

DB 63

青 海 省 地 方 标 准

DB 63/T 2552—2026

牛病毒性腹泻监测技术

2026 - 05 - 07 发布

2026 - 06 - 01 实施

青海省市场监督管理局 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。

请注意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。

本文件由青海省农牧业标准化技术委员会提出。

本文件由青海省农业农村厅归口。

本文件起草单位：西宁市动物疫病预防控制中心、青海大学畜牧兽医科学院、中国农业科学院兰州兽医研究所、宁夏农林科学院动物科学研究所。

本文件主要起草人：孟茹、李志、韩元、付永、高闪电、王淑琴、吴英、薛万朝、陈长江、潘兴业、曾小玲、林元清、陈辅云、肖利成、柳清、桑巴、王鸿忠、彭毛卓玛、王建东、李秀英、吴鹏、李存梅、索南达杰、严德青、张珍、谢冲、杜梅卓、马元莲、徐生瑞、严海龙、王军、党媛、普华才让、徐青、周措吉、李亚榕。

本文件由青海省农业农村厅监督实施。

牛病毒性腹泻监测技术

1 范围

本文件规定了牛病毒性腹泻监测技术术语和定义、监测目的和对象、监测方式和结果处理、流行病学调查、样品采集处理、临床诊断和检测、监测数据分析和监测档案管理等内容。

本文件适用于牛科动物牛病毒性腹泻的监测。

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 牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术规范

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

SN/T 1129 牛病毒性腹泻/黏膜病检疫技术规范

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

牛病毒性腹泻（Bovine Viral Diarrhea, BVD）又称为牛病毒性腹泻/黏膜病，是由牛病毒性腹泻病毒（Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV）感染引起牛的传染病。临床上以发热、黏膜糜烂溃疡、腹泻、呼吸道症状、出血综合征、白细胞减少、妊娠母牛流产、产畸型胎等为主要特征。世界动物卫生组织将其列为必须报告的动物疫病，我国将其列为三类动物疫病。

3.2

最小群体单位

进行牛病毒性腹泻监测时，能够独立代表某一特定群体特征的最小牛群单元。

3.3

病毒分型

基于BVDV-1、BVDV-2、BVDV-3基因型特定基因序列差异，通过套式RT-PCR或荧光定量RT-PCR鉴定其基因型。

3.4

持续感染牛

妊娠母牛在怀孕早期(约120 d前)感染BVDV后可导致病毒的垂直传播,从而感染胎牛,感染的胎牛出生后存活下来的大部分犊牛都会发展成为持续感染牛(PI牛)。PI牛是BVDV最主要的储存宿主和传播来源。

4 监测目的和对象

4.1 监测目的

掌握并跟踪BVD在牛群中的分布,识别PI牛,评价其危害程度,判定其流行发展趋势。

4.2 监测对象

整个牛群或特定区域内的牛群,重点监测新生犊牛、繁殖牛群和引进牛只。

5 监测方式和结果处理

5.1 被动监测

以兽医技术人员或养殖场(户)的BVD疑似病例报告为监测核心,所有疑似病例应检尽检,适用于疫情早期预警和持续监控。

5.2 主动监测

5.2.1 季节性监测

在冬季或春季高发期,按照7.2中的采样方式,每年至少进行一次牛群BVD普查。

5.2.2 宿主群体分层监测

在季节性监测的基础上,对新生犊牛群体、后备牛及繁殖牛群、妊娠母牛群体、流产胎儿、新引进牛等进行分群分层检测。

5.2.3 风险区域分级监测

近三年内频发或者暴发过BVD的地区,或正在暴发疫情或实施净化计划地区,增加监测频率,每六个月一次;其他地区按季节性监测执行;屠宰场监测,每年每个场随机抽检屠宰牛的肠系淋巴结、脾脏各50份进行检测。

