

动物 Q 热诊断技术编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

本标准由国家标准管理委员会《2013 年国家标准制定和修订项目》下达任务，原项目是由三个标准项目组成，名称和序号分别为：Q 热病原分离培养方法（20121541-T-326）、Q 热病原核酸扩增方法（20121542-T-326）和 Q 热血清学方法（20121543-T-3261）。根据标委会 2014 年确定的新的体系表，每种疫病都应有一个综合诊断技术标准，但是 2012 年立项的三个标准都为单项检测技术标准，不符合标委会新体系表的要求。故秘书处建议将 3 个标准合并成 1 个综合诊断技术标准送审。全国动物卫生标准化技术委员会秘书处于 2016 年 3 月 29 日和 6 月 29 日分别通过邮件通知标准起草人，建议将“20121541-T-326 Q 热病原分离培养方法”、“20121542-T-326 Q 热病原核酸扩增方法”和“20121543-T-326 Q 热血清学检测方法”三个标准草案合并成一个标准，名字改为“动物 Q 热诊断技术”。2017 年 4 月，标准项目承担单位中国检验检疫科学研究院同意将项目合并。2016 年底秘书处上报的复审结论中，已经申请将三个标准合并成一个标准完成。2018 年 10 月 31 日合并后的标准送审稿上报秘书处审核后，接秘书处电话通知，建议拆分为三项国家标准，名称分别为“动物 Q 热诊断技术”、“动物 Q 热 TaqMan 荧光定量检测方法”和“动物 Q 热间接 ELISA 检测方法”。

（二）起草单位

中国检验检疫科学研究院，是国家设立的公益性中央研究机构。主要任务是开展检验检测应用研究，以及相关基础、高新技术和软科学研究，着重解决检验检测检疫工作中带有全局性、综合性、关键性、突发性、基础性的科学技术问题，为国家检验检测检疫决策、市场综合监管和综合执法提供技术支持，为质量安全科普教育及社会实践培训提供科技服务。

2011 年至 2014 年，中国检验检疫科学研究院研究团队完成了公益性行业科研专项《动物 Q 热检疫技术及标准研究》（201110247），建立了动物 Q 热贝氏柯克斯体多重 PCR 检测方法、荧光定量 PCR 检测方法和间接 ELISA 检测方法等多种 Q 热抗原和抗体检测方法，上述方法经过验证，适用于动物 Q 热的诊断。

（三）主要工作过程

1. 起草阶段

接到标准编写的任务后，主要参考 OIE 最新公布的 2.1.12.-Q fever 的有关章节以及在科研工作中收集的技术资料和国内外动物 Q 热诊断技术的相关文献，设计试验方案，并进行大量试验后，开始编制该项标准的“征求意见稿”。

2. 征求意见阶段

征求意见稿发送到重要口岸出入境检验检疫技术中心、中科院、农科院、省级动物疫病预防控制中心、农业大学、军事兽医研究所等相关单位征求意见，根据专家意见修改标准草案，形成送审稿，上报动物卫生防疫标准委员会。

3. 审查和报批阶段

根据动物卫生防疫标准委员会对送审稿提出的审查意见进行了修改，并于 2018 年 11 月 19 日上报了标准送审材料。标委会于 2018 年 12 月 24 日在北京组织专家对标准送审稿进行了会议审查，会上各位专家对标准送审稿和标准说明进行了详细的审查和质询，并提出了如下意见：

（1）该《动物 Q 热诊断技术》是在充分查阅相关文献基础上，并依据公益性行业科研专项

《动物 Q 热检疫技术及标准研究》(201110247) 获得的研究结果起草了本标准。该《标准》规定了 Q 热的诊断技术要求, 适用于 Q 热的诊断。

(2) 该《标准》内容叙述正确、简明, 内容编排和层次划分清晰合理。所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关政策, 并与相关法律、法规一致。适合我国国情, 具有实用性和可操作性。

