

赵润涛, 特木尔巴根, 郭宇, 等. 牛犊病毒 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (7): 851–856.
ZHAO R T, Temuerbagen, GUO Y, et al. *TaqMan* qRT-PCR Assay for Detecting Bovine Kobuvirus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (7): 851–856.

牛犊病毒 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用

赵润涛¹, 特木尔巴根², 郭宇², 武娅楠², 王旭芬¹,
侯琳¹, 张贺¹, 赵洋¹, 张志丹¹, 周伟光^{1*}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院/农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古自治区动物疫病防控控制中心, 内蒙古 呼和浩特 010020)

摘要:【目的】建立一种快速、准确且能定量分析牛犊病毒 (Bovine kobuvirus, BCoV) 的检测方法。【方法】根据 GenBank 上发布的牛犊病毒 3D 基因序列设计合成一对特异性引物和一条探针, 通过优化反应体系建立牛犊病毒 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测方法, 并对临床样品进行检测。【结果】该方法最佳上下游引物浓度均为 300 nmol·L⁻¹, 探针浓度为 400 nmol·L⁻¹, 在 1×10¹~1×10⁸ copies·μL⁻¹ 呈现良好的线性关系, 线性相关系数 $R^2=0.999$, 扩增效率为 103%; 特异性较强, 在多个犊牛腹泻相关病原中, 只检测出牛犊病毒; 敏感性较高, 对 BCoV 质粒标准品最低检测下限为 1×10¹ copies·μL⁻¹, 而普通 RT-PCR 对 BCoV 质粒标准品最低检测下限为 1×10² copies·μL⁻¹; 重复性较好, 组内变异系数和组间变异系数均小于 3%。2021 年 3~5 月采自内蒙古地区牧场的 37 份犊牛粪样中 BCoV 的检出率为 24.3%, 通过标准曲线计算其病毒载量, 其中腹泻粪样平均病毒载量为 3.7×10⁵ copies·μL⁻¹, 健康犊牛粪样平均病毒载量为 8.65×10³ copies·μL⁻¹。【结论】建立的牛犊病毒 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性强、稳定性好、灵敏度高, 为 BCoV 的检测和分子流行病学调查提供了有力的手段。

关键词: 牛犊病毒; 荧光定量 RT-PCR; 犊牛腹泻; 特异性; 敏感性; 重复性

中图分类号: S852.62

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 07-0851-06

TaqMan qRT-PCR Assay for Detecting Bovine Kobuvirus

ZHAO Runtao¹, Temuerbagen², GUO Yu², WU Yanan², WANG Xufen¹,
HOU Lin¹, ZHANG He¹, ZHAO Yang¹, ZHANG Zhidan¹, ZHOU Weiguang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University/Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment of Animal Diseases, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China; 2. Inner Mongolia Animal Disease Control Center, Hohhot, Inner Mongolia 010020, China)

Abstract: 【Objective】A rapid, accurate qRT-PCR method for detecting bovine kobuvirus (BCoV) was established and clinically tested for application. 【Method】A pair of specific primers and a probe were designed and synthesized according to the 3D gene sequence of BCoV published on GenBank for the establishment of a *TaqMan* fluorescence qRT-PCR assay. The reaction system of the analytic was optimized prior to verification on clinical specimens. 【Result】The optimal upstream and downstream primers were 300 nmol·L⁻¹ in concentration, and the applied probe 400 nmol·L⁻¹. A linearity with a correlation coefficient of $R^2=0.999$ was achieved in the range of 1×10¹–1×10⁸ copies·μL⁻¹. The amplification efficiency reached 103%. The assay demonstrated a high specificity among the pathogens related to diarrhea in calves, a high sensitivity with the minimum detection limit of 1×10¹ copies·μL⁻¹ on BCoV plasmid standard, in comparison to that of 1×10² copies·μL⁻¹ by conventional RT-PCR, and a high repeatability with a coefficient of variation of less than 3% within and between groups. In 37 bovine fecal samples collected from different pastures in Inner Mongolia from March to May 2021, the assay showed a positive

