

ICS 11.220  
B 41

# DB23

## 黑 龙 江 省 地 方 标 准

DB23/T 2057.5—2017

---

### 实验动物 牛微生物学等级及监测

2017-12-29 发布

2018-01-29 实施

---

黑龙江省质量技术监督局 发布

# 目 录

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	2
4 等级分类 .....	2
5 微生物学等级及控制指标 .....	2
6 检测程序 .....	4
7 检测方法 .....	4
8 检测规则 .....	6
9 结果判定 .....	6
10 判定结论 .....	6
附录 A .....	8
附录 B .....	10
附录 C .....	12
附录 D .....	14

## 前 言

本标准依据GB/T 1.1-2009的编写规则起草。

本标准由黑龙江省质量技术监督局提出。

本标准由黑龙江省实验动物专业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、黑龙江省标准化研究所、黑龙江省百洲生物工程有限公司、东北农业大学。

本标准主要起草人：于力、朱远茂、常继涛、宋莹、姜志刚、李昌文、赵丽丽、刘怀然、刘思国、杨艳坤、徐纯柱。

# 实验动物 牛微生物学等级及监测

## 1 范围

本标准主要规定了实验动物 牛（以下简称实验牛）微生物学等级及监测的术语和定义、等级分类、检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、结果判定等。

本标准适用于实验牛微生物学等级及监测。

## 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 14922.2 实验动物 微生物学等级及监测
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法
- GB/T 18089 蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和抗体检测技术
- GB/T 18637 牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术
- GB/T 18645 动物结核病诊断技术
- GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术
- GB/T 18653 胎儿弯曲杆菌的分离鉴定方法
- GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
- GB/T 22915 口蹄疫病毒荧光RT-PCR检测方法
- GB/T 27528 口蹄疫病毒实时荧光RT-PCR检测方法
- GB/T 27637 副结核分枝杆菌实时荧光PCR检测方法
- GB/T 27639 结核病病原菌实时荧光PCR检测方法
- GB/T 27981 牛传染性鼻气管炎病毒实时荧光PCR检测方法
- NY/T 539 副结核病诊断技术
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
- NY/T 561 动物炭疽诊断技术
- NY/T 562 动物衣原体病诊断技术
- NY/T 574 地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法
- NY/T 575 牛传染性鼻气管炎诊断技术
- SN/T 1086 牛生殖道弯曲杆菌病检疫技术规范
- SN/T 1087 Q热检疫技术规范
- SN/T 1088 布氏杆菌检疫技术规范
- SN/T 1129 牛病毒性腹泻/黏膜病检疫技术规范
- SN/T 1315 牛地方流行性白血病检疫技术规范
- SN/T 1693 牛流行性热微量血清中和试验操作规程
- SN/T 1917 牛地方流行性白血病聚合酶链反应操作规程

SN/T 3392 国境口岸莱姆病螺旋体检疫规程

SN/T 3741.1 国境口岸致病性钩端螺旋体PCR检测方法

### 3 术语和定义

GB/T 14922.2界定的以及下列术语和定义适用于本标准。

#### 3.1

##### 实验牛

经人工饲养，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定以及其它科学实验的牛。

#### 3.2

##### 普通级牛

不携带重要人兽共患病原和牛烈性传染病病原的实验牛。简称普通牛。

用于牛病研究及生物制品研发、生产与检验等的实验牛，除符合前款各项规定外，还应无特别规定的特异性病原和抗体，并符合特别规定的有关要求。

#### 3.3

##### 无特定病原体级牛

除普通牛应排除的病原外，不携带主要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的实验牛。简称无特定病原体牛。

