ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXX—XXXX

牛羊精液重要垂直传播人畜共患病病原的检测技术

Detection technology for important vertically transmitted zoonotic pathogens in frozen semen of cattle and sheep

（征求意见稿）

中国兽医协会
CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由中国动物疫病预防控制中心、中国农业科学院兰州兽医研究所和甘肃省动物疫病预防控制中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

引　言

人工授精是世界上绝大多数种牛、种羊繁育系统采取的标准做法。当前我国畜牧改良和繁殖广泛地采用了人工授精技术，但是从外部引进公牛、公羊精液时也可能存在疾病传播风险，如携带多种病原体的公牛、公羊通过配种（包括人工授精和自然交配）将病原体传给母牛、母羊，这不仅加大了病原传播的速度和广度，并且增加了防控工作的难度和复杂性，尤其是传播严重影响动物健康养殖和人类健康的人畜共患病病原体，对经济的危害是巨大的。

当前牛羊疫病日趋复杂化，公牛和公羊精液的质量直接关系到牛羊养殖业的健康发展，在我国及周边国家跨境传播的 4 种重要人畜共患细菌病（布鲁氏菌病、结核病、Q 热、衣原体）流行率较高的情况下，最佳的避免人工授精传染疾病的策略就是加强对种畜场的疫病监测，尽早发现和剔除感染上述病原的阳性种牛羊、或使用无特定病原的种牛羊、或在引进种牛羊和精液前必须严格检疫，从种源上净化疫病，维持较高水平的生物安全。

在上述 4 种人兽共患病中，WOAH 将布鲁氏菌病、牛结核病列为法定报告的传染病，这两种疫病也是我国《一、二、三类动物疫病病种名录》规定为的二类动物疫病，而 Q 热和动物衣原体病为三类动物疫病。其中，布鲁氏菌病（简称布病）是由布鲁氏菌属细菌感染导致人畜共患的传染病，在全世界范围内严重威胁人类健康并影响畜牧业发展。布鲁氏菌属包括羊种布鲁氏菌（B.melitensis）、牛种布鲁氏菌（B.abortus）、猪种布鲁氏菌（B.suis）、绵羊附种布鲁氏菌（B.ovis）、犬种布氏菌（B.canis）、沙林鼠种布鲁氏菌（B.neotomae）、鲸种布鲁氏菌（B.cei）、鳍种布鲁氏菌（B.pinnipedialis）和田鼠种布鲁氏菌（B.microti） 及新报道的 B.inopinata 等，其中动物布病主要是由羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌感染羊、牛和猪等动物，呈急性或慢性经过，是人间布病的主要传染来源。动物临床主要特征为生殖器官和胎膜发炎，母畜流产、乳腺炎、不育和各种组织（如睾丸、关节）的炎症。

动物结核病是由分枝杆菌属的细菌引起的一种慢性、人兽共患性传染病。分枝杆菌属主要由结核分枝杆菌复合群（牛分枝杆菌、结核分枝杆菌）、麻风分枝杆菌以及非结核分枝杆菌（禽分枝杆菌）所组成。该病主要通过呼吸道和消化道感染，可侵害多种动物，家畜中奶牛最易感，其次为黄牛、牦牛，野生动物中以鹿较为常见；其中结核分枝杆菌主要导致人结核病，但也可感染牛；禽分枝杆菌禽亚种主要引起禽结核病。临床主要特征为病程缓慢、渐进性消瘦、咳嗽、衰竭，并在多种组织器官（如肺、肝、脾和肠道等）形成肉芽肿和干酪样钙化结节。

Q 热是由伯奈特柯克斯体（又称 Q 热立克次体）感染所引起的一种自然疫源性人兽共患病，主要侵袭牛、羊等反刍动物和犬、猫等伴侣动物。Q 热立克次体对理化因素抵抗力强，在野生啮齿动物如黄胸鼠、野兔等及多种野生哺乳动物/鸟类间经蜱传播、循环，形成自然疫源地。一般因蜱、螨等叮咬或由犬从野生动物群传至家养牛、羊群，引起牛、羊流产、死胎、弱仔、非典型肺炎等，并经感染牛羊的胎盘（流产胎儿等）、尿、呼出气体等形成气溶胶或经多种蜱、螨在人畜间传播扩散。

流产衣原体（Chlamydia abortus）是一种细胞内寄生革兰氏阴性的原核微生物，主要宿主为羊、牛、猪等，被感染的家畜在妊娠后期会出现流产。流产衣原体可通过呼吸道传播或直接接触感染人类，引起非典型肺炎和孕妇流产等，属于人畜共患病原体。人类经呼吸道吸入或密切接触患病牛羊，可发生人畜感染，但人与人之间的传染相对罕见。

