

11种致牛腹泻病原的一步法多重PCR/RT-PCR检测方法的建立

金美君^{1,2}, 胡云皓¹, 辛凌翔¹, 刘燕¹, 潘瑶⁴, 王秀丽¹, 赵浩然¹, 汤承³, 陈曦³, 李锦铨^{*2}, 朱良全^{*1}

1 中国兽医药品监察所, 北京 100081

2 华中农业大学, 湖北 武汉 430070

3 西南民族大学, 四川 成都 610041

4 四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川 康定 626000

金美君, 胡云皓, 辛凌翔, 刘燕, 潘瑶, 王秀丽, 赵浩然, 汤承, 陈曦, 李锦铨, 朱良全. 11种致牛腹泻病原的一步法多重PCR/RT-PCR检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 383-396.

JIN Meijun, HU Yunhao, XIN Lingxiang, LIU Yan, PAN Yao, WANG Xiuli, ZHAO Haoran, TANG Cheng, CHEN Xi, LI Jinquan, ZHU Liangquan. A one-step multiplex PCR/RT-PCR method for detecting 11 pathogens causing bovine diarrhea[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 383-396.

摘要:【背景】单病原或多病原混合感染导致的牛腹泻综合征严重制约养牛业发展, 病原快速准确诊断是防控该病的重要前提。【目的】建立 11 种致牛腹泻的细菌或病毒的一步法多重 PCR/RT-PCR 检测方法, 实现快速诊断病原。【方法】通过文献检索调查了引起牛腹泻病的主要病原及其高覆盖率的引物, 选择以产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) α -toxin、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*) *invA*、大肠杆菌(*Escherichia coli*) *K99*、牛肠道病毒(bovine enterovirus, BEV) 5'-UTR、牛星状病毒(bovine astrovirus, BAstV) *ORF1a*、牛轮状病毒(bovine rotavirus, BRoV) *VP6*、牛嶙病毒(bovine kobuvirus, BKoV) *D4*、牛诺如病毒(bovine norovirus, BNoV) *ORF1*、牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV) *N*、牛环曲病毒(bovine torovirus, BToV) *N*、牛病毒性腹泻黏膜病病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV) 5'-UTR 为靶标序列的引物, 通过温度梯度 PCR 及单一控制变量法优化退火温度、引物浓度、循环数, 建立 11 种病原的多重 PCR/RT-PCR 检测方法, 对该方法进行特异性、灵敏度和重复性评价, 并应用该方法进行临床样品检测。【结果】最佳退火温度为 54.4 °C, *C. perfringens*、*S. enterica*、*E. coli*、BEV、BAstV、BRoV、BKoV、BNoV、BCoV、BToV 和 BVDV 对应基因片段最优引物浓度分别为 0.20、0.25、0.25、0.20、0.25、0.25、0.35、0.50、0.25、0.25、0.30 $\mu\text{mol/L}$, 最优循环数为 35 个循环。该方法特异性强, 仅对靶标病原检测为阳性, 对溶血性曼氏

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800703); 中国兽医药品监察所第三批公益性专项(GY202403)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800703) and the Third Batch of Public Welfare Special Project of IVDC (GY202403).

*Corresponding authors. E-mail: LI Jinquan, lijinqun@mail.hzau.edu.cn; ZHU Liangquan, 1367391894@qq.com

Received: 2024-06-02; Accepted: 2024-07-15; Published online: 2024-08-06

杆菌(*Mansielia haemolyticus*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、牛支原体(*Mycoplasma bovine*)分离株等病原检测均为阴性; 敏感性高, 对重组质粒标准品最低检出限依次为 7.5×10^3 、 7.5×10^4 、 7.5×10^3 、 7.5×10^1 、 7.5×10^4 、 7.5×10^2 、 7.5×10^3 、 7.5×10^2 、 7.5×10^2 、 7.5×10^4 、 7.5×10^3 copies/ μL ; 重复性好, 批间与批内试验均一致。用该方法检测江苏地区临床样品 490 份, 结果显示, BEV、BAstV、BRoV、BKoV、BNoV、BCoV、BToV、BVDV 阳性率分别 0.61%、0.41%、0.61%、0.21%、27.14%、3.27%、0.21%、1.02%。通过单重 PCR 对该多重 PCR 临床样品检测结果进行重复验证, 结果显示符合率为 100%。随机挑选 50 个检测为阳性的 PCR 产物进行测序验证, 结果均为相应病原的基因片段。

