

动物检疫资料汇编

(四)

精液的检疫

中华人民共和国动植物检疫总所

一九八四年八月

动物检疫资料汇编

(四)

精液的检疫

中华人民共和国动植物检疫总所

一九八四年八月

前 言

精液的检疫由于实验室的诊断方法未完全标准化，因此，使进出口国家动物检疫部门，在诊断标准问题上，常发生争执。为交流进出口精液检疫技术，一九八三年六月十三日世界兽医实验室诊断人员协会在美国衣阿华召开第三次国际专题讨论会，对国际间交换合格的动物精液和胎儿的兽医实验室诊断问题，进行了专题研究。来自十五个国家的五十多位科学家讨论了十位权威人士关于精液检疫方面的提案，并对当前用于公牛和公猪的最适检疫达成了一致意见。会议要求各国政府组织采取必要的行动以寻找有关各方都能普遍接受的标准。

我们编辑出刊此次会议有关精液检疫方面的资料和一些国家对进口精液的检疫卫生要求，供有关从事检疫、科研、教学和生产单位的同志参考。

由于时间匆促，缺点和错误难免，不妥之处，请同志们批评指正。

中华人民共和国动植物检疫总所

一九八四年八月

目 录

1. 关于家畜冷冻精液带菌带毒情况…………… (1)
2. 关于牛冷冻精液带菌带毒情况…………… (1—3)
3. 牛精液样品中病毒分离标准 (草案) (加拿大人工授精中心) …… (3—5)
4. 关于牛精液中病毒的检查…………… (5)
5. 牛精液中牛白血病病毒的检查…………… (5)
6. 从牛精液中分离出霉形体…………… (6—7)
7. 从公牛的精液和包皮检出尿素水解支原体…………… (7)
8. 从公牛精液中分离支原体 附: 支原体实验室检查程序…………… (7—9)
9. 公牛精液中牛传染性鼻气管炎病毒的中和物质和分离病毒前对其中和物质的处理方法…………… (9)
10. 牛精液中的兰舌病病毒、病毒分离…………… (9—13)
11. 应用病毒分离或血清学方法诊断牛兰舌病感染…………… (14—19)
12. 联邦德国从美国进口牛精液之前检验牛精液中兰舌病病毒的培养方法…………… (20—21)
13. 大量精液样品病毒污染的检验法…………… (21—23)
14. 牛精液的特有病原菌的检验和检验程序…………… (24—26)
15. 牛胚胎中传染病原的控制…………… (26—28)
16. 猪精液的检疫…………… (29—33)
17. 精液中支原体和尿原体的控制…………… (33—40)
18. 关于与精液和胚胎的国际交流有关的牛地方流行性白血病的介绍…………… (40—42)
19. 兰舌病病毒——介绍获得优质的无兰舌病病毒精液和胚胎的方法…………… (43—46)
20. 为国际间交换精液推荐的试验国家法定控制的项目…………… (46)
21. 在牛精液中传染性牛鼻气管炎病毒检查方面有关流行病学的商榷…………… (47—51)
22. 胎儿弧菌培养标准程序…………… (51—60)
23. 有关国家对进口精液的检疫要求…………… (60—62)
 - (1) 加拿大对进口精液的检疫要求…………… (60—62)
 - (2) 加拿大向中国输出牛精液的检疫和卫生条件…………… (63—64)
 - (3) 从美国无兰舌病州向丹麦进口精液的要求范例…………… (64—66)
 - (4) 美国从中国进口猪精液检疫和卫生要求…………… (66—69)
 - (5) 美国从日本进口精液的要求…………… (69—70)
 - (6) 从美国进口牛精液的健康证书…………… (70—72)
 - (7) 法国对人工授精用公牛的卫生要求及精液检查…………… (72—75)
 - (8) 爱尔兰从加拿大进口牛精液的检疫要求…………… (75—76)
 - (9) 澳大利亚向中国输出精液的证书…………… (76—77)
 - (10) 日本牛精液的输出检查要领…………… (77—80)

(11) 日本产牛精液向加拿大输出条件·····	(80—81)
(12) 澳大利亚从新西兰进口绵羊精液的条件·····	(81—82)
(13) 澳大利亚从英国进口牛精液的条件·····	(82—83)
(14) 澳大利亚从英国海峡群岛、马恩岛和爱尔兰共和国进口牛 的冷冻胚胎的条件·····	(83—85)
(15) 澳大利亚向中华人民共和国输出牛精液的健康检疫条款补充草案·····	(86—87)
(16) 中华人民共和国农牧渔业部和新西兰农渔部关于从新西兰输入 牛精液的检疫与卫生条件·····	(87—88)
24. 从精液中分离高兰舌病病毒及其检查方案·····	(89—90)
25. 动物人工授精——种公牛冷冻精液（国际标准）·····	(91—96)