(3) 建议标准起草小组对送审稿和标准起草说明进行下列修改和补充:

- ①流行病学、临床症状和病理变化部分需要重新整理撰写。
- ②样品的采集要优先排序。
- ③病原鉴定部分参考 OIE 的标准编写。
- ④全文对 Q 热和 Q 热伯奈特柯克斯体的应用要规范修改。
- ⑤对全文文字和文句按各位专家提出的具体意见进行规范性修改。

(4) 专家组原则上同意通过审定, 建议标准起草小组根据专家组意见, 完善文字表述后形成报批稿。

标准起草小组, 根据专家意见, 对标准送审稿进行了详细修改, 形成“动物 Q 热诊断技术”报批稿上报动物卫生防疫标准委员会。

(四) 主要起草人及其所做的工作

王慧煜: 设计试验方案, 主持和起草本标准;
吕继洲、张永宁: 协助设计试验方案, 验证性试验和应用试验;
袁向芬、王彩霞: 实验室试验, 参与标准草案的编写工作;
邓俊花、韩雪清: 试验条件的优化及方法的建立;
孔玉方、吴绍强: 试验条件的优化及方法的建立;
贾广乐、陈晨: 参与标准的病原分离部分的起草及编写工作;
王勤、张旻、刘丹丹等: 参与标准的起草工作。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

(一) 标准编制原则

在编写本标准过程中主要参考 OIE 公布的 2.1.12.-Q fever 的有关章节以及在科研工作中收集的技术文献和国内外动物 Q 热诊断技术的相关资料; 征求标准编写单位中国检验检疫科学研究院等专家意见并结合科研工作中的实践经验编制而成。

(二) 提出本标准的依据

Q热是由伯奈特柯克斯体(*Coxiella Burnetii*)引起的一种自然疫源性人畜共患传染病, 是危害世界畜牧养殖业的主要疾病, 我国将其列为二类动物疫病。该病对理化因素有较强的抵抗力, 该病以蜱为媒介, 在袋鼠, 野兔及其他野生动物中循环, 形成自然疫源地。病原体从自然疫源地转至大哺乳动物(如牛、羊等家畜)而造成感染, 在通过这些动物的胎盘、乳汁等排泄物, 在家畜之间经污染的空气而广泛传播, 从而形成另一完全独立循环的疫源地, 且能传播该病的硬蜱和软蜱已有50多种, 在野生动物中, 能自然感染Q者达60多种。Q热存在宿主依赖的相变异现象, 即致病性抗原 I 相, 见于被感染的人和动物, 非致病性抗原 II 相, 经鸡胚和细胞反复传代获得^[2]。人患Q热表现为急性型(肺炎、肝炎)或严重的慢性型(心内膜炎), 牛患Q热的症状有流产、死胎或弱犊、胎衣不下、子宫内膜炎和不育, 小反刍畜患Q热常伴发畜群突然流产, 紧接着无并发病状康复, 但感染则持续多年或终生。绵羊、山羊和牛主要呈无症状带菌, 但在分娩时排出大量病原菌, 并在分泌物和排泄物中间歇排菌。

该病于1935年在澳大利亚屠宰场工人中首次被发现, 本病分布于五大洲的大部分国家和地区, 我国于1950年首先发现本病, 目前已证实内蒙古、四川、云南、新疆、西藏等10多个省、市、自治区存在本病。2009年在荷兰扑杀4万多头怀孕母羊防止Q热疫情的扩散, 2010

年，荷兰再次爆发Q热，且导致10余人的死亡，2013年黑山共和国发生Q热疫情。口岸检疫部门经常在进口羊驼等动物中检出Q热抗体阳性。

本标准在借鉴 OIE 相关规定及国内外发表文献的基础上，建立了 Q 热伯奈特柯克斯体病原分离方法和 PCR 方法，为出入境检验检疫把关和国内伯奈特柯克斯体的流行病学普查所使用。为保护我国畜牧养殖业生产安全及人体健康、促进国际贸易的顺利发展，防止 Q 热的广泛传播具有重要的现实意义和应用价值。