用于牛病研究、生物制品研发与检验等的实验牛，除符合前款各项规定外，还应无特别规定的特异性病原和抗体，并符合特别规定的有关要求。

### 4 等级分类

按微生物学与寄生虫学等级分类，实验牛分为普通级、无特定病原体级。

### 5 微生物学等级及控制指标

#### 5.1 临床观察

实验牛应外观健康，无异常。

#### 5.2 微生物检测项目

各等级实验牛病原微生物检测项目见表1。

参考GB 14922.2中对牛以外的实验动物微生物控制及检测指标的规定，并参照牛微生物流行病学调查情况，各等级实验牛微生物指标见表1。

表1 实验牛微生物检测项目

等级	病原微生物	检测要求
普通级	口蹄疫病毒 Food-and-mouth disease virus	必须检测， 可免疫
	布鲁氏菌 <i>Brucella</i>	
	牛分枝杆菌 <i>Mycobacterium bovis</i>	必须检测
	炭疽芽胞杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	必要时检测
	钩端螺旋体 <i>Leptospira</i>	
	伯氏疏螺旋体 <i>Borrelia burgdorferi</i>	
无特定病原体级	牛传染性鼻气管炎病毒 Infectious bovine rhinotracheitis virus	必须检测
	牛病毒性腹泻/粘膜病毒 Bovine viral diarrhea virus/mucosal disease virus	
	牛副流感病毒 3 型 Bovine parainfluenza virus type 3	
	牛呼吸道合胞体病毒 Bovine respiratory syncytial virus	
	牛轮状病毒 Bovine rotavirus	
	牛流行性出血热病毒 Bovine ephemeral fever virus	
	牛白血病病毒 Bovine leukemia virus	
	蓝舌病病毒 Bluetongue virus	
	副结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium avium Subsp. paratuberculosis</i>	
	胎儿弯曲杆菌 <i>Campylobacter fetus</i>	
	牛荚膜 A、B 型多杀性巴氏杆菌 <i>Bovine pasteurellamultocida capsular type A and type B</i>	
	牛支原体 <i>Mycoplasma bovis</i>	
	贝氏柯克斯体 <i>Coxiellaburnetii</i>	
	衣原体 <i>Chlamydia</i>	

### 5.3 检测项目分类

5.3.1 必须检测项目：在进行实验牛质量评价时必须检测的项目。普通级可免疫项目，无特定病原体级不能免疫。

5.3.2 必要时检测项目：申请生产许可证、从省外或国外引进实验牛、疑有该病原体感染和实验特殊需要时应检测的项目。普通牛规定的必要时检测项目，在无特定病原体牛中为必须检测项目。