关于家畜冷冻精液带菌带毒情况

引进国外优良种畜的冷冻精液，普及人工授精，是迅速改良与提高我国家畜品质及其生产性能的有效措施，但家畜冷冻精液并非一种除精子外不含其它任何微生物的物质，大量资料证明，冷冻精液带菌带毒的情况是常见的。为严防由于精液带菌带毒将国外的动物疫病传入我国及防止国内家畜人工授精中传播疫病，必须加强对家畜冷冻精液检疫方法研究。

据资料报导，家畜精液中带菌带毒的种类有细菌、病毒、立克次氏体、支原体、衣原体、霉菌、真菌、酵母菌、原虫等引起的20多种疫病。

从精液中分离的微生物区系大致可分为以下几类：

一、特异病原体：

- 1、生殖系专性病原体。如：结核、副结核、口蹄疫、猪伪狂犬病、蓝舌病、肿瘤等。
- 2、引起流产的非生殖系专性病原体。如：布氏杆菌、沙门氏杆菌、钩端螺旋体、李氏杆菌、弓形体、立克次氏体、牛病毒性腹泻、粘膜病及可引起流产的非生殖专性病原病毒。
- 3、生殖器官专性病原体。如：胎儿弧菌、胎儿毛滴虫、IBR-NPV病毒、牛阴道炎病毒、Epivage病毒等。

二、非特异性病原体：

此类微生物大多由于在精液采集、实验室处理、分装封口、冷冻贮藏或液氮罐容器内污染等情况下，造成的外源性精液污染。此类微生物，多数是无致病性或微弱致病或少数的条件病原体。如：葡萄球菌、链球菌、化脓棒状杆菌、溶血巴氏菌、粘性巴氏菌、大肠埃希氏菌、普通变形菌、绿脓杆菌、霉菌、酵母、真菌等。

关于牛冷冻精液带菌带毒情况

一、结核病

牛结核病可通过人工授精传播，法国曾发生患结核病的公牛精液传播牛结核病的典型事例。精液中的结核分枝杆菌在精液采集，冷冻过程中均能存活。

二、副结核病

有人曾试验证明，副结核阳性公牛的内生殖器均有副结核分枝杆菌，在冷冻精液制作过程中加入抗菌素不能将其杀死，在精液冷冻贮藏过程中，该菌均能存活。

三、牛布氏杆菌病

据报导，生殖器官感染布氏杆菌病的公牛，即使其血清凝集价很低或为阴性，但其精液却带牛型布氏杆菌。丹麦曾因用患生殖器官布氏杆菌病而血清凝集价为阴性或可疑的公牛精液进行人工授精而传播本病。

四、牛生殖器官弧菌病

本病是由胎儿弧菌引起的一种最常见的最重要的由精液传播的传染病，公牛是本病的无症状带菌者和传播者。

五、胎儿毛滴虫病

这种典型的生殖系统传染病很容易通过人工授精传播。胎儿毛滴虫在精液处理（加抗菌素）冷冻贮存条件下，均能存活。本病在欧美各国较为流行。

六、钩端螺旋体病

本病可以精液为媒介，通过交配或人工授精而传播。

七、边虫病

八、口蹄疫

已经证明，患口蹄疫的公牛其病毒在精液中出现的时间比临床病变出现的时间要早。同时有些病愈或预防接种后数月内仍保持精液带毒状态。用排毒公牛精液给易感母牛授精，则可传播本病。

九、蓝舌病

据Lendke等人（1975）报道，公牛感染蓝舌病后7—21天内可从其精液中分离本病毒，还可从病牛的睾丸、副睾丸及精囊中分离本病毒。Watson（1976）报导，患病公牛与易感母牛配种后全部母牛均感染蓝舌病。

电镜检查公牛精子头部可见有蓝舌病毒样颗粒及头山口缺陷和形成空泡。

Evasmus氏（1976）认为在流行国家和地区，在无库蠓Culicoides spp情况下，通过精液可构成本病的自然传播。

十、牛传染性鼻气管炎、传染性脓胞性阴道炎、传染性脓胞龟头包皮炎。

已经证明，这种病毒均可通过精液排毒传播本病。公牛（生殖道粘膜）睾丸、副睾丸并有畸形精子。不仅可从血清阳性公牛（患生殖性IBR）精液中分离到病毒，而且还可以从血清阴性公牛精液中分离到病毒。