5.3 监测结果处理

除屠宰场外,BVDV抗原阳性牛应进行隔离,间隔14 d~21 d进行第二次采样检测,若抗原检测结果呈阳性,则判定为PI牛,应淘汰。

6 流行病学调查

6.1 问卷调查

收集养殖场(户)基本信息,填写动物疫病流行病学最初调查单,见附录A的图A.1。

6.2 现场调查

观察牛只健康状况，记录临床症状，填写动物疫病流行病学现场调查单，见附录A的图A.2。组织采样、检测、隔离、消毒、治疗及无害化处理等。

6.3 跟踪调查

填写动物疫病流行病学跟踪调查单，见附录A的图A.3，建立调查档案。

7 样品采集处理

7.1 采样原则

按照NY/T 541执行。

7.2 采样方式

7.2.1 随机抽样

年龄、品种、饲养条件等相同或相似牛群中随机抽取样本，以单个牛只为最小群体单位的或者不超过5头的，抽检率要求为100%；以圈舍或栏为最小群体单位，不超过50头的抽检率为30%；以养殖场区为最小群体单位，不超过200头的抽检数量不低于10%；200头以上最小抽检量不低于20头。

7.2.2 分层抽样

将年龄、品种、饲养条件等相差较大牛群，根据牛群特征进行分层，在每层内随机采样，抽样比例同7.2.1。

7.3 样品采集

无菌采集抗凝全血；血清、组织样品、鼻拭子、精液、牛奶样品的采集、保存、贮存和处理按GB/T 18637执行。新鲜粪便样品使用一次性粪便采集器或手套等采集，采集量为3g~5g，4℃保存和运输。

8 临床诊断和检测

8.1 临床诊断

按照GB/T 18637执行。

8.2 检测

8.2.1 抗原检测

对血清、全血、新鲜粪便样品、组织中的病毒抗原检测，按照SN/T 1129执行，或采用市售牛病毒性腹泻抗原检测试剂盒进行检测。

8.2.2 核酸检测

8.2.2.1 仪器设备

生物安全柜、冰箱、高速台式离心机（最高离心力不低于12000 g）、单道微量移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）、涡旋混合振荡器、PCR仪、荧光定量PCR仪、核酸电泳系统、凝胶成像仪等。

8.2.2.2 耗材

无核酸酶吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）、无核酸酶离心管（1.5 mL）、PCR仪的配套反应管（板）、荧光定量PCR仪配套的反应管（板）。

8.2.2.3 试剂

- 无核糖核酸酶（Ribonuclease-Free Water, RNase）水、TRIzol（2℃~25℃）、氯仿（2℃~8℃）、异丙醇、75%乙醇、DL2000 DNA Marker；
- RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、荧光探针 RT-PCR 试剂盒、预混型 Taq 酶；
- 1×TAE 电泳液、1.0%琼脂糖凝胶及其使用注意事项见附录 B；
- 逆转录聚合酶链式反应（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR）引物及其反应液见附录 C；
- 套式 RT-PCR 引物及其反应液见附录 D；
- 荧光定量 RT-PCR 引物、探针序列及其反应液见附录 E；
- 阴性对照为无 BVDV 核酸的 RNA；
- RT-PCR 阳性对照可从 BVDV AV69 株或其它毒株细胞培养物提取，也可委托生物公司将毒株 5' UTR 区合成至含 T7 启动子载体后利用 T7 RNA 聚合酶转录获得。

8.2.2.4 核酸提取

为确保检测准确性，严格按照以下步骤进行RNA提取。可选用市售总RNA提取试剂盒，参照说明书执行。实验操作应在生物安全柜中进行，并全程使用无RNase耗材及试剂：

- 在样本制备区，根据待检样品数量（n）取无 RNase 离心管，编号；
- 在生物安全柜中，每管中加入 600 μL Trizol，分别加入 100 μL 待检血清、抗凝血、处理的组织或新鲜粪便混悬液离心后的上清，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 1 mL 无 RNase 水配制的冰冷 75%乙醇充分洗涤沉淀；
- 4℃、7500 g 离心 5 min，弃上清，吸去残存的液体，室温风干 3min；
- 加入适量（20 μL~25 μL）无 RNase 水溶解，直接用于检测-80℃保存。

8.2.2.5 RT-PCR

BVDV的RT-PCR检测应按照分区操作要求（反应液配制区、样本制备区及检测区）进行，具体步骤如下：

- 引物序列、反应液配方见附录 C；
- 在反应混合物配置区进行反应液配制；
- 在每个反应体系使用 24 μL 反应液，根据 8.2.2.4 中设定的 n 值，按表 C.2 配制 n+3 个反应体系的反应液，充分混匀后分装，每管 24 μL，转移反应液至样本制备区；
- 在反应管中加入 8.2.2.4 中制备的 RNA 溶液 1 μL，使每管总体积达到 25 μL，分别在阳性对照管和阴性对照管中分别加入 8.2.2.3 中的 RT-PCR 阳性对照 RNA 和阴性对照 RNA 各 1 μL；盖紧管盖编号，瞬时离心；

