



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

动物 Q 热诊断技术

Diagnosis technology of animal Q fever

(报批稿)

(本稿完成日期：2018.11.28)

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中国农业大学。

本标准主要起草人：王慧煜、吕继洲、张永宁、袁向芬、邓俊花、王彩霞、吴绍强、韩雪清、贾广乐、孔玉方、王勤、张旻、林祥梅、陈晨、刘丹丹、崔贝贝、诸明欣。

引 言

Q热是由伯奈特柯克斯体（*Coxiella Burnetii*，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；在兽医上主要感染家畜畜牧生产中主要侵袭牛、羊等反刍动物和犬、猫等伴侣动物。伯奈特柯克斯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、螨等叮咬或受感染的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。该病于1935年首次发现于澳大利亚屠宰场的工人，中国于1950年证实有该病存在，在四川、云南、新疆、内蒙古、西藏等10多省市地方性流行。

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热病原分离、Q热柯克斯体PCR方法操作规范，为Q热诊断所使用。

动物 Q 热诊断技术

1 范围

本标准规定了 Q 热诊断时的常规诊断、病原分离鉴定及 PCR 检测方法的技术要求和操作规范。本标准适用于牛、羊等 Q 热的诊断及可疑样品的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

陆生动物诊断试验和疫苗手册（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）

3 缩略语

下列术语和定义适用于本标准。

Q fever: Q热，是由伯奈特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）引起的一种自然疫源性人兽共患传染病，以蜱、螨等节肢动物为传播媒介，在动物中主要感染牛、羊，且是人类感染的重要储存宿主。

***Coxiella burnetii*:** 伯奈特柯克斯体，是引起Q热的病原体，属于原菌门、γ亚门、军团菌目、柯克斯体科、柯克斯体属。

DNA: 脱氧核糖核酸。

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase Chain Reaction)。

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。

bp: base pair, 碱基对。

4 临床诊断

4.1 流行病学

多种动物可以感染，在自然疫源地动物中，有90多种野生哺乳动物和70多种野鸟可自然感染；在经济疫源地或家居环境（家居型循环）的宿主动物主要是黄牛、水牛、奶牛、绵羊和山羊、马等，猫、犬、家兔、鸟等也参与Q热的传播循环，尤其是牛、羊，是人感染的主要传染源。动物可经消化道、呼吸道、垂直传播和性传播而感染，蜱、螨是重要传播媒介。Q热感染主要是通过吸入干燥的气溶胶颗粒、接触感染动物及其生殖组织而传播。摄入感染主要是通过饮、食未经消毒处理的、甚至经巴氏消毒的奶品。病原可在动物体内持续感染，经奶、粪便、尿排出病原，有时血液带菌。病原大量存在于生殖排出物（胎盘、羊水和胎儿），未孕动物传播风险较少。

4.2 临床症状

牛、羊患Q热的症状有流产、早产、死产、弱仔、胎衣不下、子宫内膜炎和不育。小反刍兽患Q热常伴发畜群突然流产，虽然康复但感染则持续多年。绵羊、山羊、牛呈无症状带菌者，在分娩时排出大量病原菌，并从分泌物和排泄物中间歇排菌。

4.3 病理变化

流产胎儿的脾脏、肝脏、肾脏和生殖器官有大小不一的坏死灶和增生组织（或肉芽肿）。

4.4 结果判定

易感动物出现上述临床症状和病理变化，可判定为疑似Q热。

确诊应采集有临床症状动物的胎盘、阴道分泌物、肝、肺或流产胎儿胃内容物、奶汁、初乳等样品，也可采集未见明显临床症状的易感动物血清、奶样等样品进行实验室诊断。

5 试剂和材料

除另有规定外，所用化学试剂均为分析纯。

5.1 Pfu DNA polymerase (2.5U/ μ L), Pfu DNA polymerase buffer, 10 \times Thermopol Reaction buffer, dNTP (2.5mmol/L), DL 2000 Marker, 6 \times Loading Buffer 均为商品化试剂。