十一、牛病毒性腹泻和副流感

十二、牛白血病

本病可通过精子的染色体（genome）或通过精细胞间成分传播。

十三、纤维乳头状瘤病

本病可通过交配传播，尤其采集有阴茎和包皮纤维乳头瘤的公牛精液时，最易传播本病。

十四、牛瘟

十五、衣原体病

生殖器官立克氏体（衣原体）病。

鸚鵡热——淋巴肉芽肿——生殖器病原体。

鸚鵡热——淋巴肉芽肿——沙眼病原体。

衣原体病可引起公牛精液囊炎和亚急性、慢性颗粒性睾丸炎、使精液质量降低甚至使公牛丧失生殖能力。并引起母牛阴道炎、子宫炎，造成永久性不孕。

十六、Q热

此病究竟通过交配传播还是通过人工授精用的冷冻精液传播，尚未得到证明。

牛感染伯氏考克斯氏体（Coxiella Burnetii）不表现症状，人感染则产生相当严重的类

似感冒症状，在美国加利福尼亚州Q热在牛群中普遍流行，可从牛奶中分离到本病原体。

十七、枝原体病

据报导，精液中污染枝原体是常见的，而且枝原体、在精液中的处理、冷冻和保存过程中均能存活。

牛生殖道枝原体和无乳枝原体的致病作用可造成公牛精液囊炎、母牛子宫炎和输卵管炎。

十八、霉菌、酵母菌、真菌引起的疾病

据报导，精液中的热带假丝酵母、白假丝酵母、烟曲霉、隐球酵母、假丝酵母、红酵母、毛孢酵母、酵母、球拟酵母等，可引起母牛霉菌性流产、子宫内膜炎、子宫颈炎等。

农牧渔业部动物检疫所 冷冻精液检疫组

牛精液样品中病毒分离标准(草案)

(加拿大人工授精中心)

一、所需材料:

1. 试验精液

2. 干冰

3. Whirl—Pak塑料袋

4. 带金属帽盖的无菌稀释试管

(12mm × 100mm)

5. 甲醇或70%酒精

6. 剪刀

7. 稀释液: 含有下列添加剂的磷酸镁、磷酸钙缓冲盐液(PBS)

——5%胎儿牛血清(FBS)

——200国际单位/毫升青霉素

——200微克/毫升链霉素

——50微克/毫升庆大霉素

8. 镰状细颈组织培养瓶(25cm²)

9. 细胞: 不超过7—8代培养的牛胚肾细胞(FBKC), 并且证实没有牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)和牛付流感病毒I型(PI₁)的感染。

10. 营养液: 含最低需要量媒介剂的瓦尔氏平衡盐水(MEM-E), 并含:

——200国际单位/毫升青霉素

——200微克/毫升链霉素

——50微克/毫升庆大霉素

——2%的胎儿牛血清(FBS)

(注: FBS应证实1:2稀释检查牛病毒性腹泻, 牛传染性鼻气管炎和牛付流感抗体结果阴性)。

11. 1 毫升的血清吸管

12. 2 毫升的 Cornwall 自动分液吸管

二、样品的准备：

一般来说，采集双份样品于微细吸管或玻璃安瓶内，贮放于液氮中，并同时裹一包装纸标明采集样品所放的位置，为了便于以后操作，在筛选各个公牛样品时，将每一份样品从液氮缸中取出，置于一层干冰上冷冻。从某一公牛身上所采样品全部拣选出来后，一组样品集中于一塑料袋中用于试验，而另一组相同的样品仍然保存以备再次试验。两个塑料袋均应贮放于 -70°C 。

三、试验步骤：

1. 试验工作记录的准备：

——按公牛编排所采精液样品的号码。

——如果一头公牛的精液是在十天内采集的，原则上集中为四份样品。

——每份精液样品或累积精液样品使用 $2 \times 25\text{cm}^2$ 的 BFK 细胞细颈组织培养瓶。

(注：参看附录样品工作单)。

2. 微细吸管或玻璃安瓶的消毒：

——按试管工作记录的次序进行精液样品的解冻，采取和集中：

——将微细吸管或玻璃安瓶浸放于装有甲醇或70%酒精的烧杯中消毒。

——待玻璃安瓶表面酒精挥发干燥后，将其打开，用 1 ml 吸管吸取精液并注入消毒过的稀释管中。

——将微细吸管浸入无菌磷酸盐缓冲盐水中再处理，以洗去剩余的酒精，用无菌剪刀剪掉微细吸管的尖端，然后将吸管放于一个消毒过的稀释试管中，再剪掉顶端被塞住的部分，以便精液流出。

3. 正式试验：

① 稀释精液：

精液样品或累积精液样品*用 PBS 以 1:5 进行稀释(量的多少随试验需要而定)，取 0.5 ml 稀释精液注于 25cm^2 细颈组织培养瓶中的二代单层牛肾细胞上，置培养瓶于 37°C 培养一小时，倾出接种物(精液)，用营养液冲洗单层细胞一次，然后再加入新鲜营养液 5 毫升，置细胞培养瓶于 37°C 培养。

每天观察细胞生长情况，持续五天或五天以上(详细看附录中的要求)，培养期满，先将培养瓶中细胞冷冻固定，解冻后取 0.5 ml 细胞碎片液移至另一新鲜的牛肾单层细胞上，同样进行每天观察，连续观察五天。

被接种的牛胚肾单层传代细胞中，凡出现细胞病变反应的任何细胞，移至 Leighton 试管中凡殖，然后用免疫荧光法检验有无病毒。

毒性细胞污染的样品要用双份样品中的另外一份进行第二次试验。

② 未稀释精液：

未稀释的精液样品用 PBS 1:10 进行稀释(量的多少，随需要而定)，除了下列情况以外，均需作精液的稀释。

如果精液酶的作用对组织培养细胞产生的影响太剧烈的话，可在15—30分钟后移出接种物（精液），一次冲洗单层细胞，并加入新鲜营养液。

*样品采集在十天期限内，如果公牛血清牛传染性鼻气管炎抗体检查阴性，从某一公牛采集的样品最多要累积四份；如果牛传染性鼻气管炎抗体检查阳性，每次的精液样品要单独进行试验。