【结论】建立一种同时检测 11 种牛腹泻主要病原的一步法多重 PCR/RT-PCR 检测方法。

关键词: 牛; 腹泻; 细菌; 病毒; 多重 PCR; RT-PCR

A one-step multiplex PCR/RT-PCR method for detecting 11 pathogens causing bovine diarrhea

JIN Meijun^{1,2}, HU Yunhao¹, XIN Lingxiang¹, LIU Yan¹, PAN Yao⁴, WANG Xiuli¹, ZHAO Haoran¹, TANG Cheng³, CHEN Xi³, LI Jinquan^{*2}, ZHU Liangquan^{*1}

1 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

2 Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

4 Animal Husbandry Science Institute of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Kangding 626000, Sichuan, China

Abstract: [Background] The bovine diarrheal syndrome, caused by single or multiple pathogen infections, significantly restricts the development of the cattle industry. Rapid and accurate pathogen diagnosis is crucial for disease control. **[Objective]** To establish a one-step multiplex PCR/RT-PCR method for detecting 11 bacterial and viral pathogens causing bovine diarrhea, facilitating rapid pathogen diagnosis. **[Methods]** We identified the main pathogens causing bovine diarrhea and appropriate high-coverage primers by literature searching. According to the searching results, we selected primers for the following target genes: *Clostridium perfringens* α -toxin, *Salmonella enterica invA*, *Escherichia coli* K99, bovine enterovirus (BEV) 5'-UTR, bovine astrovirus (BAstV) ORF1a, bovine rotavirus (BRoV) VP6, bovine kobuvirus (BKoV) D4, bovine norovirus (BNoV) ORF1, bovine coronavirus (BCoV) N, bovine torovirus (BToV) N, and bovine viral diarrhea virus (BVDV) 5'-UTR. After optimization of the annealing temperature with the temperature gradient PCR method as well as the primer concentration and cycle number with the single factor test method, we established a one-step multiplex PCR/RT-PCR method for detecting the 11 pathogens. The specificity, sensitivity, and repeatability of the method were evaluated, and then the method was employed to detect clinical samples. **[Results]** The optimal annealing temperature was 54.4 °C. The optimal concentrations of primers for the target genes in *C. perfringens*, *S. enterica*, *E. coli*, BEV, BAstV, BRoV, BKoV, BNoV, BCoV, BToV, and BVDV were 0.20, 0.25, 0.25, 0.20, 0.25, 0.25, 0.35, 0.50, 0.25, 0.25, and 0.30 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The optimal number of cycles was 35. The established method demonstrated high specificity, yielding positive results only for the target pathogens and negative

results for *Mannheimia haemolytica*, *Streptococcus pyogenes*, and *Mycoplasma bovine*. This method exhibited high sensitivity, with the lowest limits of detection of the recombinant plasmid standards being 7.5×10^3 , 7.5×10^4 , 7.5×10^3 , 7.5×10^1 , 7.5×10^4 , 7.5×10^2 , 7.5×10^3 , 7.5×10^2 , 7.5×10^2 , 7.5×10^4 , and 7.5×10^3 copies/ μ L, respectively. The method showed good reproducibility, with consistent inter-batch and intra-batch test results. We then used the established method to detect 490 clinical samples from Jiangsu. The positive rates for BEV, BAstV, BRoV, BCoV, BNoV, BCoV, BToV and BVDV were 0.61%, 0.41%, 0.61%, 0.21%, 27.14%, 3.27%, 0.21%, and 1.02%, respectively. The results of the one-step multiplex PCR/RT-PCR method in clinical samples were consistent with those of single PCR. Sequencing verification of 50 randomly selected positive PCR products confirmed the presence of genes corresponding to the identified pathogens. **[Conclusion]** We successfully established a one-step multiplex PCR/RT-PCR method for the simultaneous detection of 11 major pathogens causing bovine diarrhea.

