

团体标准

T/ NAIA×××-××××

规模化牛场牛病毒性腹泻病毒（BVDV）基 因分型与防制

Technical regulations for genotyping and prevention of bovine viral
diarrhea virus (bvdv) in large-scale cattle farms

××××-××-××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。

专利免责声明：本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由宁夏回族自治区科技厅提出。

本文件由宁夏回族自治区化工学会归口。

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、西宁市动物疫病预防控制中心、青海省畜牧兽医科学院、中国农业科学院兰州兽医研究所。

本文件起草人：王建东、高闪电、于有利、郭亚男、梁小军、王晓亮、许立华、李知新、宣小龙、施安、康晓冬、高海慧、张久盘、孟茹、李志、付永、郭慧琛、邵军军、刘伟、常惠芸、周广青。

本文件为首次发布。

规模化牛场牛病毒性腹泻病毒（BVDV）基因分型与防制

1 范围

本文件规定了规模化牛场牛病毒性腹泻病毒(BVDV)RT-PCR 基因分型与防制的术语和定义、诊断、预防和净化。

本文件适用于规模化牛场对奶牛、肉牛、黄牛、牦牛、犏牛等牛科动物的牛病毒性腹泻病毒（BVDV）RT-PCR 基因分型与防制。

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于本文件；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

GB19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401-2008 实验室质量控制规范 动物检疫

农业部农医发[2017]25号 病死及病害动物无害化处理技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 牛病毒性腹泻病 Bovine Viral Diarrhea Virus

牛病毒性腹泻/黏膜病简称为牛病毒性腹泻病，是指由牛病毒性腹泻病毒引发牛的一种传染病，临床上以发热、腹泻、呼吸道症状、出血综合征、黏膜糜烂、白细胞减少、怀孕母牛流产、产畸型胎为主要特征。

3.2 RT-PCR基因分型RT-PCR genotyping

即利用分子生物学方法，对其基因进行分型的技术。

4 流行病学

各种年龄的牛都易感染、以幼龄牛易感性最高。传染来源主要是病畜。病牛的分泌物、排泄物、血液和脾脏等都含有病毒，以直接接触或间接接触方式传播。牛病毒性腹泻病毒可以穿过胎盘感染，特别是怀孕早期。牛病毒性腹泻—黏膜病血清抗体阴性的母牛一旦感染，常常通过胎盘使胎儿产生免疫抑制，引起持续性病毒血症，如果小牛正常产出，病毒血症能持续地带入成年期，这种牛体内始终带毒，是牛群中最危险的传染源。

5 RT-PCR基因分型

5.1 样品采集

用无菌注射器直接采集血液或者抗凝血至灭菌离心管，或使用兽用采血针、真空无菌采血管、真空无菌抗凝管采血管，采集全血或抗凝全血，编号备用。

5.2 样品处理

5.2.1 血清处理

使用无抗凝剂采血器，采血后采血管倾斜于25℃~37℃静置30 min~45 min，待血液完全凝固，转速8000 rpm离心10 min或4000 rpm离心30 min，用移液枪把血清移入储存管备用。

5.2.2 全血的处理

5.2.2.1 采血

使用抗凝枸橼酸葡萄糖（ACD）为抗凝剂。利用灭菌离心管收集血液时，加入1/6体积的ACD抗凝剂，充分混匀；利用商品化EDTA抗凝采血管收集血液时，直接收集血液并混匀即可。

5.2.2.2 RNA的提取

在样本制备区，根据待检样品数量取n个无RNase离心管，编号。每管中加入600 μL Trizol，分别加入100 μL待检血清或抗凝血，充分混匀后加入200 μL氯仿，充分颠倒混匀；于4℃、12000 g离心15 min，小心吸取上清至一新的无RNase离心管中，加入0.5 mL异丙醇，轻轻混匀，4℃、12000 g离心10 min；弃上清，加入1mL DEPC水配制的冰冷75%乙醇充分洗涤沉淀；4℃、12000 g离心5 min，弃上清，12000 g离心 10 s，吸去残存的液体，室温风干3 min，加入适量（20~25 μL）DEPC水溶解，直接用于检测或-80℃保存。

5.3 基因分型

5.3.1 套式RT-PCR

参考文献（Decaro N, et al., 2012. A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle; Gao S, et al., 2016. Genome analysis of an atypical bovine pestivirus from fetal bovine serum）中的引物，分别为：