冯学平、李通瑞译自

加拿大驻华使馆寄给总所的材料

关于牛精液中病毒的检查

从牛精液中分离的病毒，有口蹄疫，兰舌病、牛白血病、牛传染性鼻气管炎、牛病毒性腹泻、流行热和多疣皮肤病等病毒。还分离出肠道病毒、付牛痘病毒（付痘苗病毒），以及若干个尚未确定的病毒。精液中这些病毒是依据各种动物接种试验和细胞培养法来确定的。精液中病毒的流行及其对牛凡殖力的影响，几乎尚未弄清楚。

保持病毒感染性的最理想的条件就是冷冻精液的广泛普及成为将病毒传播给未感染牛群和地区的重要媒介物。这就使精液的国际交往受到限制，为了评价问题的重要性和开发现实的预防方法，将改进检查精液中病毒的方法是必要的。

摘译自《Theriogenology》1980,14,151~165

摘自畜禽传染病 1983,第4期

牛精液中牛白血病病毒的检查

1. 将1ml无菌精液和 1.5×10^4 证明无牛病毒性腹泻(BVD)/和粘膜病(MD)病毒的胎羊肾细胞混合物，在伊格尔氏(Eagle)培养基中共同培养。所用伊格尔氏培养基经杜尔伯克(Dulbecco)改良加有10%灭能的胎牛血清。

2. 胎羊肾细胞融合后，每隔三~四天做两次继代接种。

3. 在载玻片上做第三次继代接种。

4. 细胞用丙酮固定（10分钟， -20°C ）。

5. 用标有抗-C₃抗血清-FITC的免疫荧光，人的补体和对牛白血病病毒蛋白簇51的抗血清的单一特异性来检查牛白血病的特异性抗体。

6. 整个试验都设有阳性对照细胞。用培养液上层清液中的牛白血病病毒来感染胎羊肾细胞。

.....

另一方法：

可把牛精液10~15ml注入绵羊腹腔内。

感染后3~4周，为获得牛白血病特异性抗体，对绵羊血清进行了筛选。

徐景清译、刘恩会校

从牛精液分离出霉形体

苏格兰爱丁堡市 Moredun 动物病研究所 A. C. Rac 著

在一次调查霉形体与牛泌尿生殖道疾病的关系的期间，进行了一次普查以探讨霉形体在牛精液中的发生情况。从两个育种中心获得了10个品种牛的55份未经处理的精液样品。用以前报道过的培养基和技术 (Jones, 1978) 来检查所有样品有无糖酵解性和能水解精氨酸的霉形体。用来分离脲原体 (ureaplasmas) 的肉汤培养基含有 (v/v) 49.5% 199 培养基、20% 脑心浸汤、20% 灭活猪血清、添加0.5% (w/v) 尿素的5% 新鲜酵母浸出液、0.02% 盐酸半胱氨酸、0.002% 犊牛胸腺DNA、以及0.006% 酚红。还包括最后浓度分别为0.5毫克/毫升和0.002毫克/毫升的氨苄青霉素 (ampicillin) 和二性霉素B (fungizone)。供脲原体生长用的固体培养基含有30% 灭活猪血清、30% 脑心浸汤、30% 199 培养液、2.5% 磷酸钠缓冲液 (Windsor等, 1975) 和0.9% 琼脂糖。

用生化和血清学技术来鉴定大菌落的分离株 (Clyde, 1964; Rosendal等, 1972) 通过它们使脲产生代谢变化的能力和菌落的形态来鉴定脲原体。结果列于表1。

共有39 (71%) 个样品分离出霉形体。9个样品出现牛生殖道霉形体 (*Mycoplasma bovis*) 和脲原体的混合培养物，2个样品出现牛生殖道霉形体和加拿大霉形体 (*M. canadense*) 的混合培养物。A和B中心的牛生殖道霉形体和脲原体的分离率是相同的，但是从A中心得到的加拿大霉形体分离物只有1株。每个品种的牛至少有1个精液样品分离出霉形体。

表1 从两个育种中心的牛精液分离出的霉形体

分离出的种	分离株的数量		阳性数	滴度为 $\geq 10^3$ ccu 的样品数
	A 中心	B 中心		
牛生殖道霉形体	13	13	26 (47.3%)	19
加拿大霉形体	7	1	8 (14.5%)	未做
脲原体	7	8	15 (27.3%)	10
鉴定不出来的	1		1	

ccu = 颜色改变单位 (Colour changing units) / 0.2毫升

几位学者已经从牛精液分离出牛生殖道霉形体 (Gourlay等, 1979) 但从牛精液分离加拿大霉形体的报告是 Ruhuke等 (1975) 在加拿大提出的。不过，加拿大霉形体已在美国 (Jaspar, 1977)、加拿大 (Ruhuke等, 1975) 和英国 (Gourlay等, Jackson等, 1981) 从乳腺炎爆发的牛中分离出来。加拿大霉形体对牛乳腺的人工接种，导致了临床性乳腺炎 (Ruhuke等, 1975)。在 Jackson等 (1981) 所研究的乳腺炎爆发中，被涉及的牛群已建立了40年，所有的后补牛全是自繁自养的。这些学者确定不出来感染的来源，但他们提出通过直接接触或苍蝇的传播是有可能的。由于这个农场实行人工授精已有多年，所以通过精液而把加拿大