收稿日期: 2022-10-31 修回日期: 2023-04-10

作者简介: 赵润涛 (1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事动物传染病诊断与防控研究, E-mail: 854963174@qq.com

* 通信作者: 周伟光 (1971—), 男, 博士, 教授, 主要从事动物传染病诊断与防控研究, E-mail: zhouwg2001@aliyun.com

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项 (2020ZD0006)

detection rate of 24.3%. The calculated viral loads using the standard curve had an average on the feces from diarrheal animals at 3.7×10^5 copies· μL^{-1} and at 8.65×10^3 copies· μL^{-1} on the specimens from healthy calves. 【Conclusion】 The newly developed *TaqMan* fluorescent qRT-PCR assay was specific, repeatable, and sensitive in detecting BCoV. It could be applied for clinic diagnosis and epidemiological investigation on the disease.

Key words: Bovine kobuvirus; fluorescence qRT-PCR; calf diarrhea; specificity; sensitivity; repeatability

0 引言

【研究意义】犊牛腹泻在全国各地均常年发生, 涉及范围广, 危害影响大, 其病原较为复杂, 同时多伴随混合感染现象出现, 发病率和致死率居高不下, 养殖产业遭受巨大冲击, 严重制约牛养殖业发展与壮大。根据近几年的流行病学调查发现, 牛冠状病毒 (Bovine kobuvirus, BCoV) 可导致两周以上、二月龄以下犊牛严重腹泻、脱水、体温明显升高^[1], 容易与其他致犊牛腹泻病原, 如牛轮状病毒等混合感染^[2], 且腹泻犊牛粪样牛冠状病毒检出率明显高于健康犊牛样本检出率, 表明此病毒可以单独致病或促进犊牛腹泻, 因此亟需建立一种高效、灵敏、特异的 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测牛冠状病毒的方法, 为开展内蒙古地区犊牛腹泻分子流行病学调查提供技术支撑。【前人研究进展】牛冠状病毒是国内近几年发现的引起犊牛腹泻的新病原, 是小 RNA 病毒科冠状病毒属的一种无囊膜单链 RNA 病毒^[1], 其基因组长度约 8.3 kb, 由 5'、3' 非翻译区 (UTR)、前导蛋白 L 和一个编码大型多聚蛋白的开放阅读框 (ORF) 组成^[3], ORF 水解后包含编码结构蛋白的 P1 区和编码非结构蛋白的 P2、P3 区, 其中 P1 区分为 VP0、VP3、VP1 这 3 种结构蛋白, P2 区切割为 2A、2B、2C 等 3 种非结构蛋白, P3 区切割为 3A、3B、3C、3D 等 4 种非结构蛋白^[4]。该病毒直径 27~30 nm^[5], 因病毒颗粒表面结构凹凸不平或呈旋钮状而得名。目前检测牛冠状病毒的方法已有 RT-PCR 检测方法^[6]、染料法实时荧光 PCR 方法^[2]、荧光探针 PCR 方法^[7]。2018 年, 王文佳等^[6]通过建立 RT-PCR 检测方法对河南省地区的牛场进行牛冠状病毒的调查研究, 检测到牛冠状病毒的阳性率为 4.72%, 敏感性为 2.23×10^6 copies· μL^{-1} ; 2021 年, 师志海等^[2]首次建立了染料法实时荧光 PCR 方法检测牛冠状病毒, 该方法的敏感性达 1.08×10^1 copies· μL^{-1} , 2022 年, 该学者又建立荧光探针 PCR 方法对 BCoV 进行定量检测, 其对 BCoV 的最低检出量为 1.1×10^1 copies· μL^{-1} ^[7]。【本研究切入点】锁核酸结构可以增加引物的熔解温度, 提高其识别能力以及对错配碱基的分辨能力^[8], 本研究在引物 3' 末端添加了锁核酸结构, 以便