PanBVDVpcrF（5'-CTCTGCTGTACATGGCACATG-3'）

PanBVDVpcrR（5'-TTCTCACTNGCRTCCATCAT-3'）

BVDV-1 npcrF（5'- TTTCAAGCTGCTCHGAYAC -3'）

BVDV-2 npcrF（5'- ATCCTGACCAATGCTAGGTCC -3'）

BVDV-3 npcrF（5'- TCCTGTGGCAACCGGTAGGT-3'）

取2 μL待检RNA进行RT-PCR扩增，每个反应体系需要25 μL反应液，含2 X Step Buffer 12.5 μL、上游引物PanBVDVpcrF（10 μM）1 μL、下游引物PanBVDVpcrR（10 μM）1 μL、1 X Step Enzyme Mix 1 μL、DEPC水7.5 μL。根据检测的RNA数量（n），首先配制n+1个体系的反应液，混匀后分装至N+1

个PCR管中，分别加入1 μ L待检RNA、DEPC水对照，混匀瞬时离心后进行第一轮RT-PCR扩增。反应参数为：50°C 30 min；94°C 2 min；94°C 30 s，55°C 30 s，72°C 1 min，共35个循环；72°C 10 min。反应结束后取1 μ L PCR产物稀释至49 μ L DEPC 水中。取2 μ L第一轮扩增产物分别进行BVDV-1、BVDV-2、BVDV-3的分型检测。反应体系为Premix Taq（dye plus）12.5 μ L、引物BVDV-1 nprF/PanBVDVpcrR（10 μ M）各1 μ L或引物BVDV-2 nprF/PanBVDVpcrR（10 μ M）各1 μ L，或引物BVDV-3 nprF/PanBVDVpcrR（10 μ M）各1 μ L，DEPC水10.5 μ L，待检第一轮扩增产物2.0 μ L。反应程序为98°C 10 s，55°C 30 s，72°C 1 min, 30个循环，72°C 10 min。利用含GelRed核酸染料的1%琼脂糖凝胶电泳，经凝胶成像扫描仪观察目的片段大小。目的条带的大小分别为：BVDV-1，505 bp；BVDV-2，833 bp；BVDV-3，211 bp。

5.3.2 荧光定量 RT-PCR

参考文献（Baxi et al., 2006. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses; Liu et al., 2008. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products.）中的引物，在一反应管中同时检测BVDV-1和BVDV-2，在另一反应管中对BVDV-3单独进行检测。

5.3.2.1 BVDV-1 和 BVDV-2 分型

检测BVDV-1和BVDV-2的引物为PestiF：5'-CTAGCCATGCCCTTAGTAG-3'，PestiR：5'-CGTCGAACCAGTGACGACT-3'，探针为

BVDV-1P：FAM-TAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCT-BHQ

BVDV-2P：TxR-TAGCGGTAGCAGTGAGTTCGTTGGATGGCC-BHQ

反应体系为25 μ L，以MX3000P real-time PCR 仪器检测为例，每一体系中加入2 X One Step RT-PCR Buffer 12.5 μ L、Ex Taq 0.50 μ L、反转录酶 0.50 μ L、PestiF（10 μ M）0.50 μ L、PestiR（10 μ M）0.50 μ L、BVDV-1P（10 μ M）0.25 μ L、BVDV-2P（10 μ M）0.25 μ L、ROX Reference Dye or Dye II 0.50 μ L、DEPC水8.25 μ L，待检RNA 1.0 μ L，反应程序为42°C 5 min；95°C 10 s进行反转录反应，然后按95°C 5 s、60°C 30 s在荧光定量RT-PCR进行40个循环的扩增。在扩增结束后根据扩增曲线判定样品中BVDV RNA 的存在与否以及BVDV基因型（FAM通道的扩增曲线表示BVDV-1阳性，TxR（ROX）通道扩增曲线表示BVDV-2阳性）。

5.3.2.2 BVDV-3 分型

检测BVDV-3的引物为

T34F：5'- GACTAGTGGCAGTGAGC -3'

T220R：5'- GAGGCATTCCTTGATGCGTC-3'