5.2 5日龄 SPF 鸡胚。

5.3 人胚肺成纤维细胞 (HEL)。

5.4 姬姆萨(Giemsa's)染液：配制方法参见附录 A。

5.5 伯奈特柯克斯体表面抗原 Com1 蛋白的单克隆抗体 (6E8)。

5.6 红色荧光标记的兔抗鼠 IgG 抗体。

5.7 电泳缓冲液：配制方法参见附录 A。

5.8 4%多聚甲醛磷酸缓冲液：配制方法参见附录 A。

5.9 Tris-HCl(10mmol/L)：配制方法见附录 A。

5.10 DNA 提取液 (pH8.0)：配制方法见附录 A。或可应用等效的市售商品细菌或组织 DNA 提取试剂盒。

5.11 柠檬酸钠缓冲液：配制方法见附录 A。

5.12 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)：配制方法见附录 A。

6 仪器设备

6.1 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱。

6.2 -20 $^{\circ}$ C 低温冰箱。

- 6.3 -80℃的超低温冰箱。
- 6.4 组织捣碎机/匀浆仪。
- 6.5 冷冻高速离心机和离心管。
- 6.6 生物安全柜。
- 6.7 倒置显微镜。
- 6.8 荧光显微镜
- 6.9 PCR 仪。
- 6.10 恒温振荡器。
- 6.11 电泳仪。
- 6.12 凝胶成像仪或紫外透射仪。
- 6.13 高压灭菌锅。
- 6.14 水浴锅。
- 6.15 微量移液器及配套的吸头。

7 生物安全要求

由于Q热为人兽共患病，采样时应采取适当的生物安全防护。样品处理及检测过程所涉及的试验操作，须在生物安全柜或隔离设备中进行。活培养物或从感染物采集病料的操作，必须在三级生物安全实验室内进行。

8 采样及处理

8.1 采样技术要求

按照GB/T 18088和NY/T 541进行。

8.1.1 有临床症状的样品采集要求

采集流产、死胎或弱犊、胎衣不下、子宫内膜炎和不育病畜的胎盘、阴道分泌物、肝、肺或流产胎儿胃内容物、奶汁或初乳等样品。

8.1.2 无临床症状的样品采集要求

应采集能达到统计学显著意义数量的病畜样品。

8.1.3 监测目的的样品采集要求

监测时间应选在一年中最能观察到临床症状并能检测到该病的温度和季节进行采样。每次采样的动物样品数量要能代表所调查的情况和观察到的病变。

8.2 样品的采集

8.2.1 组织样品

流产、死胎或弱犊、胎衣不下、子宫内膜炎和不育病畜及患病畜群中健康动物的组织样品，用消毒的器械切取所需器官的组织块，每个组织块应单独放在已消毒的容器内，每份重量在10g~50g，容器壁上注明日期、组织和动物名称。注意防止组织间相互污染。

8.2.2 血液样品

用无菌注射器或真空采血管，由动物静脉无菌采血，并立即连续摇匀，充分混合。

8.2.3 奶液样品

无菌采集奶液于灭菌容器中，因后段奶液含菌量较多，早晨挤出的奶液含菌量最高，故尽量于清晨采取，将头3-4把乳汁弃去，采集此后的样品。

8.3 样品保存及运送

采取的样品须在取样后24小时内4℃冷藏送至实验室，要附有标签或采样单，清楚标明采样地点、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。

8.4 样品处理

8.4.1 组织样品

取适量组织样品，剪碎，按1:5的比例加入柠檬酸钠-磷酸缓冲液，充分研磨，加入等量4%氢氧化钠溶液，继续研磨5min~10min，使组织液化；移入离心管，充分振荡，75℃温浴0.5h~1h；取上清，15000×g离心10min，弃上清，加等量PBS，振荡混匀，使沉淀充分悬浮，15000×g离心10min，弃上清，重复步骤1次，收集沉淀物，置于-20℃贮存备用。

8.4.2 血样样品

取1mL~2mL全血样品，编号，15000×g离心10min，弃上清。加等体积灭菌双蒸水充分振荡，15000×g离心10min，弃上清，若红细胞裂解不完全，需采用灭菌双蒸水重复洗涤，收集沉淀物，置于-20℃贮存备用。

8.4.3 奶液样品

采集新鲜的10mL奶样，加100μL Triton X-100，振荡混匀，2500×g离心20min，弃上清，取沉淀，加1mL PBS，充分振荡混匀；将沉淀悬浮液移入微量离心管，15000×g离心10min，弃上清，收集沉淀物，置于-20℃贮存备用。

9 病原分离鉴定

9.1 鸡胚接种

将处理好的样品用含抗生素（链霉素100-200μg/mL和青霉素或庆大霉素50-100μg/mL）PBS制成匀浆，低速离心后，将上清接种5日龄SPF鸡胚卵黄囊，收集已孵化至10-15天的死亡鸡胚卵黄囊。

9.2 细胞接种

将处理好的样品用含抗生素（链霉素100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和青霉素或庆大霉素50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）PBS制成匀浆，低速离心后，将上清接种于长成单层的人胚肺成纤维细胞（HEL），700 $\times\text{g}$ 离心1h。接种后第3、10和21天分别用倒置显微镜检查HEL细胞空泡化。

9.3 动物接种

对杂菌污染严重的样品，如胎盘、阴道分泌物、奶汁等，须先接种小鼠或豚鼠，将处理好的样品用含抗生素（链霉素100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和青霉素或庆大霉素50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）PBS制成匀浆，低速离心后，每只腹膜内接种0.5mL上清液，进行体温和抗体检测。接种病料21天后采血检测抗体，阳性动物出现发热后宰杀，取脾接种鸡胚或细胞分离病原，并进行染色镜检。

