



中华人民共和国国家标准

GB/T 28630.4—2012

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

Diagnostic protocols for white spot disease—
Part 4: Histopathology method

中华人民共和国
国家标准
白斑综合征(WSD)诊断规程
第4部分:组织病理学诊断法
GB/T 28630.4—2012

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
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 1 字数 21 千字
2012年11月第一版 2012年11月第一次印刷

*

书号: 155066·1-45623 定价 18.00 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)68510107



GB/T 28630.4—2012

2012-07-31 发布

2012-11-01 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

大于 8 cm 的虾或蟹:参照上述修整方法,按照长宽不超过 1 cm×1 cm,厚度不超过 0.5 cm 的要求对感兴趣的组织所在的区域进行修整;对特定的组织或蟹的组织,也可考虑进行横切,甚至独立地解剖出相应的组织器官,按需要分别进行脱水和包埋,胃和肠道中的内容物应剔除干净以免损伤切片刀。

B.2.3 分子生物学或免疫学诊断的样品

B.2.3.1 样品采集和保存要点

用于 PCR、RT-PCR 或核酸探针斑点杂交检测的样品应注重保护病原的核酸。用于抗体的免疫分析检测的样品应注重保护病原的抗原活性。

用于核酸检测或抗体检测的样品应十分小心地防止各样品间的交叉污染,每个样品应使用新的一次性塑料袋或塑料管和内置标签。

不同的样品采集和保存方法对不同的检测方法的适用性有差异,并且可能应增加一些辅助的样品处理手段,因此在样品采集和运输时要注明曾使用过的保存条件,使实验室能根据其保存条件进行相应处理。

B.2.3.2 不同类型样品的采集和运输

B.2.3.2.1 活标本:活标本可在现场处理或以活体形式运输到诊断实验室。

B.2.3.2.2 血淋巴:许多分子生物学或免疫学检测的首选样品是血淋巴,样品可用注射器从心脏、腹部血窦采集,或切断附肢采集。

B.2.3.2.3 冷藏标本:应经 24 h 以内运输到实验室进行分子生物学或免疫学检测的样品可采用这种方法保藏。运输前,应将各样品独立装袋,用足量的冰将样品塑料袋埋入泡沫塑料箱中,进行合适的包装后运输到实验室。

B.2.3.2.4 深冻标本:采集活标本,用干冰或用低于 -20 °C 的冰柜速冻,将标签放入独立的样品包装袋,用足量的干冰将样品包装袋埋入泡沫塑料箱中,进行合适的包装后可满足较苛刻的运输要求。

B.2.3.2.5 乙醇保存的样品:对于难以用冷藏或冷冻方法存放和运输样品的情况,可用 90%~95% 的乙醇来保存和运送某些类型的样品。小于 2 g~3 g 的个体、解剖出的组织或抽取的血淋巴可保存于 90%~95% 的乙醇中,做好相应标签,运输前 1 h,将保存的标本转移到 50% 的乙醇中,然后按 B.2.2.5 的方法进行包装和运输。

B.2.3.2.6 特殊采样液保存的样品:一些特定的分子生物学或免疫学检测方法或试剂盒提供了样品的采集、保存和运输用试剂,可为样品的保存、运输和后续的检测操作提供便利。如 SEMP-SSC 采样液可用于斑点杂交检测的核酸样品的保存和运输、SEMP-Tris 采样液可用于 PCR 和核酸探针检测的核酸样品保存和运输,TrizolTM 1) 可用于 RT-PCR 样品的保存和运输等。但要注意,不同的采样液保存的样品通常只适用于该试剂指定的检测方法,而并不一定适于进行其他的诊断。

1) 这是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对这一产品的认可。

前 言

GB/T 28630《白斑综合征(WSD)诊断规程》分为五个部分:

——第 1 部分:核酸探针斑点杂交检测法;

——第 2 部分:套式 PCR 检测法;

——第 3 部分:原位杂交检测法;

——第 4 部分:组织病理学诊断法;

——第 5 部分:新鲜组织的 T-E 染色法。

本部分为 GB/T 28630 的第 4 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 156)归口。

本部分起草单位:中国水产科学研究院黄海水产研究所、农业部全国水产技术推广总站。

本部分主要起草人:黄健、杨冰、陈爱平、宋晓玲、史成银、杨丛海、魏琦、刘莉。

表 B.1 (续)

群体大小	各假定检出率的采样数量						
	2%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
2 000	145	60	27	10	9	9	8
4 000	145	60	27	10	9	9	8
10 000	145	60	27	10	9	9	8
≥100 000	150	60	30	10	9	9	8

注：表格中的采样数量是指实际被有效分析的样品数，如果所采集到的样品不一定每份都能分析到，则应采集更多样品。例：对于 100 000 尾仔虾的群体来说，在 60 尾样品中查出 3 尾阳性，则该群体存在 5% 病原检出率的结果具有 95% 的可信度。

