

张康, 郭志廷, 仇正英, 等. 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (9): 1042–1047.
ZHANG K, GUO Z T, QIU Z Y, et al. A RT-PCR Assay for Quantitative Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (9): 1042–1047.

牛病毒性腹泻/黏膜病病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立

张 康^{1,2}, 郭志廷¹, 仇正英¹, 张景艳¹, 王 磊¹, 张 凯¹,
王贵波¹, 梁芬芬¹, 马 倩^{1*}, 李建喜^{1*}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业农村部兽用药物创新重点实验室/甘肃省新兽药工程重点实验室,
甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要:【目的】设计一种能够快速检测出牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 的方法。【方法】依据 GenBank 公布的 BVDV 5'UTR 基因属于特异性保守区域的前提, 构建具有特异性的探针和引物, 以体外转录病毒 RNA 作为绝对定量标准品。对荧光定量 RT-PCR 方法的各反应条件进行优化, 创建 BVDV 荧光定量 PCR 检测方法。【结果】5.026 7 copies·μL⁻¹ 是此检测方法的最低下限值, 该方法拥有良好的重复性, 变异系数在组内、组间均<1%。特异性较高, 对其他病毒核酸的扩增均为阴性, 如猪瘟病毒、口蹄疫病毒等。【结论】建立的 BVDV 荧光定量 PCR 方法敏感性高、特异性强、重复性好, 为牛病毒性腹泻的早期诊断提供了重要的技术支撑。

关键词:牛病毒性腹泻病毒; 5'UTR; 实时荧光定量 PCR; RNA 标准品

中图分类号: S 852.62

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 09-1042-06

A RT-PCR Assay for Quantitative Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus

ZHANG Kang^{1,2}, GUO Zhitong¹, QIU Zhengying¹, ZHANG Jingyan¹, WANG Lei¹, ZHANG Kai¹,
Wang Guibo¹, LIANG Fenfen¹, MA Qian^{1*}, LI Jianxi^{1*}

(1. Key laboratory of New Animal Drug Project of Gansu Province, Key Laboratory of Veterinary Drug Innovation and Ministry of Agriculture, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS of Ministry of Agriculture, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract:【Objective】A rapid detection and quantification method for bovine viral diarrhea virus (BVDV) was established.

【Method】For the methodology development, specific primers and probes were designed based on the target regions of the BVDV 5'UTR gene published by GenBank. The RNA of *in vitro* transcription viruses was used as the absolute quantitative standard. Reaction conditions of the fluorescent quantitative RT-PCR were optimized. 【Result】The newly developed assay had a minimum detection limit of 5.0267copies/μL and an intragroup variation coefficient of less than 1% with high repeatability and specificity. Other than BVDV, it amplified no viral nucleic acids of viruses such as swine fever and foot-and-mouth diseases. 【Conclusion】The established fluorescence quantitative RT-PCR method was highly sensitive, specific, and repeatable in detecting and quantifying BVDV. It appeared appropriate for early diagnosis of bovine viral diarrhea.

Key words: Bovine viral diarrhea virus; 5'UTR; RT-PCR; standard RNA

收稿日期: 2020-11-02 初稿; 2021-08-30 修改稿

作者简介: 张康 (1987-), 男, 助理研究员, 主要从事奶牛疾病诊断研究 (E-mail: 467863181@qq.com)

* 通信作者: 马倩 (1991-), 女, 助理研究员, 主要从事兽医临床诊断研究 (E-mail: 499462890@qq.com); 李建喜 (1971-), 男, 研究员, 主要从事奶牛疾病免疫学研究 (E-mail: Lzjianxil@163.com)

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设项目 (CARS36); 甘肃省青年科技基金计划 (21JR7RA030); 中国农业科学院科技创新工程协同创新项目 (CAAS-XTCX2016011-01-09); 中兽医与临床科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2015-LIHP)

