

《传染性胰脏坏死病诊断方法》

征求意见稿编制说明

一、工作简况（包括任务来源、制定背景、起草过程等）

（一）任务来源

根据国家标准计划项目信息：2024年1月2日，传染性胰脏坏死病诊断方法（计划号：20233360-T-326）修订工作正式启动，归口单位为全国水产标准化技术委员会，主管部门为农业农村部，项目周期16个月，2024年12月27日前完成组织起草，2025年4月28日前完成报批。

本标准是修订原国标《GB/T 15085.1-2008 鱼类检疫方法 第1部分：传染性胰脏坏死病毒（IPNV）》，由全国水产技术推广总站、北京市水产技术推广站申请修订。修订后的标准名称为：传染性胰脏坏死病诊断方法GB/T 15085.1-202X。起草单位为：全国水产技术推广总站、北京市水产技术推广站、中国水产科学院黑龙江水产研究所。依据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》中的要求进行编写。

（二）制定背景

1、传染性胰脏坏死病的危害性

传染性胰脏坏死病（Infectious pancreatic necrosis, IPN）是一种严重危害渔业生产，可造成鲑鳟养殖业重大经济损失的鱼类疫病。IPN最早发生在加拿大、美国，随着水产品贸易的增加，扩散至世界各地。在20世纪80年代传入我国，辽宁、山西、山东、甘肃等我国虹鳟产区均有IPN发生，造成流行区域虹鳟的大规模死亡，造成了严重经济损失。由于IPN严重危害性，在我国被列为三类动物疫病，国家水生动物疫病监测计划中规定的专项调查对象。

IPN主要感染虹鳟*Oncorhynchus mykiss*，由于毒株、宿主和环境因素的不同，可造成虹鳟10%~90%的死亡率，急性感染时累计死亡率可达100%。发病鱼体色发黑、眼突出、腹部膨大、皮肤和鳍条出血、肠内无食物且充满了黄色黏液，胃幽门部出血。组织病理变化为胰腺组织坏死，细胞坏死；黏膜上皮坏死；肠系膜，胰腺泡坏死，脂肪病变。大多数急性感染的鱼都出现上述病症。被感染了的成年鱼则没有病理解剖学上的变化。

该病呈急性流行，且发病后残存未死的鱼可数年以上直到终身带毒，依然能够传播病毒。目前，国内虹鳟苗种场阳性率较高，近5年来国内虹鳟场阳性检出率均在10%以上，且

分布地域较广（北京、河北、山西、山东、辽宁、吉林、黑龙江、甘肃、青海、云南等），目前及未来一段时间我国虹鳟养殖业，尤其是苗种产业会受到较大影响，全国范围内虹鳟苗种发生IPV风险较高。

2、IPN病原简介

IPN病原为传染性胰脏坏死病毒（Infectious pancreatic necrosis virus,IPNV），IPNV特点之一是非常稳定，对环境的抵抗力极强。在水中能存活一年以上，且有非常广泛的宿主。另一特点是对三个月以内的虹鳟鱼苗有极强的杀伤力，可达到较高的死亡率，由此可导致无法提供足够的虹鳟苗种。

IPNV属于双链RNA病毒科，水生双链RNA病毒属，病毒颗粒呈20面体，无囊膜，有92个壳粒。衣壳内有由2个片段组成的双股RNA基因，片段A编码一个多聚蛋白，包括VP2、VP3、VP4,并通过间隔的ORF编码一个非结构蛋白VP5。其中，VP2蛋白是IPNV的主要外衣壳蛋白，含有病毒的主要抗原决定簇，并含有病毒特异性中和抗原表位，常作为IPNV的诊断及疫苗研究的主要靶点。IPNV分离株含有10个血清型，包括A组血清型A1（West Buxton,WB）、A2（Spajarup,Sp）、A3（Abild,Ab）、A4（Hecht,He）、A5（Tellina,Te）、A6（Canada,C1）、A7（Canada2,C2）、A8（Canada3,C3）、A9（Jasper,Ja），B组血清型B1（Tellinavirus,TV-1），根据IPNV的多聚蛋白氨基酸序列，IPNV分为6个基因簇（Genogroup 1-6）。不同IPN病毒株对鳟鱼的毒力相差很大。国际上公认的强毒株是欧洲的sp株（即A2血清型或基因5型）和美洲的VR299株（即A9血清型或基因1型）。我国目前流行的IPNV基因型为5型和1型，其中5型对应的是A2血清型（即sp株），是强毒株；而1型对应2个血清型，一个是强毒株（VR299），1个是弱毒株（WB）。

3、修订国标的必要性

IPN诊断主要依赖于对IPNV的检测。现有的国家标准GB/T 15805.1-2008《鱼类检疫方法 第1部分：传染性胰脏坏死病毒（IPNV）》，采用CHSE、PG、RTG-2细胞分离病毒，病鱼组织接种细胞3~4天即出现明显的CPE（细胞破碎、崩解）；再用中和试验或ELISA方法进一步鉴定。2000年版世界动物卫生组织OIE发布的《水生动物疾病诊断手册》，关于IPN的诊断技术，也是采取细胞分离IPN病毒后，再采取中和试验或ELISA等免疫学技术鉴定。由于IPN在世界范围分布广泛，从2008年起将IPN诊断相关章节从OIE《水生动物疾病诊断手册》中移除。我国国标GB/T 15805.1-2008就是参考2000年版OIE手册相关章节编制而成。

