

第4.9章 家畜和马卵母细胞和体外胚胎的采集和处理

第4.9.1条

控制目的

动物体外胚胎生产技术主要操作步骤包括：从供体卵巢采集卵母细胞，卵母细胞体外成熟和受精，然后将受精卵培养至桑椹胚或囊胚阶段以备植入受体。官方对动物体外胚胎的国际贸易进行卫生控制的目的在于确保胚胎无特定病原体传播风险，避免将感染传播给受体动物和后代。本章的规定同样适用于体外成熟（IVM）的卵母细胞运输。

第4.9.2条

关于胚胎生产小组的规定

胚胎生产小组由具有资质的技术人员组成，至少包括一名兽医。该生产小组负责采集和处理卵巢和卵母细胞，以及生产和保存体外受精胚胎。小组应符合下列条件：

- 1) 小组应经过兽医主管部门批准认可。
- 2) 小组应接受组内兽医的监督指导。
- 3) 小组兽医负责胚胎生产小组的各项操作，包括卵巢和卵母细胞的卫生采集，以及国际贸易用胚胎生产的所有其他相关程序。
- 4) 小组所有成员应接受疫病控制原则和技术的相关培训，应按标准严格执行卫生措施以防止引入感染。
- 5) 生产小组应为以下操作配备足够的仪器设备和设施：
 - a) 卵巢或卵母细胞的采集；
 - b) 在固定或移动实验室进行卵母细胞和胚胎加工；
 - c) 卵母细胞或胚胎的贮存。

上述设施不一定放在同一地点。

- 6) 胚胎生产小组应将其各项活动记录在案，该记录在胚胎出口后至少保存两年，供兽医机构检查。
- 7) 胚胎生产小组应定期接受官方兽医检查，每年至少一次，确保卵母细胞的采集、加工，胚胎生产和贮存符合相关规程。

第4.9.3条

关于胚胎加工实验室的规定

胚胎生产小组可使用移动或固定加工实验室，该实验室可设在卵母细胞采集区域附近，也可设在独立区域。在该实验室完成的操作主要是将从卵巢中采集的卵母细胞进行体外成熟并人工授精，将获得的胚胎进行体外培养。

在该实验室内也可对胚胎进行其他必要的处理，如洗涤、贮存和检疫。

另外：

- 1) 实验室应在小组兽医的直接监督之下，并接受官方兽医定期检查。
- 2) 在出口用胚胎加工处理并置于安瓿、小瓶或吸管中保存前，不得在同一实验室回收或加工卫生状况较差的卵母细胞或胚胎。
- 3) 实验室应做好啮齿类动物和昆虫的防控工作。
- 4) 加工实验室的建筑材料应便于清洁和消毒。应经常对实验室进行清洁和消毒，并在每次出口胚胎加工前后进行清洁和消毒。
- 5) 根据国际胚胎技术协会手册的建议，加工实验室应拥有并采用适当的设施进行出口胚胎的处理和加工。

第4.9.4条

关于供体动物的规定

从供体动物采集用于体外胚胎生产的卵母细胞主要有两种途径：个体采集和批量采集，对这两种途径的建议有所差别。

个体采集通常在养殖场或实验室内从活体动物卵巢内采集卵母细胞，偶尔也可通过外科手术切取卵巢，从中抽取卵母细胞。从动物活体内采集卵母细胞时，卵母细胞供体应按照本法典第4.8.4条规定处理。

进行个体采集时，清洗和消毒相应设备（如超声波引导探头）尤为重要。按照《国际胚胎技术协会手册》的规定，采集每一个供体的前后均应清洗及消毒设备。

批量采集通常从屠宰厂所宰杀的动物体内取出卵巢，然后将这些卵巢运至加工实验室，在实验室采用抽吸法或切割法从卵泡中采集卵母细胞。批量采集的缺点是通常不可能将运送到实验室的卵巢溯源至屠宰厂宰杀的供体。这种做法的关键是确保获得健康的卵巢，并保证从供体取出及将其运至实验室的整个过程完全符合卫生要求。

另外：

- 1) 兽医机构应掌握供体动物来源畜群的情况。

- 2) 供体动物不应来自存在口蹄疫或小反刍兽疫疫情的畜群,也不能在疫区或因上述疫病实行控制的地区采集体外胚胎生产用相关组织及抽取卵母细胞。
- 3) 如从活体动物采集卵母细胞,应根据相关疫病潜伏期对供体动物和供体畜群进行采集后监测,用于供体卫生状况回顾性评价。
- 4) 如卵母细胞源自屠宰厂批量采集卵巢,屠宰厂应经官方批准且由兽医人员直接监管,兽医职责是保障对供体动物实施严格的宰前与宰后检疫检验,确保供体动物不存在上述2)所列疫病的临床症状或病理学变化。
- 5) 在屠宰厂宰杀的供体动物不得是因法定通报疫病而遭强制性宰杀的动物,也不得与这些动物同时宰杀。
- 6) 在对供体动物的宰前与宰后检疫检验未获得完全满意结果之前,不得将从屠宰厂批量采集的卵巢和其他组织运到加工实验室。
- 7) 摘取和运输卵巢和其他组织的仪器设备在使用前应清洗并消毒,且应为专用设备。
- 8) 所有供体动物的身份和来源记录应在胚胎出口后保存至少2年,以备兽医机构检查。如无法满足此要求,则应保留供体动物来源畜群的标识记录。

第4.9.5条

检测与处理

确保体外胚胎无传播疫病风险的一种补充方法是检测各种材料,以确认不存在第4.9.4条2)中所列病原体。

这些检测也可用于评估加工实验室的质量控制程序是否达到标准。

可检测下列材料:

- 1) 出口用体外胚胎生产线上任一生产阶段的无活性卵母细胞或胚胎;
- 2) 精液与卵母细胞混合进行体外授精之前采集的体外成熟培养液样本;
- 3) 胚胎贮存前提取的胚胎培养液样本;
- 4) 对胚胎进行10次洗涤的最后3次洗涤液混合液。

上述样本应4℃保存,24小时内进行检测。如24小时内无法检测,样本应在-70℃或更低温度冷冻保存。

另外:

- 1) 用于体外授精的精液采集和处理应符合第4.6章的要求,并满足第4.7章相关动物种类以及有关OIE名录疫病章节的卫生要求。

如果供精动物死亡或采样时供精动物的某传染病或关注疫病状况未知,可对剩余的胚胎进行补充检测,以证实无相关传染病传播。另一种替代方案是检测同一天采集的留样精液。

- 2) 在卵母细胞采集、成熟、受精、培养、洗涤和贮存中的任何动物产品，包括共培养的细胞和培养基成分，均不应含病原体。培养基在使用前应采用《国际胚胎技术协会手册》认可的方法灭菌，并作恰当处理，以确保保持无菌状态。应按照《国际胚胎技术协会手册》的建议，在所有液体和培养基中添加抗生素。
- 3) 所有用于采集、处理、培养、洗涤、冷冻和贮存卵母细胞或胚胎的仪器设备应为新设备，或在临使用前按照《国际胚胎技术协会手册》的建议进行清洁和消毒。

第4.9.6条

风险管理

尽管体外胚胎移植的疫病传播风险没有体内分离胚胎那么低，但仍是一种可用的疫病传播风险低的动物遗传物质转移方式。应注意的是，第4.8.14条中国际胚胎技术协会分类适用于体内分离胚胎的疫病和病原体，但不适用于体外胚胎。无论动物种类如何，在胚胎生产和转移过程中，主要有三个阶段决定最终风险水平：

- 1) 第一个阶段涉及潜在的卵巢、卵母细胞或胚胎污染风险，该风险取决于：
 - a) 出口国或地区的动物疫病状况；
 - b) 用于采集卵巢、卵母细胞、胚胎或供卵母细胞受精的精液供体动物群的卫生状况；
 - c) 第4.9.4条2)所列病原体的特性。
- 2) 第二阶段涉及采用《国际胚胎技术协会手册》规定的国际公认的减低胚胎处理风险程序，这些程序如下：
 - a) 卵母细胞和胚胎应在每个生产阶段间洗涤；
 - b) 体外培养阶段结束后，胚胎应至少洗涤10次，每次洗涤应至少稀释100倍，且每次转移胚胎均应更换新移液管；
 - c) 只有来自同一供体动物（个体采集）或来自同一批（批量采集）的胚胎才能一起洗涤，且每次洗涤不得超过10个胚胎；
 - d) 如需灭活或消除某一特定病毒，如牛疱疹病毒1型、伪狂犬病病毒，应根据《国际胚胎技术协会手册》的规定，适当修改标准清洗流程，增加胰酶清洗处理这一环节；
 - e) 洗涤后，应在50倍或以上显微镜下观察每个胚胎整个表面，以确保透明带完整且无附着物。
- 3) 第三个阶段涉及采取以下降低感染风险措施，适用于第4.8.14条第2点所列疫病：
 - a) 根据已知疫病潜伏期，对供体动物及其所在动物群进行采集后监测，在胚胎贮存期间（如低温保存），对出口国/地区供体动物卫生状况进行回顾性确定。虽无法对从屠宰厂批量采集的卵母细胞进行供体采集后监测，但有可能监测动物所在的种群。
 - b) 对卵母细胞、胚胎、共培养细胞、培养基和其他样本（如血液，参见第4.9.5条）进行病原体实验室检测。

第4.9.7条

关于卵母细胞和胚胎贮存、运输和出口的规定

卵母细胞和体外生产的胚胎可在新鲜、冷藏或冷冻状态下进行贮存和运输。

新鲜胚胎在运输过程中可置于便携式培养箱中培养，并应在5天内到达受体动物所在地，以便及时移植成熟囊胚。冷藏胚胎应在冷藏后10天内完成移植。

兽医机构应了解各种可利用的卵母细胞和胚胎贮存系统，并应建立安全、及时检验和鉴定这些卵母细胞和胚胎的程序，以确保其活力。

- 1) 仅来自于同一供体或同一批采集的胚胎方可保存于同一安瓿、小瓶或吸管内。
- 2) 对于冷冻卵母细胞和胚胎：
 - a) 无菌安瓿、小瓶或吸管应在冷冻前或玻璃化后密封，并应根据《国际胚胎技术协会手册》的要求标记；
 - b) 冷冻卵母细胞和胚胎应在此前未使用过的液氮中冷冻，然后在严格的卫生条件下，放入从未使用过的液氮液相或气相消毒容器内贮存；
 - c) 液氮容器应在出口装运前密封。
- 3) 对于新鲜或冷藏的卵母细胞和胚胎：
 - a) 无菌安瓿、小瓶或吸管应在放入便携式培养箱中之前密封，并按照《国际胚胎技术协会手册》的要求标记；
 - b) 应在严格的卫生条件下，将新鲜或冷藏的卵母细胞和胚胎存放于按《国际胚胎技术协会手册》和制造商说明进行消毒的便携式培养箱中；
 - c) 便携式培养箱应在出口装运前密封。
- 4) 卵母细胞和胚胎在获得相应兽医证明书后方可出口。

第4.9.8条

显微操作规程

如需进行胚胎显微操作，应在完成第4.9.6条2)要求的处理后，按照第4.10章的规定进行。

注：于1992年首次通过，于2018年最新修订。