



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7248.2—2025

斜管虫病诊断方法 第2部分：鱼斜管虫病

Diagnostic methods for chilodonelliasis—
Part 2: Disease caused by parasitic ciliate *Chilodonella piscicola*

2025-04-27 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。

本文件为 SC/T 7248《斜管虫病诊断方法》的第 2 部分。SC/T 7248 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：十六线斜管虫病；
- 第 2 部分：鱼斜管虫病。

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：中国科学院水生生物研究所、全国水产技术推广总站、西华师范大学、水利部中国科学院水工程生态研究所。

本文件主要起草人：李明、王桂堂、李文祥、张翔、梁艳、邹红、步夏莲、曾燊、王崇。



引 言

斜管虫病是淡水养殖中危害最严重的寄生虫病之一；可导致养殖鱼类在短期内大批死亡，造成巨大的经济损失。SC/T 7248《斜管虫病诊断方法》旨在建立一套准确、快速、易于操作的斜管虫病诊断方法。斜管虫病主要有3种病原：十六线斜管虫、鱼斜管虫和钩刺斜管虫。由于这3种病原的生物学特征、易感宿主、流行特点存在差异，因此斜管虫病诊断方法标准拟由3个部分构成。

- 第1部分：十六线斜管虫病。目的在于确定进行十六线斜管虫病诊断的技术要求、诊断结果的判定方法。
- 第2部分：鱼斜管虫病。目的在于确定进行鱼斜管虫病诊断的技术要求、诊断结果的判定方法。
- 第3部分：钩刺斜管虫病。目的在于确定进行钩刺斜管虫病诊断的技术要求、诊断结果的判定方法。

SC/T 7248《斜管虫病诊断方法》通过3个部分明确了十六线斜管虫病、鱼斜管虫病和钩刺斜管虫病的诊断方法。通过确定试验设备、试验方法和试验结果的处理，让检测人员能够更加清晰、准确地进行操作，有效提升检测人员对斜管虫病的诊断能力，指导斜管虫病的准确诊断以及鱼种放养前的检验检疫，并及时采取有效的防控手段，控制该寄生虫病的发生，减少水产养殖的经济损失。对于斜管虫病的流行病学调查、诊断、检疫和监测具有重要意义，为水产养殖业的产业升级提供技术支撑。

斜管虫病诊断方法

第2部分：鱼斜管虫病

1 范围

本文件描述了鱼斜管虫病诊断的试剂和材料、仪器设备、临床症状、样品，以及形态学鉴定、PCR 检测和综合判定的方法。

本文件适用于鱼斜管虫病的流行病学调查、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 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

寄生虫 parasite

寄生于水生动物的动物，包括原虫、蠕虫和甲壳类等。

[来源：SC/T 7011.1—2021, 3.2.4.2]

3.2

寄生虫病 parasitosis

寄生虫侵入水生动物而引起的疾病。

[来源：SC/T 7011.1—2021, 3.2.4.3]

3.3

鱼斜管虫 *Chilodonella piscicola*

引起鱼类鱼斜管虫病的病原。

3.4

斜管虫病 chilodonelliasis

由斜管虫侵入鱼体而引起的寄生虫病。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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)

TAE：Tris-Acetate-EDTA 缓冲溶液

Taq：水生嗜热菌(*Thermus aquaticus*)

TE：Tris 盐酸和 EDTA 缓冲溶液(EDTA Tris · HCl)

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 中规定的一级水。
- 5.2 无水乙醇:分析纯。
- 5.3 异丙醇:分析纯。
- 5.4 *Taq* DNA 聚合酶:—20 ℃保存,避免反复冻融。
- 5.5 dNTPs(10 mmol/L):含 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 10 mmol/L。
- 5.6 矿物油。
- 5.7 1%硝酸银溶液:按附录 A 中 A.1 的要求配制。
- 5.8 裂解缓冲液:按 A.2 的要求配制。
- 5.9 50×TAE 电泳缓冲液:按 A.3 的要求配制。
- 5.10 1×TAE 电泳缓冲液:按 A.4 的要求配制。
- 5.11 DNA 抽提缓冲液 1:按 A.5 的要求配制。
- 5.12 DNA 抽提缓冲液 2:按 A.6 的要求配制。
- 5.13 5 mol/LNaCl 溶液:按 A.7 的要求配制。
- 5.14 TE 缓冲液:按 A.8 的要求配制。
- 5.15 1%琼脂糖凝胶:按 A.9 的要求配制。
- 5.16 上游引物:5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3';
下游引物:5'-TGATCCTTCTGCAGGTTTCACCTAC-3'。
- 5.17 DNA marker。
- 5.18 核酸染料。
- 5.19 阳性对照:鱼斜管虫 DNA 模板,—20 ℃保存。
- 5.20 阴性对照:无斜管虫 DNA 模板,—20 ℃保存。
- 5.21 吸管。
- 5.22 盖玻片。
- 5.23 载玻片。
- 5.24 培养皿。
- 5.25 离心管。

