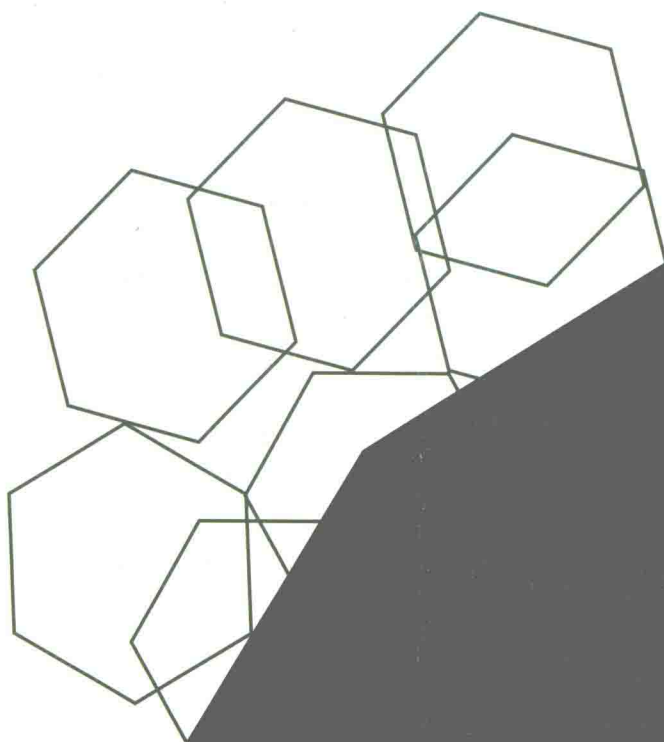


进口动物精液 和 胚胎的检疫管理技术

◎徐自忠 主编

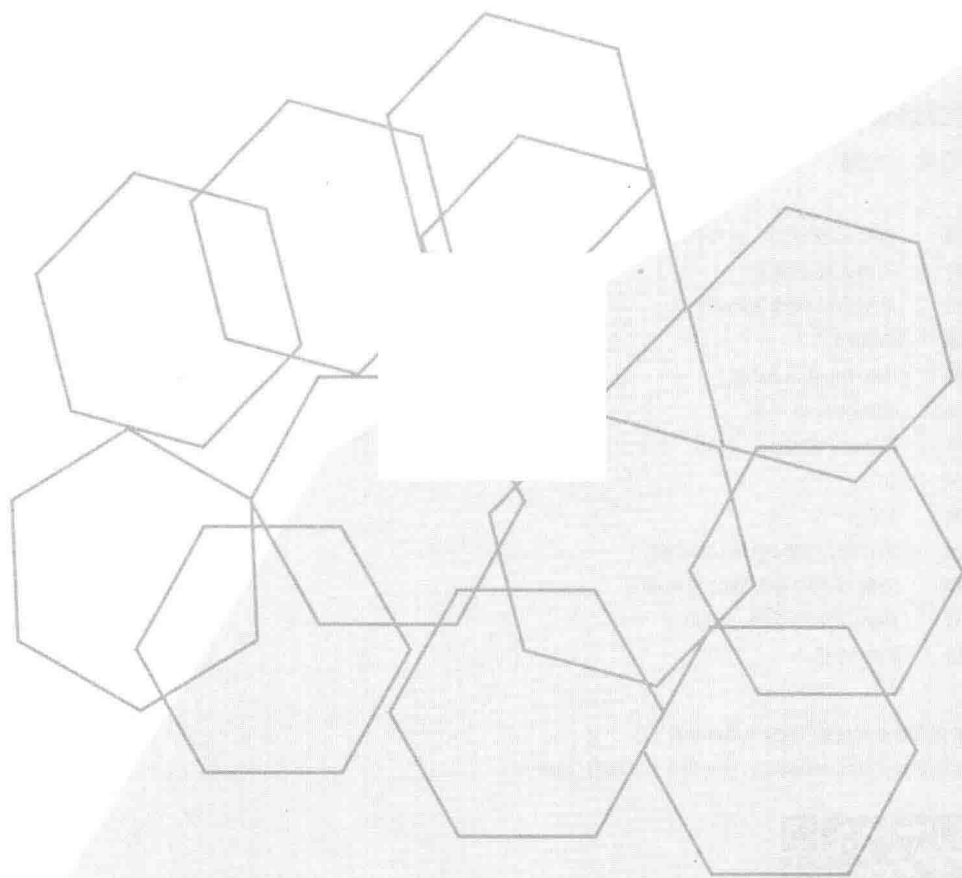


云南出版集团

云南人民出版社

进口动物精液 和 胚胎的检疫管理技术

◎徐自忠 主编



◆ 云南出版集团

■ 云南人民出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

进口动物精液和胚胎的检疫管理技术 / 徐自忠主编.
— 昆明: 云南人民出版社, 2017. 1
ISBN 978-7-222-14000-4

I. ①进… II. ①徐… III. ①动物-精液-国境检疫
②动物-胚胎-国境检疫 IV. ①S851.34

中国版本图书馆CIP数据核字 (2017) 第024989号

责任编辑: 刘 娟
装帧设计: 云南华达印务有限公司
责任校对: 周 碧
责任印制: 杨 立

进口动物精液和胚胎的检疫管理技术

徐自忠 主编

出版 云南出版集团 云南人民出版社
发行 云南人民出版社
社址 昆明市环城西路609号
邮编 650034
网址 www.ynpph.com.cn
E-mail ynrms@sina.com
开本 787mm×1092mm 1/16
印张 26
字数 470千
版次 2017年1月第1版第1次印刷
印刷 云南华达印务有限公司印刷
书号 ISBN 978-7-222-14000-4
定价 110.00元

如有图书质量及相关问题请与我社联系

审校部电话: 0871-64164626 印制科电话: 0871-64191534



云南人民出版社公众微信号

本书编委会

主 编：徐自忠

编著者：李凌枫 刘晓丹

校 对：叶玲玲

前 言