BVDV-3P FAM- ACTCGGGGCTTCGGTGATCCAGGG-BHQ

反应体系为25 μL ，以MX3000P real-time PCR仪器检测为例，每一体系中加入2 X One Step RT-PCR Buffer 12.5 μL 、Ex Taq 0.50 μL 、反转录酶0.50 μL 、T34F（10 μM ）0.50 μL 、T220R（10 μM ）0.50 μL 、BVDV-3P（10 μM ）0.25 μL 、ROX Reference Dye or Dye II 0.50 μL 、DEPC水8.50 μL ，待检RNA 1.0 μL ，反应程序42°C，5 min；95°C，10 s进行反转录反应，然后按95°C 5 s、60°C 30 s在荧光定量RT-PCR进行40个循环的扩增。在扩增结束后根据扩增曲线判定样品中BVDV-3 RNA存在与否（FAM通道扩增曲线表示BVDV-3阳性）。

5.4 BVD 防制规程

见附件B

附录 A

(规范性附录)

溶液配制

以下所用试剂均为分析纯

A.1 抗凝枸橼酸葡萄糖 (ACD) 为抗凝剂

称取柠檬酸0.48 g、柠檬酸钠1.32 g、葡萄糖1.47 g溶于100 mL去离子水中，高压灭菌。

A.2 DEPC 水

在通风橱中,将 DEPC 加入去离子水（符合 GB/T 6682）中至终浓度为 0.1%，充分作用 12 h。
121℃高压灭菌 30 min，冷却后分装备用。

A.3 50×TAE 贮存液

Tris 碱	242.0 g
冰醋酸	57.1 mL
EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)	100.0 mL

加蒸馏水定容至 1000 mL，在 1.034×10⁵ Pa 压强下蒸汽灭菌 20 min，使用时用蒸馏水稀释成 1×TAE。

A.4 1.0%琼脂糖凝胶

琼脂糖 1 g

加 1×TAE 定容至 100 mL，在微波炉中加热融化、混匀，冷却至 55℃，加入适合浓度的核酸染料，倒入已封好的凝胶灌制平台上，插上样品梳，凝固后移去样品梳，当天使用。

附录 B

(规范性附录)

BVD 防制规程

牛病毒性腹泻病，是由牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 引起的。BVDV 属于黄病毒科瘟病毒属。该病毒是有囊膜的正链 RNA 病毒，能通过胎盘感染在妊娠期 30 d 至 150 d 的怀孕母牛，引起流产、死产或者犊牛未成年死亡，造成大量经济损失。幸存下来的犊牛对该病毒产生“免疫耐受”现象，并转化为持续感染 (PI) 牛。PI 牛是 BVDV 传播的重要传染源。PI 牛每天排出大量病毒，并传染群体中其它动物。这些带毒牛通常在 2 岁之内死于黏膜病，部分牛只可存活 2 年甚至更长。各生产阶

段的奶牛（犊牛、后备牛、产奶牛）和公牛都可被暂时感染，感染持续数天至数周，直至其免疫系统清除病毒。虽然 BVDV 感染造成的死亡率低，但该病毒会降低牛只自身免疫力，从而导致牛只对其它疾病更易感，如乳房炎、口蹄疫、牛传染性鼻气管炎（IBR）、腹泻、肢蹄病等。BVDV 有两种感染方式，一种是急性感染（TI），BVDV 可以感染各年龄段的牛，影响奶牛场生产的各个方面从奶的质量和产量，到犊牛健康和兽医费用。另一种是持续感染（PI），从繁殖性能到动物使用年限。急性感染是由于牛只接触了 PI 牛或者其它急性感染牛，一般持续数天到数周，感染期间，感染会抑制牛只的免疫系统（免疫抑制），导致牛只对继发感染敏感，例如乳房炎和体细胞数的增加。持续感染仅发生在，当 BVDV 感染怀孕母牛时，该母牛正处于其妊娠期的第 30-150 d 接触该病毒，病毒进入胚胎而产生。PI 牛经常无临床表现，但终身感染，排毒量是急性感染的 1000 倍。PI 犊牛存活下来，不仅成活率低，而且在存活期间会持续传播病毒。PI 牛带来的危害远远超越单一的牛舍或者牧场。病毒可以传播到相邻的牛舍或牧场，因此会存在大量的动物迅速被感染和再感染的潜在危险。