提高定量 RT-PCR 的敏感性和特异性。【拟解决的关键问题】通过荧光定量 RT-PCR 引物和探针浓度的优化, 建立高效、灵敏、特异的检测牛冠状病毒的方法, 进一步提高牛冠状病毒检测检测效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牛病毒性腹泻病毒 1 型 (Bovine viral diarrhea virus 1, BVDV-1)、牛病毒性腹泻病毒 2 型 (Bovine viral diarrhea virus 2, BVDV-2)、牛轮状病毒 (Bovine rotavirus, BRV)、牛冠状病毒 (Bovine coronavirus, BCoV)、沙门菌 (*Salmonella*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*), 均由内蒙古农业大学兽医学院兽医传染病学教研室保存; 37 份犊牛粪样来源于内蒙古地区牧场, 所有样本于 -80 °C 保存^[9]。

1.2 主要试剂

RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; One Step qRT-PCR Kit 均购自 promega 公司; pMD19-T 载体、DH5 α 感受态细胞、Premix *Taq*TM、EASY Dilution、6 \times Loading Buffer、500 bp DNA Ladder Marker 均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 质粒小提试剂盒、RNase-Free ddH₂O 购自 TIANGEN 公司^[9]。

1.3 引物和探针的设计与合成

根据 GenBank 的 BCoV-3D 基因序列 (KF728683、KY260614、AB097153、AB084788、HQ650180、MN336260), 利用 Lasergene 软件中 MegAlign 程序进行同源性分析, 选取保守序列设计了一对 BCoV 引物和一条探针, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 探针由宝生物工程 (北京) 有限公司合成。引物及探针序列见表 1。

1.4 牛冠状病毒 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

1.4.1 标准品的制备

按照 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书对预试验 BCoV 核酸阳性粪样提取 RNA, 用上下游引物扩增目的基因, 胶回收纯化 PCR 产物, 连接至 pMD19-T 载体并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 涂板, 筛选出阳性克隆菌并进行增菌培养, 提取质粒

表 1 牛犄病毒引物及探针序列信息
Table 1 Sequences of BKoV primers and probe

项目 Items	名称 Names	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	扩增长度 Amplification length/bp
引物 Primers	BKoV-F-221	TYTCACCYGCTTGGCTCTC	200
	S-BKoV-R-421	AGTGTAGGTGCCRCGCAT+A	
探针 Probe	BKV-TZ	FAM-CTTCACACAGTGGCGTGGTGAAC-T-BHQ1	

进行测序鉴定。以鉴定正确的阳性重组质粒命名为 pMD19T-BKoV，测定重组质粒 DNA 浓度，计算拷贝数，10 倍梯度稀释成 $1\sim 1\times 10^{10}$ copies·μL⁻¹ 作为标准品。

1.4.2 荧光定量 RT-PCR 方法的条件优化

模板为牛犄病毒的阳性重组质粒 DNA，分别吸取上下游引物各 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μL（终浓度分别为 100、200、300、400、500 nmol·L⁻¹）进行引物浓度优化。再取优化好的引物浓度，探针各吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μL（终浓度分别为 100、200、300、400、500 nmol·L⁻¹），模板为牛犄病毒的阳性重组质粒 DNA，进行探针浓度优化。利用优化好的引物和探针浓度进行荧光定量 PCR 扩增，扩增体系：2×One Step RT-PCR Buffer 10 μL，TaKaRa Ex Taq HS 0.4 μL，PrimeScript RT enzyme Mix 0.4 μL，10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.6 μL，10 μmol·L⁻¹ 探针 0.8 μL，cDNA 模板 2 μL，RNase-Free ddH₂O 5.2 μL，总体积为 20 μL；扩增程序：42 ℃ 反转录 5 min；95 ℃ 预变性 10 s；95 ℃ 变性 15 s，59 ℃ 退火延伸 45 s，共 45 个循环。