我国马人工授精最早于 1935 年在江苏句容马场开展了试验研究，但直到 20 世纪 50 ~ 60 年代才在黑龙江、吉林等北方省区大规模开展，应用范围及实际效果均居世界领先地位，到 20 世纪 70 年代末共改良近百万匹。20 世纪 60 年代普及了乳牛人工授精，从 1977 年开始在全国推广牛的冷冻精液。目前各省、区都有冷冻精液站，据估测已形成年产 2000 万份以上冻精剂量的能力。大中城市乳牛已普及了人工授精，利用人工授精技术杂交改良黄牛每年都在千万头以上。我国绵羊人工授精的规模及冷冻精液研究水平居世界前列。在养羊发达的新疆、内蒙古等北方各省区已经普及人工授精，对中国美利奴羊、新疆细毛羊及东北细毛羊的育成起了重要作用。猪的人工授精自 20 世纪 50 年代在广西开展以来，目前南方各省区开展得较广泛。我国猪人工授精研究及冷冻精液的开始较早，技术水平及输精母猪数均处于领先地位。我国的胚胎生物技术研究始于 20 世纪 70 年代中期。目前我国胚胎生物技术研究取得长足进展，已与世界水平接近。新疆、内蒙古等省区牛、羊的冻胚移植已用于生产。东北优质细毛羊繁育的成功主要靠冻胚移植而获得。随着我国动物养殖业不断发展的要求，进口动物精液、胚胎不断增加。目前，向我国出口胚胎和精液的主要国家有欧盟、澳大利亚、新西兰、加拿大、美国等。由于近年来对国外优质动物种质资源需求的不断扩大，除以上地区外，还有来自乌拉圭、阿根廷、巴西、南非的关于动物精液胚胎的进口需求。

本书在系统总结检验检疫和监管工作实践经验的基础上，依据最新版

本的国家标准、国际标准、国外先进标准和行业标准，尤其结合最新的国内外疫病研究进展编制成册。旨在系统归纳我国进出境动物及其产品检疫方面的管理经验和检疫技术，为广大检疫人员和进出境相关单位提供全面细致、切实可行的技术参考。另外，也可作为广大出入境检验检疫人员、兽医检疫人员的业务参考书，又可作为相关单位、院校的辅导材料。

