

团体标准

T/ NAIA×××-××××

规模化肉牛场牛冠状病毒病诊断与防治技术 规程

Technical regulations for diagnosis, prevention and treatment of
Bovine coronavirus disease in large-scale beef cattle farms

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农林科学院动物科学研究所、宁夏大学、宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心、宁夏回族自治区兽药饲料监察所。

本标准主要起草人：郭亚男、王建东、梁小军、王秀琴、李知新、李昕、李继东、闫背背、杨萌萌、邵顺成、曹晓真、邵倩、白涛涛、李勇、祁燕蓉、张慧宁、谢文青、毛磊、施安、陈秀红、康晓冬、高海慧、张久盘。

本文件为首次发布。

规模化肉牛场牛冠状病毒病诊断与防治技术规程

1 范围

本文件规定了规模化肉牛场牛冠状病毒病诊断与防治技术的术语和定义、诊断、预防和治疗。

本文件适用于规模肉牛场牛冠状病毒病的防治。其他肉牛场参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；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

DB15/T 2194-2021 牛冠状病毒PCR检测方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 牛冠状病毒病 Bovine coronavirus

是指由牛冠状病毒引发犊牛以出血性腹泻为主要症状的传染病。

4 诊断

4.1 流行病学

牛冠状病毒多发于 7~10 日龄的犊牛。病牛和带毒牛是感染性腹泻的主要传染源。通过消化道、呼吸道、接触、胎盘和交配等途径传播。本病一年四季均可发生，尤以气候多变、寒冷季节和环境卫生较差时多发。

4.2 临床症状

犊牛感染后发生腹泻，发病初期出现带血的黄色黏性粪便，后期发展为水泻，有时出现脱水、虚弱、体温低，少数犊牛出现发热、卧地不起等症状，严重的犊牛会出现昏迷甚至死亡。成年牛常突然暴发，排出深褐色带血稀粪，伴有产奶下降、沉郁及厌食等症状。

4.3 病理变化

小肠肠壁变薄、透明，肠腔液体增多，严重者引起腹腔积水，胃内有未消化的凝乳块。感染的牛可

能伴随呼吸道症状，表现为气管黏膜充血、局限性肺炎等。

4.4 结果判断

出现 4.1、4.2、4.3，可判定为牛冠状病毒病疑似病例。

5 实验室诊断

5.1 主要仪器设备

电镜、低温高速离心机、倒置显微镜、CO₂ 细胞培养箱、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪。

5.2 主要试剂

PBS、2%磷钨酸、胰酶、HCT-8 细胞、PCR Taq 酶。

5.3 样品采集

5.3.1 粪便样品

将棉拭子伸入肛门内刮取新鲜粪便，放入装有 3 mL PBS 采样管中；也可无菌采集地上刚排出新鲜粪便。编号并记录相关信息。

5.3.2 组织样品

取病死牛肠道及内容物、肝、脾、淋巴结等，置于无菌密封袋或采样杯内。

5.4 样品处理

对于粪便样品，放入盛有 3 mL PBS 管中，充分振荡，12000 r/min 4℃离心 5 min~8 min，取上清备用；对于组织样品，称取 1 g 置于研钵，充分研磨后加 5 mL PBS，混匀，8000 r/min 4℃离心 5 min，取上清备用。将上清于 0.22 μm 滤器过滤，-80℃冰箱保存或直接接种细胞。

5.5 病原检测

5.5.1 病原检测

5.5.1.1 电镜检查

将采集的粪便或肠内容物用 PBS 制成 1:4 悬液，于盛有玻璃珠的管内充分震荡 30 min，取悬液 3000 r/min 离心 30 min，取上清，15000 r/min 离心 30 min，取上清，以 40000 r/min~50000 r/min 离心 3 h~5 h，弃上清，加 1~2 滴蒸馏水悬浮管内沉淀，滴加铜网，2%磷钨酸染色，电镜下观察病毒粒子形态。

5.5.1.2 病毒分离鉴定

将处理的样品接种 HCT-8 细胞进行病毒分离培养，根据中和试验（固定血清-稀释病毒法）进行病毒鉴定。

5.6 分子检测

5.5.1 基因组 RNA 提取

将 5.4 中样品上清或 5.5.1.2 中纯培养细胞毒用商品化试剂盒进行基因组 RNA 提取。提取方法按试剂盒说明书进行。

5.5.2 反转录

将 5.5.2 中的基因组 RNA 利用反转录试剂进行反转录（见附录表 A, B）。

5.5.3 基础 RPA 鉴定

应用基础 RPA 方法进行病原核酸检测，BRV 引物序列（见附录表 C）。

每次进行 RPA 扩增时，除检测样品外，均需设置阳性对照和阴性对照。

RPA 反应体系（见附录表 D），反应条件为 37 °C 20 min。

5.5.4 RPA 产物电泳

用 1×TAE 电泳缓冲液配制成 2%琼脂糖凝胶。取 5 μL 产物分别加入样品孔，同时在一加样孔中加入 DNA 分子量标准（DL500），以 5 V/cm 恒压电泳，30 min 后采用凝胶成像系统判定核酸片段大小。