由于较多水生动物疫病检测实验室不具备抗体制备技术，或不熟悉免疫学技术，且IPNV鉴定采用的中和试验、ELISA的检测方法，操作相对繁琐，耗时长，因此开展IPNV检

测时采用国标方法的实验室仅选择性采用细胞分离病毒部分，较少采用中和试验、ELISA等检测方法进行鉴定，而是选择分子生物学技术进行鉴定。

国内外已有多篇关于IPNV分子生物学检测方法的研究报道；起草单位关于IPNV分子生物学检测也开展了多年的研究工作，有较好的研究基础，研制的成果已经用于国家水生动物疫病监测工作中。针对目前国内各实验室对IPNV分子生物学检测技术的需求，本项目申请对原国标进行修订，标准中增加RT-PCR、RT-qPCR检测方法，并修订综合判定部分内容。既丰富IPNV的国标检测方法，也有利于各实验室便于使用该标准。以尽早确诊病原，切断病毒传播途径，指导养殖户及相关推广管理部门制定下一步防控措施，以达到降低我国鲢鳙鱼养殖产业经济损失的目的。

4、具有较好的标准制修订工作基础

本标准起草组成员在标准制修订方面具有较强的工作基础和丰富的工作经验。已主持或参与制定国标、水产行标、地标共30多项。包括：GB/T 25878-2010蛙病毒感染检疫技术规范，SC/T 7016.13-2019鱼类细胞系第13部分：鲫细胞系，SC/T 7229-2019鲤浮肿病诊断规程，SC/T 7221-2016蛙病毒检测方法，DB11/T 374—2021水生动物检疫检验实验室管理规范，DB11/T 376—2021养殖鱼类疫病防控技术规范等。

起草组成员包括3名以上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委员，能及时跟进和掌握相关标准制修订的前沿动态，把握标准内容中各参数的技术依据和应用信息，为标准的应用奠定了良好基础。

5、国标修订后的目标

规范传染性胰脏坏死病的诊断方法，保障传染性胰脏坏死病的流行病学调查、诊断、检疫和监测结果的准确性，为疫病监测、诊断、防控提供技术支撑。

修订后的内容力求实用、可靠；文字表达力求准确、规范、无歧异。

(三)起草过程

1、立项前的工作基础

准备阶段：标准修订的承担单位密切合作，开展了相关准备工作。认真查阅文献，收集国内外关于传染性胰脏坏死病的发病信息及检测方法等相关资料，并对资料进行分析、归纳和总结。

研究阶段：起草组先后承担了北京市渔业创新团队病毒病防控岗位、北京市农业农村局科技项目，研究建立了IPNV的RT-qPCR方法，并引用借鉴了中国水产科学院黑龙江水产

研究所研究建立的RT-PCR检测方法，收集大量疑似感染IPNV样品组织，利用RT-qPCR方法、RT-PCR方法进行鉴定和研究。

2、编制起草阶段

根据《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T1.1—2020），前期研究结果以及参考文献，制定了标准草案和编制说明。

申报修订国标阶段：申报修订项目。

制定征求意见稿和编制说明：组成起草工作小组，制定传染性胰脏坏死病诊断方法（GB/T 15085.1-202X）征求意见稿和完善编制说明。

到2024年4月完成了标准文本和编制说明。

3、第三方验证机构的实验验证

2024年4月，由起草组提供样品，分别由中国检验检疫科学研究院动物检疫研究所、大连海洋大学水产与生命学院、青海省渔业技术推广中心等3家单位实施该标准的实验验证工作。验证的主要内容包括：病毒分离、RT-qPCR方法、RT-PCR方法。4月底，三家验证单位将报告反馈至起草组。验证结果表明：本标准技术路线合理，操作流程清晰明确，结果易于判断；样品检测结果与预期结果一致，具有较高的特异性、灵敏度；可操作性强。

4、征求意见阶段

2024年5月，起草组面向全国 家单位 位专家进行征求意见，发出《征求意见稿》。共收到 家单位的 位专家的回复意见共 条。其中研究单位 ，出入境系统 ，高校系统， 检测单位 家。研究回复意见，采纳或部分采纳 条，无重大分歧意见。

（四）标准主要起草人及主要所做的工作

起草单位：全国水产技术推广总站、北京市水产技术推广站、中国水产科学院黑龙江水产研究所。

标准主要起草人见下表。

起草人	工作单位	研究方向	任务分工
徐立蒲	北京市水产技术推广站	鱼病诊断与防控研究	组织修订工作，编写标准和编制说明
张文	北京市水产技术推广站	分子生物学研究	RT-qPCR 检测方法建立及验证工作，编写标准和编制说明
冯东岳	全国水产技术推广总站	标准研究与管理	标准适用性评价