## 6 检测程序

检测程序见图 1。

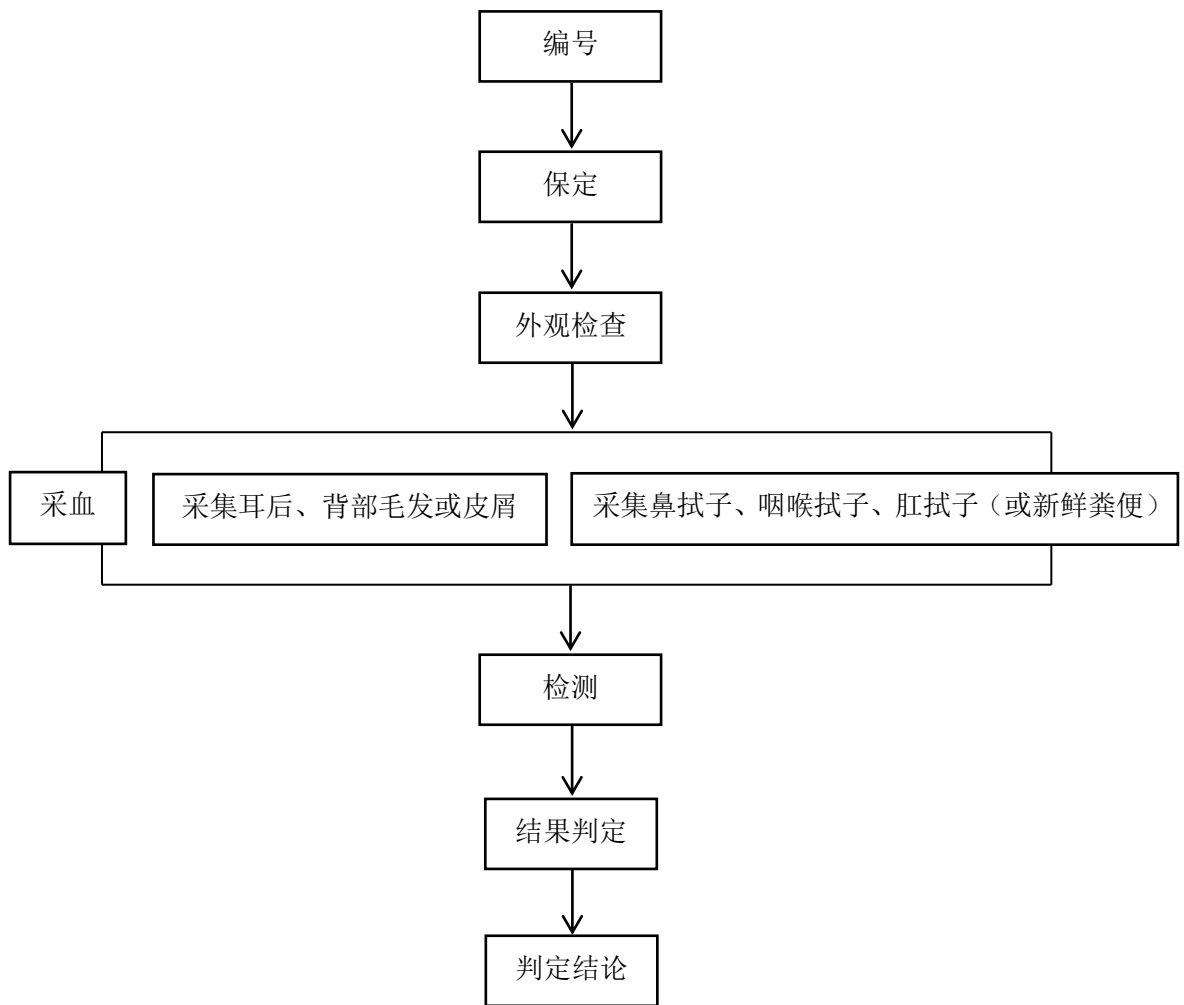


图 1 检测程序

## 7 检测方法

检测方法见表 2。

表2 实验牛微生物检测方法

微生物	检测方法	
	检测标准	适用范围
口蹄疫病毒	GB/T 18935	抗体检测 <sup>1</sup> 、抗原检测（食道—喉部分泌物） <sup>2</sup> 、核酸检测（组织）
	GB/T 22915	核酸检测（血样、咽喉拭子）
	GB/T 27528	核酸检测（水泡液）
布鲁氏菌	GB/T 18646	抗体检测（血清或奶样）
	SN/T 1088	核酸检测（阴道拭子、奶样、组织）
牛分枝杆菌	GB/T 18645	皮内变态反应试验、抗原检测（血样、奶样、粪便或病料）
	GB/T 27639	核酸检测（血样、奶样、粪便或病料）
炭疽芽胞杆菌	NY/T 561	抗原检测（血液、病变部位的水肿液或渗出液）
		核酸检测（血液、病变部位的水肿液或渗出液）
钩端螺旋体	GB/T 14926.46	抗体检测
	SN/T3741.1	抗原检测（血液、尿液、组织）
伯氏疏螺旋体	SN/T 3392	抗体检测、抗原检测（血样或蜱 <sup>3</sup> ）、核酸检测（血样或蜱）
贝氏柯克斯体	SN/T 1087	抗体检测
		抗原检测（阴道分泌物、奶样、粪便、动物组织或流产胎儿）
牛传染性鼻气管炎病毒	GB/T 27981	核酸检测（血样、结膜/黏膜拭子、精液及动物组织）
	NY/T 575	抗体检测、抗原检测（鼻拭子、阴道拭子、精液及组织）
牛病毒性腹泻-粘膜病病毒	GB/T 18637	抗体检测、抗原检测（血样、鼻拭子、精液或动物组织）
	SN/T 1129	核酸检测（血样、鼻拭子、精液或动物组织）
牛副流感病毒3型	附录A	核酸检测（鼻拭子、肺组织）
牛荚膜A、B型多杀性巴氏杆菌	附录B	核酸检测（鼻拭子、肺组织）
副结核分枝杆菌	GB/T 27637	核酸检测（血样、奶样、粪便或病料）
	NY/T 539	抗体检测（血清或奶样）、抗原检测（粪便、病料）、皮内变态反应
胎儿弯曲杆菌	GB/T 18653	抗原检测（阴道粘液、包皮液、精液）
	SN/T 1086	核酸检测（阴道粘液、包皮液、精液、流产胎儿或胎盘）
牛呼吸道合胞体病毒	附录C	核酸检测（鼻拭子、肺组织）
牛轮状病毒	附录D	核酸检测（肛拭子、新鲜粪便）
牛流行性出血热病毒	NT/T 543	抗体检测
牛白血病病毒	NY/T 574	抗体检测
	SN/T 1315	抗原检测（血样）
	SN/T 1917	核酸检测（血样、动物组织）
蓝舌病病毒	GB/T 18089	抗体检测、抗原检测（血样、精液、动物组织或库蠓 <sup>4</sup> ）
		核酸检测（血样、精液、动物组织或库蠓）
衣原体	NY/T 562	抗体检测、抗原检测、核酸检测（流产胎儿或病料）