- e) 在检测区进行第一轮 RT-PCR 反应，反应参数为：50℃、30 min；94℃、2 min；94℃、30 s，55℃、30 s，72℃、30 s，共 35 个循环；72℃、10 min。也可根据所用试剂盒推荐的程序进行 RT-PCR 反应；
- f) 利用含凝胶红（GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 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，1×TAE 电泳液配制方法见附录 B.1，1.0% 琼脂糖凝胶配制方法见附录 B.2，目的条带的大小分别为 294bp，扩增结果见附录 F.1。

8.2.2.6 套式 RT-PCR

病毒分型检测可采用套式 RT-PCR 方法，该方法通过两轮特异性扩增可提高检测灵敏度，可区分 BVDV-1、BVDV-2 和 BVDV-3 三种基因型。实验操作遵循分区管理原则，并设置相应基因型的阳性对照。具体检测流程如下：

- a) 套式 RT-PCR 检测引物序列、反应液配方见附录 D；
- b) 在反应混合物配置区进行反应液配制；
- c) 在每个反应体系使用 24 μL 反应液，根据 8.2.2.4 中设定的 n 值，按表 D.2 配制 n+5 个反应体系的反应液，充分混匀后分装，每管 24 μL，转反应液至样本制备区；
- d) 在反应管中加入 8.2.2.4 中制备的 RNA 溶液 1 μL，使每管总体积达到 25 μL；在阴性对照管加入 8.2.2.3 中的阴性对照 RNA 1 μL，在阳性对照管分别加入 BVDV-1、BVDV-2、BVDV-3 阳性对照 RNA 1 μL；盖紧管盖，编号，瞬时离心；
- e) 在检测区进行第一轮 RT-PCR 反应，反应参数为：50℃、30 min；94℃、2 min；94℃、30 s，55℃、30 s，72℃、1 min，共 35 个循环；72℃、10 min。也可根据所用试剂盒推荐的程序进行 RT-PCR 反应；
- f) 按表 D.3 配置 n+5 个反应体系的反应液，充分混匀后分装，每管 24 μL，转移反应液至样本制备区；
- g) 在第一轮反应结束后取 1 μL PCR 产物与 49 μL 无 RNase 水混匀后，取 1 μL 分别进行 BVDV-1、BVDV-2、BVDV-3 的病毒分型检测。反应程序为 95℃、30 s，55℃、30 s，72℃、30 s，30 个循环；72℃、10 min。也可根据预混型 Taq 酶推荐的程序进行扩增反应；
- h) 利用含核酸染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳，经凝胶成像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。扩增结果见附录 F.2。

8.2.2.7 荧光定量 RT-PCR

BVDV 荧光定量 RT-PCR 检测采用多重探针技术也可实现病毒分型，可对 BVDV-1、BVDV-2 和 BVDV-3 基因分型。具体检测流程如下：

- a) 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；BVDV 分型荧光定量 RT-PCR 检测引物和探针，见附录 E.1；也可以根据所用荧光定量 PCR 仪选择适当的染料对探针进行标记；
- b) 在反应混合物配置区进行反应液配制；
- c) 在每个反应体系使用 24 μL 反应液；根据 8.2.2.4 中设定的 n 值，分别按表 E.2、E.3 配制 n+3 个反应体系的反应液，充分混匀后分装，每管 24 μL，转移反应液至样本制备区；
- d) 在反应管中加入 8.2.2.4 中制备的 RNA 溶液 1 μL，使每管总体积达到 25 μL；在阴性对照管加入 8.2.2.3 中的阴性对照 RNA 1 μL，在阳性对照管加入 8.2.2.3 中的 BVDV-1 和 BVDV-2 阳性对照 RNA 各 0.5 μL（BVDV-1/BVDV-2 检测）或 8.2.2.3 中的 BVDV-3 阳性对照 RNA 1 μL（BVDV-3 检测）；盖紧管盖，编号，瞬时离心；