张翔	全国水产技术推广总站	标准研究与管理	标准适用性评价
吕晓楠	北京市水产技术推广站	快检技术研究	标准文本修订等
徐黎明	中国水产科学院黑龙江 水产研究所	鱼类病害防治技术研究	建立 RT-PCR 检测方法
卢彤岩	中国水产科学院黑龙江 水产研究所	鱼类病害防控技术研究	RT-PCR 检测方法的验证 及适应性评价
王静波	北京市水产技术推广站	鱼病诊断与防控研究	参与标准的起草研制等
王 姝	北京市水产技术推广站	病毒性疾病研究	标准方法的验证和适用性 评价等
曹 欢	北京市水产技术推广站	病害防控技术研究	标准技术规范的验证等
王小亮	北京市水产技术推广站	病害防控技术研究	检测条件优化及试验验证
王 澎	北京市水产技术推广站	病害防控技术研究	标准文本修订等

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据，修订前后技术内容的对比

(一)标准编制原则

标准修订严格按照国家标准《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T1.1—2020）^[1]的要求；编制说明按国家技术监督局“国家标准管理办法”第三章第十六条和《农业部国家（行业）标准的计划编制、制定和审查管理办法》第二章的基本要求而编写。在编写过程中，严格遵循一致性、协调性、易用性等原则；同时还遵照以下原则。

通用性强原则：本标准的修订主要是充分考虑方法成熟性、检测工作效率、试剂耗材获取的难易程度以及操作的难易程度，以适合各级疫病预防控制机构、检验检疫部门、高等院校和研究所相关专业技术人员的使用。标准中主要技术内容修订是增加了RT-qPCR方法、RT-PCR方法鉴定IPNV，以及其他相关内容。增加的RT-qPCR方法、RT-PCR方法，均为起草单位多年来的研究成果，并经过大量样品检验，且为国家水生动物疫病监测计划中IPN监测的指定方法。通过上述工作，已经充分验证了所使用的检测技术方法成熟，准确性高；且试剂耗材易获取，操作技术易掌握，实用性较高，通用性较强。

病原为主线原则：在修订中严格遵循以病原为主线，不论健康、患病鱼的IPN诊断的判定以病原为第一要素。

方便疫病监测工作使用原则：在IPN监测工作中，多数还是阴性结果，需要出具检测报告作为监测工作的支撑。但原标准中综合判定中没有阴性结果（病或病原）的判定，给疫病监测工作带来不便。本次修订，在综合判定部分给出阴性结果判定。

(二)主要内容及其确定依据

1、主要内容

标准内容包括：规范性引用文件、术语和定义、试剂和材料、仪器设备、临床症状、样品、病毒分离、中和试验、ELISA、RT-PCR检测、RT-qPCR检测、综合判定、附录。

检测流程：样品经病毒分离后，采用中和试验、ELISA、RT-PCR或RT-qPCR进行鉴定，判定结果。

2、确定依据

在标准修订过程中，保留了原标准病毒分离、中和试验、ELISA检测。新增加了两种检测技术（RT-PCR、RT-qPCR），均为起草组研制成果^[2-3]，已经过大量样品检验，并作为国家水生动物疫病监测计划IPN监测指定的方法。研究表明，两种方法的特异性、灵敏度满足开展IPN诊断、监测、检疫、流行病学调查使用。

(1) 新增加的临床症状和附录（IPN）部分

临床症状部分参照2000版OIE手册中IPN的相关描述^[4]，以及历年《传染性胰坏死病(IPN)状况分析》（来源：我国水生动物重要疫病状况分析）相关描述^[5-6]。

附录（IPN蛋白片段）来自病毒测序结果。

(2) 病毒分离

① 样品处理

采样按GB/T 18088的规定执行。采集鲑鳟鱼类，尤其是5月龄以内的虹鳟鱼苗。对体长 ≥ 6 cm的鱼，取肾、肝、脾、脑；体长4 cm~6 cm的鱼，取所有内脏；体长 ≤ 4 cm的鱼，取整条鱼；带卵黄囊的鱼去掉卵黄囊；成熟雌鱼还需取卵巢液。鱼卵则取卵壳。取样应加贴标签，标签上清楚标明样品编号、采样时间、采样地点。样品应活体送达实验室，立即取样检测。

在10℃以下环境下，先用组织研磨器将样品匀浆，匀浆后，再用含有抗菌素（1 000 IU/mL的青霉素和1 000 μ g/mL的链霉素）的细胞培养液，按1:10的最终稀释度悬浮。于15℃下孵育2 h~4 h或4℃下孵育过夜，7000 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。

② 病毒分离

用细胞培养液对 1:10 的组织匀浆上清液再 2 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分别接种到生长约 24 h 的 BF-2、RTG-2、CHSE 或者 PG 细胞单层中,每孔 (2 cm²) 的细胞单层接种 100 μL 稀释液,接种后细胞板置于 18 °C±2 °C 培养。同时设置阳性对照 (接种 IPNV 参考株细胞) 和空白对照 (未接种病毒的细胞)。