（三）制定本标准的基础

中国检验检疫科学研究院在国家质检总局公益性行业科研专项经费资助下开展了“动物 Q 热病原核酸扩增检测方法技术规范”，建立了 Q 热伯奈特柯克斯体病原分离方法、PCR 方法。该一系列方法具有快速，敏感，高通量，可操作性强等优点。所建立的方法在有关养殖场进行了验证和应用，取得了良好的经济和社会效益。这些验证试验和应用过程为制定本标准奠定了坚实的基础。

（四）实验内容

1. Q 热病原 (*C. burnetii*) 病原的分离培养

伯奈特柯克斯体 *C. burnetii* 细菌的小量试验培养

(1) 将处理好的组织样本处理液用 PBS 制成匀浆，1000rpm/min，低速离心 5min。

(2) 取 100 μ L 稀释好的匀浆液上清接种 5 日龄 SPF 鸡胚，用卵黄囊接种的方法，放入含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养，并把改天记录为 0 天。

(3) 培养至第 5 天，取出鸡胚观察，如果 5 天内，鸡胚死亡的则应该弃去。鸡胚正常的则继续培养。

(4) 收集已孵化至 10-15 天的死亡鸡胚卵黄囊。进行下一步试验。

伯奈特柯克斯体 *C. burnetii* 细菌的灭活

伯奈特柯克斯体 *C. burnetii* 细菌的灭活步骤

(1) 在 4 $^{\circ}$ C 低温条件下，取上述培养好的 100mL 卵黄液，12000rpm/min，离心 15 分钟。

(2) 在生物安全柜中，弃去上清，加入 500 μ L 高压双蒸水重悬细菌沉淀，按 100 μ L 每管分别加入 5 个 50mL 的细胞培养瓶中，再在每个细胞培养瓶中分别加入 5mL (质量值) 0.5% 甲醛溶液，作好标记，放置 37 $^{\circ}$ C 度温箱灭活 2 天共 48 小时。

伯奈特柯克斯体 *C. burnetii* 细菌的鉴定

染色镜检

(1) 取卵黄囊壁轻触玻片，使其在玻片上形成薄层膜，自然风干。

(2) 丙酮或甲醇固定印记，滴加姬姆萨染液 4-5 滴，固定 1 分钟。

(3) 然后按 1: (1-2) 的比例加缓冲液 (pH6.4-6.8 的磷酸盐缓冲液) 用洗耳球吹匀，染色 5-10 分钟，流水冲洗，晾干。

(4) 置于 400-1000 \times 显微镜下观察。

免疫荧光试验操作方法

(1) 将上述感染培养 48 小时细胞用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定细胞，10-15 分钟。

(2) 用 PBS 洗三次，每次 5 分钟。

(3) 用 0.2-0.5% Triton X-100 (用 PBS 配制) 反应 10 分钟，对细胞进行透化处理。重复步骤 4。

(4) 用 10% 的脱脂奶进行封闭，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，重复步骤 4。

(5) 用 PBS 稀释，按 1: 5000 加入抗 *C. burnetii* 表面抗原 Com1 蛋白的单抗 (6E8)，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟，重复步骤 4。

(6) 加入 mcherry (红色荧光) 标记的兔抗鼠 IgG 荧光二抗 (1: 5000)，37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟，用 PBS 洗涤 4-5 次，每次 5 分钟。于荧光显微镜下观察细胞是否有红色荧光的出现。

2. Q 热伯奈特柯克斯体 PCR 检测方法

PCR 检测体系及扩增程序

以样品基因组 DNA 为模板，以本实验室制备的含 IS1111 序列构建的阳性质粒为阳性对照，根据 Genbank 发表的 Q 热伯奈特柯克斯体编码转位酶的 IS1111 基因序列设计特异性引物对 IS1111 F/IS1111 R 进行聚合酶链式反应，预期扩增片段长度为 463bp，引物序列如下：