0 引言

【研究意义】牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 隶属黄病毒科、瘟病毒属, 是一个较大的 ORF (开放阅读框)^[1-2], 主要包括三个部分 3'UTR (3'非翻译区)、ORF 编码区、5'UTR (5'非翻译区)。5'UTR 序列在整个基因系列中具有高度的保守性, 根据这组基因的特点设计引物能够在分子水平对 BVDV 进行诊断, 并对其进行病原基因分型^[3]。目前 BVDV 是一种威胁全球养牛业的重要病原体^[4]。BVDV 能够穿过怀孕母牛的胎盘屏障感染胎儿, 从而生出携带有大量病原的持续感染 (PI) 犊牛^[5]。该 PI 牛通常出生后体弱多病, 并且由于其自身免疫系统的损伤, 特别容易伴随机会性感染。PI 牛在临幊上通常出现死亡率极高的迟发型粘膜病^[6], 严重影响牛群健康, 对养殖业造成极大的经济损失^[7]。因此控制 BVDV 感染最有效的手段就是 PI 牛的早期诊断^[8]。【前人研究进展】目前国内外检测 BVDV 的方法繁多, 包括免疫组织化学 (IHC)、抗原 ELISA、RT-PCR 和 RT-qPCR 以及最近开发的 RT-ELISA 和交叉引物恒温扩增技术^[9]。Driskell 等^[10]建立检测 BVDV 的免疫组织化学 (IHC) 方法, 其优点是适合批量临幊样本检测, 但需要操作熟练的稳定人员和新鲜完整的组织样本; 李家伟等^[11]建立牛病毒性腹泻病毒 LAMP 检测方法, 其优点是可现场操作, 但极易出现假阳性; 范晴等^[12]与胡俊英等^[13]建立的牛病毒性腹泻病毒抗原 ELISA 检测方法, 其包被蛋白暂不能批量生产满足临幊检测需求; 王荣等^[14]提出的使用实时荧光定量 RT-PCR 检测 BVDV 的方法不如探针技术敏感性高。而我国诊断 BVDV 国家标准技术规定首先采用培养细胞分离病毒的方法, 其分离鉴定法主要通过接种牛肾细胞, 一般需传至 1~3 代左右才能出现明显病变, 具备分离条件的实验少, 因此不适用批量检测临幊样本^[15]。【本研究切入点】以上每个检测方法在灵敏度、成本和耗时方面都存在着优缺点。而荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术是一种能够实时、快速、敏感、准确地检测病毒在体内的分布及变化且能克服其他方法检测不足的技术, 因此在病原诊断、病原定量检测及抗病毒机制等方面得到了广泛应用^[9,16]。应用荧光定量 PCR 方法诊断牛病毒性腹泻病毒的研究尚待深入探讨。【拟解决的关键问题】本研究对 GenBank 提交的 BVDV 5'UTR 基因序列进行比对, 对 TaqMan 通用探针、BVDV 的引物进行改造、设计, 以期创建具有灵敏度高、特异性强、能够相对定量且快速便捷的检查

方法, 为兽医工作者研究和快速诊断牛病毒性腹泻病毒提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 病毒和样品

从中国兽医药品监察所购进 BVDV 阳性样品, 编号为 CVCC AV67, 存放于中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所兽医室实验室。牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV) 疫苗购自金字保灵生物药品有限公司, 口蹄疫病毒 (FMDV) 灭活疫苗购自中农威特生物科技股份有限公司, 猪瘟病毒 (CSFV) 疫苗、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV) 疫苗购自青岛易邦生物工程有限公司。从甘肃、青海和陕西等省份的奶牛养殖户中收集到 65 份临床症状疑似受牛病毒性腹泻病毒感染的腹泻牛粪便样品 (兽医根据腹泻牛体格瘦小、抵抗能力差、免疫力低下和使用抗生素治疗无效等筛选出疑似 BVDV 感染牛进行采样)。

1.2 主要仪器及试剂

荧光定量 PCR 仪, 紫外分光光度计, 凝胶成像仪; Dnase-FreeRNase, Rnas-Free DnaseI, T7 RNA Polymerase, MaximaH Minus First StrandcDNA Synthesis Kit; 2×EsTaq MasterMix; 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、DNA 琼脂糖胶回收试剂盒、EasyPURE RNA Purification Kit、One Step PrimeScript TM RT-PCR Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 引物设计和合成