- e) 在检测区进行荧光定量 RT-PCR 反应, 反应参数为: 42℃, 5 min; 95℃, 10 s 进行反转录反应, 然后按 95℃、5 s, 60℃、30 s 在荧光定量 PCR 仪进行 40 个循环的扩增; 也可根据所用试剂盒推荐的程序进行反应;
- f) 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 (图 F.3 在一反应管中同时检测 BVDV-1 和 BVDV-2, 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; 在另一反应管中对 BVDV-3 单独进行检测, FAM 通道扩增曲线表示 BVDV-3 阳性)。

8.3 结果判定

符合 8.2.1 且符合 8.2.2 (8.2.2.5 或 8.2.2.6 或 8.2.2.7 中核酸阳性条件) 阳性判定指标的均判定为样品病原学阳性。

9 监测数据分析

9.1 感染率计算

9.1.1 群体感染率

检测阳性牛群占全部调查牛群的比例。群体感染率见式 (1):

$$\text{BVDV(HIR)} = \frac{\text{BVDV(H}^+)}{\text{BVDV(H}^T)} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

HIR —— 群体感染率 (%);

H^+ —— 检测阳性牛群数;

H^T —— 总调查牛群数。

9.1.2 个体感染率

检测阳性牛只占全部检测牛只的比例。个体感染率见式 (2):

$$\text{IR} = \frac{N_{\text{BVDV}^+}}{N^T} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

IR —— 个体感染率 (%);

N_{BVDV^+} —— 牛病毒性腹泻病毒检测阳性牛数;

N^T —— 检测牛总数。

9.1.3 阳性抗体率

BVDV 抗体阳性的牛比例, 反映牛群既往感染或疫苗免疫情况。抗体阳性率见式 (3):

$$\text{Ab}^+ = \frac{N^+}{N^T} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

Ab^+ —— 抗体阳性率 (%);

N^+ —— 检测阳性牛数;

N^T —— 检测牛总数。

9.2 空间分布分析

分析感染牛只的分布特征，识别高风险区域。

9.3 时间趋势分析

评估感染率随时间的变化，预测疫情发展趋势。

9.4 群体特征分析

比较不同年龄、品种、饲养方式牛只的感染率，识别高风险群体。

9.5 调查数据分析

收集养殖场/户的背景信息、饲养管理和PI牛淘汰情况等，识别与BVDV感染相关的风险因素，评估防控措施和净化效果。

10 监测档案管理

牛场基本信息、监测计划、采样记录、流行病学调查表、检测结果、防控措施、检测报告、数据分析等形成纸质和电子材料，保存期不低于十年。

附 录 A
(规范性)
动物疫病流行病学调查单

图A. 1给出了最初发现动物疫病时开展的流行病学调查单的模板，图A. 2给出了动物疫病流行病学现场调查单的模板，图A. 3给出了动物疫病流行病学跟踪调查单的模板。

畜主：	地址：	联系电话：
接报时间：	接报途径：	
养殖场户地貌特征：山地口 丘陵口 湿地口 草场口 荒漠半荒漠口 其他 _____		
饲养方式：放牧口 舍饲口 半舍饲半放牧口		
始现症状日期：	临床症状：	
发病动物种类：	存栏数：	发病数： 同群数：
死亡数：	无害化处理数：	
动物来源：	购进时间：	检疫证号：
近一月出栏及去向：		
免疫时间：		
疫苗种类、来源、生产厂家及批号：		
免疫人：	免疫耳标：	
与野生动物交集情况： 是 ☐ 否 ☐		
饲草料种类及来源：		
防疫消毒设施及消毒情况：		
其他：		
调查日期：	调查人员：	调查人员单位：