由于编写时间紧迫，加之编者水平与经验所限，书中错误和不足之处难免，敬请读者提出宝贵意见，以供再版时改进。

编 者

2017年1月

目 录

Contents

第1章 概述及相关法规标准	001
第1节 动物精液和胚胎检验检疫概述	001
1 商品特点	002
2 进口管理规程	012
第2节 相关的法规及标准	013
1 检疫法规	013
2 我国主要动物检疫标准	014
第2章 进口管理技术	022
第1节 进口风险分析	022
1 概 述	022
2 风险分析的过程	026
3 进口精液和胚胎风险分析	034
第2节 进境检疫流程	038
1 进境动植物检疫许可证的申请	038
2 备 案	038

3 检疫审批	039
4 境外产地检疫	039
5 报检	039
6 现场检验检疫	040
7 实验室检疫(冷冻精液)	040
8 不合格要求处理	042
9 检疫出证	042
10 检疫监督	042
11 检疫处理	042
12 资料归档	043

第3章 检疫试验技术 044

第1节 主要的诊断方法 044

1 传染病诊断方法的验证原则	044
2 常用实验室检疫技术	050
3 国际贸易中常用方法	088

第2节 动物精液、胚胎的共患病检疫技术 092

1 伪狂犬病(Aujeszky's Disease)	092
2 蓝舌病(Bluetongue)	101
3 布氏杆菌病(Brucellosis)	112
4 口蹄疫(Foot and Mouth Disease)	132
5 日本脑炎(Japanese Encephalitis)	142
6 钩端螺旋体(Leptospirosis)	146
7 副结核病(Paratuberculosis)	152
8 Q热(Q Fever)	157
9 狂犬病(Rabies)	161
10 裂谷热(Rift Valley Fever)	168
11 牛瘟(Rinder Pest)	173
12 水泡性口炎(Vesicular Stomatitis)	180

第3节 牛精液胚胎的检疫技术	184
1 地方流行性牛白血病 (Enzootic Bovine Leukosis)	184
2 牛海绵状脑病 (Bovine Spongiform Encephalopathy)	192
3 牛结节疹 (Lumpy Skin Disease)	206
4 牛生殖道弯曲杆菌病 (Bovine Genital Campylobacteriosis)	213
5 毛滴虫病 (Trichomonosis)	220
6 牛病毒性腹泻 (Bovine Viral Diarrhea)	226
7 牛传染性鼻气管炎/传染性脓疱性阴户阴道炎 (Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infection Pustula Vulvovaginitis) ...	233
8 牛结核病 (Bovine Tuberculosis)	242
第4节 羊精液胚胎的检疫技术	251
1 羊痒病 (Scrapie)	251
2 小反刍兽疫 (Pestides Petits Ruminants)	260
3 山羊关节炎/脑炎 (Caprine Arthritis / Encephalitis)	265
4 接触传染性无乳症 (Contagious Agalactia)	269
5 山羊传染性胸膜肺炎 (Contagious Caprine Pleuropneumonia)	275
6 梅迪-维斯纳病 (Maedi-Visna Disease)	283
7 内罗毕羊病 (Nairobi Sheep Disease)	287
8 羊痘 (Sheep Pox and Goat Pox)	291
第5节 马精液胚胎的检疫技术	298
1 非洲马瘟 (African Horse Sickness)	298
2 马传染性子宫炎 (Contagious Equine Metritis)	306
3 马媾疫 (Dourine)	310
4 马脑脊髓炎 (Equine Encephalomyelitis)	314
5 马传染性贫血 (Equine Infectious Anaemia)	323
6 马鼻肺炎 (Equine Rhinopneumonitis)	328
7 马病毒性动脉炎 (Equine Viral Arteritis)	335
8 马鼻疽 (Glanders)	342

9 苏拉病 (Surra Disease)	349
第6节 猪精液胚胎的检疫技术	356
1 古典猪瘟 (Swine Fever)	356
2 非洲猪瘟 (African Swine Fever)	370
3 猪水疱病 (Swine Vesicular Disease)	375
4 尼帕病毒脑炎 (Nipah Virus Encephalitis)	384
5 猪传染性胃肠炎 (Transmissible Gastroenteritis of Swine)	391
6 猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)	397
参考文献	405