霉形体引入该农场，也是应该予以考虑的另一种可能性。

从这次的普查可以明了，大部分的精液样品可能被霉形体所污染，包括有潜在致病性的加拿大霉形体，因此这些微生物主要是借助于精液而得以散播的。Truscott等(1977)以及Truscott(1981)所报告的研究工作已经证明，在一般情况下用来处理精液的抗生素(链霉素和青霉素)不能消除精液中的霉形体，但最新的抗生素minocin、incospiclin和rosaramicin)则能。在受处理的精液中应该加入一种或多种这类的抗生素，并应该对精液实行有无霉形体性污染的常规检查以避免这些微生物的传播，似乎是可取的。

胡祥璧译自Vet. Rec., 1982, 111(20): 462

从公牛的精液和包皮检出尿素 水解支原体(摘要)

尿素水解支原体是“T-系”支原体，曾见于人体及一些动物的健康和患病组织，实验研究表明，尿素水解支原体可引起牛的乳房炎、粒状阴道炎、绵羊粒状阴道炎和犊牛肺炎。在新西兰除猫以外在其它动物未见有该菌存在的报导。本文作者共检查了100头公牛，50头检查精液，25头检查包皮刮取物，25头检查包皮冲洗液。结果在24份精液、19份包皮刮取物及10份包皮冲洗液中检出尿素水解支原体。作者使用了液体和固体两种培养基，液体培养基的成份是：Difco PPLO肉汤70毫升，马血清20毫升、25%的酵母浸出液10毫升、0.1%尿素、0.002%酚红和1500单位苯甲青霉素。固体培养基用上述培养加入1.0%纯化的琼脂和0.05%醋酸铊，PH调正至6.0—7.0。作者还详细描述了采样方法、样品保存、培养条件及该微生物的培养特性，并进行了讨论。作者认为公牛尿素水解支原体感染率高提示应进一步研究，以明确其存在的意义。

李通瑞摘自《N.Z. Vet. J.》

1980, 28, No 5, 89~90

从公牛精液中分离支原体(要摘)

本研究的目的在于发现用于人工授精的种公牛感染支原体的情况。从15头外表上健康的哈里亚纳公牛用假阴道采集精液，按Albertsen和Barber等的方法分离支原体。15个精液样品在固体培养基上分离到两个支原体菌株，即牛生殖器支原体和颗粒状支原体。前者在含20%马血清的固体培养基上为80—225微米的大菌落，在37°C潮湿大气条件下通入5—10% CO₂孵育24—48小时出现。菌落中部形成“油煎蛋”状奶头。培养时不能利用葡萄糖和精氨酸，对毛地黄皂甙敏感。磷酸酶和薄膜点状反应为阳性，被氯化四唑还原。颗粒状支原体的菌落大，可利用葡萄糖不能利用精氨酸，磷酸酶反应阳性，不被四唑还原，对毛地黄皂甙敏感。

李通瑞摘自《Indian J Anim Sci.》，

1975, 45, No10, 797—798

附：支原体实验室检查程序

在当前，对于精液中带有致病性支原体的公牛尚无血清学试验的方法进行检查，只能靠精液的培养来发现。

培养基——有效地用于分离支原体的培养基种类很多，但已改良的Hayflick's肉汤培养基或固体化的培养基最为满意。但尿原体需要在培养基内加入尿素且PH值必须在 6.0 ± 0.2 范围，有的需加进含锰的硫酸盐(0.01%)作为尿原体菌落的指示剂(呈暗褐色或黑色)或者使用Shepard和Luncefrel发明的鉴别诊断的琼脂培养基。一般说来，公牛精液内的支原体是容易生长的。

检查程序——如果检查的是未经稀释的原精液，可取0.2毫升精液直接加入到含1.8毫升支原体肉汤和尿原体肉汤的试管内，并在尿原体平板上作划线培养。每种肉汤作几个10倍法的稀释，试管在 37°C 孵育18天，每日检查有无支原体生长的典型轻雾状的混浊。为了证实支原体的存在，将肉汤培养物接种于琼脂平板培养基，假如精液内尿原体存在，在12—18小时内试管底部将出现粉红色，再经过几小时的孵育后，培养基将变成粉红色，当一经见到颜色发生改变时应立即作支原体平板培养基的划线培养。接种后琼脂平板应在 37°C ，含5% CO_2 的空气或氮气的条件下孵育至少七天，在显微镜下检查(以 $100\times$ 检查尿原体，以 $30\times$ 检查支原体)。