B1. 牛病毒性腹泻最大的危害是持续感染

B1.1 繁殖影响，包括空怀率高、流产、木乃伊胎、早期胚胎死亡、死胎或弱犊。

B1.2 腹泻，尤其在初次感染时，多见于青年牛。

B1.3 产奶量降低，乳质降低。

B1.4 生长缓慢，先天缺陷，发育不良。

B1.5 免疫抑制长达 6 周，使牛只易感染其它疾病，如乳房炎、肺炎和牛呼吸道综合征（BRD）、肺溶血性巴氏杆菌感染等。

B1.6 感染胎儿，生出 PI 犊牛，PI 母牛经常会发生早期胚胎损失，或者产出死胎或木乃伊胎儿。即使能顺利生出的犊牛，所产犊牛 100%为 PI 犊牛。这些犊牛成活率低，生长状况不好，而且持续大量排毒、并易感其它疾病，影响整个群体的健康和生产状况。

B2 制定牛病毒性腹泻最佳控制方案和净化策略

B2.1 只引入非 PI 牛。购入的妊娠母牛所产的犊牛，只有进行 BVDV 抗原检测，确认为阴性，方可进入现有牛群并允许配种。

B2.2 配种前，对所有未接受过 BVDV 抗原检测的犊牛和后备牛以及群中无后代的母牛（如流产、没有确认怀孕、所生犊牛死亡或淘汰、所生犊牛为公犊出售等）进行 BVDV 抗原检测。

B2.3 持续对全部新生犊牛进行 BVDV 抗原检测。

B2.4 认真记录并保存检测结果。

B2.5 设计免疫方案，选择适合的疫苗和免疫时间。需要考虑公牛、断奶前、断奶、青年牛和引入非 PI 牛。购入的妊娠母牛所产的犊牛，只有进行 BVDV 抗原检测，确认为阴性，方可进入现有牛群并允许配种。

B26 与兽医、相邻牧场和后备牛供应商合作，及时发现风险，将BVDV进入牛群的风险降到最低。

B2.7 免疫是控制BVD的工具之一，目前已有商品化疫苗用于预防牛病毒性腹泻/黏膜病。3月龄以上健康牛肌肉注射，每头接种2.0 mL，21日后以相同剂量进行二免，免疫期为6个月。但是如果PI牛存在于群体中，单纯只依靠免疫不能将牧场风险降到最低，推荐采取免疫接种与PI牛检测淘汰的综合防控措施。

B3 如何处理抗原阳性的检测结果

B3.1 确定群体目标和相应的措施。

B3.2 如果犊牛被怀疑是PI牛，应尽早实施隔离并采集血液进行BVDV抗原检测（利用套式RT-PCR或荧光定量进行病毒分型），检测阳性者应保持隔离，间隔15 d进行第二次采样检测。如果犊牛确认是PI牛，应对其无害化处理，以切断BVDV向繁育群体的传播。

B3.3 对PI牛的母亲进行 BVDV 抗原检测（PI牛的母亲也可能是PI牛）。

B3.4 如果确认PI牛的母亲不是PI牛，那么其母亲不需要被淘汰。

B3.5 与兽医、相邻牧场和后备牛供应商合作，及时发现风险，将BVDV进入牛群的风险降到最低。

B4. 对于牛病毒性腹泻的几种误解

B4.1 弱毒疫苗可以消除PI犊牛事实：试验表明，注射弱毒疫苗后，并不能引起PI犊牛发病或死亡。然而，也有报道表明，弱毒疫苗可以导致PI犊牛生病或死亡，但不是100%发生。

B4.2 PI牛很瘦，皮毛不好，而且是一个生产性能表现不好的牛事实：尽管大多数PI牛不健康，但报告指出，50% 以上的持续感染牛表现正常，并以很好的状态进入泌乳牛群。PI牛不能用肉眼判断。只能通过检测来较弱病毒发现和确认。