中国兽医协会 CVMA

本标准借鉴 WOAH 相关规定、国家标准及行业标准，建立了检测布鲁氏菌、结核分枝杆菌复合群、Q 热立克次体及流产衣原体的 qPCR 方法操作规范，适用于种畜场或人工授精站动物精液生物安全检测使用。

中国兽医协会
CVMA

中国兽医协会
CVMA

牛羊冷冻精液重要垂直传播人畜共患病原的检测技术

1 范围

本标准规定了动物布鲁氏菌病、结核病、Q热、衣原体四种疫病诊断所用的常规分离鉴定及qPCR检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于牛、羊等动物精液中布鲁氏菌、结核分枝杆菌、Q热立克次体、流产衣原体的诊断及可疑样品的检测。

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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Bp：碱基对（base pair）

BHQ1：无荧光猝灭基团(Black hole quencher-1)

Ct值：每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数（cycle threshold）

dNTP：脱氧核糖核酸

DMSO：二甲基亚砜

EDTA：乙二胺四乙酸

FAM：6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein)

PBS：磷酸盐缓冲液

PCR：聚合酶链式反应 （polymerase chain reaction）

Taq酶：Taq DNA聚合酶（Taq DNA ploymerase）

5 仪器与设备

中国兽医协会 CVMA

5.1　II级生物安全柜。

5.2　荧光定量PCR扩增仪。

5.3　精液采样器。

5.4　高速台式冷冻离心机，可控温至4 ℃，离心速度可达12000 g以上。

5.5　微量移液器：量程为0.5 μL~10 μL、2μL~20 μL、20 μL~200 μL和200 μL~1000 μL。

5.6　涡旋震荡仪。

5.7　无菌注射器或EP管。

5.8　分析天平。

5.9　冰箱：2℃~8 ℃、-20 ℃和-70 ℃以下。

5.10　恒温水浴锅：0 ℃~100 ℃。

5.11　组织研磨器或研钵。

5.12　高压灭菌锅。

5.13　电热恒温鼓风干燥箱：0 ℃~100 ℃。

6　试剂与耗材

6.1　除另有规定，本方法试验用水应符合GB/T 6682-2008规定的二级水，所用化学试剂均为分析纯。

6.2　引物和探针。采用无DNA、无RNA水将每条引物与探针（序列见表 1）配制成100 μmol/L储存液，置-20 ℃或更低温度冻存；使用时取适量配制成10 μmol/L工作液，避免多次冻融。荧光定量PCR扩增仪。

6.3　离心管。

6.4　PCR光学反应管。

7　原理

以种特异的基因组序列为模板；Q热立克次体qPCR以IS1111为模板；流产衣原体以OmpA基因为模板设计特异扩增引物与探针。

8　精液样品采集与运输

8.1　人工阴道采集精液

对公牛、公羊等大型动物可用一专门的人工阴道套在发情的雄性动物阴茎上，采集精液；或可将人工阴道置入雌性动物的阴道内，待动物交配完毕后，取出人工阴道采集精液；或将人工阴道固定在雌性动物外生殖器附近，雄性动物阴茎开始插入时，立即将其阴茎移入人工阴道内，射精完毕后，采集人工阴道内的精液。

中国兽医协会 CVMA

8.2 其他阴道采集精液

将发情的雌性动物与雄性动物共处，当雄性动物被刺激发情后，立即将雄性动物分开，再用人工法刺激其射精。也可按摩雄性动物的生殖器或用电刺激其发情中枢或性敏感区，使其射精。

8.3 精液的运输

采取的样品须在取样后24 h内4 ℃冷藏送至实验室，附有标签或采样单，清楚标明采样时间、地点、数量、采集人、养殖数量及方式、临床症状、动物来源、养殖方式、养殖数量，采样数目、免疫状况、临床症状和采样时间、采样人等信息。此外采样、样品处理及检测过程所涉及的实验操作应遵守GB 19489-2008的有关规定。

9 qPCR 方法

9.1 精液前处理

将被检精液样品置于试管中，加入3倍~4倍量的15%~20%安福民溶液，充分摇匀后 37 ℃作用1h，加1倍~2倍量的灭菌水，1 000 g离心20 min~30 min，弃上清液沉淀物加水恢复量后再离心一次，取沉淀物涂片镜检、培养。安福民（antiformin）沉淀浓缩法具体操作参见附录B.1。