阳性对照和待测样品都接种细胞后,7 d 内每天用 40 倍~100 倍倒置显微镜检查。空白对照细胞应正常,阳性对照细胞应出现 CPE。如接种待测样品匀浆上清稀释液的细胞在培养中出现 CPE,应立即进行 IPNV 的鉴定。在培养 7 d 后如无 CPE 出现应进行盲传。盲传时,将接种了组织匀浆上清稀释液单层细胞培养物冻融 1 次,以 7 000 r/min,4 °C 离心 15 min,收集上清液,将上清液接种于 24 h 内新鲜培养的单层细胞中,培养 7 d,每天用 40 倍~100 倍倒置显微镜检查。盲传培养期间出现 CPE,应立即进行 IPNV 的鉴定。

如果阳性对照也未出现 CPE,则应换用敏感细胞和一批新的组织样品重新进行病毒分离。

此外,新增加分离病毒的细胞系 BF-2,原国标中分离 IPNV 的细胞系有 3 种,即 CHSE、RTG 和 PG。现新增加 BF-2 细胞系。在 2000 版 OIE 手册中,分离 IPNV 的细胞系就包括 BF-2;但在当年国标制定过程中,由于考虑到国内还没有 BF-2 细胞系,因此就没有包括 BF-2。现阶段国内已经有 BF-2 细胞系,因此依据 OIE 手册要求,在分离 IPNV 的细胞系中增加 BF-2,便于各实验室有更多的选择。

(3) 中和试验

参照 2000 版—2008 版 OIE 手册中有关 IPN 的中和试验检测方法。

① 试验准备

- ◆ 把 BF-2 (或 RTG-2、CHSE、PG 等) 细胞培养于 96 孔微量细胞培养板上。
- ◆ 病毒: 用 IPNV 参考株,传代后制成病毒悬液。
- ◆ 抗血清: 抗 IPNV 的参考血清,使用前于 56°C 灭活 60min。
- ◆ 待检样品 (病毒分离培养结果为阳性的细胞培养物); 冻融一次,除去细胞碎片后使用。

② 操作步骤

- ◆ 用细胞培养液稀释待检样品至 1: (10¹~10⁸), 每管体积为 0.5mL

- ◆ 取两排离心管,分别从上述各稀释度的待检样品中取出 0.2mL 于两排离心管中,然后第一排管加入 0.2mL 抗 IPNV 参考血清,第二排管加入 0.2mL 细胞培养液,充分混合均匀。
- ◆ 25°C温育 60min,
- ◆ 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 0.1mL。
- ◆ 将抗 IPNV 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 0.05mL,作为参考抗血清对照。
- ◆ 将 IPNV 参考病毒按照 1: (10¹~10⁸) 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 0.1mL,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。
- ◆ 各孔再加入细胞培养液 0.1mL。
- ◆ 放入 20°C培养箱中培养,逐日观察病变,按下表填写试验结果。

稀释度		样品类型											
		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 ⁻¹											1 : 8	细胞对照
B	10 ⁻²											1 : 8	
C	10 ⁻³											1 : 16	
D	10 ⁻⁴											1 : 16	
E	10 ⁻⁵											1 : 32	病毒对照
F	10 ⁻⁶											1 : 32	
G	10 ⁻⁷											1 : 64	
H	10 ⁻⁸											1 : 64	

此外,更改了中和试验结果判定,即当细胞接种了经特异的抗 IPNV 参考血清处理的悬液(即“待检样品+参考血清”)后,细胞的 CPE 被阻断或明显延迟产生,而其它未经特异的抗 IPNV 参考血清处理的悬液(即“待检样品+细胞培养液”)有明显的 CPE,则判定中和试验检测结果阳性,否则为阴性。原国标中中和试验判定部分较为复杂,且难理解和执行,修改后的判定方法比较实用。

(4) ELISA

参照 2000 版—2008 版 OIE 手册中有关 IPN 的 ELISA 检测方法。

①包被羊抗 IPNV 抗体

将羊抗 IPNV 的 IgG 用包被稀释液稀释成工作浓度后包被酶标板，每孔 0.1ml。4℃孵育 12h~24h 或者 37℃反应 1.5h~2h。倒出孔内液体。

②洗涤

将 PBST 加满小孔，2min 后倒出，拍干。如此重复 3 次

③加入待测样品

待检样品为用细胞培养液按 1:10 的比例稀释的组织研磨上清液或接种了组织研磨上清液的细胞培养悬液，每个待检样品两孔，每孔 0.1 mL。另将 IPNV 参考株或接种 IPNV 参考株且出现典型 CPE 的细胞悬液（阳性对照）、不含 IPNV 的组织研磨上清液或未接种 IPNV 的细胞碎片（阴性对照）和 PBST（空白对照）也各加两孔。37℃反应 1.5h~2h。倒出孔内液体。用 PBST 洗 3 次。