6 仪器设备

- 6.1 体式显微镜。
- 6.2 普通光学显微镜。
- 6.3 天平:感量 0.001 g。
- 6.4 紫外灯。
- 6.5 水浴锅或金属浴。
- 6.6 高速冷冻离心机:4 ℃转速 12 000 *g* 以上。
- 6.7 普通冰箱:具 4 ℃冷藏室和—20 ℃冷冻室。
- 6.8 微量移液器。
- 6.9 PCR 扩增仪。
- 6.10 水平电泳系统。

6.11 凝胶成像系统。

7 临床症状

少量感染斜管虫的鱼体症状不明显。大量感染时,病鱼体瘦发黑、厌食,身体无法保持平衡、漂浮水面或聚集在水体下风口;患病鱼体表常分泌大量黏液,皮肤溃烂,鱼鳃缺损坏死。

8 样品

8.1 采样对象

优先采集具有典型临床症状的鱼。

8.2 采样数量

每一采样批次取 10 尾~20 尾。采样数量应符合 SC/T 7103 中的规定。

8.3 采样部位

鱼苗取整条鱼;鱼种或成鱼取鳃丝、鳍条,刮取体表黏液。

8.4 样品运输

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。样品运输应符合 SC/T 7103 中的规定。

8.5 样品固定与保存

在体视显微镜下(放大 40 倍)用吸管吸取虫体,部分样品制作水浸片,普通光学显微镜检查。部分样品置于培养皿中,用水清洗后移至洁净的载玻片上,尽量吸去水分并在空气中干燥,制成干片,用于硝酸银染色和后续形态学参数测量。用于 PCR 检测的虫体样品用水清洗干净后可直接加入无水乙醇固定,4℃保存备用。

9 形态学鉴定

9.1 水浸片观察

吸取虫体置于载玻片上,轻轻盖上盖玻片,置于普通光学显微镜下进行活体观察。

9.2 硝酸银染色与形态学参数测量

用 1%硝酸银溶液(5.7)覆盖虫体干片样品,置于黑暗处染色 1 min。用水清洗后,自然晾干;置于紫外灯下照射 10 s~20 s 显影。将染色样本置于显微镜下,测量虫体体长、体宽、左右体动基列数目等形态学数据。

9.3 形态学特征

鱼斜管虫的形态特征见附录 B 中的图 B.1 和图 B.2。

活体形态:呈椭圆形壳状,腹侧扁平,背侧拱形,前部略向左侧突出;游动方式为自转或水平翻动。

虫体大小:长 30 μm ~80 μm ,宽 20 μm ~40 μm 。

腹面体动基列:分左右两组,左侧体动基列 9 列~15 列,右侧体动基列 8 列~13 列。最左侧的动基列明显短于其他动基列。

胞核:大核呈椭圆形,位于虫体中部。

胞口:位于腹面前端,外有内外两圈围口动基列交错环绕。外侧的围口动基列明显长于内侧的围口动基列。口前动基列始于胞口右上方,向左一直延伸至左、右体动基列的交界处。

胞咽:由 9 个~10 个刺杆组成。

其他特征:背端动基列片段呈线性,由 16 个~19 个动基体组成。

9.4 结果判定

如果虫体的形态学特征符合 9.3 的描述,判定形态学鉴定结果为阳性。

10 PCR 检测

10.1 DNA 的提取

10.1.1 样品裂解

将无水乙醇固定保存的虫体充分干燥去除乙醇,置于 1.5 mL 离心管中,加入 180 μ L 裂解缓冲液(5.8),置于水浴锅(6.5)中 55 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。