9.2 基因组DNA的提取

在上述已完成前处的样品（沉淀物）中加入50 μL~100 μL DNA提取液充分，56 ℃温浴30 min，98 ℃~100 ℃加热 10min瞬时离心使液滴聚集管底，加等体积三氯甲烷，振荡混匀，12000×g 离心5 min上，直接用于qPCR 或储存于-80 ℃备用。

可采用经验证的商品化核酸提取试剂盒（推荐用柱式提取方法）。

9.3 qPCR反应体系和条件

表 2 qPCR 反应体系和条件

类 别	PCR 反应体系	PCR 反应条件
布鲁氏菌（BCSP31）	在 PCR 管内，加入 qPCR 预混反应液 10 μL， 10 μmol/L 的上下游引物各 0.6 μL，10 μmol/L 探针 P：0.6 μL，模板 DNA 2 μL,补充 ddH2O 至 25 μL	95 ℃预变性 2 min；95 ℃变性 15 s，60 ℃ 退火 60 s，然后采集荧光，扩增 40 个循环。
结核分枝杆菌复合群（IS6110） 结核分枝杆菌复合群（IS1081） 结核分枝杆菌	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)，50 mmol/L KCl，2.5 mmol/L MgCl，0.2 mmol/L dNTP，上、下游引物各 0.2 μmol/L，探针 0.1 μmol/L，5% DMSO，5%甘油，0.4 U 尿 DNA 基化酶（UDG 酶），1 U Taq DNA 合（Taq 酶），5 μL 模板 DNA	第一阶段：50 ℃ 2 min，95 ℃ 4 min，1 个循环；第二阶段：95 ℃ 10 s，60 ℃ 45 s， 40 个循环，荧光收集设置在 60 ℃ 退火延伸时进行

中国兽医协会 CVMA

牛分枝杆菌

Q 热立克次体（IS1111）	在 PCR 管内，加入 qPCR 预混反应液 12.5 μL， 10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL，10 μmol/L 探针 P：0.5 μL，模板 DNA 1μL,补充 ddH2O 至 25 μL	95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 15 s，57.7 ℃退火 45 s，然后采集荧光，扩增 45 个循环
流产衣原体（OmpA）	在 PCR 管内，加 qPCR 预混反应液 10 μL， 10 μmol/的上下游引物各 0.8 μL，10 μmol/L 探针 P：0.4 μL，模板 DNA 2μL,补充 ddH2O 至 20μL	95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 30 s，65 ℃退火 30 s，然后采集荧光，扩增 45 个循环

9.4 结果判定

阴性判定：检测结果呈现无Ct值、无扩增曲线或反应曲线无明显对数增长期，判为阴性。

阳性判定：检测结果呈现Ct值≤35、且扩增曲线有明显的对数增长期，判为阳性。

可疑：对于35＜Ct值≤40的样品，为可疑样品，可疑样品需重新取样进行重复检测。如果重复检测的Ct值＜40，且曲线有明显的对数增长期，判为阳性反应。否则判为荧光PCR阴性反应。必要时，对初次检测呈荧光PCR阳性反应的样品进行重复检测。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
试剂的配制

A.1　0.01 mol/L pH7.6 PBS

先配制A液、B液。

A液（0.2 mol/L NaH2PO4溶液）：称取一水合磷酸二氢钠（NaH2PO4·H2O）27．6 g，或二水合磷酸二氢钠（NaH2PO4·2H2O）31.2 g，溶于蒸馏水中，定容至1 L。

B液（0.2 mol/L Na2HPO4溶液）：称取十二水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·H2O）71.6 g，或二水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·2H2O）35.6 g，溶于蒸馏水中，定容至1L。

称取17 g氯化钠，用适量蒸馏水溶解，量取13 mL A液和87 mL B液，混合，用蒸馏水定容至2 L。

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（资料性）
安替福民（antiformin）沉淀浓缩法

B.1　A液

Na_2CO_3：12 g、漂白粉 8 g、蒸馏水 80 mL。

B.2　B液

NaOH 15 g、蒸馏水 85 mL。

B.3　工作液

应用时，将AB两液等量混合，再用蒸馏水稀释成 15%~20%后使用，该溶液应存放于棕色瓶内。将被检样品置于试管中，加入 3 倍~4 倍量（质量浓度）的 15%~20%安福民溶液，充分摇匀后 37 ℃作用 1 h，加入 1 倍~2 倍量（体积分数）的灭菌水，3 000 g~4 000 g离心 20 min~30 min，弃上清，沉淀物加蒸馏水恢复原量后再离心一次，取沉淀物涂片镜检、培养。

中国兽医协会
CVMA