图A. 1 动物疫病流行病学最初调查单

畜主:	地址:	联系电话:
接报时间:	接报途径:	
养殖场户地貌特征: 山地口 丘陵口 湿地口 草场口 荒漠半荒漠口 其他 _____		
饲养方式: 放牧口 舍饲口 半舍饲半放牧口		
始现症状日期:		
发病动物种类:	存栏数:	发病数: 同群数:
死亡数:	无害化处理数:	
动物来源:	近一月出栏及去向:	
购进时间:	检疫证号:	
免疫时间:	疫苗种类、来源、生产厂家及批号:	
免疫人:	免疫耳标:	
与野生动物交集情况: 是 ☐ 否 ☐		
饲草料种类及来源:		
防疫消毒设施及消毒情况:		
饲养管理及人员:		
临床症状:		
剖检变化:		
初步诊断:		
样品类型:	实验室检测:	
建议的措施: (按实际情况选项打√)		
隔离病畜口;	2. 立即上报疫情;	3. 禁止易感动物流动;
	4. 全面消毒;	5. 采样送检;
6. 周边紧急免疫。其他 _____		
调查日期:	调查人员:	调查人员单位:

图A. 2 动物疫病流行病学现场调查单

畜主:	地址:	联系电话:
接报时间:	接报途径:	
养殖场户地貌特征及饲养方式:		
平原口 山地口 丘陵口 湿地口 草场口 封闭圈舍口 舍饲口 半舍饲半放牧口 放牧口		
始现症状日期:	最初感染日期:	
发病动物种类:	存栏数:	发病数: 同群数:
死亡数:	无害化处理:	
动物来源:	近期出栏及去向:	
购进时间:	检疫证:	
疫苗种类、来源、生产厂家及批号:		
免疫时间:	免疫人:	免疫耳标:
周围畜禽及野生动物情况:		
圈舍:	饲料:	
饲养管理及人员:	场地圈舍环境卫生:	
防疫消毒设施及消毒情况:		
诊断情况:		
无害化处理/消毒灭源情况:		
人畜共患病人员感染情况:		
已采取的措施 (按实际情况选项打√):		
1. 隔离病畜;	2. 立即上报疫情;	3. 禁止易感动物流动;
4. 全面严格;	5. 采样送检;	6. 病畜扑杀;
7. 封锁疫点、疫区, 人员、车辆进出严格消毒; 8. 周边紧急免疫, 建立免疫带。		
调查时间:	调查人员:	调查人员单位:

图A. 3 动物疫病流行病学跟踪调查单

附 录 B
(规范性)
溶液配制

B.1 1×TAE 电泳液

Tris碱, 4.48 g; 冰醋酸, 1.14 mL; EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0) 2 mL。加蒸馏水定容至1000 mL, 在121℃下蒸汽灭菌20 min。

B.2 1.0%琼脂糖凝胶

琼脂糖, 1 g, 加1×TAE定容至100 mL, 加热融化、混匀, 适当冷却, 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 C
(规范性)

RT-PCR 引物序列及反应液配方

C.1 RT-PCR 引物序列

BVDV RT-PCR引物见表C.1。

表C.1 BVDV RT-PCR 引物

引物名称	序列（5'-3'）
5' UTR-F	CTAGCCATGCCCTTAGTAGGACTA
5' UTR-R	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCA

C.2 BVDV RT-PCR 反应液

BVDV RT-PCR反应液见表C.2。

表C.2 BVDV RT-PCR 反应液

RT-PCR反应液组分	每个反应体系用量（μL）
2X 1 Step Buffer	12.5
5' UTR-F引物（10 μM）	1
5' UTR-R引物（10 μM）	1
1 Step Enzyme Mix	1
无RNase水	8.5

附 录 D
(规范性)

套式 RT-PCR 引物序列及反应液配方

D. 1 套式 RT-PCR 引物探针序列

BVDV套式RT-PCR引物见表D. 1。

表D. 1 BVDV 套式 RT-PCR 引物

引物名称	序列（5’-3’）
PanBVDVpcrF	CTCTGCTGTACATGGCACATG
PanBVDVpcrR	TTCTCACTNGCRTCCATCAT
BVDV-1 npcrF	TTTCAAGCTGCTCHGAYAC
BVDV-2 npcrF	ATCCTGACCAATGCTAGGTCC
BVDV-3 npcrF	TCCTGTGGCAACCGGTAGGT

D. 2 BVDV 套式 RT-PCR 第一轮反应液

BVDV套式RT-PCR第一轮反应液配方见表D. 2。

表D. 2 BVDV 套式 RT-PCR 第一轮反应液

套式RT-PCR反应液组分	每个反应体系用量（μL）
2X 1 Step Buffer	12.5
PanBVDVpcrF引物（10 μM）	1
PanBVDVpcrR引物（10 μM）	1
1 Step Enzyme Mix	1
无RNase水	8.5