注1：如无注明，用于抗体检测的样本均为血清。



注2：抗原检测、核酸检测后“（）”中注明的是可用于检测的样本来源。

注3：蜚是伯氏疏螺旋体的传播媒介。

注4：库蠓是蓝舌病病毒的传播媒介。

## 8 检测规则

### 8.1 检测频率

普通、无特定病原体牛群每三个月至少检测一次。

### 8.2 抽样

#### 8.2.1 方式

选择六月龄以上的实验牛用于检测（也可根据需求抽样），随机抽样。

#### 8.2.2 数量

根据实验牛群体大小，抽样数量见表3。

表3 抽样数量

群体大小	抽样数量
小于20头	不少于5头
21~100头	不少于10头
101~500头	不少于20头
大于500头	不少于30头

#### 8.2.3 方法

8.2.3.1 可按病毒、细菌、真菌、寄生虫检测要求联合采样。

8.2.3.2 采集血液及毛发、皮屑、鼻拭子、咽拭子、肛拭子（或新鲜粪便）的方法参照 NY/T 541 进行。

8.2.3.3 检测结果存疑，需要进一步确诊时，应结合临床症状和前期检测结果，按照表 2 中的要求采集动物组织或特定样本，以做进一步检测。

### 8.3 样本要求

样本要有明显标识，写明检品名称、品系、等级、数量及检测项目等内容，安全送达实验室。涉及疑似人畜共患病的病料，按照生物安全规定执行。

## 9 结果判定

### 9.1 抗体检查

免疫项目，群体免疫合格率大于等于70%，判为合格。

非免疫项目，血清样品全部阴性判为合格。

### 9.2 病原和核酸检测

未见阳性结果为合格。

## 10 判定结论

所有项目的检测结果均合格，判为符合相应的等级标准。否则，判为不符合相应的等级标准。

## 附录A (规范性附录) 牛副流感病毒3型RT-PCR诊断方法

### A.1 检测原理

流行病学调查显示我国牛副流感病毒 3 型血清阳性率达 77.96% (2960/3797), 我国对牛副流感病毒 3 型未进行免疫接种, 高血清阳性率说明我国牛群中感染非常普遍。运输、气候变化、混群等应激因素可导致牛副流感病毒 3 型的感染, 作为实验牛经历运输等应激因素是必然的。牛感染牛副流感病毒 3 型后不但引起牛呼吸道疾病, 还可引起免疫抑制, 感染后不宜作为实验牛。本方法采用 RT-PCR 扩增牛副流感病毒 3 型高度保守性 M 基因, 实现牛副流感病毒 3 型的检测, 达到筛选牛副流感病毒 3 型阴性实验牛的目的。

### A.2 检测样本

牛鼻腔深部拭子。

### A.3 检测引物

BPIV3 MF 5' CCG CAA TAT ACA CAT TTC CAG 3' ;

BPIV3 MR 5' GTA ATA TCT GAA CTC ACC GGG 3' 。

### A.4 检测方法

鼻拭子加入一定量的 PBS, 漩涡震荡后, 3000 rpm 离心 5 min, 取上清液。按照 AXYGEN 病毒 RNA 小量提取试剂盒说明书方法提取基因组 RNA。以提取的基因组 RNA 为模板, 将其反转录为 cDNA。取 7.5  $\mu$ l 基因组 RNA, 加入 1  $\mu$ l BPIV3 MF (4  $\mu$ mol/L)、以及 6  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L), 65 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后迅速在冰浴上冷却 2 min 以上。离心数秒使混合物集于管底。在上述混合物中加入如下物质, 4  $\mu$ l 5 $\times$ M-MLV Buffer、1  $\mu$ l M-MLVRTase (200 U/ $\mu$ l)、0.5  $\mu$ l RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ l)。56 $^{\circ}$ C 作用 60 min, 75 $^{\circ}$ C 保温 15 min。然后冰浴冷却后作为 PCR 反应模板备用。PCR 反应体系为 1.0  $\mu$ l Ex Taq (5 U/ $\mu$ l)、5  $\mu$ l 10 $\times$ Ex Taq Buffer、5  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L)、2  $\mu$ l 反转录产物、上下游引物(10  $\mu$ mol/ $\mu$ l)各 1  $\mu$ l, 加水至 50  $\mu$ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60.5 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。预计产物大小为 998 bp。同时设牛副流感病毒 3 型作为阳性对照和水作为阴性对照。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

### A.5 结果判定

阴阳性对照成立的条件下, 样本能扩增出特异性大小约 998 bp 的目的条带判为阳性, 否则判为阴性。

### A.6 检测序列

```
CCGCAATATACACATTTCCAGAATCTTCATTTTCTGAAAGTGGCAATATAGAGCCACTAC
CACTAAAGGTCAACGAACAAAGGAAGGCAATTCCTCATATCAGAGTTGTTAAAATAGG
TGACCCACCCAAACATGGTTCAAGATATCTTGATGTAATTTCTACTGGGTTTTTTTGAGAT
GGAGCGGTCAAAGGACAGATATGGGAGTGTCAGTGATCTGGATGATGATCCAAGTTAT
AAAGTCTGTGGTTCTGGATCTCTACCACTTGGGCTAGCAAATACACTGGGAATGATCA
GGAACTCCTACAAGCCGCAATTAAGTTAGATATAGAAGTGAGAAGAAGTGTCAAAGCC
ACGGAGATGATAGTCTACACCGTGCAGAACATTAACCTGAACTGTACCCATGGTCAA
GCAGATTAAGAAAAGGGATGTTATTTGACGCCAACAAAGTTGCGCTTGACCCCAAGTG
TCTTCCACTCGATAGAGGGATAAAATTCAGAGTAATATTTGTGAATTGTACAGCAATTG
GATCAATAACACTCTTTAAAATCCCAAATCTATGGCTTTGCTATCATTGCCAAACACCA
TATCAATAAACTTACAGGTACACATAAAAACAGGAATCCAAACTGACTCTAAGGGGGT
```