第1章 概述及相关法规标准

第1节 动物精液和胚胎检验检疫概述

我国动物检疫的主要目的首先是防止动物疫情疫病传入和传出，避免重大疫情灾害，保护我国农、牧、渔业生产安全。其次，保护人类身体健康，动物及其产品与人的生活密切相关。许多疫病是人畜共患的传染病，据有关方面不完全统计，目前动物疫病中，人畜共患的传染病已达196种。动物检疫对保护人民身体健康具有非常重要的现实意义。第三，通过引入优良品种，生产出优质动物产品，可有效促进对外贸易的发展。我国实施动物检疫依据的法律主要包括《中华人民共和国进出境动植物检疫法》、《中华人民共和国进出境动植物检疫法实施条例》和《中华人民共和国动物防疫法》及有关的配套法规，如《中华人民共和国进境动物一、二类传染病、寄生虫病名录》、《中华人民共和国禁止携带、邮寄进境的动物、动物产品及其他检疫物名录》等。《进出境动植物检疫法》是中国动植物检疫的一个重要法律，它对动物检疫的目的、任务、制度、工作范围、工作方式以及动检机关的设置和法律责任等作了明确的规定。《进出境动植物检疫法》和《动物防疫法》都是为了预防和消灭动物传染病、寄生虫病，保护畜牧业生产和人民身体健康而制定的。而《进出境动植物检疫法》主要是进出境动物检疫方面的内容，《动物防疫法》是立足国内动物防疫和检疫方面的规定。我国十分重视动物检疫工作，多年来，通过遍布全国各地从事动物检疫人员的共同努力，取得了举世瞩目的成绩。

应用冷冻精液配种技术是当今发展畜牧业的重要措施，它的优越性在于可以提高优良种公牛的利用率，加快了优良遗传性状的传递，扩大了传递范围；人工授精为选择理想遗传性能的公牛提供了机会，可以大大减少种公牛的饲养数量，大大节约饲料和管理费用，以及不受时间、地域和公牛寿命的限制。

所谓胚胎移植是指一头母畜（称为“供体”）发情排卵并经过配种（自然交配或人工授精）后，在一定时间从其生殖道（输卵管或子宫角）取出卵子或胚胎，然后把它们移植到另外一头与供体同时发情排卵，但未经配种的母畜（称为“受体”）的相应部位（输卵管或子宫角），使其妊娠、分娩。胚胎移植的意义在于提高优良母畜的繁殖潜力；促进品种改良；单胎动物生产双胎或多胎；长期保存冷冻胚胎，便于运输和保存品种资源；有利于疾病控制和疾病根除计划的实施等。

胚胎移植最早始于1890年，英国剑桥大学Heape于1890年4月27日首次获得兔受精卵移植的成功，该项技术当时并未引起足够的重视。直至1932年首例山羊移植成功，此后鼠（1933）、绵羊（1933）、小鼠（1942）、牛（1951）、马（1974）、猫（1978）、狗（1979）等相继移植成功。而胚胎远距离移植成功的记录是兔（1952）、绵羊（1961）、猪（1970）、牛（1972）、鼠（1974）、马（1976）。胚胎远距离移植的成功，为胚胎的国际贸易和交换提供了可能，最近20多年来胚胎移植已完全商业化，目前每年有30万~40万枚牛胚胎在国际贸易。仅北美地区每年就获得10万头以上的胚移植牛，高产奶牛中有30%来自胚胎移植，种公牛有近一半来自胚胎移植。目前世界胚胎移植协会有50多个成员国。我国家畜胚胎移植的研究首先在家兔（1973）首获成功，以后羊（1974）、牛（1978）、马（1982）等相继获得成功。在奶牛胚胎移植方面，1978年获得成功，1980年非手术移植成功，1982年冷冻胚胎移植成功。

1 商品特点

1.1 精液、胚胎的种类

目前，人工授精和胚胎移植技术已成为动物繁殖和遗传育种的主要手段，在生产实践中得到广泛应用的动物精液和胚胎的种类主要有牛精液、猪精液、小反刍动物（如绵羊、山羊、鹿）精液、牛胚胎、绵羊胚胎、山羊胚胎、马胚胎、猪胚胎。