引物的设计登录 NCBI 从 GenBank 下载 BVDV 5'UTR 保守区域基因序列, 使用 MegAlign 软件对其进行对比, 选择其相对保守位置, 利用 Oligo6.0 进行分析, 设计 2 对特异性引物 (标准品引物 A-F/B-R 和定量引物 Q-F/Q-R) 和 1 条探针, 其中标准品上已加有 T7 启动子, 下游引物加有多聚 T 尾巴 (表 1), 均由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.4 样品 RNA 的提取

按照试剂盒中的说明书进行操作, 样本中提取总 RNA, 置于 -20 ℃ 环境保存备用。

1.5 阳性标准品的制备

以阳性样品提取的 RNA 作为模板进行 RNA 反转录, 以引物 A-F 和 B-R 作为扩增引物进行 PCR 产物的扩增, 依照胶回收试剂盒的说明对其进行操作, 可以得到纯化回收目的片段, 之后按照 T7 RNA Polymerase 相关说明, 对其转录进行操作, 转录后纯化所得到的产物即为体外转录所制备的标准品。

1.6 荧光定量 PCR 方法的建立

以 BVDV 的阳性标准品作为模板建立荧光 PCR

表1 引物和探针
Table 1 Primers and probes applied

引物名称 Primers	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'-3')	目的片段大小/bp Product size/bp
A-F	TAATACGACTCACTATAGGG-CATGCCCATAGTAGGAC	325
B-R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CCATGTGCCATGTACAG	
Q-F	GAGGGTAGCAACAGTGGTGA	76
Q-R	AGGCGTCGAACCAGTGACG	
探针	FAM-GTGGTGAGTCGTTGGATGGCT-BHQ1	

方法, 配制的荧光 PCR 反应体系包括以下组分: 2×One Step RT-PCR Buffer III 反应液 10 μ L, TaKaRa Ex *Taq* HS 反应液 0.4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix II 反应液 0.4 μ L, 上游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 和下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.4 μ L, 荧光探针 (5 μ mol·L⁻¹) 0.8 μ L, RNA 标准品 2 μ L, 用 ddH₂O 补充至 20 μ L, 扩增条件为: 温度 45 ℃ 时间 5 min, 95 ℃ 10 s, 40 个扩增循环 (95 ℃ 5 s、60 ℃ 20 s)。

1.7 标准扩增曲线的建立和敏感性试验

将标准品 RNA 模板浓度分别进行 10 倍倍比稀释, 以 5.0267×10^9 copies· μ L⁻¹ 为起始浓度稀释到 5.0267×10^{-1} copies· μ L⁻¹, 之后按照其相关要求对其进行稀释, 不同稀释度核酸作为模板进行 PCR 扩增, 将相关标准浓度的 Ct 值作为纵轴指标, 以稀释倍数所计算得到的对数作为横轴指标, 画出其标准曲线。在这个曲线基础上得到荧光定量 PCR 的敏感程度以及最小测定值。

1.8 特异性试验

按照上述的手段对其 FMDV、BVDV、IBRV、CSFV、PRRV 的 DNA/RNA 模板进行扩增, 对其定量 PCR 反应指标进行观察, 对特异性进行评价。

1.9 重复性试验

将得到的已知浓度 BVDV 阳性标准品按照 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 以及 10^{-6} 的比例进行稀释, 然后进行组间与组内重复试验, 在进行组内试验的过程中, 需要将每一个标准使用同一种方法重复 3 次; 在进行组间试验时, 需要在不同的时间使用这一方法重复 3 次, 针对测定的结果对其进行分析, 来评估本次研究的价值, 能否将结果复现。

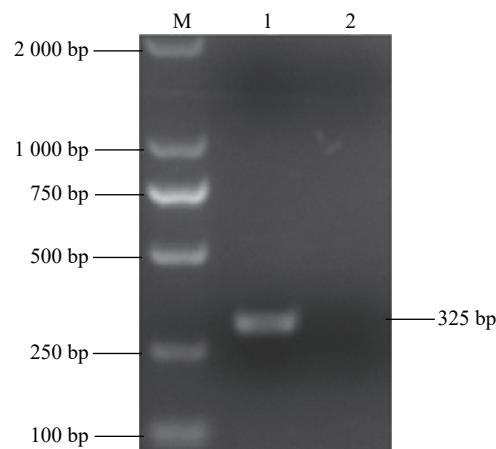
1.10 荧光 PCR 方法的应用

使用已经获得的荧光定量 PCR 方法, 对临床收集到的 65 份标本 (这些标本均为怀疑为牛病毒性腹泻病毒感染的牛粪便) 进行扩增, 出现了阳性结果并对本次研究的可行性程度进行评估。