1.4.3 标准曲线的建立

选取含量为 $1.0\times 10^1\sim 1.0\times 10^8$ copies·μL⁻¹ 质粒 DNA 作为模板进行扩增，以无酶水为阴性对照，用优化的荧光定量 RT-PCR 扩增体系及程序进行扩增，绘制标准曲线^[9]。

1.4.4 特异性试验

按照 RNA/DNA 提取试剂盒说明书提取牛病毒性腹泻病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒、沙门菌以及大肠杆菌核酸，以 1.0×10^6 copies·μL⁻¹ 的牛犄病毒阳性重组质粒标准品作为阳性对照，无酶水为阴性对照。利用上述优化的反应体系进行荧光定量 RT-PCR，评价该方法的特异性。

1.4.5 敏感性试验

选取含量为 $1.0\times 10^0\sim 1.0\times 10^8$ copies·μL⁻¹ 质粒 DNA 作为模板，进行普通 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 扩增，得出两种检测方法能够检出的最低拷贝数^[9]。

1.4.6 重复性试验

选取含量为 $1.0\times 10^2\sim 1.0\times 10^6$ copies·μL⁻¹ 5 个梯

度的质粒 DNA，利用上述优化的反应体系进行荧光定量 RT-PCR，进行组内和组间重复性试验，并分别计算组内和组间 *Ct* 值的变异系数，检测该方法的重复性。

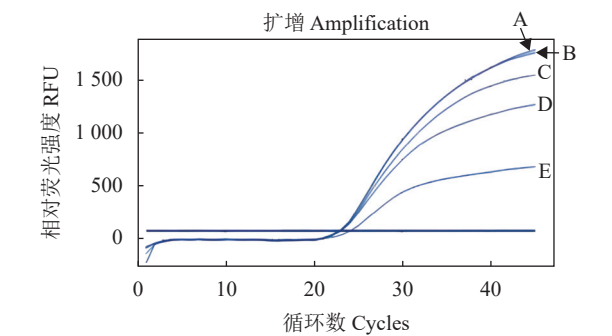
1.5 临床样品的检测

按照 RNA 快速提取试剂盒说明书提取 37 份临床样品核酸，应用本试验建立的牛犄病毒荧光定量 RT-PCR 方法和普通 RT-PCR 方法对在内蒙古地区牧场采集的 37 份犊牛粪样进行检测，并比较二者的一致性。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 RT-PCR 方法优化

在优化后的 20 μL 扩增体系中，选取 *Ct* 值最小、荧光量最高为参考标准。结果表明，牛犄病毒的最佳上下游引物浓度均为 300 nmol·L⁻¹（图 1），最佳探针浓度为 400 nmol·L⁻¹（图 2）。

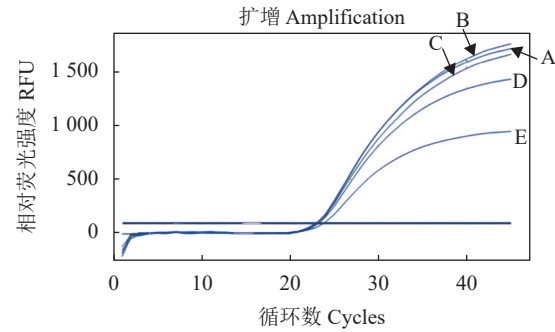


A~E: 引物浓度分别为 500、400、300、200、100 nmol·L⁻¹。
A~E: Concentrations of primers at 500, 400, 300, 200, and 100 nmol·L⁻¹, respectively.