1.2 精液、胚胎的规格等级

1.2.1 精液

参照GB4143-2008国家标准，以牛为例，新鲜精液质量应符合以下标准：色泽呈乳（灰）白色或淡黄色

精子活力 $\geq 65\%$

精子密度 $\geq 6 \times 10^8$ 个/mL

精子畸形率 $\leq 15\%$ 。

冷冻精液的规格按照细管冻精的剂量分为：微型 ≥ 0.18 mL；中型 ≥ 0.40 mL。

剂量冻精解冻后的精液应符合下列标准：

活力 $\geq 35\%$ ，水牛 $\geq 30\%$

前进运动精子数 $\geq 8 \times 10^6$ 个/mL，水牛 $\geq 1 \times 10^7$ 个/mL

畸形率 $\leq 18\%$ ，水牛 $\leq 20\%$

细菌数 ≤ 800 个。

1.2.2 胚胎

世界胚胎移植协会将胚胎发育分为9个阶段，即未受精或单细胞胚（1天）、2~16细胞期（2~5天）、早期桑椹胚（5~6天）、桑椹胚（6天）、早期囊胚（7天）、囊胚（7~8天）以及扩展囊胚（8~9天）、卵化囊胚（9天）、后期囊胚（9~10天）。胚胎质量分为1~4级。1级“优”（Excellent/Good）、2级“良”（Fair）、3级“差”（Poor）、4级“劣”（Dead/Degenerating）。分级标准主要是不同日龄胚胎卵的分裂状态。细胞内颗粒的多少和透明带是否完好等指标。1、2级胚胎为可供冷冻胚胎，3级为可供鲜胚移植，4级是不可用的死胚或退化胚胎。从试验结果看，早期囊胚的移植受胎率比桑椹胚较高。牛胚胎多是每个细管中保存一枚胚胎，其他动物一个细管中可保存多枚，但必须来自同一供体。

1.3 包装和运输

1.3.1 包装

精液、胚胎可用安瓿、细管进行分装。分装精液、胚胎的安瓿或细管上应做好标记，标记应能体现产地、供体动物、生产单位、采集日期等内容。对于牛精液，应按照动物档案国际委员会（International Committee for Animal Recording, ICAR）的规定进行标记。胚胎的安瓿或细管上的标记应符合国际胚胎移植协会的规定。

1.3.2 运输

精液、胚胎应在液氮生物容器中保存和运输，运输过程中应防止液氮泄漏，按时检查液氮状况，及时补充液氮。

1.4 贸易

精液、胚胎在低温条件下可长期保存，国外已有使用保存16~30年的冻精配种，获得犊牛的事例。在防止动物疫病传播方面，精液、胚胎比活动物传播疫病的风险小。此外，精液、胚胎在长距离运输上也比活动物方便。以上这些优势促使精液、胚胎的国际贸易日益频繁。

在畜牧业发达国家，如美国、加拿大、澳大利亚、新西兰以及欧洲一些国家，猪、牛、羊等家畜的人工授精和胚胎移植已经形成产业化，是家畜精液、胚胎的主要输出国。随着近年来人工授精和胚胎移植技术在我国的应用，我国每年都从国外引进一定数量的家畜精液和胚胎，用于改良国内品种和发展家畜养殖业，上述国家是我国进口家畜精液、胚胎的主要贸易国。引进的家畜精液主要是牛精液、猪精液，牛精液的主要输出国为美国、澳大利亚、加拿大，品种以荷兰斯坦黑白花奶牛为主。进口胚胎的种类包括牛胚胎、绵羊和山羊胚胎，牛胚胎的输出国为美国、加拿大，绵羊和山羊胚胎的输出国为澳大利亚，品种有波尔山羊胚胎、道塞特羊胚胎、texel羊胚胎等，我国内蒙古地区2000-2001年从澳大利亚进口近2万枚羊胚胎。

1.5 品质

1.5.1 精液的品质检测

对于精液品质评估的终定标准，以实际的受胎率和最终的分娩率、产仔率作为评定指标是最好的。但测定这些数据要投入大量的时间和资金，不便于精液品质的评定。传统的精液质量检测主要是通过光学显微镜来评价精子的精液量、密度、运动能力、形态和活力等常规指标来评价精子的功能状态，但不能准确预测精子的受精能力，因此需要更好的精子功能检测系统来评估精液的受精能力。随着科学技术的发展和低温生物学的逐步深入，人们对精液质量的检测方法不断改善，进而对精液质量的评价指标也相应发生了变化，使得对冷冻-解冻后精液质量的评定更加科学、准确，以便于确切的反映精子的受精能力。目前精液质量的检测方法包括：精子质膜完整性检测、顶体完整性、线粒体的功能活性、精子受精能力、精子核染色质状态和DNA的损伤，以及精液中酶活性检测等。