2 结果与分析

2.1 BVDV 标准品引物的特异性扩增结果

按照相关说明书对其病毒 RNA 进行扩增操作, 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 对其进行测定, 获得了分子量为 325 bp 左右的条带 (图 1)。



注: M 为 DNA marker; 1 为 PCR 产物; 2 为阴性对照。

Note: M: DNA marker; 1: PCR product; 2: negative control.

图 1 标准品引物扩增产物

Fig. 1 Amplification products of RNA standard primers

2.2 标准品 RNA 纯度分析结果

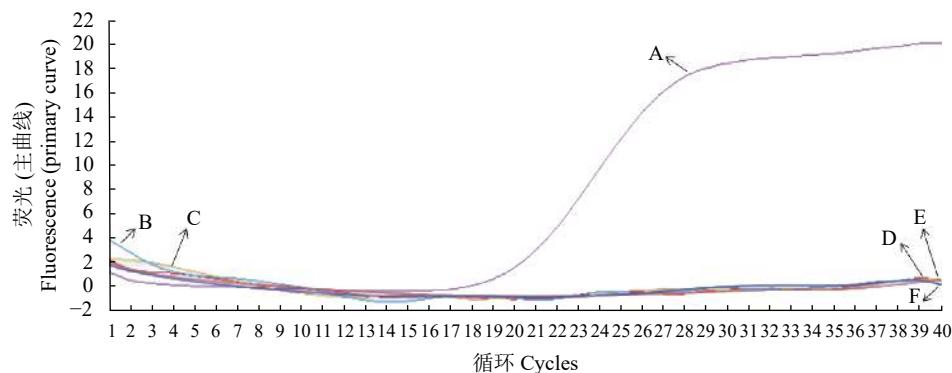
紫外分光光度计测定结果显示, 标准 RNA 原液的 D_{260}/D_{280} 值达到 1.92, 其质量浓度达到 35.70 mg·L⁻¹。

2.3 荧光定量 PCR 方法的建立和特异性试验

将 BVDV 阳性核酸作为模板, 对其进行扩增, 最终得到了 S 形曲线, 同时用建立的荧光探针方法对 FMDV、IBRV、CSFV 和 PRRS 病毒进行扩增, 上述样品都没有得出特异性条带, 这就证实这一检测手段对 BVDV 有较好的特异性, 但对遗传物质比较类似的病毒并没有出现相关的反应 (图 2)。

2.4 荧光定量 PCR 方法的标准曲线和敏感性试验

将 BVDV 阳性核酸 (含量为 5.0267×10^9 copies· μ L⁻¹) 10 倍稀释后进行扩增 (表 2), 其数据表明, 由于模板拷贝数不断减少, Ct 值逐渐上升,



注: A 为阳性样品 (BVDV NADL 标准毒株); B 为 FMDV; C 为 IBRV; D 为水 (阴性对照); E 为 CSFV; F 为 PRRS。

Note: A: BVDV positive control; B: FMDV; C: IBRV; D: negative control; E: CSFV; F: PRRS.

图 2 荧光定量 PCR 方法特异性试验

Fig. 2 Specificity of RT-PCR assay

当稀释达到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 时, Ct 值分别为 11.17、13.48、18.68、21.43、24.13、28.44、31.22、35.16 和 37.69, 为 S 形曲线, 但达到 10^{-10} 时, 则不显示曲线。这表明本方法的检测极限是样品的 10^{-9} 稀释倍数, 即阳性标准品的浓度为 $5.0267 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 3)。以 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 等不同浓度的反对数作为