④加入兔抗 IPNV 血清

每孔加 0.1mL 稀释到工作浓度的兔抗 IPNV 参考血清（用细胞培养液稀释）。37℃反应 1.5h~2h。倒出孔内液体。用 PBST 洗两次。

⑤消除非特异性过氧化物酶

每孔加 0.1mL0.1%的 H₂O₂（用双蒸水稀释）。37℃反应 15min 以除掉非特异性的过氧化物酶。倒出孔内液体。用 PBST 洗两次。

⑥加入酶标羊抗兔 IgG 结合物（酶标二抗）

每孔加入 0.1mL 稀释到工作浓度的酶标羊抗兔 IgG（用细胞培养液稀释）。37℃反应 1.5h~2h。倒出孔内液体。用 PBST 洗 3 次。

⑦加底物 OPD 溶液

每孔加入 0.1mL OPD 溶液。室温下避光反应显色约 10min。

⑧加终止液

当阳性对照出现明显棕黄色，阴性对照无色时，立即每孔加入 0.2mL 浓度为 2mol/L 硫酸终止反应。

⑨结果计算和判定

阳性对照孔的 A₄₅₀ 值（P）与阴性对照孔的 A₄₅₀ 值（N）之比大于等于 2.1（即 $P/N \geq 2.1$ ），则检测有效。

当待测样品孔的 A₄₅₀ 值（P）与阴性对照孔的 A₄₅₀ 值（N）之比大于等于 2.1（即 $P/N \geq 2.1$ ），判定 ELISA 检测结果阳性，否则为阴性。

（5）RT-PCR 检测

①RNA提取

采用CTAB抽提核酸，或采用等效的商品化RNA提取试剂盒。这两种方法均为检测实验室常用方法，参照标准流程或试剂盒说明书即可。

②cDNA合成

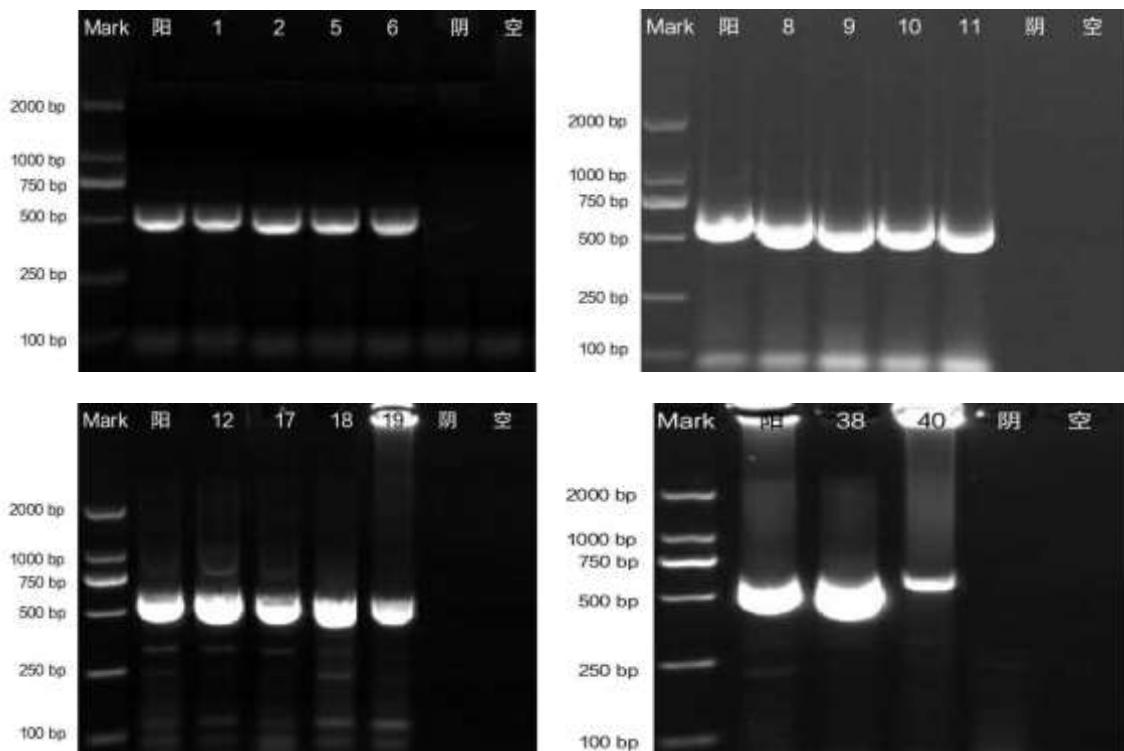
采用反向引物、逆转录酶、dNTP等试剂合成，或采用等效的商品化cDNA合成试剂盒，或采用等效的商品化一步法RT-PCR试剂盒，省略cDNA合成步骤。以上方法均为检测实验室常用方法，参照标准流程或试剂盒说明书即可。

③引物序列及退火温度确定

采用2篇文献建立的IPNV RT-PCR检测方法中引物序列及退火温度^[3,7]。

④临床样品验证

回顾性检测实验室保藏的虹鳟鱼组织样品，包括2017年（36份）、2018年（88份）、2019年（15份）、2020年（5份），共144份样品，对阳性扩增产物进行测序，获得25个序列信息，电泳结果见图1，比对结果见图2（以1#样品为例）。通过构建系统进化树进行分析，见图3。