D. 3 BVDV 套式 RT-PCR 第二轮反应液

BVDV套式RT-PCR第二轮反应液配方见表D. 3。

表D. 3 BVDV 套式 RT-PCR 第二轮反应液

PCR反应液组分	每个反应体系用量（μL）
Premix Taq（dye plus）	12.5
BVDV-1 npcrF引物（10 μM）	1
BVDV-2 npcrF引物（10 μM）	1
BVDV-3 npcrF引物（10 μM）	1
PanBVDV pcrR引物（10 μM）	1
无RNase水	7.5

附 录 E
(规范性)

引物探针序列及荧光定量反应液配方

E. 1 BVDV 引物及探针序列

BVDV引物及探针序列见表E. 1。

表E. 1 BVDV 引物探针序列

引物或探针名称	序列（5'-3'）
BVDV-1/2上游引物	CTAGCCATGCCCTTAGTAG
BVDV-1/2下游引物	CGTCGAACCAGTGACGACT
BVDV-1探针	FAM-TAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGGCT-BHQ
BVDV-2探针	TxR-TAGCGGTAGCAGTGAGTTCGTTGGATGGCC-BHQ
BVDV-3上游引物	GACTAGTGGTAGCAGTGAGC
BVDV-3下游引物	GAGGCATTCCTTGATGCGTC
BVDV-3探针	FAM-ACTCGGGGCTTCGGTGATCCAGGG-BHQ

E. 2 BVDV-1、BVDV-2 分型荧光定量 RT-PCR 反应液配方

BVDV-1、BVDV-2分型荧光定量RT-PCR反应液配方见表E. 2。

表E. 2 BVDV-1、BVDV-2 分型荧光定量 RT-PCR 反应液配方

反应液组分	每反应体系用量（μL）	
2×One Step RT-PCR Buffer	12.5（Buffer不含酶）	/12.5（Buffer含酶）
BVDV-1/2上游引物（10 μM）	0.5	/0.5
BVDV-1/2下游引物（10 μM）	0.5	/0.5
BVDV-1探针（10 μM）	0.25	0.5
BVDV-2探针（10 μM）	0.25	0.5
ROX Reference Dye或DyeII	0.5	/0.5
反转录酶	0.5	/-
ExTaq	0.5	/-
无RNase水	8.5	/9.5

E. 3 BVDV-3 分型荧光定量 RT-PCR 反应液配方

BVDV-3分型荧光定量RT-PCR反应液配方见表E. 3。

表E. 3 BVDV-3 分型荧光定量 RT-PCR 反应液配方

反应液组分	每反应体系用量（μL）	
2×One Step RT-PCR Buffer	12.5（Buffer不含酶）	/12.5（Buffer含酶）
BVDV-3上游引物（10 μM）	0.5	/0.5
BVDV-3下游引物（10 μM）	0.5	/0.5

表 E.3 BVDV-3 分型荧光定量 RT-PCR 反应液配方（续）

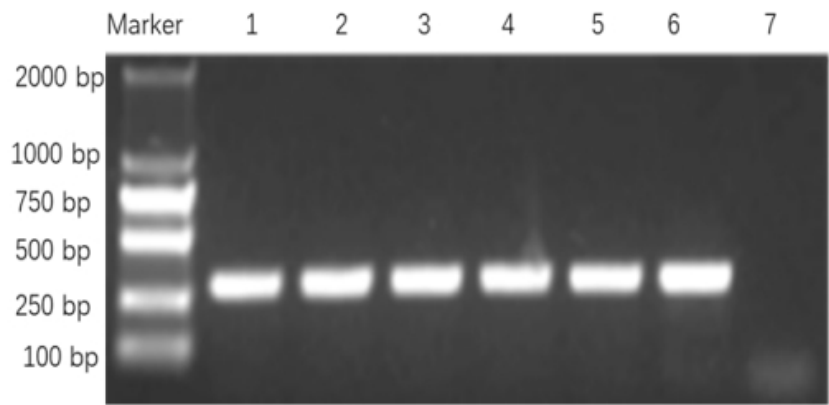
反应液组分	每反应体系用量（ μL ）	
BVDV-3探针（10 μM ）	0.25	/0.25
ROX Reference Dye或DyeII	0.5	/0.5
反转录酶	0.5	/-
ExTaq	0.5	/-
无RNase水	8.75	/9.75