图 1 BKoV 荧光定量 RT-PCR 引物优化结果
Fig.1 Optimization on primer concentration for detecting BKoV by qRT-PCR

2.2 荧光定量 RT-PCR 标准曲线的建立

将重组质粒标准品 pMD19T-BKoV 梯度稀释成 $1.0\times 10^1\sim 1.0\times 10^8$ copies·μL⁻¹ 作为模板进行扩增，获得牛犄病毒荧光定量 RT-PCR 的扩增曲线和标准曲线（图 3）。结果显示，牛犄病毒的标准曲线参数斜率为 -3.252；*R*² 值为 0.999；扩增效率（*E*）为 103%，



A~E: 探针浓度分别为 500、400、300、200、100 nmol·L⁻¹。
A~E: Concentrations of probe at 500, 400, 300, 200, and 100 nmol·L⁻¹, respectively.

图 2 BKoV 荧光定量 RT-PCR 探针优化结果

Fig. 2 Optimization of probe concentration for detecting BKoV by qRT-PCR

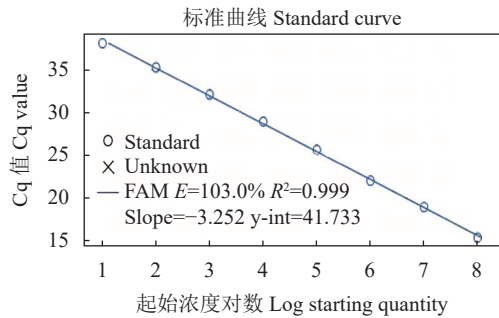


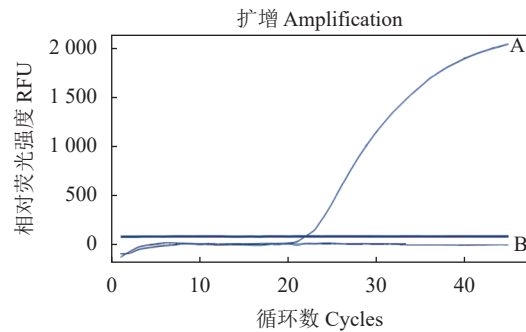
图 3 BKoV 荧光定量 RT-PCR 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of qRT-PCR for BKoV detection

说明建立的方法相关性较高，可用于牛嶙病毒的定量检测。

2.3 特异性试验

采用本试验建立的牛嶙病毒荧光定量 RT-PCR 方法对牛病毒性腹泻病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒、沙门菌以及大肠杆菌核酸进行检测，结果（图 4）显示，只检测出牛嶙病毒，其他病原和阴性对照均无扩增曲线，证明该方法具有较好特异性，可用于牛嶙病毒检测。

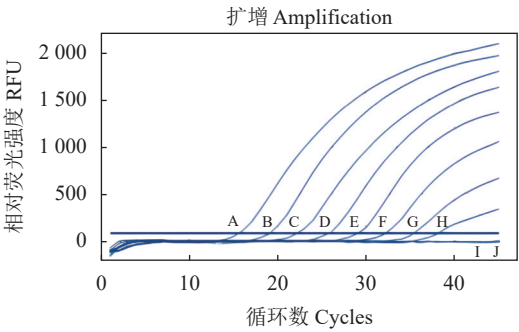


A: 牛嶙病毒; B: 其他病原和阴性对照。

A: BKoV; B: other pathogens and negative control.

图 4 BKoV 荧光定量 RT-PCR 特异性试验结果

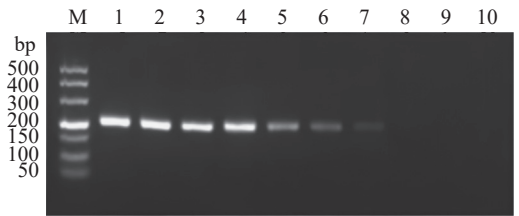
Fig. 4 Specificity of qRT-PCR assay for BKoV detection



A~H 分别为质粒 DNA 含量 $1.0\times 10^8\sim 1.0\times 10^1$ copies·μL⁻¹; I: 阴性对照; J: 1.0×10^0 copies·μL⁻¹ 质粒 DNA。
A~H: plasmid DNA at $1.0\times 10^8\sim 1.0\times 10^1$ copies·μL⁻¹, respectively; I: negative control; J: 1.0×10^0 copies·μL⁻¹ plasmid DNA.