9.4 染色镜检

将卵黄囊壁或细胞液轻触玻片，在载玻片上形成薄层膜，自然风干，丙酮或甲醇固定1min，滴加姬姆萨(Giemsa's)染液4滴~5滴，染色5min~10min，流水冲洗，晾干，置于500 \times 显微镜或油镜上观察。在蓝色或绿色背景下，观察到粉红色的杆状菌体，疑似Q热柯克斯体阳性。

9.5 免疫荧光鉴定

将上述疑似阳性的卵黄液或培养48h的细胞用4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定细胞10~15min，PBS洗3次，每次5min；用PBST（0.2-0.5% Triton X-100）反应10min，对细胞进行透化处理，重复上述洗涤步骤；用10%的脱脂奶进行封闭，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min，重复洗涤步骤；加入PBS按1：5000稀释的抗C.burnetii表面抗原Com1蛋白的单抗（6E8），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60min，重复洗涤步骤；加入用PBS按1：5000稀释的红色荧光标记的兔抗鼠IgG荧光二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育45min，重复洗涤步骤。阳性对照样品在显微镜下有点状荧光信号，阴性对照样品无荧光。在阴阳性样品成立的情况下，若检测样品有荧光信号则判定为阳性。无信号则为阴性。若标准阴阳性样品不成立，则需重复实验。

10 PCR 检测

10.1 DNA 提取

DNA提取之前，首先要用90 $^{\circ}\text{C}$ 30~60 min灭活处理。

参见附录中提取样品DNA的方法提取待检基因组DNA。除检测样品外，需要设立阴性、阳性及空白对照。

阳性对照：阳性质粒（通过测序与目标扩增序列一致）或标准Q热菌株模板DNA作为阳性对照

阴性对照：取健康动物同类样品作为阴性对照。

注：也可采用商品化的组织基因组DNA提取试剂盒进行。

10.2 PCR 用引物

根据IS1111基因保守序列，设计上下游引物。

上游引物：5'- CAATGAAATGGACCCACC-3'

下游引物：5'- ATCGCGTATCTTTAACAGC-3'

引物合成后采用灭菌ddH₂O均稀释为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，预期扩增片段长度为463bp（具体序列参见附录B.1）。

10.3 反应体系

在PCR管内，分别加入

反应液	用量
Pfu DNA polymerase buffer	2.5μL
Pfu DNA polymerase	0.5μL
10μmol/L 上游引物	0.5μL
10μmol/L 下游引物	0.5μL
dNTPs	2μL
模板DNA	5μL
补充ddH ₂ O至	25μL

PCR扩增时，除检测样品外，需要设立阴性、阳性及空白对照（以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照）。

10.4 反应程序

95℃预变性5min；95℃变性1min，51.4℃退火1min，72℃延伸1min，共30个循环；72℃延伸10min；4℃保存。

10.5 琼脂糖电泳

取5μL PCR扩增产物，于1.5%浓度的琼脂糖凝胶中电泳，电泳结束后，用紫外灯或凝胶成像仪观察扩增结果。

10.6 结果判定

10.6.1 试验成立的条件

阳性对照出现463bp左右大小的条带，阴性及空白对照没有扩增条带，则视为该实验成立。

10.6.2 样品检测结果

在实验成立的前提下，若检测样品有463bp的条带，PCR结果为阳性。将阳性的PCR扩增产物进行核酸序列测定，与GenBank中相对应片段的序列比对，其片段大小正确，同源性达到98%以上，结果表明该样品中存在Q热伯奈特柯克斯体病原核酸。

11 综合判断

临床判定为疑似的易感动物，经分离出病原，或经PCR检测结果为阳性的，可判定为Q热。

临床无明显特异性症状的易感动物，经本标准或国家标准 Q热TaqMan荧光定量PCR检测方法或国家标准 Q热间接ELISA检测方法检测出阳性的，可判定为Q热感染。

奶液等样品经本标准或国家标准 Q热TaqMan荧光定量PCR检测方法或国家标准 Q热间接ELISA检测方法检测出阳性的，可判定为Q热柯克斯体阳性。

附 录 A
(规范性附录)
样品 DNA 的提取及溶液配制

A. 1 姬姆萨Gimsa's染液的配制

A. 1.1 贮存液

称取姬姆萨粉末 0.5g, 甘油 25mL, 甲醇 25mL。先将姬姆萨粉末研细, 再逐滴加入甘油, 继续研磨, 最后加入甲醇, 在 56℃放置 24h或者室温放置 3~5d后即可使用。