假如送检的是细管精液，为了保证有足够的接种量作各项试验，须作1:10的稀释，每支细管大约含0.2毫升，因此尿原体培养基应加1.8毫升。

当精液中已确知或怀疑有抗生素药物，为了除掉它或是将其浓度减低到不杀死和不抑制支原体的程度，可使用下面的方法，以PH7.1的PBS稀释精液，以 $3.0-35,000g$ 离心20分钟，倒掉上清液，沉淀物以PBS重悬，再离心，倒掉上清液，以无抑制的肉汤按原精液的数量悬浮沉淀物。

生化试验——精液可能含有致病性和/或非致病性的支原体(后者可能是在采集和/或处理过程中以外界环境而来)，因此必须加以鉴定。支原体一般鉴定到种的水平(如果可能的话)，但无胆甾支原体可不必如此，如果某一未知的培养物能利用葡萄糖，就可不必用抗非发酵支原体血清来作血清学试验。(如表1)

固醇的要求——需不需要固醇来生长可作为定科的标准，支原体科需要固醇，无胆甾支原体科无需固醇，对洋地黄皂甙的敏感性已显示它基本上可以反映出对固醇的要求、操作过程类似于以特异抗血清作的园片生长抑制试验，园片以0.025毫升含1.5%(W/V)洋地黄皂甙的乙醇溶液浸湿，自然干燥。以富含血清的琼脂培养基来保证培养物生长良好，接种后能长出均匀一致的菌落群，以稀释的肉汤培养物淹没培养基的表面，然后将过量的液体倾去。接种后把浸湿的洋地黄皂甙的园片放置在表面，进行孵育，当能看到菌落后作出判断。环绕在园片周围的生长抑制带应超过1毫米方可认为是敏感的。支原体是敏感的，无胆甾支原体有抵抗力。

葡萄糖发酵——最起码需要一种试验培养基和两种对照培养基。

(1)没有试验底物但须接种的基础培养基，随试验一起进行孵育，

(2)有试验底物不接种的培养基，也须孵育。第一周每日作检查，第二周第二日作检查，未接种的对照培养基应无PH值的改变，作为阳性判断，接种的葡萄糖培养基应为偏酸，其偏移值应超过接种的基础培养基至少是0.5PB单位，据报导，用试验培养基先制备出一套

PH的标准来作参考很有用。

精氨酸水解——与葡萄糖发酵试验的程序相同，不过(1)以精氨酸代替葡萄糖，(2)培养基的PH值调到7.0。

阳性结果是向碱的方向偏移0.5PB单位。

血清学鉴定——最常使用的方法是生长抑制试验(GI)和荧光抗体(FA)GI有高特异性。使用纸园片法(Glyde法)或琼脂平板打孔法来作GI，同种的抗血清能抑制支原体的生长。FA试验可用初次分离或者肉汤培养物接种的平板上生长的支原体菌落来做。FA除了能节省时间和材料外，还可查出M、SPP混合物以及非典型或异常生长的菌落。

公牛精液中牛传染性鼻气管炎病毒的中和物质和分离病毒前对其中和物质的处理方法(摘要)

文中指出公牛精液运往其它地区以外，政府检查部要对精液进行病毒学检查，特别要检查牛传染性鼻气管炎病毒，因为它是造成牛流产的一个重要原因。作者指出许多公牛的精液对组织培养细胞有毒性并且能中和组织培养中的牛传染性鼻气管炎病毒，这种毒性和中和能力用白陶土可以除去，但用能使牛传染性鼻气管炎病毒沉淀的速度进行超速离心仍不能沉淀它。因此在分离牛传染性鼻气管炎病毒时，精液的超速离心应成为最初步骤，从沉淀中分离病毒，而含有毒性和牛传染性鼻气管炎病毒中和物质的上清液应抛弃。

李通瑞摘自《Canad. Vet. J》

1976, 17, No 2, 318—320

牛精液中的兰舌病病毒、病毒分离

R. D. Breckon, A. T. Luedke和 T. E. Walton
(美国农业部科教局农业研究处，虫媒动物病研究室)

摘 要

用Vero行明包培养物和发育鸡胚直接从病牛血液及精液试样中分离兰舌病病毒(简称BTV)。这两种方法都比血液或精液对易感绵羊做血液自家移植接种的效果好。为细胞培养技术用于分离兰舌病病毒的评价表明，蒸馏水的品质是增加Vero细胞对此次BTV分离的敏感性的主要因素。用鸡胚分离牛尿里的病毒，效果最差。用沉淀素试验和补体结合试验进行测定对BTV抗体的比较试验表明，沉淀素试验更为准确。