图 5 BKoV 荧光定量 RT-PCR 敏感性试验结果

Fig. 5 Sensitivity of qRT-PCR assay for BKoV detection



M: 500 bp Ladder DNA Marker; 1~9: 质粒 DNA 用量分别为 $1.0\times 10^8\sim 1.0\times 10^0$ copies·μL⁻¹; 10: 阴性对照。

M: 500 bp ladder DNA marker; 1~9: plasmid DNA concentrations at $1.0\times 10^8\sim 1.0\times 10^0$ copies·μL⁻¹, respectively; 10: negative control.

图 6 BKoV 普通 RT-PCR 敏感性试验结果

Fig. 6 Sensitivity of qRT-PCR assay for BKoV detection

2.4 敏感性试验

牛嶙病毒的荧光定量 RT-PCR 最低检出量达 1.0×10^1 copies·μL⁻¹（图 5），而应用相同引物扩增的普通 RT-PCR 最低检出量为 1.0×10^2 copies·μL⁻¹（图 6），表明本试验所建立方法具有较好的敏感性。

2.5 重复性试验

以含量分别为 $1.0\times 10^2\sim 1.0\times 10^6$ copies·μL⁻¹ 的牛嶙病毒重组质粒标准品作为模板进行 3 次重复性试验，结果组内和组间试验 Ct 值的变异系数均小于 3.0%，表明该方法重复性和稳定性良好，见表 2。

2.6 临床样品检测结果

应用普通 RT-PCR 方法和本试验所建立的牛嶙病毒荧光定量 RT-PCR 方法对采集的 37 份犊牛粪样进行检测，同时设置阳性对照和阴性对照。普通 RT-PCR 方法只检出 6 份牛嶙病毒阳性病料，阳性率为 16.2%，而应用本试验建立的荧光定量 RT-PCR 方法则检出 9 份牛嶙病毒阳性病料，阳性率为 24.3%（表 3），说明本试验建立的荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性高于普通 RT-PCR 方法的敏感性。

表 2 牛犊病毒荧光定量 RT-PCR 组内及组间重复性
Table 2 Intra- and inter-group repeatability of qRT-PCR assay for BCoV detection

标准品 Plasmid standard concentration/ (copies·μL ⁻¹)	组内重复性 Reproducibility intra-group		组间重复性 Reproducibility intra-group	
	平均值 (<i>M</i> ± <i>SD</i>) /%	变异系数 <i>CV</i> /%	平均值 (<i>M</i> ± <i>SD</i>) /%	变异系数 <i>CV</i> /%
1×10 ⁶	21.99±0.23	1.0	22.02±0.04	0.2
1×10 ⁵	25.30±0.03	0.1	25.31±0.09	0.4
1×10 ⁴	28.76±0.24	0.8	28.91±0.13	0.4
1×10 ³	32.04±0.03	0.1	32.19±0.29	0.9
1×10 ²	34.82±0.49	1.4	34.77±0.63	1.8

表 3 犊牛粪样牛犊病毒载量检测
Table 3 Detection of BCoV load on calf fecal samples

粪样 Fecal samples	数量 Number	阳性数量 Positive number	最低拷贝数 Minimum copies/ (copies·μL ⁻¹)	最高拷贝数 Maximum copies/ (copies·μL ⁻¹)	平均拷贝数 Average copies/ (copies·μL ⁻¹)
腹泻 Diarrhea	30	7	2.33×10 ³	1.90×10 ⁶	3.70×10 ⁵
健康 Healthy	7	2	3.54×10 ³	1.38×10 ³	8.65×10 ³