横轴, 以对应的 Ct 值作为纵轴制作标准曲线 (图 4), 可以得到相关的回归方程: $y=3.4689x+7.3039$, 相关系数 $R^2=0.9938$, 这说明 Ct 值与拷贝数之间呈现非常强的线性关系, 表明该方法稳定性好, 意味着无论待检样品的模板浓度高低, 用该方法进行检测都可以得到较好的试验结果。

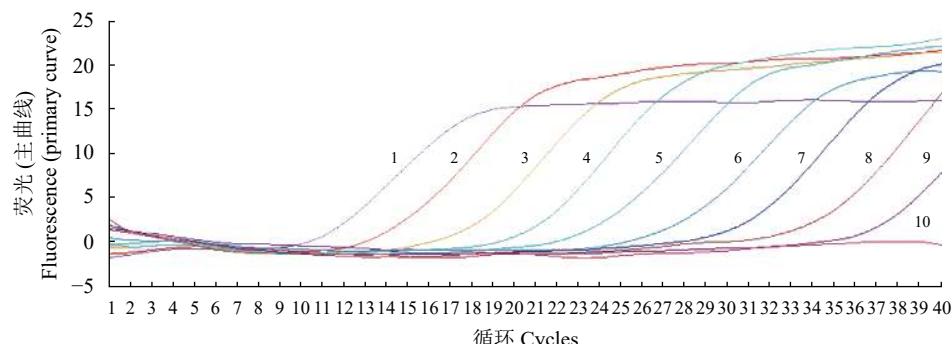


图 3 荧光定量 PCR 敏感性试验

Fig. 3 Sensitivity of RT-PCR assay

表 2 核酸浓度

Table 2 Nucleic acid concentration

扩增曲线 Amplification curve	核酸浓度 Nucleic acid concentration (copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1	5.0267×10^8
2	5.0267×10^7
3	5.0267×10^6
4	5.0267×10^5
5	5.0267×10^4
6	5.0267×10^3
7	5.0267×10^2
8	5.0267×10^1
9	5.0267
10	0.50267

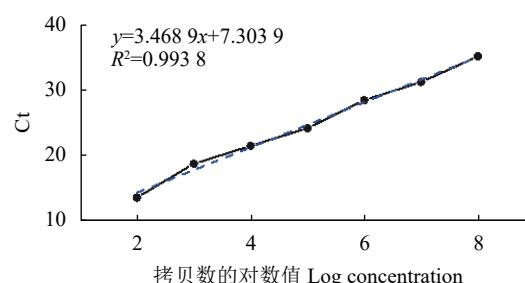


图 4 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 4 Standard curve for RT-PCR assay

2.5 荧光 PCR 方法的重复性

获取以上的稀释倍数 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 的模板对其进行重复性研究, 结果表明, 组内重

复试验的变异系数 (CV) 平均为 $0.77\% \pm 0.13\%$ ，组间重复试验的变异系数 (CV) 平均为 $0.90\% \pm 0.67\%$ ，这表明本方法的重复性较好，结果详见表 3 和图 5。

2.6 荧光定量 PCR 方法的应用

用建立的荧光 PCR 方法对 65 份腹泻牛肛门拭子

样品进行检测，共有 4 份样品得到了 S 型曲线（图 6），与阳性数据相符，说明这一方式是可行的，在实际中可以使用到该疾病的流行病学监测以及筛查 PI 牛等方面。

表 3 实时荧光定量 PCR 方法的变异系数
Table 3 Coefficients of variation between inter- and intra-groups of RT-PCR assay

稀释度 Dilution rate	组内重复性 Reproducibility intra-batch		组间重复性 Reproducibility inter-batch	
	Ct 平均值 Ct average values	组内变异系数 Coefficient of variation/%	Ct 平均值 Ct average values	组间变异系数 Coefficient of variation/%
浓度1	21.82 ± 0.12	0.55	21.79 ± 0.08	0.37
浓度2	25.31 ± 0.19	0.75	24.93 ± 0.49	1.97
浓度3	28.63 ± 0.27	0.94	28.45 ± 0.16	0.56
浓度4	31.21 ± 0.27	0.87	31.27 ± 0.07	0.22
浓度5	35.65 ± 0.27	0.76	35.14 ± 0.48	1.37