由精液传递病毒一直还没有在许多病毒性疾病中得到证明，但却具有使疾病长久存在的重要方法的潜力。例如可以从一些病公牛的精液中找到牛流行热病毒(或暂时热)(Porosonou等1974)；口蹄疫病毒可从表现临床症状前的某些公牛精液中分离出来，(Seller等1968)；牛传染性鼻气管炎(IBR)病毒也可以由于生殖道感染而污染公牛的精液(Spradbroni 1968)。因此，当作者用绵羊接种法从一头隐性感染兰舌病的公牛精液中分离出BTV时，增加了着重用细胞培养物来检测BTV的研究。

本研究在细胞培养物中分离BTV的结果，明显地表现不一致，从而怀疑用来稀释精液试

样的蒸馏水有问题。某些虫媒病毒为细胞的最大附着力依赖于是否存在含有特异的单价或双价阳离子的电解液，这和把病毒结合于宿主细胞的静电力的已知情况是符合的。

本文目的是讨论蒸馏水在检测公牛血液和精液中BTV的可能影响，还提供两个来源蒸馏水的金属分析；并包括牛尿中 BTV 的测定以及对改变了的直接补体结合试验(简称MDCF)和微量琼扩沉淀试验(简称AGP)之间的血清学比较。

材 料 及 方 法

动物：3头荷兰种公牛(1、2、3号)和1头海福特公牛(4号)，均2~3岁，这些已知没有兰舌病的公牛都是在试验室里养大的并在试验期中在有防虫设备的隔离舍内饲养。公牛均用已感染兰舌病病毒的库蠓(*Culicoides Varii penis*)去叮咬(生物学感染法)而受传染。

方法如下：1. 一头供毒绵羊(donor sheep)由于被库蠓叮咬而感染。这些库蠓是因为吸吃一头感染了BTV的3岁带毒公牛(carrier)的血而生物学地感染兰舌病毒的。2. 让正常的OOC系*Culicoides Variipenis*种库蠓雌虫群去吸吃上述供毒绵羊的血。3. 吃过供毒绵羊血的上述库蠓，经体外培育16天后，用它们去叮咬1号公牛，在1号公牛的病毒血症期内，采取血毒，盖上一层人工薄膜，作为经口喂养另外一组正常库蠓的血餐来源。4. 又经过14天体外培育后，当这代库蠓再去叮咬2号病牛时便传播了BTV。像这样，通过已感染的库蠓的叮咬，3号及4号公牛也相继地感染了BTV。

试样的采集：每头公牛要同时采取血和精液试样11次供测毒试用。在被库蠓叮传BTV后的0, 7, 14, 21, 28, 50, 54, 57, 102, 104及106天采取试样，血样加入肝素，提出红细胞，洗一次(参考Luedke A, T等的方法1977)。用电动射精器刺激公牛采取混有子射液的精液(lane公司，Denver市，科罗拉多州购置)。测量精液的容积，鉴定其色泽是否带血迹以及PH。同时检查精虫的运动性，记录其活/死比例数及形态特征。在采精前还要采尿样，按1:1混以抗凝剂(配方是草酸钾5克，酚5克，甘油和蒸馏水各500毫升)。

病毒测定：每一份精液、尿和红细胞试样，各至少接种18个孵化11天的鸡胚。先用含抗菌素的磷酸缓冲盐水(每毫升含青霉素10,000单位，链霉素10,000微克，庆大霉素100微克)各稀释成1:10，接种0.1毫升，接种物均需先经超声波处理约10秒钟，4°C保存1~3周后使用。所有试样在接种以前，均需马上再经超声波处理约10秒钟。

每个细胞培养物的接种量也是0.1毫升，取自1毫升的接种样品(内容被检试样0.1毫升、抗菌素液0.1毫升和0.8毫升蒸馏水)。血细胞和精液悬液也要经过超声波处理，在水槽内处理10秒钟，放4°C保存直到使用，一般三周内用完。将试样接种于生长在25平方公分面积的塑料瓶内48~72小时形成单层的MARV Vero细胞(非洲绿猴肾细胞株)上，听其吸附一小时，不吸除接种物，加入不含血清的Eagle氏，最低要素培养液(MEM, PH7.0)做维持液放37°C培养，一直到有50~75%细胞出现致细胞病变作用(CPE)为止。假如培养10天后不出现CPE，则收获细胞和上清液，再传细胞一代，培养观察10天如属阴性再淘汰。

此外，每头公牛均在库蠓叮咬感染后50~57天和102~106天，各采精液(5毫升)和经过洗涤的红细胞(50毫升)。将每段间隔时间所采集的血液和精液样品加以混合并在测毒前经超声波处理。16份混合试样各接种对BTV易感的绵羊一只。

蒸馏水：制造细胞培养物接种液用的蒸馏水(DW)有两个来源：都是来自城市水，DW

是从一个不常更换的小容量去离子器获得的，再经玻璃蒸馏器（Corning型AGI）的双蒸馏。DW又是来源于一个常更换的大容量去离子器，再经大型玻璃蒸馏器（Corning型AG10a）双蒸馏。都各取水20立升，蒸发使干将残留物做分光光度计的光度分析。再用这两种不同来源的蒸馏水制备的培养液培养细胞，做已确证被感染了各头公牛的精液和红细胞试样的平行试验。