TGTCCAGATCTTAGATGAGAAAGGTGAGAAATCGTTAAACTTTATGGTCCATCTTGGAT  
TAATTAACGGAAGGTAGGTCGAATGTATTCAGTAGAGTATTGCAAACAAAAGATTGA  
GAAGATGAGACTACTATTTTCATTGGGATTAGTTGGAGGAATTAGCTTTCATGTCAATGC  
AACTGGGTCTATTTTCGAAGACGTTGGCGAGTCAACTAGCGTTCAAAGGGAAATCTGT  
TATCCTCTCATGGATTTAAACCCACACCTAAATCTGGTTATATGGGCATCATCAGTTGAA  
ATCACAAGAGTGGATGCAATCCTTCAACCTTCATTGCCCGGTGAGTTCAGATATTAC。

**附录B**  
**(规范性附录)**  
**牛荚膜A、B型多杀性巴氏杆菌多重PCR诊断方法**

**B.1 检测原理**

牛多杀性巴氏杆菌为典型的条件致病菌，自然条件下常寄生于牛上呼吸道，在受到应激刺激后可引起牛体发病。实验牛不可避免地受到运输等应急因素的刺激而增加发病风险，从而对其它实验造成不利影响，所以实验牛排除该病很有必要。我国主要流行荚膜 A、B 两种血清型的多杀性巴氏杆菌。本方法通过对采集的牛鼻腔拭子进行多重 PCR 的检测，采用特异性引物分别扩增多杀性巴氏杆菌种特异性基因 *kmt1*，以及 A、B 荚膜血清型特异性基因 *hyaD-hyaC* 与 *bcbD*，实现多杀性巴氏杆菌检测并分型，达到筛选牛荚膜 A、B 型多杀性巴氏杆菌阴性实验牛的目的。

**B.2 检测样本**

牛鼻腔深部拭子，置于脑心浸液培养基中(含万古霉素 10μg/ml)培养后，收获细菌。

**B.3 检测引物**

多杀性巴氏杆菌种特异性基因 *kmt1* (460bp) 上下游引物序列：

*kmt1*-U: 5' ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG 3' ;

*kmt1*-L: 5' GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC 3' 。

荚膜血清 A 型特异性基因 *hyaD-hyaC* (1044bp) 上下游引物序列：

CAPA-U: 5' TGC CAA AAT CGC AGT CAG TAT TTT TTA TCC 3' ;

CAPA-L: 5' TGC CAT CAT TGT CAG TGA TTT ATT TTG TAA G 3' 。

荚膜血清 B 型特异性基因 *bcbD* (760bp) 上下游引物序列：

CAPB-U: 5' GCG ATA TCA ATC TGC TTA AGA TAA T 3' ;

CAPB-L: 5' GAG GAT TCT ATC TTG ACT GAA GTA 3' 。

**B.4 检测方法**

按照 AXYGEN 病毒 DNA 小量提取试剂盒说明书方法提取培养物 DNA。配制下列 PCR 反应体系，DNA 模板 < 500 ng，多重上游引物 (10 μM) 1.5 μl，多重下游引物 (10 μM) 1.5 μl，2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl，ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μl，同时设多杀性巴氏杆菌作为阳性对照和水作为阴性对照。95℃ 预变性 5 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 70 s，共 30 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

**B.5 结果判定**

阴阳性对照成立的条件下，同时扩增出多杀性巴氏杆菌种特异性基因 *kmt1* (460 bp) 片段和荚膜血清 A 型特异性基因 *hyaD-hyaC* (1044 bp) 片段的，判定为牛多杀性巴氏杆菌荚膜 A 型阳性；同时扩增出多杀性巴氏杆菌种特异性基因 *kmt1* (460 bp) 片段和荚膜血清 B 型特异性基因 *bcbD* (760 bp) 片段的，判定为牛多杀性巴氏杆菌荚膜 B 型阳性。

**B.6 检测序列**

*Kmt1*:

```
TGCTGTAAACGAACTCGCCACTTTTTGTTTTTCATTTGGACTGACACGATCAAACCGTTGA
ACACGAAGAAAAAGACCAAATAGGTAACCAATACACGATAAATAAATTAACCGCTC
TACCGTTAATGGCTTCAATAATGGCCATAAGAAACGTAACCTCAACATGGAAATATTGATA
AATCAGACTGACAAGGAAATATAAACCGGCAAATAACAATAAGCTGAGTAATAAATAA
CGTCCAATCAGTTGCGCCGTTGTCAAGGAAGCAGATTGGCTCAACACACCAAACCTCTG
CCCAACAAAACCTGTGCTTTTCTTTGCCACAAGCCAAATAAAAGACTACCGACAAGCCC
```

ACTCACAACGAGCCATAAAAATAATGCCATTTCCCATTTCAGTGCCATAAAACTCAATT  
TCGCGGCAATCGGTTTCATTTCGCACCGCCCCACTGGGTAAATAGCGGATAA。

hyaD-hyaC:

TGCCAAAATCGCAGTCAGTATTTTTTATCCCAATACATTAAACGGCTTAGTGAAAAAC  
TAAACAATATTATTGAATATAATAAAAATATATTCGTTATTGTTCTACATGTTGATAAGAAT  
CATCTTACACCAGATATCAAAAAAGAAATACTAGCCTTCTATCATAAACATCAAGTGAAT  
ATTTTACTAAATAATGATATCTCATATTACACGAGTAATAGATTAATAAAAACTGAGGCG  
CATTTAAGTAATATTAATAAATTAAGTCAGTTAAATCTAAATTGTGAATACATCATTTTTG  
ATAATCATGACAGCCTATTTCGTTAAAAATGACAGCTATGCTTATATGAAAAATATGATG  
TCGGCATGAATTTCTCAGCATTAAACACATGATTGGATCGAGAAAATCAATGCGCATCCA  
CCATTTAAAAAGCTCATTAAACTTATTTAATGACAATGACTTAAAAAGTATGAATGTG  
AAAGGGGCATCACAAGGTATGTTTATGACGTATGCGCTAGCGCATGAGCTTCTGACGAT  
TATTAAGAAGTCATCACATCTTGCCAGTCAATTGATAGTGTGCCAGAATATAACACTG  
AGGATATTTGGTTCCAATTTGCACTTTTAATCTTAGAAAAGAAAACCGGCCATGTATTTA  
ATAAACATCGACCCTGACTTATATGCCTTGGGAACGAAAATTACAATGGACAAATGAA  
CAAATTGAAAGTGCAAAAAGAGGAGAAAATATACCTGTTAACAAGTTCATTATTAATAG  
TATAACTCTATAAACACTTGCATTTTATTAATAAATAAATCCTATAATATTTGCAGTTTA  
AATAAAGGATAAAAAATGAAGAAAATTACAATTGCTGGGGCTGGCTATGTTGGTTTATC  
CAATGCAGTATTATTAGCTCAACACCACAATGTGATCTTATTAGATATTGATCAAAAATA  
AGTTGATTTAATTAATAATAAAAAATCGCCCATCACAGATAAAGAAATCGAAGATTTCTT  
ACAAAATAAATCACTGACAATGATGGCA。

bcbD:

GCGATATCAATCTGCTTAAGATAATTGCTATCTTTAATGAATAACGCAAATAAATAATTAA  
CGATTTCTAGTTTTACCAAATAAAGTTCAACTGTGTTTGAGAACACTTTTTTAAAATG  
AGTAGTATTTCTCTGGTGGAGCTTGGATAAATGAGGAGGGGGCAAATAAGCTACATT  
AACATTAAGTCAGATCTCTAGGCTCAAACCTCCAATCATTTTTTCACGAGAAATTCAT  
CCAAGGCAGCTGCAACATTCTTCCAGCTACCCACGGTAAACCAGCAGAGTCGTTATA  
ACGAGTAACGCTAATCAAATCACTACGTTGAAACTGTTCAAGTAACGCATCCACACTC  
AGTTGCTTCTCTGCAATGAGTTTTTCAATATTTGTTTGTGAGAAAATAATTTTATGCATTA  
TTTACGCCTTTACTATTATATTTTGTGTTCAACAGAGAGTTAACAGCCTCCAAAATCTCA  
TCTAACTGGTGCATATCTGCTTTGAGTAAACGATCGTTTTCAATGTGACTCATCGGACTG  
TCTTGCTCGGTCAGTGCTAAAATTAAGAAGCGGATCCTAAGTAATCGCTCAATTTTGA  
TGGTAAGTAAGGATTATTCATTTTTAGTTCTTTGGTTTGCCTGTCCATCACAATCAGACC  
ATCAAATTGATCCGCTAATGCTAGAAAATCAAAGTAAGCTACATATTTTTGGATAACAAT  
CTGTGCTCAATTTCTCCGGTACTTCAGTCAAGATAGAATCCTC。

**附录C**  
**(规范性附录)**  
**牛呼吸道合胞体病毒套式RT-PCR检测方法**

**C.1 检测原理**

自 2008 年以来,我国牛群爆发严重的呼吸道疾病,表现为牛呼吸道疾病综合征,抗生素治疗效果不明显,发病率高,死亡率高,给养牛业带来极大的经济损失。病原流行病学调查显示存在多病原感染,其中主要原发病因为病毒性病原,包括牛呼吸道合胞体病毒等。本方法采用 RT-PCR 方法,扩增呼吸道合胞体病毒高度保守性核酸,实现牛呼吸道合胞体病毒的检测,达到筛选牛呼吸道合胞体病毒病阴性实验牛的目的。