5.5.5 RPA 结果判定

5.5.5.1 阳性对照出现一条 144 bp 大小的条带，且阴性对照不出现条带。

5.5.5.2 在满足 5.5.5.1 的条件下，被检样品的 RPA 产物经电泳后出现一条 144 bp 的条带判定为核酸阳性（+）；被检样品的 PCR 产物经电泳后不出现 144 bp 的条带判定为核酸阴性（-）（参见附录 B 中图 A）。

5.7 综合判定

5.7.1 确诊

符合 5.5.1.1、5.5.1.2、5.6，经实验室诊断任一检测结果为阳性可判定为牛冠状病毒病。

6 预防

6.1 加强饲养管理，保持卫生清洁。按照 GB/T 16568 和 NY/T 5049 的规定。

6.2 加强产房消毒卫生，产房需要保暖、宽敞、通风、干燥，产犊过程中排出物及时清除，随时消毒。6.3 在保证舍内温度的前提下，自然通风，保证牛舍干燥、舒适、温暖。

6.4 避免应激，消除可能降低机体抵抗力的各种应激因素。

6.5 自然哺乳母牛定期消毒乳头，防止致病微生物传染犊牛。

6.6 分娩时，落地犊牛口鼻切勿接触脏污。

6.7 初生犊牛及时哺喂初乳。犊牛出生后 1 h 内灌服经巴氏消毒的初乳 4 L，奶温 36℃~38℃，12 h 后视情况可再饲喂 2 L。

6.8 哺乳犊牛给予开食料，补充微量元素，饲料配比适当。

6.9 牛群防疫参照 NY 5047 的规定。

6.10 可注射牛冠状病毒疫苗，随着国内疫苗种类的丰富，及时调整免疫程序。

6.11 病死或死因不明牛按照《病死及病害动物无害化处理技术规范》及《病死畜禽和病害畜禽产品无害化处理管理办法》的规定处理。

7 治疗

7.1 兽药使用应符合 NY/T 5030 的规定。

7.2 针对冠状病毒引起的腹泻，及时隔离,防止继发感染;针对酸中毒，静脉注射 5%碳酸氢钠注射液，每次 100mL~200ml，或 1.9%乳酸钠溶液 500mL ~1000mL。

7.3 对持续腹泻不止的犊牛，可应用明矾、次硝酸铋、硅酸银、颠茄酊(或流浸膏),内服。

7.4 及时补充体液，若脱水仅占体重 8%以下时，给予口服补液;若脱水占体重 8%以上或腹泻严重时，应在给予口服补液的同时，皮下或静脉注射含有碳酸钠的林格氏液。

7.5 制止肠内腐败、发酵过程，除应用抗生素和磺胺类药物外，也可适当选用乳酸、克辽林等防腐制酵药物。

附录 A

表 A 反转录反应体系

试剂	使用量
RNase-free ddH ₂ O	10 μL
5× All-in-one Qrt sUPERMix	4 μL
Enzyme Mix	1 μL
模板 RNA	5 μL

表 B 反转录反应程序

温度	时间
50 °C	15 min
85 °C	5 sec

表 C 轮状病毒基础 RPA 引物序列信息

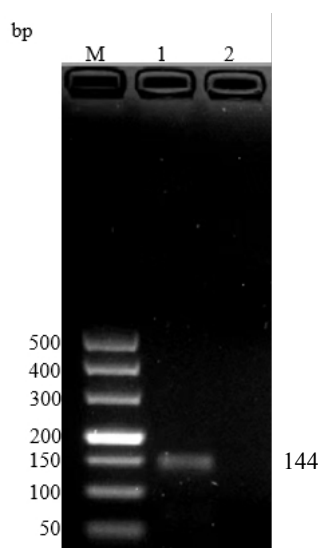
引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)	参考序列
BCoV-F	GCTAAGGGGTACTGGTACAGACACAACAGA	144	KT318094.
BCoV-R	TCCGTCAATGTCGGTGCCATACTGGTCTTT		

表 D RPA 反应体系

试剂	体积 μL
BRV-F1 (10 μM)	1.2 μL
BRV-R1 (10 μM)	1.2 μL
Rehydration buffer	14.75 μL
模板	1 μL
ddH ₂ O	5.6 μL
MgOAc	1.25 μL

附录 B

RPA 产物电泳图 A



M: DL500 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照