上游引物 IS1111 F: 5'- CAATGAAATGGACCCACC-3'

下游引物 IS1111 R: 5'- ATCGCGTATCTTTAACAGC-3'

引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。灭菌双蒸水稀释引物为 10 μ mol/L，分装，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR 反应体系：在 PCR 管内，加入 Pfu DNA polymerase buffer 2.5 μ L，5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L，10 μ mol/L IS1111 F/ IS1111 R 各 0.5 μ L，2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L，模板 DNA 0.5 μ L，补充 ddH₂O 至 25 μ L。

PCR 扩增参数为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min；之后 95 $^{\circ}$ C 变性 1min，51.4 $^{\circ}$ C 退火 1min，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，扩增 30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 补充延伸 10min。每次反应均设立不含 DNA 模板的阴性对照和已知伯奈特柯克斯体 DNA 的阳性对照。

PCR 产物电泳

取 PCR 产物 5 μ L，加入 1 μ l 的 6 \times Loading Buffer，混匀，点样到 1% 琼脂糖凝胶中（已含 0.1% Gene colour 荧光染料），放于 1 \times TAE 缓冲液中，80V 电压下电泳 20-25min。紫外凝胶成像系统下观察，记录拍照并分析 PCR 结果，见图 1。

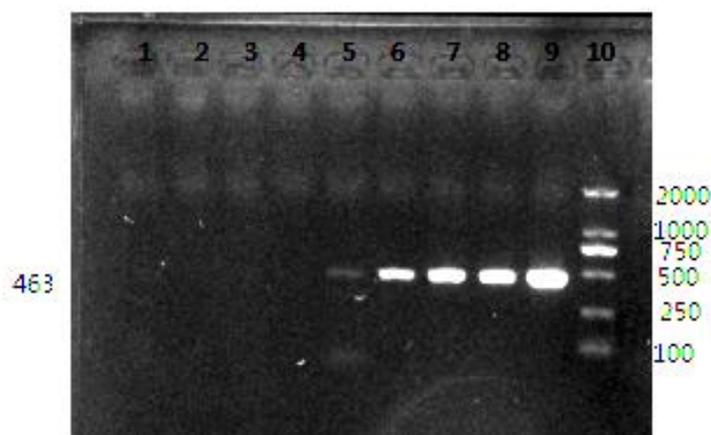


图 1 伯奈特柯克斯体 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图

PCR 扩增产物测序

将 PCR 电泳鉴定为阳性的产物送往英潍捷基（上海）贸易有限公司进行测序。测序结果如下：

```
ATCGCGTATCTTTAACAGCGCTTGAACGTCTTGTTGTTCCACCGTTTTACCCCGCA  
CAAACCGCATCGAGGCGCGGAAGCCGCTTCAGCTATCGCCTGCGCATCGTTACGATC  
ATTCTTGTTACTTTTGACATACGGTTTGACGTGCTGCGGACTGATCAACTGCGTTGGGA  
TACCCATCCCCATAAACGTCCGATAACCAATGGTTCGCTCCTCCACACGCTTCCATCACC  
ACGCAGCCCACCTTAAGACTGGCTACGGTGGATACATACTGAGCACGCTTAACCCGTC  
TCGTGTAGATCACTTTACCCCACTCATCAATTCCACACAGTTGAAAACATCTTTTGCA  
ATATCAACACCCAGTATTTTAATATCTTTCATGGACCTTCTCCTTTTTTTGAAAATAGAAA  
TTCTATGTTGGCGCAATTATGACGCCGTCTTTAAGGGGTGGGTCCATTTTCATTG
```

核酸序列测定结果显示，该目的基因的 PCR 产物大小为 463bp，将测序结果与 Genbank

上的序列经行对比, 结果发现样品基因片段的碱基序列与 Genbank 中 IS1111 (*Coxiella burnetii* transposase (IS1111a) gene M80806) 的一致率为 99%, 因此可初步确定为伯奈特柯克斯体。