3 讨论与结论

近年来，我国乃至世界各国都发生了大面积犊牛腹泻（俗称小牛痢疾），严重影响当地经济与畜牧养殖业的发展，因此犊牛腹泻被称为新生犊牛的杀手^[10]，部分牧场犊牛腹泻发病率高达 90%^[11]。犊牛腹泻是一种消化系统疾病，主要指刚出生的小牛与外界环境不适应，表现出腹泻、乏力、蜷卧、食欲不振、身体消瘦、体温升高、排水样便、软粪便等症状。该病多季节都可发生，尤其在气候多变季节（初春及秋末初冬）多发^[12]，发病率和死亡率都很高，可直接影响犊牛早期的生长发育和成年后的泌乳性能^[12]，也危害养殖业的经济效益和可持续发展。目前引起犊牛腹泻的原因有很多，包括环境和饲料等非感染性原因，细菌、寄生虫以及病毒等重要感染性病因，这些病因可能单独存在，也可能合并存在。

2008 年，首次在腹泻牛的粪便样品中检出 BCoV^[13]。2013 年，常继涛等^[14]在内蒙古、安徽、新疆等地进行 BCoV 流行病学调查，结果表明牛犊病毒在我国西北部地区广泛存在，近年来大部分数据表明 BCoV 作为我国新发病原已经在我国各省市地区广泛流行并且可发生混合感染，对养殖户的影响较大。此类现象存在主要有以下两方面原因：一

方面可能是由于工作人员对新发病原不了解，不重视，导致疏忽奶牛引种过程中的必要检测与步骤；另一方面可能是人为因素，未及时消毒，未按规定操作等造成交叉感染，同时多种肠道病毒共同作用，引发患病牛群腹泻现象更为严重，从而加大对犊牛腹泻的诊断和控制。因此，在牛群培育生产中，建议将新发腹泻病原纳入日常检测范围^[15]。

本试验进行 RT-PCR 预试验时产生非特异条带，在引物中加入锁核酸结构后，增加引物的 Tm 值^[16]，扩增出单一的特异性条带，进而提高荧光定量 RT-PCR 的特异性和敏感性。本试验建立的 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 方法特异性强，从牛病毒性腹泻病毒、牛冠状病毒、牛轮状病毒、大肠杆菌以及沙门菌核酸中能特异性检测牛犊病毒；灵敏度高，最低检出量达 1.0×10¹ copies·μL⁻¹，敏感性高于文献报道的普通 RT-PCR 检测方法^[6]；稳定性好，在 1.0×10²~1.0×10⁶ copies·μL⁻¹ 的 5 个梯度范围内具有良好的重复性（变异系数 < 3.0%）。应用建立的方法首次检测了犊牛粪样 BCoV 载量，其中腹泻粪样平均病毒载量为 3.70×10⁵ copies·μL⁻¹，健康犊牛粪样平均病毒载量为 8.65×10³ copies·μL⁻¹，且样品 BCoV 阳性率为 24.3%。从数据看出腹泻粪样牛犊病毒载量明显高于健康犊牛粪样病毒载量，证明牛犊病毒可以引起混合感染或促进犊牛腹泻的发生，是导致犊牛腹泻的新病原。本试验建立的检测 BCoV 的 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 方法特异性强、灵敏度高、稳定性好，可以为 BCoV 的快速检测和分子流行病学调查提供技术支撑。

参考文献：

[1] MOHAMED F F, MANSOUR S M G, ORABI A, et al. Detection and genetic characterization of bovine kobuvirus from calves in Egypt [J]. *Archives of Virology*, 2018, 163 (6) : 1439-1447.

[2] 师志海, 王文佳, 王亚州, 等. 染料法实时荧光 PCR 检测牛犊病毒 [J]. *中国兽医科学*, 2021, 51 (12) : 1498-1503.

SHI Z H, WANG W J, WANG Y Z, et al. A real-time PCR suitable for detection of bovine kobuvirus based on the fluorescent dye [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2021, 51 (12) : 1498-1503. (in Chinese)

[3] REUTER G, BOROS A, PANKOVICS P. Kobuviruses - a comprehensive review [J]. *Reviews in Medical Virology*, 2011, 21 (1) : 32-41.