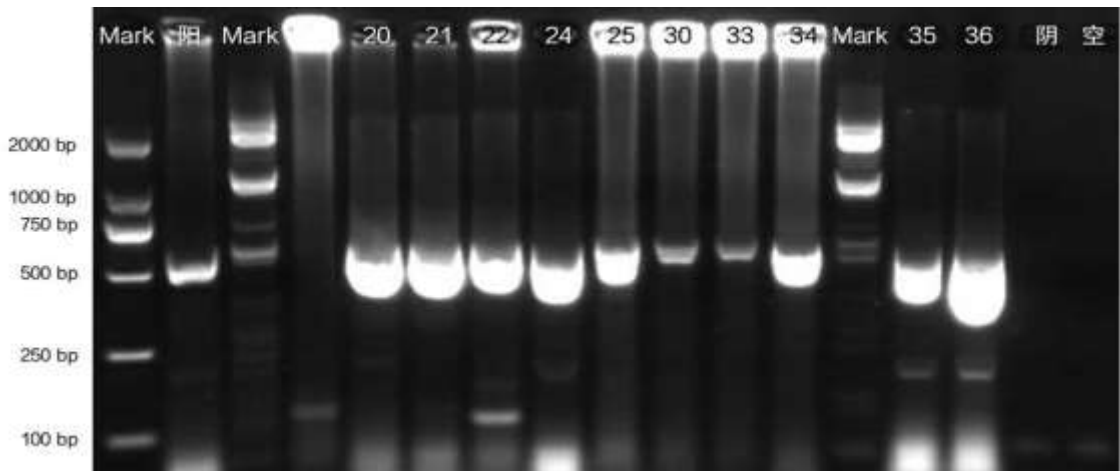


图1 电泳结果

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy	Select columns	Show	100	
Sequences producing significant alignments				Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>		1038	1038	100%	0.0	100.00%	1536	MW662108.1
		1033	1033	100%	0.0	99.82%	1536	MG543570.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate R/2020-1 VP2 protein gene, partial cds	1033	1033	100%	0.0	99.82%	1539	MW662092.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/PN/159/Mar97 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1027	1027	100%	0.0	99.64%	1536	MG543631.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate G52025-2 VP2 protein gene, partial cds	1027	1027	100%	0.0	99.64%	1536	MG543599.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VD/873/Dec12 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1027	1027	100%	0.0	99.64%	1536	MG543586.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/TN/294/Oct11 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1027	1027	100%	0.0	99.64%	1536	MG543578.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/TN/79/Mar11 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1027	1027	100%	0.0	99.64%	1536	MG543569.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VR/27/Jan11 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1027	1027	100%	0.0	99.64%	1536	MG543569.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/PN/410/Jun90 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1024	1024	100%	0.0	99.47%	1536	MG543581.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/TN/43/Jan11 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543641.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VD/311/Mar17 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543636.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/TN/487/May16 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543635.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VI/100/Mar10 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543623.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VD/154/Nov12 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543621.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VD/153/Nov12 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543621.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VD/148a/Nov12 VP2 precursor (pVP2) gene, na...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543620.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/TN/57/Feb15 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543618.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/TV/206/May13 VP2 precursor (pVP2) gene, parti...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543611.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Infectious pancreatic necrosis virus isolate IPNV/D.mykisu/0/VI/78/Sep13 VP2 precursor (pVP2) gene, partial...	1022	1022	100%	0.0	99.47%	1536	MG543609.1

图2 比对结果

结果表明，2017年—2020年，在甘肃检出Genogroup 5和Genogroup 1；辽宁检出Genogroup 1；北京检出Genogroup 5和Genogroup 1。结合参考文献，自1986年至今，我国山西、辽宁、山东、甘肃、北京等地，主要检出的基因型为Genogroup 1和Genogroup 5。

通过对144份样品25份阳性样品进行检测及序列分析，结果表明，当扩增产物经电泳有明显目的条带，经测序所获得的序列与参考序列同源性均可达到99%~100%。考虑到实验室间检测技术差异，明确当待测样品有明显目的条带，经测序结果与参考序列一致性>98%时，可判为RT-PCR检测核酸阳性。