(五) 实际应用效果

本标准中 Q 热核酸扩增检测方法在国内部分养殖场进行了验证, 在新疆局应用于牛和羊的 Q 热核酸扩增方法, 结果证明, 该研究所建立的 Q 热核酸扩增方法具有敏感性高, 特异性强等优点, 为我国 Q 热分子生物学检测方法提供了有力的技术支持。

三、主要试验或验证的分析、综述报告, 技术经济论证, 预期的经济效果

(一) 主要试验和验证的分析

Q 热的检测可采用多种方法, 如病原分离, 聚合酶链式反应, 但最常用的有三种方法: 间接荧光抗体试验 (IFA), 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和补体结合试验。在医学方面, 免疫荧光试验是 Q 热血清学诊断的标准方法, 而 ELISA 方法因其具有很高的敏感性和很好的特异性而广泛使用, 且适合大量的样品检测。本项目从分子生物学入手, 借助 PCR 扩增技术和 TaqMan 荧光定量等技术, 建立了动物 Q 热 PCR 检测方法、荧光定量 PCR 方法, 根据 Q 热 IS1111 基因序列设计引物, 成功构建了 Q 热伯奈特柯克斯体 PCR 方法、Q 热伯奈特柯克斯体荧光定量 PCR 方法 (TaqMan 荧光定量 PCR 方法)。通过对布鲁氏杆菌, 结核分枝杆菌, 康氏立克次体、立氏立克次体、莫氏立克次体、普氏立克次体进行特异性检测, 该方法特异性好, 对 Q 热标准阳性样本能出现特异性的扩增。本项目从血清学入手, 采用无细胞培养的伯奈特柯克斯体 II 相抗原为包被抗原, 建立了间接酶联免疫吸附试验, 操作简便, 方法特异灵敏, 特异。

实验室诊断样品可采集胎盘、阴道分泌物、流产胎儿胃内容物、奶汁、粪便等, 使用 Stamp's 染色、改良萋-尼氏染色、吉曼尼兹 (Gimenez's) 染色等方法, 是检测病原菌感染 Q 热的方法之一, *C.Burnetii* 可能与鸚鵡热衣原体和布鲁氏菌相混淆, 应结合其他方法一起进行鉴定, 聚合酶链式反应 (PCR) 比传统的染色法更加特异和敏感, 对筛选大量和多种样本非常有力, 同时应用于 PCR 方法检测的样本, 可以进行加热灭活, 确保实验人员安全。该标准根据 Q 热 IS1111 基因序列设计引物, 建立多种 PCR 检测方法, 在用于临床样本检测时, 使该方法的敏感性和特异性提高。TaqMan 探针法在退火温度为 57.7℃时, 能检出 10 个拷贝数。对临床样本的检测有很大的适用性。

II 相抗原是缺失了 LPS 的弱毒株, 但 I 相强毒株与 II 相弱毒株相比蛋白质抗原基本一致, 抗原诊断区别不大。从操作要求和培养安全来说, II 相抗原对生物安全要求低, 且对人的感染威胁降低。同时, 在受感染的宿主体内, 伯奈特柯克斯体 I 相抗原在感染的早期可以诱发产生 II 相抗体, 感染的晚期产生 I 相抗体。II 相抗原可以与早期的血清进行反应, 检测 II 相抗体, I 相抗原只能与晚期血清发生反应, 检测 I 相抗体。该标准以 Q 热 II 相抗原为包被抗原, 建立的间接酶联免疫吸附试验检测方法使用于临床样本的大批量检测及病原的确诊。