附 录 F
(规范性)

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

F. 1 BVDV RT-PCR 结果电泳示意图

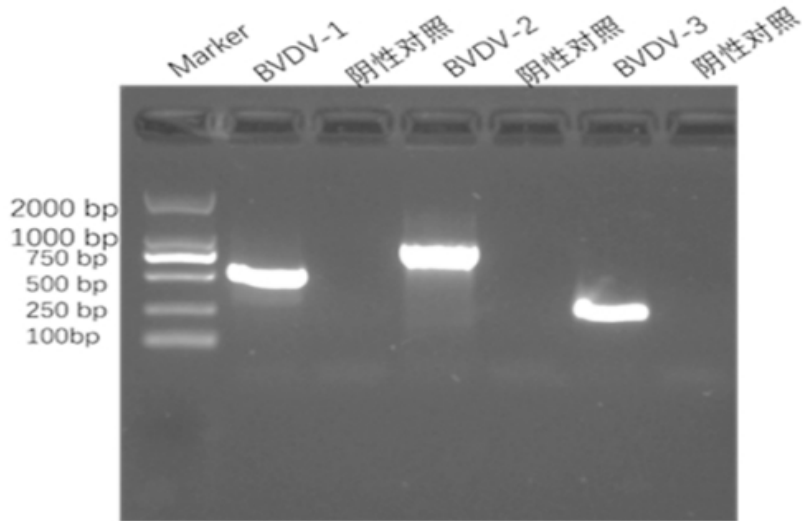
BVDV RT-PCR结果电泳示意图见图F. 1。



图F. 1 BVDV RT-PCR 结果

F. 2 BVDV 套式 RT-PCR 结果电泳示意图

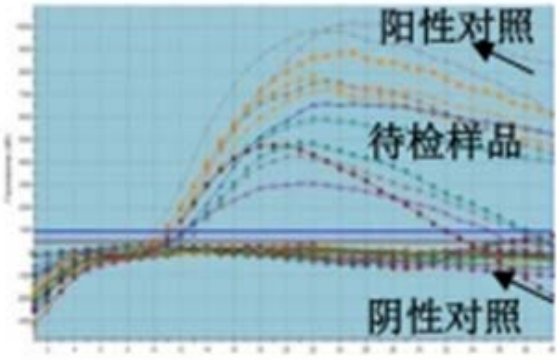
BVDV套式RT-PCR结果电泳示意图见图F. 2。



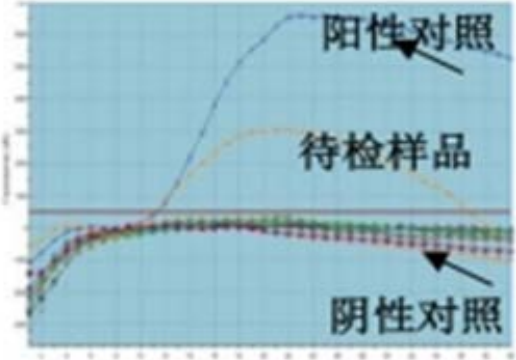
图F. 2 BVDV 套式 RT-PCR 结果

F. 3 BVDV 分析荧光定量 RT-PCR 扩增曲线示意图

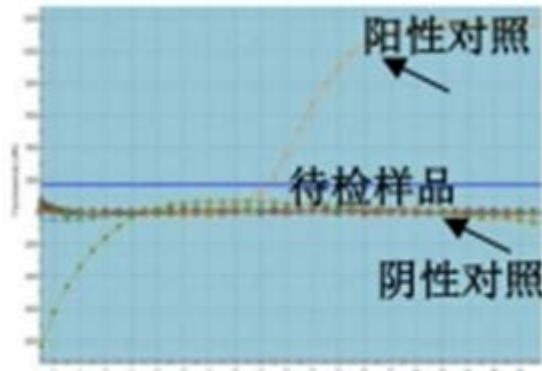
BVDV分型荧光定量RT-PCR扩增曲线示意图见图F. 3。



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)

图F. 3 BVDV 分型荧光定量 RT-PCR 扩增曲线示意图