10.1.2 DNA 抽提

加入等体积的 DNA 抽提缓冲液 1(5.11),冰上摇匀,静置 10 min;高速冷冻离心机(6.6)3 500 g ,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液。加入 700 μ L DNA 抽提缓冲液 2(5.12),冰上摇匀,静置 10 min;3 500 g ,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液。

10.1.3 DNA 沉淀与保存

加入 1/3 上清液体积的 5 mol/L NaCl(5.13),再加入等体积的异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min(可过夜),12 000 g 离心 15 min,弃上清液;70%乙醇洗涤沉淀 2 次,弃上清液,空气干燥后溶于 40 μ L TE 缓冲液(5.14),-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

10.1.4 其他提取方法

可采用同等抽提效果的其他方法或使用商品化 DNA 提取试剂盒。

10.2 18S rDNA 的 PCR 扩增

10.2.1 反应体系

25 μ L 扩增反应体系包括:2 μ L 模板基因组 DNA(10 ng~50 ng)、上游引物和下游引物(5.16)(10 μ mol/L)各 1 μ L、2 μ L dNTPs(0.2 mmol/L)、2.5 μ L MgCl₂(2 mmol/L)、0.5 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5.4)(5 U/ μ L)、2.5 μ L *Taq* DNA 聚合酶缓冲液,最后用灭菌水定容至 25 μ L。无加热盖的 PCR 仪应滴加少许矿物油。

10.2.2 反应条件

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、56 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保温。

10.2.3 对照设置

PCR 扩增时,应设置阳性对照和阴性对照。

10.3 PCR 产物电泳与测序

取 5 μ L PCR 产物,用 1% 琼脂糖凝胶(5.15)[含终浓度 0.05 μ L/mL 核酸染料(5.18)]于 1 $\times$ TAE 缓冲溶液中电泳分离,5 V/cm 电压下电泳约 0.5 h。同时设置 DNA marker(5.17)作为参照,凝胶成像系统(6.11)检查并拍照记录。如果观察到大约 1 700 bp 大小扩增片段,则对 PCR 扩增产物进行测序。

10.4 结果判定

PCR 扩增阳性对照在 1 700 bp 附近有特异性目的条带,同时阴性对照无上述特异性目的条带,检测有效;否则,检测无效。将检测样品所测定的 18S rDNA 序列分别与附录 C 中的序列进行比对分析,当相似性在 99.5%及以上者,判定 PCR 检测结果为阳性。

11 综合判定

11.1 鱼斜管虫病的疑似判定

如果鱼体临床症状符合第 7 章的描述,则判定为疑似病例。

11.2 鱼斜管虫病的确诊判定

如果鱼体疑似患斜管虫病,且符合以下任何一项,则判定为确诊病例:

- a) 形态学鉴定结果为阳性;
- b) PCR 检测结果为阳性。

附 录 A
(规范性)
试剂及其配制

A.1 1%硝酸银溶液

100 mL 水加入 1 g 硝酸银,溶解后置于棕色瓶中,4℃避光保存。

A.2 裂解缓冲液

900 μL TE 缓冲液、80 μL 蛋白酶 K(5 mg/mL)和 20 μL 10% SDS 的混合溶液,室温保存。

A.3 50 × TAE 电泳缓冲液

242.0 g Tris 碱、37.2 g Na₂EDTA·2H₂O 混合,然后加入 800 mL 去离子水充分搅拌溶解,再加入 57.1 mL 冰乙酸,充分混匀,加去离子水定容至 1 L,室温保存。

A.4 1 × TAE 电泳缓冲液

20 mL 的 50 × TAE 电泳缓冲液加水定容至 1 000 mL,室温保存。

A.5 DNA 抽提缓冲液 1

按苯酚、氯仿(三氯甲烷)、异戊醇以 25 : 24 : 1 的体积比混合,密闭避光 4℃保存。

A.6 DNA 抽提缓冲液 2

氯仿与异戊醇按 24 : 1 的体积比混合,密闭避光 4℃保存

A.7 5 mol/L NaCl 溶液

0.29 g NaCl 加 1 mL 灭菌水。

A.8 TE 缓冲液

1 mL Tris-HCl(1 mol/L, pH 8.0)和 0.2 mL EDTA(0.5 mol/L, pH 8.0)混合,加无菌去离子水定容至 100 mL,高压灭菌后 4℃保存。