本研究对 Q 热病原 PCR 方法在养殖场进行了应用验证试验, 对新疆, 河北, 宁夏等地的奶牛和羊的血液样品进行随机取样检测, 共检测牛血液样本 352 份, 其中阳性样本 36 份, 感染率为 10.23%, 羊血清样本 316 份, 其中阳性样本 52 份, 感染率为 16.46%。该检测是 Q 热核酸检测方法在养殖场的检测中的应用, 阻止了动物 Q 热疫病的传入, 对保护我国畜牧业的健康发展具有重要意义。

(二) 预期的经济效果

本标准建立的 Q 热核酸扩增检测方法操作简便, 方法敏感, 特异, 检测时间短, 适用于大批量临床样本的检测, 适用于牛群, 羊群的监测与清栏工作, 适合日常检测与应用。因

IS1111 基因在贝氏柯克斯体基因组存在多个拷贝，可有效的用于鉴定 Q 热病原^[4]。本研究选取该基因作为核酸扩增检测方法所用基因，建立多种核酸扩增检测方法。本实验设计的引物与探针序列，优化了目的片段扩增长度以及探针所在位置，使其扩增效率更高，特异性更好。能够提高其检测灵敏度和特异性。实验通过对血液或组织样本的基因组的提取，通过三种方法的核酸扩增得到相对应的扩增产物，上述方法全面而具有可操作性，可以实现对大量样品的检测与疫病监测。对于养殖业及相关产品的检疫具有重要的指导意义，对伯奈特柯克斯体的防治与诊断有着重要意义，维护国内畜牧业的健康发展，同时对国内动物 Q 热（主要为牛和羊）感染情况做到及时的监控与防患。

Q 热是一种人畜共患传染病，OIE 规定其为 B 类传染病，我国将其划为动物二类疫病。该病原是伯奈特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）（原名贝氏立克次体，*Rickettsia burnetii*）该病愈 1935 年在澳大利亚屠宰场工人中首次发现，患者表现不明原因的热性病症状，因而称之为 Q 热（“Q”为英文 Query 的第一个字母，即疑问之意），后来确定此病是有伯奈特柯克斯体引起。

本标准的实施，不仅有助于提高国内养殖场动物 Q 热检验检疫的监管力度，而且可以有效的掌握 Q 热伯奈特柯克斯体流行情况，保护国内畜牧业的健康发展，并为国内伯奈特柯克斯体的检测及流行病学调查提供技术储备。上述对于 Q 热病原的检测方法，快速、经济、有效，能够对病原进行准确的检测，且检测灵敏度较高，特异性良好，适用于动物（主要为牛和羊）及其相关产品的诊断，可大大减少因伯奈特柯克斯体感染引起的流产，死胎等问题所带来的直接经济损失。本标准规定的方法对伯奈特柯克斯体的流行病学调查、疫病的综合防制以及疫情暴发时的监控具有非常重要的价值，具有广阔的应用前景。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

本标准以 OIE 指南为主要依据，根据进出动物及相关产品检疫要求，制定了 Q 热核酸扩增检测方法和血清抗体检测方法技术规范，所规定的方法符合 OIE 的国际标准要求，可操作性强。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

目前有关动物 Q 热伯奈特柯克斯体检测方法的国家或行业标准有伯奈特柯克斯体 PCR 检测方法，Q 热检疫技术规范，本系列标准在此基础上增加了 Q 热荧光定量 PCR 检测方法，Q 热间接 ELISA 检测方法，使检测体系更加完善，检测结果灵敏、准确，特异性更好，为保护我国畜牧业的生产安全及人体健康、促进国际贸易的顺利发展，防止伯奈特柯克斯体的传播具有重要的现实意义和应用价值。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

建议将《动物动物 Q 热诊断技术》批为推荐性标准，是对动物 Q 热伯奈特柯克斯体现有标准体系的补充和完善。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

标准发布后，建议相关部门尽快组装试剂盒，在全国范围推广应用；同时建议有关部门

拨专款给标准起草单位，举办全国技术培训班，对有关技术人员进行技术操作培训，使技术人员能够独立操作。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。