[4] HAO L L, CHEN C X, BAILEY K, et al. Bovine kobuvirus-a comprehensive review [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 68 (4) : 1886-1894.

[5] 杨振, 张笛, 于恩琪, 等. 江苏省七个县域猪冠状病毒感染的流行病学调查 [J]. *中国兽医科学*, 2014, 44 (4) : 436-440.

- YANG Z, ZHANG D, YU E Q, et al. Epidemiological investigation of porcine kobuvirus infection in 7 counties of Jiangsu Province [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44 (4) : 436–440. (in Chinese)
- [6] 王文佳, 徐照学, 兰亚莉, 等. 牛冠状病毒、牛诺如病毒和牛嗜病毒多重PCR检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (7) : 1306–1310, 1355.
- WANG W J, XU Z X, LAN Y L, et al. Establishment and preliminary application of a multiple PCR for detection of BCoV, BNoV and BKV [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40 (7) : 1306–1310, 1355. (in Chinese)
- [7] 师志海, 王文佳, 孟红丽, 等. 荧光探针PCR检测牛嗜病毒的方法建立 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (4) : 657–661.
- SHI Z H, WANG W J, MENG H L, et al. Establishment of a TaqMan PCR assay for detecting bovine kobuvirus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42 (4) : 657–661. (in Chinese)
- [8] 彭雪松. BVDV基因分型检测方法的建立及应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- PENG X S. Establishment and application of detection method for BVDV genotyping[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [9] 赵润涛, 王旭芬, 侯琳, 等. 牛纽布病毒TaqMan荧光定量RT-PCR检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43 (1) : 66–71.
- ZHAO R T, WANG X F, HOU L, et al. Establishment and application of TaqMan real-time quantitative RT-PCR for detection of bovine nebovirus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43 (1) : 66–71. (in Chinese)
- [10] 闫琛博, 李振亚, 吕海淼, 等. 河南省犊牛腹泻主要病原调查研究 [J]. 中国牛业科学, 2020, 46 (5) : 44–48.
- YAN C B, LI Z Y, LV H M, et al. Investigation on the main pathogens of calf diarrhea in Henan Province [J]. *China Cattle Science*, 2020, 46 (5) : 44–48. (in Chinese)
- [11] 王艾梅. 规模化牛场犊牛腹泻的原因及治疗方法 [J]. 畜禽业, 2022, 33 (2) : 117–118.
- WANG A M. Causes and treatment of calf diarrhea in large-scale cattle farm [J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2022, 33 (2) : 117–118. (in Chinese)
- [12] 荔霞, 王胜义, 刘永明, 等. 犊牛腹泻病因及其药物防治研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37 (10) : 161–165.
- LI X, WANG S Y, LIU Y M, et al. Progress of calf diarrhea causes and prevention of drug [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37 (10) : 161–165. (in Chinese)
- [13] MAUROY A, SCIPIONI A, MATHIJS E, et al. Molecular detection of kobuviruses and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe [J]. *Archives of Virology*, 2009, 154 (11) : 1841–1845.
- [14] CHANG J T, WANG Q, WANG F, et al. Prevalence and genetic diversity of bovine kobuvirus in China [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159 (6) : 1505–1510.
- [15] 刘彩娟, 罗清华, 李威. 牛病毒性腹泻病在养牛生产中的研究进展 [J]. 饲料广角, 2012 (23) : 38–40.
- LIU C J, LUO Q H, LI W. Research progress of bovine viral diarrhea in cattle production [J]. *Feed China*, 2012 (23) : 38–40. (in Chinese)
- [16] 李生茂, 徐祥, 梁华平, 等. 锁核酸研究进展 [J]. 生理科学进展, 2003, 34 (4) : 319–323.
- LI S M, XU X, LIANG H P, et al. Progress in locked nucleic acid research [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2003, 34 (4) : 319–323. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)