A.9 1%琼脂糖凝胶

称取 1 g 琼脂糖粉,加入 100 mL 1 × TAE 电泳缓冲液,加热融化。待温度降至 60℃左右时,加入 5 μL 核酸染料,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

附 录 B
(资料性)
鱼斜管虫病

B.1 病原学

鱼斜管虫病是由鱼斜管虫寄生于淡水鱼体表皮肤和鳃部所导致的寄生虫病。鱼斜管虫寄生于鳃部可导致鳃组织严重损伤,上皮细胞坏死;寄生于体表可导致分泌大量黏液,皮肤溃烂、鳍条残损;病鱼食欲下降或厌食,身体消瘦、体色发黑,身体无法保持平衡、漂浮水面或聚集在水体下风口,直至慢慢死亡。

B.2 易感宿主

鱼斜管虫可感染鲫(*Carassius auratus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)、异齿裂腹鱼(*Schizothorax o'connori*)、短须裂腹鱼(*Schizothorax wangchiachii*)、东方高原鳅(*Triplophysa orientalis*)、岩原鲤(*Procypris rabaudi*)、尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewartii*)、虫纹鳊鲈(*Maccullochella peelii*)等淡水鱼类。其流行区域广泛,一年四季均可发病,春秋最易流行,对鱼苗鱼种危害尤为严重。