**C.2 检测样本**

牛鼻腔深部拭子

**C.3 检测引物**

引物名称	引物序列	扩增产物片段 (bp)
1U25:	5' ACGCGAAAAAATGCGTATAACAAAC 3'	
8749U25:	5' AATTCGTAGAGCTATAGAAATAAGT 3'	1538
10262L25:	5' TCCTACCTACACTAAGTTCTCTTTC 3'	
8785U23:	5' ATATGCTATATTGAACAAATTGG 3'	1453
10215L23:	5' GTTTGGATTATTAAGATATTCCT 3'	

**C.4 检测方法**

牛鼻腔深部拭子或肺组织研磨后加入一定量的 PBS,漩涡震荡后,3000 rpm 离心 5 min,取上清液。按照 AXYGEN 病毒 RNA 小量提取试剂盒说明书方法提取基因组 RNA。用 1U25 引物进行反转录,反应条件为 25℃ 10 min,42℃ 60 min;在用 8749 U25 和 10262 L25 引物进行第一轮 PCR 扩增;然后再以第一轮 PCR 产物为模板,用 8785 U23 和 10215 L23 引物进行第二轮 PCR 扩增。同时设牛呼吸道合胞体病毒作为阳性对照和水作为阴性对照,反应条件为 94℃ 预变性 4 min,然后 94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 1.5 min 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

**C.5 结果判定**

在阴阳对照成立的条件下,第一轮或第二轮 PCR 扩增出现 1500 bp 左右的特异性目的条带,则判为牛呼吸道合胞体病毒阳性。

**C.6 检测序列**

AATTCGTAGAGCTATAGAAATAAGTGATGTCAAAGTATATGCTATATTGAACAAATTGGG  
TTTAAAAGAAAAGGGAAAAGTTGATAGATGTGATGACTAACACAACGCTATCTAAC  
ATAGTAAGAGATAATATACTCTCAGTCATAAGTGACAATACTCCCAGTACTAAAAACC  
AAATAATTCATCGTGTAACCAGATCAGCCAATTAACAACAATTTTATGCAAGCTTTT  
AAGTTCGATGAGTCATCCCCCTACATGGTTAATACATTGGTTTAATTTATACACAAAATT  
AAATGACATCTTGACCCAATACAGAACAATGAAGCAAGAAATCATGGTTACATACTTA  
TAGATACTAGAACCTTGGGTGAATTCCAATTTATATTAATCAATATGGTTGCATTGTATA  
TCATAAGAAATTAAGAAAATTACAATCACCACATATAATCAATTTCTAACATGGAAAG  
ACATTAGCCTCAGTAGATTAATGTTTGTATGATCACCTGGATAAGCAATTGTTTAAATA  
CCTTGAATAAAAGCCTTGGATTGAGATGTGAGTTTAAACAATGTCACCTCTATCTCAATTAT

TCCTTCATGGGGATTGTATATTGAAATTATTTTCATAATGAAGGTTACTATATTATAAAAGA  
AGTTGAAGGTTTTATAATGTCATTAATTTTGAACCTAACGGAAGAAGATCAATTCAGAA  
AAAGATTCTTCAACAGTATGCTAAATAATATTACAGATGCTGCAGCAAGAGCTCAACAA  
GATTTATTATCAAGAGCCCCGCCATACTATATTAGACAAAACAATATCAGATAACATATTA  
ATGGTAAATGGTTAATTTTATTAGGTAAGTTTCTTAAATTGATTAATTAGCTGGTGCTAA  
TAATCTTAATAACCTAAGTGAACCTCTACTTTCTCTTTAGAATATTTGGACATCCCATGGTA  
GATGAACGGCAAGCAATGGATGCTGTGAGATTAACTGTAATGAACTAAATTTTACTT  
ATTGAGTAGCCTTAGCATGTAAAGAGGTGCATTCATTTATAGAATTATAAAGGGATTTGT  
AAACACATATAATAGGTGGCCTACCTTAAGGAATGCTATAGTTTTACCCTTAAGATGGAT  
AAATTACTACAACTCAATACTTACCCATCATTATTAGAATTAACAGAAGCTGATTTGAT  
TATATTGTCTGGACTGAGATTTTATAGAGAATTCCATCTACCGAAAAAAGTAGATTTAGA  
AGTCATAATAAATGATAAAGCAATATCACCTCCCAAAAACCTTATCTGGACCAGTTTTCC  
CAAAAACCTATATGCCATCACACATACAGATTTACATAGAACATGAAAGACTAAAGTTTA  
CTGAGAGTGATAGATCTAGAAGGGTTCTGGAATATTATTAAAGGAATAATAGATTCAGTG  
AGAGTGACCTATATAACTGTATAGTAAACCAGGAATATCTTAATAATCCAACCATGTAA  
TATCATTAACAGGAAAAGAAAGAGAACTTAGTGTAGGTAGGA。