1.5.1.1 精子质膜完整性检测

研究认为，精子质膜是最易损伤的部位，功能完整的质膜是精子新陈代谢、

完成获能、顶体反应及与透明带(ZP)结合并穿过ZP的基础。精子质膜的完整性与精子的存活率及生存指数具有高度相关性。精子质膜完整性主要包括头膜完整性和尾膜完整性,头膜与尾膜结构都完整的精子受精能力最强。

一、非荧光染料排斥染色测定

非荧光染料排斥染色测定方法的原理是:死精子质膜丧失选择通透性功能,从而使染料可透过质膜进入精子,而活精子拒染。常用的经典染料有台盼兰、伊红、快绿、苯胺兰、姬姆萨、苯胺黑、赤藓红和萘酚黄等。这些方法多数只能提供部分信息或耗时多、成本高,且这些染色剂大多对精子有毒害作用,会杀死精子,造成结果偏差。

二、低渗肿胀—伊红拒染结合试验

低渗肿胀检测(HOS)检测精子尾膜完整性,伊红拒染检测(EY)反映精子头膜完整性。其原理是在HOS的基础上,加入伊红液制成HOS-EY低渗染液。将精子置于伊红染液,若头膜完整,伊红分子不能进入膜内,精子核不被染色;若头膜损伤,其拒染性丧失,精子核着色。因此,结合这2种方法形成单一试验(HOS-EY)可避免HOS或EY只显示精子1个部位膜状态的局限性,且试验简便、结果直观。该法已广泛用于人和家畜精子的检测。

三、精子膜脂类过氧化反应的测定

精子质膜上富含的多聚不饱和脂肪酸对维持膜的流动性、精子获能、顶体反应及精卵融合具有重要的作用。但高浓度的多聚不饱和脂肪酸在有氧条件下极易发生脂类过氧化反应(LPO)。LPO可造成精子质膜损伤,其代谢产物也对精子具有明显的毒性,最终可导致精子运动等功能的下降,甚至使精子死亡。精子膜脂类过氧反应的程度以丙二醛(MDA)的产量表示。通过检测精液中MDA的含量,可知精子质膜脂类过氧化反应的程度,从而预测精子质膜功能。

四、精浆超氧化物歧化酶的测定

精液中存在另一类物质,可清除超氧自由基,抑制LPO,超氧化物歧化酶(SOD)是其中的主要酶。SOD可有效清除自由基,对抗LPO,在维护精液中的抗氧化系统和对抗氧化产生的损伤方面起着关键性作用。适量的SOD活性对精子质膜具有保护作用,通过测定精液中SOD含量,可预测精子质膜功能。

五、流式细胞术(FCM)

评估精子质量的常规方法。主要基于显微镜检查,由于检测的精子数低及主观因素影响,通常这些方法的重复性和统计有效性较弱。FCM是20世纪70年代发展起来的一种单细胞快速分析技术,已广泛应用于细胞生物学和医学的各个

领域。概括说来,FCM就是对处在快速直线流动状态中的细胞或生物颗粒进行多参数快速定量分析和分选的技术。精子质膜功能的完整性是检测精液质量的重要指标之一,对死精子特异的荧光染料有碘化丙锭(PI)、溴化乙锭(EB)、Hoechst33258等,其中PI最为常用,其可透过死精子质膜与精子核DNA 特异结合,而活精子拒染;活精子特异性的荧光染料有SYBR-14、羧基荧光素双醋酸盐(CFDA)、羧基二甲基荧光素双醋酸盐(CDMFDA)等,它们是膜通透性的染料,能进入质膜完整的精子,在各种非特异性脂酶的作用下转化为呈现绿色光的荧光物质。流式细胞术为精子质膜功能试验提供了快速、客观、多指标、大通量的检测手段,弥补了传统方法的缺陷,成为一种检测精液质量的新平台。目前,FCM 应用于精液质量的检测主要是在人、家畜(牛、羊、马、猪、狗、兔)及实验动物(大鼠、小鼠)中进行,在野生动物方面还鲜有报道。FCM 具有快速、客观、多指标检测、高通量等优点,可有效避免其他检测方法的主观性。