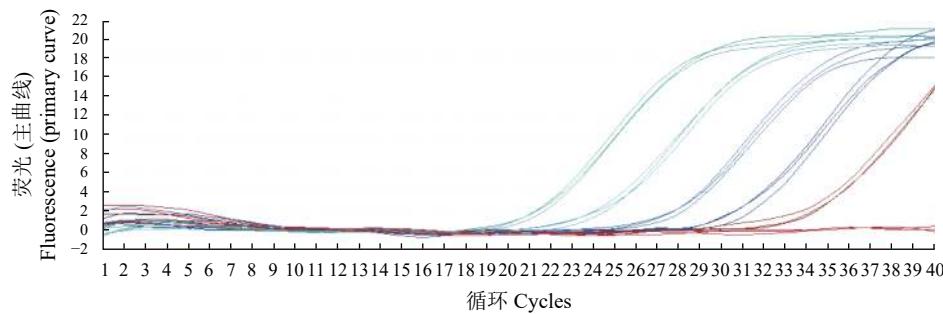
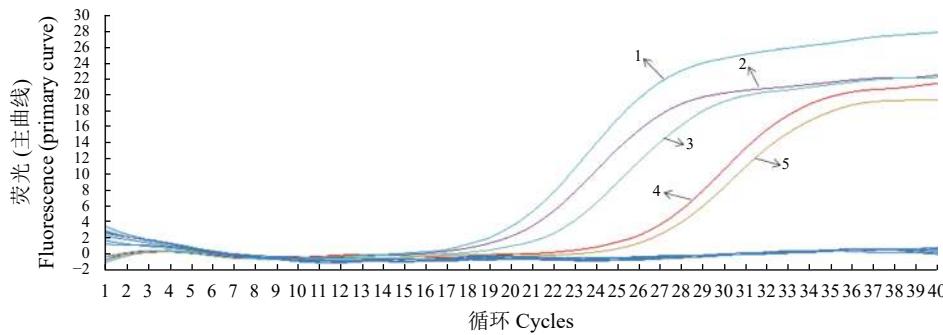


图 5 荧光定量 PCR 重复性
Fig. 5 Reproducibility of RT-PCR assay



注：1 为阳性样品（BVDV NADL 标准毒株）；2~5 为临床样品检出 BVDV 阳性。

Note: 1: BVDV positive control, 2-5: BVDV positive clinical samples were detected.

图 6 荧光定量 PCR 方法的应用

Fig. 6 Application of RT-PCR assay

3 讨论与结论

早期筛查 PI 牛是控制该病毒传播的重要措施之一。ELISA 检测技术一直被广泛用于检测血液、血

清、乳汁、鼻腔和口腔棉拭子中 BVDV 抗体水平，根据抗体水平判定是否为 PI 牛，而 ELISA 往往由于母源抗体的影响造成检测失败^[17]。因此近年来国内外研究人员越来越多地利用荧光定量 PCR 技术检测

BVDV, 不仅因为其灵敏度高, 最重要的原因是能够在早期诊断鉴定PI牛, 为此本试验以GenBank中提交的BVDV 5'UTR基因序列进行比对, 设计相关的PCR检测方法。

通过特异性、重复性以及敏感性试验, 本试验建立的BVDV TaqMan实时荧光定量RT-PCR检测方法, 对FMDV、BVDV、IBRV和PRRS等病毒无特异性扩增。该方法灵敏度高, 对病毒检测的最低检测灵敏度可达到 $5.026\text{7 copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 敏感性优于常规的RT-PCR^[18]; 稳定性好, 标准曲线相关系数是0.996; 重复性较好, 同一时期组内和不同时期组间变异系数均小于1.0%。

本试验建立的荧光定量PCR方法与常规PCR检测方法相比不需在反转录后再次向反应混合物中添加任何试剂, 仅在一支PCR反应管中操作, 直接由RNA定量RNA, 提高了操作效率, 而且减少了开管次数从而有效降低外界其他基因污染的风险^[19-20]。

本试验显示该方法专一测定这一病毒, 因此该方法既可以用于临床早期发现PI牛, 又可以检测细胞中BVDV的增殖情况, 这为研究细胞水平上药物抗BVDV及其分子机制提供了检测手段。