**附录D**  
**(规范性附录)**  
**牛轮状病毒多重半套式RT-PCR检测方法**

**D.1 检测原理**

牛轮状病毒是引起犊牛腹泻的最主要病原，发病率可高达 50%-100%，7 日龄以内犊牛最为易感，典型症状为严重腹泻，粪便呈水样，色呈淡黄色，有时混有钻液和血液，犊牛脱水，眼凹陷，四肢无力，消瘦，卧地，感染后不适合作为实验牛。本方法以牛轮状病毒的核酸为检测靶标，采用 RT-PCR 方法对样品中的核酸进行数量级扩增，最终在琼脂糖凝胶上形成肉眼可见核酸条带，从而实现对待检样品中目标病毒的检测。再在不同基因型高度变异区设计一条特异性引物，该引物仅对一个基因型反应，而不与其他基因型反应，结合一条适合该病毒检测的通用引物，采用多重半套式 RT-PCR，实现基因型的鉴定，达到筛选牛轮状病毒阴性实验牛的目的。

**D.2 检测样本**

新鲜粪便或肛拭子

**D.3 检测引物**

引物名称	引物序列	扩增产物片段 (bp)
VP7-F :	5' GGCTTTAAAAGCGAGAATTTCC 3'	1062
VP7-R:	5' GGTCACATCATACTACTAAT 3'	
G5-2:	5' CATGTACTCGTTGTTACGTC 3'	780
G6-2:	5' CTAGTTCTTGTGTAGAATC 3'	500
G10-2:	5' TTGAGCCGTTGCGACTTC 3'	715
G8-2:	5' CGGTTCCGGATTAGACAC 3'	273
G9-2:	5' TTATAAAGTCCATTGCAC 3'	148

**D.4 检测方法**

新鲜粪便或直肠拭子加入一定量的PBS，漩涡震荡后，3000 rpm离心5 min，取上清液。按照AXYGEN病毒RNA小量提取试剂盒说明书方法提取基因组RNA。用VP7-R引物进行反转录，反转录条件为25℃ 10 min，42℃ 60 min；再用VP7-F和VP7-R引物进行第一轮PCR。然后再以第一轮PCR产物为模板，用VP7-F与G5-R、G6-R、G8-R、G9-R和G10-R多条引物进行多重半套式PCR，均设置牛轮状病毒作为阳性对照和水作为阴性对照，反应条件为94℃预变性4 min，然后94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 1 min共30个循环，最后72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

**D.5 结果判定**

在阴阳对照成立的条件下。第一轮PCR扩增出1062 bp的特异性目的条带，则判定牛轮状病毒阳性，但不能确定那个基因型。多重半套式PCR扩增出780 bp特异性条带，则判定牛轮状病毒G5型阳性；500 bp为G6型，715 bp为G10型，273 bp为G8型，148 bp为G9型阳性。

**D.6 检测序列**

GGCTTTAAAAGCGAGAATTTCCGTTTGGCTAGCGTTAGCTCCTTTAATGTATGGTATT  
GAATATAACCACAATTCTAATCTTCTTGACATCGATTACATTATTGAATTATATCTTAAAATC  
AATAACGAGAATGATGGACTATATAATTTACAGATTTCTGCTTATAGTAGTGATCTTGGC

CACCATAATAAATGCGCAAAACTATGGAGTAAATTTGCCAATTACAGGTTCAATGGATA  
CTGCGTATGCAGACTCTACACAAAGTGAGCCATTTTTGACATCAACCCTTTGTTTGTATT  
ATCCTGTTGAGGCATCAAACGAAATAGCTGATACCGAATGGAAAGATACCTTATCACAA  
TTGTTCTTGACAAAAGGATGGCCAACAGGATCAGTGTACCTTAAAGAATATGCTGATAT  
AGCGGCCTTTTCAGTGGAACCACAGTTATACTGCGATTATAATTTAGTTTTAATGAAATA  
TGATTCTACACAAGAAGACTAGATATGTCTGAATTGGCCGATCTTATATTGAACGAATGGCT  
GTGCAATCCAATGGACATAACGCTATATTATTATCAGCAGACTGATGAAGCAAATAAATG  
GATATCAACGGGCTCTTCTTGACGTTAAAGTGTGTCCATTAAATACACAAACACTTG  
GTATTGGATGTCTAATAACTAATCCAGACACGTTTGAAACAGTTGCGACAATGGAGAA  
GTTAGTGATTACAGATGTTGTAGATGGTGTCAATCACAAATTAACGTCACAACGGCAA  
CGTGCACCATACGCAACTGTAAAAAGTTAGGACCAAGGGAGAACGTAGCAGTCATACA  
GGTAGGCGGGCAAATGTTTTAGACATCACAGCTGATCCAACAACACTACACCACAGACA  
GAGAGAATGATGCGAATAAATTGGAAAAAATGGTGGCAAGTGTTTTACACGGTAGTGG  
ATTACGTCAATCAGATAATTCAGACAATGTCCAAAAGATCTAGATCGCTTAATTCGTCG  
GCGTTCTACTATAGAGTGTAGGTGCATGTTAGATTAGAGTTGTATGATGTGACC。

---