对不同病原的监测，还应注意最适于采样的生活期有差异。例如，要监测对虾杆状病毒病、斑节对虾杆状病毒病或杆状病毒的中肠腺坏死，最佳采样期是幼体和早期仔虾；要监测涛拉病、白斑综合征和黄头病，最佳采样期是幼虾和亚成年虾；要监测螯虾瘟，最佳采样期是幼螯虾和成年螯虾。

B.2 不同诊断方法所需样品的采集要求

B.2.1 直接显微镜检查或组织印片/涂片染色检查的样品

用于直接镜检的样品应在采集后立即处理，起码要求能做到制备好风干的组织印片或涂片。

待检样品尽可能使用活标本，如果得不到活标本，至少也应使用冰鲜或用缓冲的 10% 甲醛 (37%) 固定的标本。

B.2.2 组织学诊断的样品

B.2.2.1 采样时样品要求

采样时，应尽量减轻对动物造成的胁迫，固定前需要运输或临时暂养时要保证水中有充足的含氧量。

B.2.2.2 固定液要求

准备好充足的固定液，一般原则是一体积的组织样品最少应十倍体积的固定液（例如，10 g 对虾组织应要 100 mL 固定液）。

大多数组织学诊断都可使用戴维森氏 AFA 固定液（见附录 A）。该固定液可快速渗透，能有效阻止甲壳类的组织自溶，且其酸性可使甲壳脱钙。

如果样品要准备进行免疫组织化学分析或进行 RNA 病毒的原位杂交诊断，可采用非酸性的 R-F 固定液（见附录 A）。但 R-F 固定液不应该用于常规组织学样品的固定，因为它对组织的渗透较慢，且不能使甲壳脱钙，用它固定的组织可能会导致切片和染色困难。

B.2.2.3 不同样品的固定方法

幼体和仔虾：用细筛绢或吸管选取标本。将采集的个体直接浸入 10 倍体积的固定液中，固定 12 h~24 h，然后转移到 70% 乙醇中长期保存。

大的仔虾和小的幼虾：按上述方法选取并采集标本。用注射针尖或解剖刀尖划破甲壳，将采集的个

白斑综合征(WSD)诊断规程 第 4 部分：组织病理学诊断法

1 范围

GB/T 28630 的本部分规定了白斑综合征组织病理学诊断法所需试剂与材料、仪器设备、操作步骤和结果判定。

本部分适用于对发病的对虾或其他敏感宿主的确诊和对怀疑染病宿主的诊断。

本部分不适用于对潜伏性感染或病毒的非感染性携带的标本进行病毒检测。

2 原理

2.1 白斑综合征的病原和病理学特征

白斑综合征 (white spot syndrome) 又称白斑病 (white spot disease)、白斑综合症、对虾暴发性流行病。白斑综合征具有发病急和死亡率高的特征，其症状是发病对虾停止摄食，反应迟钝，或卧于池边或在水面浮游，某些濒死对虾在甲壳上出现白色的斑块，有时伴随对虾腹节微微变红。

白斑综合征的病原是白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 或称白斑病毒 (white spot virus, WSV)，它是一种双链 DNA (dsDNA) 病毒，能对大多数养殖对虾造成有致命的感染。病毒粒子为长椭圆形，具有囊膜和独特的尾状物，直径 120 nm~150 nm，长 270 nm~290 nm，其基因组大小约 300 kb。病毒在细胞核内复制，不形成封闭体 (occlusion body)。

濒死虾在全身外胚层和中胚层起源的组织中呈现出病灶，病毒主要感染的组织包括甲壳下上皮（包括体表和附肢的甲壳下表皮、胃上皮和后肠上皮）、造血组织、鳃、结缔组织、触角腺、血细胞和淋巴器官等。感染早期在核内形成的包涵体 (inclusion) 呈嗜酸性，随着病毒的快速复制，造成核内染色质边移，细胞核肥大，包涵体的嗜碱性也越来越强。

2.2 技术原理

苏木精-伊红 (H-E) 染色在组织学和病理学中是一种常规染色方法。通过染色液——苏木精-伊红与组织细胞的不同组分分别相结合，使细胞核、细胞质和细胞内其他结构产生反差明显的蓝紫色和红色，而可清晰地观察到各种不同的组织结构病理变化。

3 试剂和材料

3.1 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。

3.2 石蜡 (熔点 52 °C~54 °C)：切片级。

3.3 二甲苯。

3.4 无水乙醇。

3.5 95% 乙醇。

3.6 过滤海水：盐度为 20~30 的海水在室内放置 1 周后，经滤纸和 0.22 μm 滤膜过滤。

3.7 戴维森氏 AFA (Davidson's AFA) 固定液：见附录 A 的规定。