参考文献:

- 1 BECHER P, THIEL H J. *Pestivirus*[M]//The Springer Index of Viruses. New York, NY: Springer New York, 2011: 483-488.
- 2 VILČEK Š, PATON D J, DURKOVIC B, et al. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups [J]. *Archives of Virology*, 2001, 146 (1) : 99-115.
- 3 RIDPATH J F, BOLIN S R, DUBOVI E J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes [J]. *Virology*, 1994, 205 (1) : 66-74.
- 4 PETERHANS E, BACHOFEN C, STALDER H, et al. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction [J]. *Veterinary Research*, 2010, 41 (6) : 44.
- 5 MOENNIG V, LIESS B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus [J]. *Veterinary Clinics of North America:Food Animal Practice*, 1995, 11 (3) : 477-487.
- 6 BAKER J C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection [J]. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 1995, 11 (3) : 425-445.
- 7 HOUE H. Economic impact of BVDV infection in dairies [J]. *Biologicals*, 2003, 31 (2) : 137-143.
- 8 REICHEL M, HILL F, VOGES H. Does control of bovine viral diarrhea infection make economic sense? [J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2008, 56 (2) : 60-66.
- 9 LANYON S R, SIMS S K, COCKCROFT P D, et al. Comparison of serum, ear notches, and nasal and saliva swabs for Bovine viral diarrhea virus antigen detection in colostrum-fed persistently infected (PI) calves and non-PI calves [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2014, 26 (6) : 783-787.
- 10 DRISKELL E A, RIDPATH J F. A survey of bovine viral diarrhea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005 [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2006, 18: 600-605.
- 11 李家伟, 郭利, 杨勇, 等. 牛病毒性腹泻病毒LAMP检测方法的建立与应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42 (12) : 3111-3118.
- 12 LI J W, GUO L, YANG Y, et al. Establishment and application of LAMP detection method of bovine viral diarrhea virus [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42 (12) : 3111-3118. (in Chinese)
- 13 范晴, 谢芝勋, 刘加波, 等. 牛病毒性腹泻病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31 (10) : 10-14.
- 14 FAN Q, XIE Z X, LIU J B, et al. Establishment of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of bovine viral diarrhea virus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31 (10) : 10-14. (in Chinese)
- 15 胡俊英, 鲁海冰, 常晓冉, 等. 基于单抗捕获牛病毒性腹泻病毒(BVDV)抗原ELISA方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (3) : 401-407.
- 16 HU J Y, LU H B, CHANG X R, et al. Development of a sandwich ELISA for capture of bovine viral diarrhea virus antigen and epidemiological investigation [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39 (3) : 401-407. (in Chinese)
- 17 王荣, 李文文, 王研, 等. 牛病毒性腹泻病毒实时荧光定量RT-PCR方法的建立及应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (2) : 35-39.
- 18 WANG R, LI W W, WANG Y, et al. Establishment and application of real-time fluorescent quantitative RT-PCR method for detection of bovine viral diarrhea virus [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41 (2) : 35-39. (in Chinese)
- 19 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术规范: GB/T 18637—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- 20 MACKAY I M, ARDEN K E, NITSCHE A. Real-time PCR in virology [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (6) : 1292-1305.
- 21 ZIMMER G M, VAN MAANEN C, DE GOEY I, et al. The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples [J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 100 (3/4) : 145-149.
- 22 DENG M L, JI S K, FEI W T, et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in four bovine species in China [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4) : e0121718.
- 23 付运星, 吴永丽, 徐道修, 等. 犬瘟热病毒一步法荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36 (3) : 407-411.
- 24 FU Y X, WU Y L, XU D X, et al. Development of real-time PCR assay for detection and quantification of the canine distemper virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36 (3) : 407-411. (in Chinese)
- 25 李占鸿, 廖德芳, 杨振兴, 等. 帕利亚姆血清群病毒一步法RT-PCR检测技术的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42 (1) : 40-45.
- 26 LI Z H, LIAO D F, YANG Z X, et al. The development of a one-step RT-PCR assay for the detection of PALV [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42 (1) : 40-45. (in Chinese)

(责任编辑: 吴宇琳)