B4.3 犊牛是PI牛，因为他们的母亲是PI牛事实：最近研究表明，7%PI牛的母亲是PI牛；但另外93%的PI牛的母亲是免疫机制正常的非PI牛。

B4.4 PI牛引起的最重要的经济损失是该牛只的死亡事实：低受孕率、频繁流产和犊牛死亡率高等相关联的繁殖损失是持续感染动物所造成的最大经济损失。

B4.5 BVDV不会感染已免疫的牛只事实：PI牛所散发的大量病毒能够攻克在攻击下起保护作用的一定层次的免疫保护，单纯免疫不能解决BVDV问题。

B5 检测的价值

B5.1 PI牛检测带来200元/头牛的价值。不再浪费时间治疗大量病牛。

B5.2 PI 阴性状态说明动物不是持续感染BVDV，能够极大降低产业链传播疾病的风险。

B5.3 BVD 给产业造成损失在美国超过 10 亿元。检测会挽回损失。

B6 牛病毒性腹泻的检测工具

B6.1 ELISA 实验室检测--BVDV 抗原/抗体检测试剂盒，可以掌握流行病学。

B6.2 套式RT-PCR 或荧光定量RT-PCR检测用于检测BVDV-1和BVDV-2及BVDV-3基因型，可以掌握BVDV毒株的流行态势。

B7 无害化处理

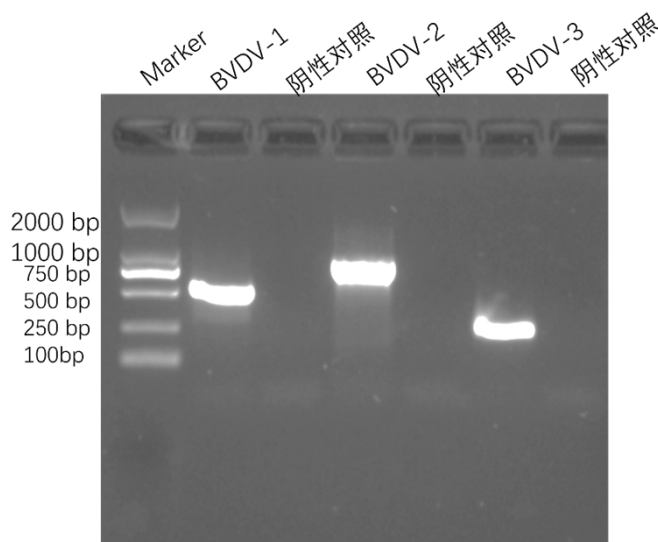
病死畜按照《病死及病害动物无害化处理技术规范》（农业部农医发[2017]25号）进行无害化处理。

附录 C

（资料性附录）

BVDV 分型 RT-PCR 结果电泳示意图及荧光定量 RT-PCR 扩增曲线示意图

BVDV 分型 RT-PCR 结果电泳图见图 C.1，BVDV 分型荧光定量 RT-PCR 扩增曲线示意图见 C.2。



图C.1 BVDV套式RT-PCR结果

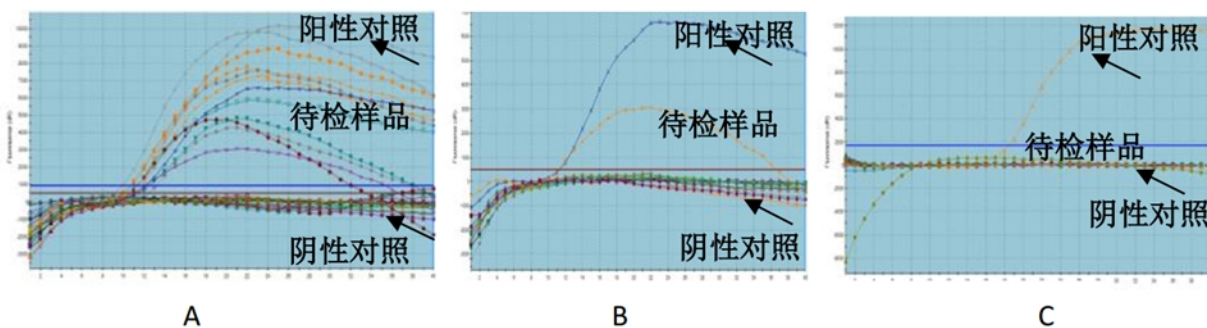


图 C.2 BVDV 分型荧光定量 RT-PCR 扩增曲线示意图

A. FAM 通道扩增曲线（BVDV-1）；B. Txd（ROX）通道扩增曲线（BVDV-2）；

C. FAM 通道扩增曲线（BVDV-3）