血清学数据：每头公牛各在其被库蠓叮咬感染BTV后的0, 21, 28, 50, 100及110天采取血清，检测其抗BTV的沉淀素及补体结合抗体。均用以前报告过的微量琼扩凝胶沉淀试验（AG-P）和改良的直接补体结合试验（ACP）作平行测定。另用间接免疫荧光技术鉴定兰舌病病毒。

结 果

用间接免疫荧光证实在Vero细胞培养物中，成功地从4头公牛被蠓虫叮咬感染BTV后的第7天到第106天所采的10份精液和10份血液试样中分离出兰舌病病毒。同样接种鸡胚的每份血液和精液试样也都分离出病毒。每头公牛均在其最高病毒血症时采取的红细胞试样中检出了可以滴定的BTV。用这种测定法证明，仅3号公牛在蠓虫叮咬传播BTV后第50~106天有可以滴定的病毒血症；在蠓虫叮咬传播BTV后第57天时，接鸡胚静脉接种平均致死量（EID₅₀）计算的滴度，达到5.0。

大多数病毒分离物在第一代细胞培养时，可在7~16天内产生细胞病变。但如早先报道的那样，在蠓虫叮咬传播BTV后102~106天所采的试样，则多数需要第二代细胞培养时，才出现细胞病变。（luedke A—T等1975）。

用两种来源不同的蒸馏水制备的细胞培养液所进行的分离病毒的平行试验表明，所有试样在DW 1水制的培养液中都可以检出BTV；而DW 2水处理的试样则只有不到20%的试样检出病毒。两种蒸馏水的化学元素分析列表1·DW 1水中锌和锶（strontium）的浓度要大些。而23种其它元素则基本上是相同的。

（表1） 蒸馏水的化学元素分析

化 学 元 素	DW 1 ((微克/立升)	DW 2 (微克/立升)
锌	1.5	0.08
铁	1.0	0.7
铝	0.3	0.25
铅	0.10	0.07
铜	0.09	0.07
锰	0.06	0.04
硼	0.18	0.14
钡	0.04	0.06
锶	0.04	0.006
镍	0.04	0.03
钴	<0.03	<0.03
锡	<0.02	<0.02
铋、铬、钴、铜、锆、钛、钒、	<0.01	<0.01
镉、锂	0.0	0.0
矽、镁、钙、钠	<1.5	<1.5

注： DW 1和DW 2中含量不同。

这四种元素含量比别的元素大，但两种水之间无大差别。

通过光学显微镜检查证明，公牛的BTV感染对精子细胞并无不良影响；3号、4号公牛的精液中无血迹(或隐血—Occult blood)，但是1号公牛的5份精液试样和2号公牛的7份精液试样中均检出微量血迹。精液试样的细菌污染对鸡胚是个问题，但对细胞培养则无问题。

用绵羊接种法对两次选定的间隔期中所采红细胞和精液的混合试样做病毒分离(表2)，结果8份红细胞混合试样中，有4份是绵羊阳性，2份可疑；2份阴性；相反，8份精液混合试样中，仅1份是阳性，2份可疑，5份阴性。

(表2)用绵羊经选定的间隔从4头感染了公牛的从混合的经过洗涤的红细胞以及精液试样中分离兰舌病病毒。

公牛号	蠓虫咬50—57天后洗涤过的 红细胞 精液		102—106天后洗涤过的 红细胞 精液	
	1	+	-	+
2	+	-	-	-
3	+	+	±	±
4	±	±	-	-

注：可疑，轻微临床BTV反应，但没分离出BTV。

用鸡胚检查21份公牛的经过挑选的尿试样做BTV分离，仅2份是成功的，这两份病毒均采自牛被感染后的第21天，一份来自1号公牛，另一份来自4号公牛。同一天的红细胞试样中也产生了可滴定量的BTV。(MDCE)试验证明4头公牛在被库蠓叮咬前都没有BTV抗体。在被库蠓叮咬后21天，有3头牛的血清转化成阳性，到28天后，4头牛均呈阳性。在整个试验过程中，对BTV的沉淀抗体反应，一直保持强阳性，MDCF试验反应也是阳性，但4号公牛例外，效价仅达到1:10，到100天时为<1:5。这两种试验的结果列于表3，所有血清试样都没表现抗补体作用。

(表3)4头公牛被感染了的库蠓C. Variipeuis叮咬后，用AGP和MDCF试验比较检测BTV抗体

公牛号	血清学方法	库蠓叮咬传播 BTV 后的天数					
		0	21	28	50	100	110
1	AGP	-	+	+	+	+	+
	MDCF	-	10	10	20	20	20
2	AGP	-	-	+	+	+	+
	MDCF	-	-	10	40	40	40
3	AGP	-	+	+	+	+	+
	MDCF	-	20	20	10	20	20
4	AGP	-	+	+	+	+	+
	MDCF	-	10	5	10	-	-

MDCF数据是以能固定3个单位补体的最高血清，稀释度的例数来表示效价的。