1.5.1.2 顶体完整性试验

顶体是源于高尔基体的一种颗粒性结构,精子黏附和穿透卵子透明带,要发生顶体反应(AR),提前发生AR或不具有AR潜力的精子,其受精力必然下降或丧失,完整的顶体对受精至关重要。顶体存在与否常通过染色来判断。

一、考马斯亮蓝染色法

是评价精子顶体完整性的一种简单方法,直接染色后就可以在普通光学显微镜下观察。

二、免疫荧光技术(IFT)

目前,利用免疫荧光技术,即用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的免疫结合物更能准确地检测精子顶体状态。常用的免疫结合物有2类:①金霉素(CTC)及一些与细胞外抗原结合的抗体。CTC顶体染色法可客观地对精子获能和顶体反应进行定量评价;②外源植物凝集素及一些与精子内顶体抗原结合的抗体,其中的外源植物凝集素常被用来评价顶体的状态。检测中通常将异硫氰荧光素(FITC)与豌豆凝集素(PAS)、花生凝集素(PNA)、伴刀豆凝集素(ConA)结合使用。在牛和猪精子检测中,用FITC-PNA检测顶体状态的结果与精子直线运动的精子数、HOST等方法检测的精子顶体状况高度相关,且经电子显微镜证实,PNA 能特异结合顶体外膜。现在该方法已被用于评价马、牛、猪、羊和人精子的顶体状态。

1.5.1.3 线粒体功能和活性

线粒体能不断产生精子运动所需要的三磷酸腺苷(ATP)来提供能量,因此

精子的运动能力与其线粒体活性密切相关。线粒体的功能状态是评定精子质量的一个关键指标。

一、ATP浓度测定

由于精子运动的动力来源于中段线粒体催化产生的ATP,因此通过测定ATP浓度与活率之间的相关性,从而预言受精能力。

二、特异荧光探针测定

检测线粒体活性最常用的方法是使用特异性的荧光探针如罗丹明123和JC-1等。罗丹明123是一种阳离子结合染色剂,根据线粒体跨膜电位在精子线粒体部位积累,具有快速非温度依赖性和固染的特点。MITO在水溶液中是非荧光性的,在线粒体上聚集后可发荧光,但不依赖于线粒体的膜电位。二者都可聚集到线粒体部位发绿色荧光。JC-1染色为绿色或红-橘红色荧光,这是精子线粒体因功能状态不同而使线粒体膜具有不同的电位,即线粒体的低电位和高电位不同而造成JC-1在线粒体上形成单体,从而发射绿色荧光,或者形成聚合体而发射红-橘红色荧光。目前,这些探针已得到广泛应用,且多和PI结合使用来检测精子质量。

1.5.1.4 精子受精能力

精子质膜完整性的重要性也反映在其他与受精相关的体外功能检测中,这些检测能更准确地评价精子获能、顶体反应、核去致密化及受精后胚胎的发育能力。

一、透明带结合检测

由于卵子周围一般被透明带包围,所以透明带是体内受精的第一个屏障。在精子与卵子质膜融合并进入卵细胞前,精子必须贴附、结合并穿入同源的透明带内,这种结合是由透明带和精子上的亲合素-受体介导的,也是透明带结合分析的理论基础。因此精子与透明带结合是受精的关键步骤,可用于预测精子的受精能力。透明带结合检测试验研究精子穿过卵子透明带的能力,常用的透明带分2类:①完整透明带结合试验(ZBA);②半透明带结合试验(HZA)。研究发现前者与受精力的相关性大于后者。

二、卵母细胞穿透检测

Yanagimachi等发明了人精子穿透去透明带的仓鼠卵母细胞检测人精子受精能力的方法。这种方法被用于多种动物受精能力的检测。近几年,去透明带牛卵母细胞被用于牛和马精子的穿透能力的检测。这种检测可以评价获能和顶体反应,因为只有经过获能和顶体反应的精子才能穿透卵母细胞。但是,这种检测方法不