

唐山市地方标准

犊牛病毒性腹泻诊断技术规程 (征求意见稿)

2023-xx-xx 发布

2023-xx-xx 实施

唐山市市场监督管理局 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。

本文件由唐山市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件及所替代文件的历代版本发布情况为：

—首次发布

犊牛病毒性腹泻诊断技术规程

1 范围

本文件规定了牛病毒性腹泻/黏膜病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒引起犊牛病毒性腹泻的临床诊断和实验室诊断技术。

本文件适用于牛饲养场和动物诊疗单位对牛病毒性腹泻/黏膜病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒 3 种病毒性腹泻的诊断。

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 18637-2018 牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范

NY/T 541-2016 兽医诊断样本采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有的需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BVDV:牛病毒性腹泻/黏膜病毒（Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease Virus）

BRV:牛轮状病毒（Bovine Rotavirus）

BCV:牛冠状病毒（Bovine Coronavirus）

Ct 值:达到阈值的循环数（Cycle Threshold）

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 传染源

患病动物和带毒动物是本病主要传染源，患病动物的分泌物和排泄物中均含有病毒。

5.1.2 传播途径

经消化道、呼吸道接触传播，亦可通过胎盘垂直传播。

5.1.3 易感动物

10 日龄以内犊牛最易感，其他日龄犊牛及成年牛也可以感染。

5.2 临床症状

5.2.1 BVD

按发病病程分为急性型和慢性型。

5.2.1.1 急性型

急性感染牛一般为突然发病，体温升高，精神沉郁，眼睛和鼻腔有液体分泌物流出，口腔和鼻镜黏膜溃烂，严重腹泻，便血，通常于发病后 1~2 周死亡，康复的病例较少。

5.2.1.2 慢性型

慢性型一般为通过垂直传播感染，存活的犊牛会发展成为慢性持续性感染牛，终生带毒排毒。临床症状不明显，生长发育受阻，消瘦，体重逐渐下降，且在其体内检测不到抗体，是牛场净化 BVD 最大的阻碍。

5.2.2 BR

1-7 日龄犊牛突然发病，潜伏期短。病初，精神沉郁，食欲减少或废绝，无细菌继发感染的前期，一般体温不会升高；典型症状为严重水样腹泻，粪便为黄白色或灰白色稀便，有时粪便中混有黏液和血液；肛门周围、后肢内侧及尾部常被稀便污染。病重牛治疗不及时，易出现酸中毒，最后心脏衰竭而死亡。

5.2.3 BC

成年牛感染后表现为严重水样腹泻，有时伴有血和黏液，粪便呈黑褐色或墨绿色，恶臭，表现为产奶量降低，精神沉郁，倦怠，食欲减退或停止。7-10 日龄犊牛感染后表现为精神倦怠，食欲减退，排出淡黄色或灰白色水样粪便，后期为喷射样腹泻，严重时会出现肠出血的症状，部分犊牛会出现肺部感染症状。

5.3 病理变化

5.3.1 BVD

急性 BVDV 感染可导致胃肠道、消化道和呼吸系统的表皮损伤，口腔腐烂或溃疡，鼻孔和上呼吸道黏膜溃疡，胃肠黏膜淤血、溃疡或出血，小肠派伊尔氏结坏死和出血。肠内容物呈水样，并有恶臭气味。

5.3.2 BR

小肠肠壁变薄，肠内容物稀薄，呈黄褐色、红色，肠黏膜脱落。电子切片观察，空肠和回肠部小肠绒毛萎缩，柱状上皮细胞脱落且被未成熟分化的立方状上皮细胞所覆盖。胃、肠系膜淋巴结、结肠、肺、肝、脾和胰等器官未见病变。

5.3.3 BC

小肠上皮细胞与呼吸道上皮细胞严重损伤。小肠出现红肿，小肠粘膜上皮发生脱落坏死并含有少量的黏液，组织学检验后发现小肠绒毛缩短，荧光学检查后发现有牛冠状病毒的荧光。

5.4 结果判定

结合临床症状和病理表现可初步判定为可疑病例，确诊需进行实验室诊断。

6 实验室诊断

6.1 样品采集与处理

采集肛拭子品或新鲜粪便，48h 以内冷藏运输进行实验室诊断，运输时间超过 24h 需冷冻保存，保存时间不得超过 2 周，并按照《NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》的要求执行。

6.2 样本核酸提取

按照 GB/T 18637-2018 中 5.4.4.2 步骤进行样品核酸提取。

6.3 荧光 RT-PCR 反应

6.3.1 引物及探针

BVDV-F: 5' -GGTCATAGCTCTCGACACCA-3' ;

BVDV-R: 5' -GAGCACGTATCTACCACCCA-3' ;

BRV-F: 5' -AGACAAAGAACGGGTTTCACA-3' ;

BRV-R: 5' -AGTCAAATCCAGCGACCTGA-3' ;

BCV-F: 5' -GCGTCCTCTGGAAATCGTTC-3' ;

BCV-R: 5' -AGCAGTTTGCTTGGGTTGAG-3' ;

6.3.2 反应体系及条件

反应体系: 25 μ L: PerfectStartTM Green SuperMix 12.5 μ L, BVDV 上、下游引物各 0.5 μ L, BRV 上、下游引物各 0.5 μ L, BCV 上、下游引物各 0.5 μ L; BVDV、BRV、BCV 模板各 1.0 μ L, 去离子水 3.5 μ L。

反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s; 55 $^{\circ}$ C 20 s; 72 $^{\circ}$ C 20 s; 共 40 个循环。

6.3.3 结果判定

6.3.3.1 实验成立条件

阴性对照无 Ct 值，且无典型的扩增曲线；或者阴性对照 Ct 值>35，出现扩增曲线，但溶解曲线在 83-85 $^{\circ}$ C 左右未出现明显的峰值。

阳性对照 Ct 值<35，并出现典型的扩增曲线，溶解曲线于 83 $^{\circ}$ C 左右出现明显的峰值为 BRV，84 $^{\circ}$ C 左右出现明显的峰值为 BCV，85 $^{\circ}$ C 左右出现明显的峰值为 BVDV。

阴性对照和阳性对照均满足上述条件时，实验成立，，否则视为结果无效。

6.3.3.2 结果描述与判定

阴阳对照成立的条件下，样品检测无 Ct 值，且无典型的扩增曲线；或者 Ct 值>35，出现扩增曲线，但溶解曲线在 83-85 $^{\circ}$ C 左右未出现明显的峰值，表明样品中无病毒核酸，判定为核酸阴性。

样品检测 Ct 值<35，并出现典型的 S 扩增曲线，溶解曲线于 83 $^{\circ}$ C 左右出现

明显的峰值时，判定 BRV 核酸阳性；

样品检测 Ct 值 <35 ，并出现典型的 S 扩增曲线，溶解曲线于 84°C 左右出现明显的峰值时，判定 BCoV 核酸阳性；

样品检测 Ct 值 <35 ，并出现典型的 S 扩增曲线，溶解曲线于 85°C 左右出现明显的峰值时，判定 BVDV 核酸阳性；

$35<\text{Ct 值}<40$ ，且出现扩增曲线的样本判定为可疑。可以样品需进行单一荧光定量 PCR 检测，若重复试验结果为阳性者判定为阳性，否则判定为阴性。