A. 1.2 工作液

取贮存液采用蒸馏水 50 倍稀释即可, 临用时配制。

A. 2 电泳缓冲液 (50 倍TAE电泳浓缩缓冲液): 取Tris碱 242g、冰醋酸 57.1mL、0.5mol/L EDTA 10mL、用 5mol/L的 HCL 调制 pH 8.0, 定容至 1000mL。用前采用蒸馏水 50 倍稀释即可。

A. 3 4%多聚甲醛磷酸缓冲液

称取40g多聚甲醛加入至500mL PBS(0.1mol/L, pH 7.4)溶液中, 加热至60℃ (温度不宜过高, 防止甲醛逸出), 且边加热边搅拌, 同时滴加 0.1mol/L NaOH至多聚甲醛完全溶解。自然冷却后再用PBS定容至1000mL, 调pH至7.4。

A. 4 10mmol/L Tris-HCl: 0.1211gTris碱溶于 80mL双蒸水, 加浓盐酸调PH至 8.0, 加水定容至 100mL, 分装后高压灭菌。

A. 5 DNA提取液 (PH8.0): 100 mmol/L Tris-HCl; 100mmol/L Na₂EDTA; 100 mmol/L 磷酸钠; 1.5mol/L NaCl; 1% CTAB。

A. 6 柠檬酸钠缓冲液: 5.3 g C₆H₈O₇ · H₂O, 15g Na₃C₆H₅O₇ · H₂O, 16.2g C₆H₁₂O₆ · H₂O, 加 900mL双蒸水溶解, 定容至 1000mL, 混匀。用 (121±2) °C/0.1 MPa, 15min高压灭菌后贮存于室温。

A. 7 0.5mol/L EDTA (pH8.0): 186.1g EDTA加入 800mL蒸馏水中, 磁力搅拌器上剧烈搅拌, NaOH调pH8.0, 定容至值 1000mL, 分装, 用 (121±2) °C/0.1 MPa, 15min高压灭菌后贮存于室温。

A. 8 样品DNA的提取方法

A. 8.1 将处理好的样品中加入1.5mL EP管中, 加20μL蛋白酶K, 再加SDS至终浓度为1%, 上下颠倒混匀, 混合液置于55℃水浴2.5h;

A. 8.2 向匀浆液中按1:1比例加入酚/氯仿/异戊醇混合液 (25:24:1), 轻轻震荡混匀5min, 12000×g离心5min;

A. 8.3 吸上层水相800μL于一灭菌EP管中, 加入等体积酚/氯仿/异戊醇混合液, 轻轻震荡混匀5min, 12000×g离心5min;

A. 8.4 吸上层水相500μL于一灭菌EP管中, 加入两倍体积的无水乙醇, -20℃放置2h;

A. 8.5 12000×g离心5min, 沉淀DNA, 倾去上清液;

A. 8.6 于沉淀中加入75%乙醇溶液500μL, 轻轻混匀后12000×g离心5min, 倾去上清液, 室温凉干;

A. 8.7 向DNA沉淀中加TE缓冲液100μL溶解, -20℃保存备用。

A. 8. 8 也可采用等效的DNA提取试剂盒，按照说明书进行操作。

A. 9 1.5%琼脂糖凝胶

称取0.3g琼脂糖，置于三角瓶中，加入20mL 1×TAE缓冲液，将三角瓶置于微波炉加热至琼脂糖完全溶解。将冷却至65℃左右的琼脂糖凝胶液，加入核酸染料，充分混匀。将温热琼脂糖溶液倒入胶模中，使胶液缓慢地展开，直到在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层。凝胶的厚度在3mm~5mm之间。室温下静置30min左右，待凝固完全后，轻轻拔出梳子，在胶板上即形成相互隔开的上样孔。

附录 B

(资料性附录)

B.1 动物Q热伯奈特柯克斯体PCR463bp目标扩增序列

```

caat gaaatggacc caccoccttaa agacggcgtc ataatgcgcc aacatagaat ttctathttc aaaaaaagga
gaaggtccat gaaagatatt aaaatactgg gtggtgatat tgcaaaagat gtttttcaac tgtgtggaat
tgatgagtgg ggtaaagtga tctacacgag acgggttaag cgtgctcagt atgtatccac cgtagccagt
cttaaggtgg gctgcgtggt gatggaagcg tgtggaggag cgaaccattg gtatcggacg tttatgggga
tgggtatccc aacgcagttg atcagtccgc agcacgtcaa accgtatgtc aaaagtaaca agaatgatcg
taacgatgcg caggcgatag ctgaagcggc ttcccgcgcc tcgatgcggt ttgtgcaggg taaaacggtg
gaacaacaag acgttcaagc gctgttaaag atacgcgat

```

B.2 伯奈特柯克斯体PCR扩增产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳图