B.3 鱼斜管虫的形态学特征

鱼斜管虫的形态学特征见图 B.1,鱼斜管虫的模式图见图 B.2。

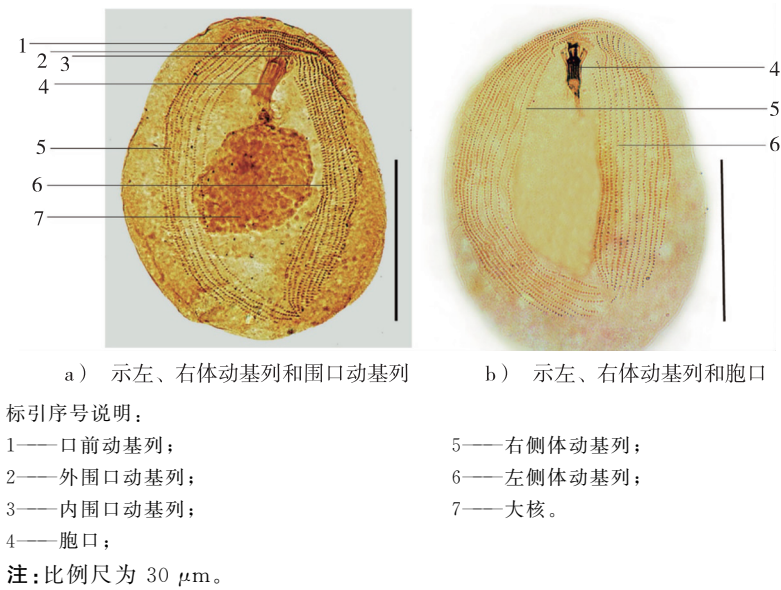


图 B.1 鱼斜管虫的形态学特征

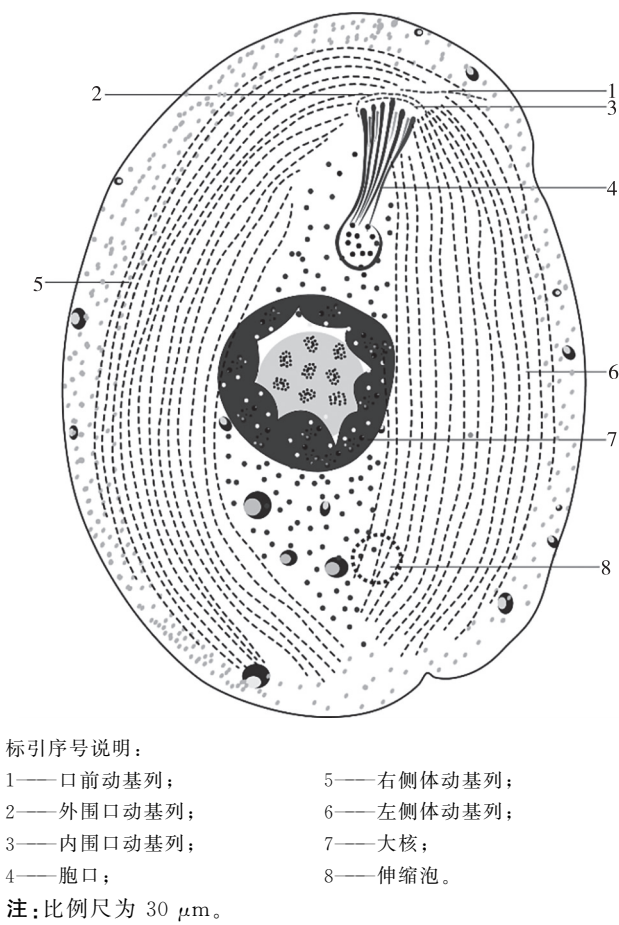


图 B. 2 鱼斜管虫的模式图

附录 C

(资料性)

鱼斜管虫 18S rDNA 扩增产物的参考序列

鱼斜管虫 18S rDNA 扩增产物的参考序列见图 C.1。

```

1  aacctggttg atcctgccag tagcatatgc tttcctcctg gagattaagc catgcatgtc
61  taagtataag ttatatacgg cgaaactgcg aatggctcat taaaacagtt ataatctatt
121 tgataatggt tttatatgga taaccattgg gaaactatgg ctaatacatg ctcaacagct
181 tcggttggtat ttattagttt tgaccggtct cgtaccgtga ggagtcataa taactgatcg
241 gagcgacta gtgtgcgcta aatctttcga gtttctgccc tatcagattg ttggtagtgt
301 attggactac catgtctatc acgggtaacg gagaattagg gttcgattcc ggagagggag
361 cctgagaaat ggctaccaca gctacggtag gcagcaggtg cgtaaattac ccaatccaaa
421 ttctggaagg tagttacagg aaatttggtg cgcgtgaaat ttcaccgaca caaccgaaca
481 catttaagca ttgtgtgttt aattggaggg caagtttggt gccagcagcc gcggtaatc
541 caactccaag agtgtatctt aatgttgctg cagttaaaaa gctcgtagtt gaatttctga
601 ggatgggaga aaccttccgg tggatcccg cttcatccgc ttggagaggc tgtgtgacct
661 ttactgggag cacagatgac ccagcatttt actttgaaga aattagagtg ttcattggcag
721 gcttcgcttg cataaattag catggaataa tggaataaga ctagtctgtt ttattggttg
781 acagaatagt aatgattaac agggacagtc gggggcattc gtactcagtg gccagaggtg
841 aaattcttag actcgctgaa gacgcactaa tgcgaaagca ttgccaag gatgttttcat
901 taatcaagaa cgaaagttag gggatcaaag acgattagat accgtcgtag tcctagccat
961 aaactatacc gactaacgat tgggtgtgcca taacacatca ggagttaatg agaaatcaaa
1 021 gtctttgggt tctgggggga gtatggctgc aaggctgaaa cttaaaggaa ttgacggaag
1 081 ggcaccacca ggagtggagc ctgcggctca atttgattca acacggggaa acttaccagg
1 141 gcaagacctt agaaggattg acagattgat agctctttct tgatttgagg gatggtggtg
1 201 catggccgtt cttagtctgt ggagtgatct gtttggttaa ttccctaaac gaacgagacc
1 261 ttaacctgct aacctagacg cggtgatcaa ttcgccgttg tgcttcttag aggactatg
1 321 cgttttaaagc gcatggaagt ttgaggcaat aacaggtcag tgatgccctt agacgtcctg
1 381 ggccgcacgt gtgctacact gatgcattca gcaagtacta tcctaaccgg aaaggggctg
1 441 ggtaatcttc acaatatgca tcgtgcttgg gattgatctt tgcaattatg gatcatgaac
1 501 gaggaattcc tagtaagtgc aagtcacat cttgtactga ttacgtccct gccctttgta
1 561 cacaccgccc gtcgtccta ccgattgagt gatccggtga attttctgga cttctggttt
1 621 atgccaagga ggaagttaag taaaccttat cacttagagg aaggagaagt cgtaacaagg
1 681 tttccgtagg tgaacctgca gaaggatca

```

图 C.1 鱼斜管虫 18S rDNA 序列

参 考 文 献

- [1] SC/T 7011.1—2021 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
-