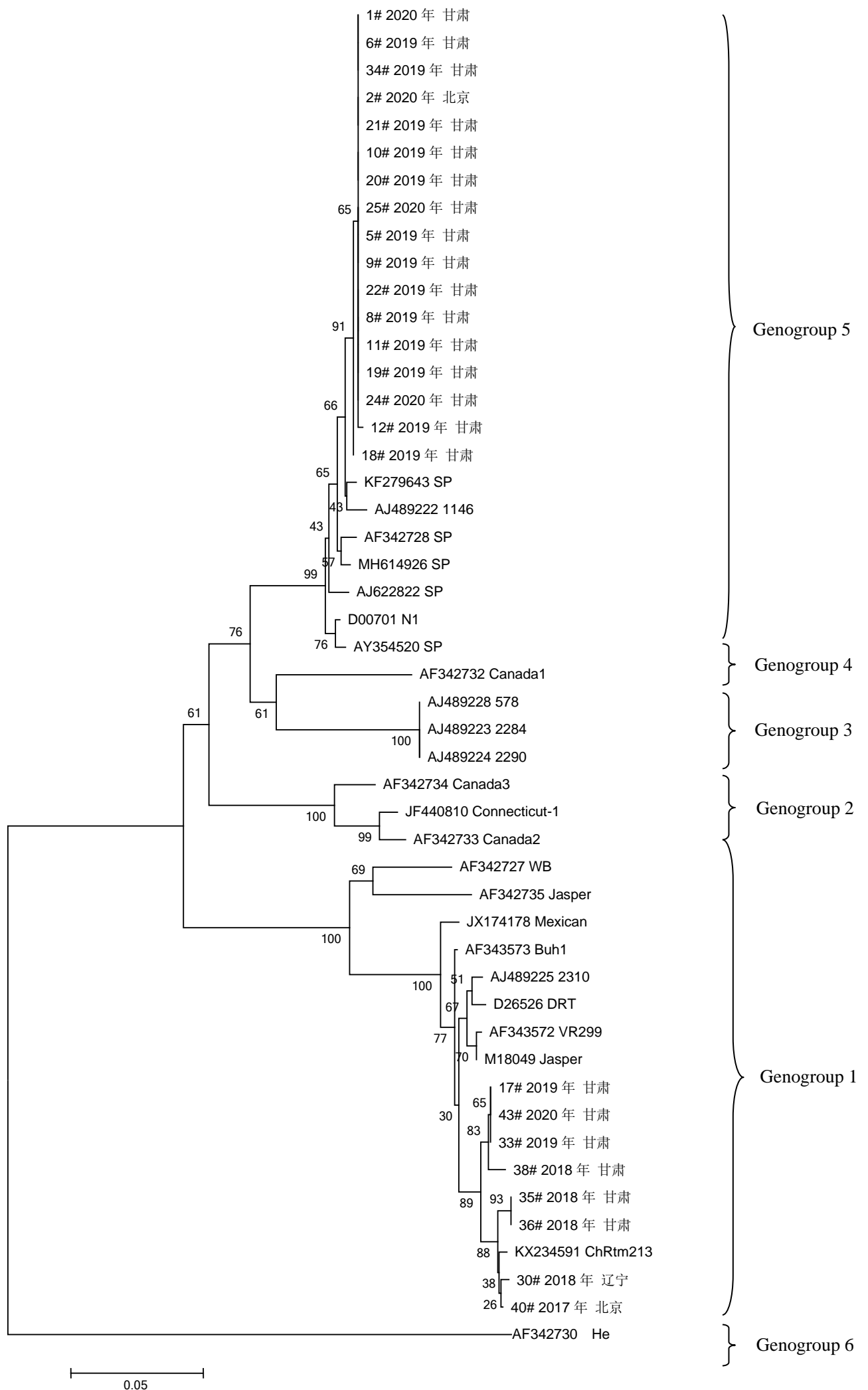


图 3 系统进化树分析

(6) RT-qPCR 检测

①RNA提取

采用CTAB抽提核酸，或采用等效的商品化RNA提取试剂盒。这两种方法均为检测实验室常用方法，参照标准流程或试剂盒说明书。

②cDNA合成

采用反向引物、逆转录酶、dNTP等试剂合成，或采用等效的商品化cDNA合成试剂盒，或采用等效的商品化一步法RT-PCR试剂盒，省略cDNA合成步骤。以上方法均为检测实验室常用方法，参照标准流程或试剂盒说明书。

③引物及探针序列确定

IPNV分为6个基因簇（Genogroup 1-6），将GenBank上公布的6种基因簇126个代表株的VP2序列输入DNAMAN软件进行同源性比对分析，确定目标区域，作为引物和TaqMan探针序列设计的主要靶点，部分代表序列信息见表1。

表 1 病毒分离株信息

序号	基因型	毒株	GenBank 登录号	国家或地区
1	1	2310	AJ489225	northwestern Spain
2	1	Chrtm213	KX234591	China
3	1	VR299	AF343572	USA
4	1	Buhl	AF343573	USA
5	1	DRT	D26526	Korea
6	1	Mexican	JX174178	Mexico
7	1	West Buxton	AF342727	USA
8	1	Jasper	AF342735	USA
9	2	Connecticut-1	JF440810	USA
10	2	Canada 2	AF342733	Canada
11	2	Canada 3	AF342734	Canada
12	3	2284	AJ489223	northwestern Spain
13	3	2290	AJ489224	northwestern Spain
14	3	578	AJ489228	northwestern Spain
15	4	Canada 1	AF342732	Canada
16	5	Sp	AF342728	USA
17	5	Sp	MH614926	Turkey
18	5	SP	KF279643	Iran
19	5	SP	AJ622822	FRANCE

