用组织研磨器将样品匀浆。再用培养液（见第 A.1 章）按 1:10 的最终稀释度悬浮。在匀浆前未用抗菌素处理过的样品，则须将样品匀浆后再悬浮于含有抗菌素（1 000 IU/mL 的青霉素和 1 000 μg/mL 的链霉素或其他抗菌素）的培养液中，于 15℃ 下孵育 2 h~4 h 或 4℃ 下孵育 6 h~24 h。7 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。卵巢液不必匀浆，稀释两倍以上。用相同的方法离心卵巢液样品并在以后的步骤中直接用其上清液。

## 5.3 分离操作

对上述 1:10 的组织匀浆上清液用培养液再作两次 10 倍稀释，然后将这 1:10、1:100 和 1:1 000 三种稀释度的上清液，以适当体积分别接种到生长约 24 h 的 RTG-2 或者 EPC 的细胞单层中，每孔（2 cm<sup>2</sup>）的细胞单层最多接种 100 μL 稀释液。15℃~18℃ 吸附 1 h 后，加入细胞培养液。置于 15℃~18℃ 培养。

阳性对照组和待测样品都接种细胞后，7 d 内每天用 40 倍到 100 倍倒置显微镜检查，接种了被检物匀浆上清稀释液的细胞培养中是否出现细胞病变（CPE）。空白对照细胞应当正常。如果阳性对照细胞出现了 CPE，而待测样品中没有 CPE 出现，则在培养 7 d 后还要用敏感细胞进行再传代培养。传代时，冻融并收集接种了组织匀浆上清稀释液的细胞单层培养物。7 000 r/min，4℃ 离心 15 min，收集上清液。接种到新鲜细胞单层，培养 7 d。每天用 40 倍到 100 倍倒置显微镜检查。如果样品经过接种细胞和盲传后均没有 CPE 出现，则结果判为阴性。如有 CPE 出现，则要用中和试验进行鉴定是否由 VHSV 引起。

如果阳性对照组也未出现 CPE，则应采用敏感细胞和新的组织样品重新进行上述病毒学检查。

## 6 VHSV 的鉴定：中和试验

### 6.1 试验准备

6.1.1 细胞：把 RTG-2（或 EPC）细胞培养于 96 孔微量细胞培养板上。

6.1.2 病毒：用参考 VHSV 毒株，传代后制成病毒悬液。

6.1.3 参考抗血清：抗 VHSV 的参考血清，使用前于 56℃ 灭活 60 min。

6.1.4 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。

### 6.2 操作步骤

6.2.1 将待检样品用细胞培养液作系列稀释，使其稀释度由 10<sup>-1</sup> 到 10<sup>-8</sup>，每管体积为 0.5 mL。

6.2.2 取两排试管，分别从上述各稀释度的待检样品中取出 0.2 mL 于两排试管中，然后第一排管加入 0.2 mL 抗 VHSV 参考血清，第二排管加入 0.2 mL 培养液，充分混合均匀。

6.2.3 25℃ 温育 60 min。

6.2.4 温育后分别将第一排管与第二排管的样品接种于已长满细胞单层的 96 孔微量细胞培养板，每个稀释度 4 孔，每孔 0.1 mL。

6.2.5 将抗 VHSV 参考血清倍比稀释后（1:8 至 1:64）接种于上述培养板，每个稀释度 2 孔，每孔 0.05 mL，作为参考抗血清对照。将参考 VHSV 接种 8 孔，每孔 0.05 mL，作为病毒对照，其余 8 孔作为正常细胞对照。

6.2.6 将 VHSV 参考病毒按照 6.2.1~6.2.3 的方法由 10<sup>-1</sup> 到 10<sup>-8</sup> 稀释，并和参考血清混合反应后加入细胞板，每个稀释度 2 孔，每孔 0.1 mL，作为参考病毒+参考血清对照，细胞板中剩余 8 孔中 4 孔作正常细胞对照，4 孔接参考病毒原液做病毒对照。

6.2.7 各孔再加入培养液 0.1 mL。

6.2.8 放入 15℃~18℃ 培养箱中培养，逐日观察 CPE，并按表 1 填写试验结果。

## 前 言

GB/T 15805《鱼类检疫方法》分为下列部分：

- 第 1 部分：传染性胰脏坏死病毒（IPNV）；
- 第 2 部分：传染性造血器官坏死病毒（IHNV）；
- 第 3 部分：病毒性出血性败血症病毒（VHSV）；
- 第 4 部分：斑点叉尾鲷病毒（CCV）；
- 第 5 部分：鲤春病毒血症病毒（SVCV）；
- 第 6 部分：杀鲑气单胞菌；
- 第 7 部分：脑粘体虫；

……

本部分为 GB/T 15805 的第 3 部分。

本部分代替 GB/T 15805.1—1995《淡水鱼类检疫方法 第一部分》中的第 5 章。

本部分与 GB/T 15805.1—1995 的第 5 章相比主要变化如下：

——分离病毒的细胞由原仅用 RTG-2 改为用 FHM 或 RTG-2 细胞分离。因为最适合 VHS 生长的细胞是 FHM 和 RTG-2。OIE 的诊断手册也是推荐这两种细胞。

——对一些过时的试剂和设备进行了修改，并纠正了一些印刷错误。

——结构格式按 GB/T 1.1—2000 的规定，作为部分编写。

本部分的附录 A 为规范性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国水产标准化技术委员会归口。

本部分起草单位：农业部全国水产技术推广总站、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：孙喜模、江育林、陈爱平、陈辉、朱泽闻。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 15805.1—1995。