20	5	Sp	AY354520	USA
21	6	He	AF342730	USA

采用 Primer Premier 6.0 设计引物及 TaqMan 探针序列，代表序列信息见表 2，探针 5' 端由 FAM 标记，3' 端由 BHQ1 标记。引物探针序列由北京六合华大基因科技有限公司合成。提取实验室鉴定保藏的 IPNV 阳性样品，反转录合成 cDNA 作为模板，对 7 组引物探针序列进行评估，确定最佳引物探针组合。

表 2 引物和 TaqMan 探针序列

序号	引物	序列(5'→3')	大小(bp)
1	F1	GGCAACCGCAACTTACTT	18
	R1	TATGAYGAGGTCTCTTGT	18
	Probe1	ATCCATTATGCTTCC	15
2	F2	ATACGTCCGCCTWGAGGA	18
	R2	GGATGGGAGGTCGATYTC	18
	Probe2	GATGAGGTGCACAGCTGC	18
3	F3	ATACGTCCGCCTDGAGGA	18
	R3	GGATGGGAGGTCGATYTC	18
	Probe3	GATGAGGTGCACAGCTGC	18
4	F4	CGTCATATAACYTAGAGGTMTTC	22
	R4	CCGTCTGGTTCTSATTCC	18
	Probe4	GAATCAGGAAGTGG	14
5	F5	GYCTYA ACTATGCCAAGATG	20
	R5	TGTATTCTCAGTCCTCCA	19
	Probe5	ATCCTGTCCCACAG	14
6	F6	AAGAACGACCTCACMGAYC	19
	R6	TKGGCTTCTCTGGTGYT	18
	Probe6	ACATGTACGAGTGGTC	16
7	F7	CRACCGACATGRACAARA	18
	R7	ACTGCTTSGTAGAAATCST	19
	Probe7	CTAGCCAACAGTG	13

按照商品化荧光 PCR 试剂盒推荐反应体系和反应程序，以 IPNV 阳性样品 cDNA 为模板进行荧光扩增，筛选最佳引物探针序列。结果显示，第 3 组引物探针所获得的 Ct 值最小，与另外 6 组相比，扩增曲线更早出现向上的趋势，见图 4。因此，确定第 3 组引物探针进行反应条件的优化。

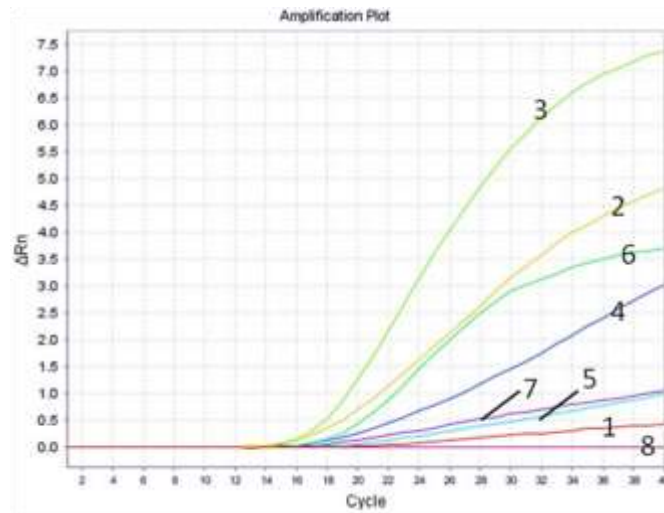


图 4 引物和探针筛选结果
注：1~7.传染性胰脏坏死病毒；8.空白对照

同时，将引物探针序列与 GENBANK 数据库中 62 个 IPNV 代表序列进行比对，序列信息见 3。比对结果见图 5（上游引物与 IPNV 代表序列比对结果）、图 6（探针与 IPNV 代表序列比对结果）、图 7（下游引物的反向互补序列与 IPNV 代表序列比对结果），未发现有个别碱基与 62 个代表序列不一致的情况。

表 3 IPNV 代表序列信息

序号	序列编号	序号	序列编号
1	AJ489225	32	EF493156
2	KX234591	33	HQ833317
3	AF343572	34	HQ833318
4	M18049	35	HQ833319
5	AF343573	36	HQ833320
6	D26526	37	KU609570
7	JX174178	38	KU609572
8	AF343570	39	KU609574
9	AY283780	40	KU609577
10	KU609593	41	KU609578
11	MH010544	42	KU609579
12	AF342728	43	KU609580
13	MH614926	44	KU609581
14	KF279643	45	KU609584
15	AJ489222	46	KU609585
16	AJ622822	47	KU609587
17	D00701	48	KU609590
18	AY354520	49	KU609592
19	AY354519	50	KX523802
20	AY374435	51	KX523805
21	AJ489229	52	KY548511
22	AY379735	53	KY548514
23	AY379736	54	KY548515
24	AY379737	55	MH614927
25	AY379738	56	MH614928
26	AY379740	57	MH614929
27	AY379742	58	MH614930

28	AY379744	59	MH614931
29	AY823632	60	MH614932
30	DQ536090	61	U48225
31	DQ536091	62	U56907

序列网址: [Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/nucleotide/)

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/558002106054007007>