Keywords: bovine; diarrhea; bacteria; virus; multiplex PCR; RT-PCR

牛腹泻通常是由细菌、病毒单病原感染或多种病原混合感染引起,临床诊断难度大,其临床表现为腹泻、厌食和精神沉郁等。病牛会出现生长迟缓、产奶量下降及体重减轻等现象,严重影响生产性能^[1];犊牛腹泻发病率高,常导致死亡^[2]。2007 年美国奶牛业国家动物健康监测系统报告称,57%的断奶犊牛死亡是由于腹泻^[3]。韩国犊牛腹泻死亡率为 53.4%^[4]。2006 年挪威因小牛死亡造成的经济损失估计约为 1 000 万美元^[5]。产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、牛肠道病毒(bovine enterovirus, BEV)、牛星状病毒(bovine astrovirus, BAstV)、牛轮状病毒(bovine rotavirus, BRoV)、牛犊病毒(bovine kobuvirus, BCoV)、牛诺如病毒(bovine norovirus, BNoV)、牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)、牛环曲病毒(bovine torovirus, BToV)、牛病毒性腹泻黏膜病病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)均能引起牛腹泻,是牛腹泻的主要病原^[6-8]。

细菌或病毒分离鉴定是病原检测的“金标准”,但操作烦琐,耗时长。考虑到牛腹泻病特点,对每种潜在病原体分离后单独检测效率低,

无法满足及时防控现实要求。因此,有学者建立了基于定量 PCR (qPCR)的多重检测方法,该方法可同时检测多种病原,具有良好的灵敏度与特异性,可对目标病原进行定量,但仪器设备及使用成本高^[9]。

PCR 是常用的临床可及的分子检测手段,RT-PCR^[10]方法需将 RNA 逆转录和 PCR 分两步进行,过程烦琐、耗时长、易造成交叉污染。一步法 RT-PCR 方法将逆转录与 PCR 反应集成到一个管中连续反应,该方法操作便捷,减少污染,且该方法的敏感性、特异性与两步法一致^[11]。传统上,犊牛腹泻通常归因于 *C. perfringens*、*S. enterica*、*E. coli* K99、BRoV、BCoV、BVDV^[12-14]。近年来,BNoV、BEV、BToV 已被确定为引起牛腹泻的潜在原因^[15-17]。BAstV 属于星状病毒科、哺乳动物星状病毒属,BCoV 属于小核糖核酸病毒科、犊病毒属,两者均为无囊膜、单股、正链 RNA 病毒,该病毒在我国牛群中的流行率、与牛腹泻的关联等研究甚少^[18-19]。国内外虽已报道多种牛腹泻病原的多重 PCR 检测方法,如同时检测 BVDV、BCoV、BRoV 的三重 PCR 方法^[20],同时检测 BNoV、BAstV、BToV 的三重 PCR 方法^[21],以及同时检测 BRoV、BCoV、

E. coli K99、*S. enterica* 和微小隐孢子虫的五重 PCR/RT-PCR 检测方法^[22]，但缺乏集成上述的病原检测方法的报道。本研究的目的在于建立一种能同时检测 11 种常见牛腹泻病原的一步法多重 PCR/RT-PCR 检测方法，实现快速准确鉴别诊断。

本研究拟以 *C. perfringens* α -toxin、*S. enterica* *invA*、*E. coli* K99、BEV 5'-UTR、BAstV *ORF1a*、BRoV *VP6*、BKoV *D4*、BNoV *ORF1*、BCoV *N*、BToV *N*、BVDV 5'-UTR 作为靶标序列的特异性引物，运用温度梯度 PCR 与棋盘试验优化退火温度、引物浓度等反应条件建立多重 PCR 方法。

1 材料与方 法

1.1 基因组及临床样品

产气荚膜梭菌(*C. perfringens*) CVCC3831、肠道沙门氏菌(*S. enterica*) CVCC3375、产肠毒素大肠杆菌(*E. coli*) CVCC1358、溶血性曼氏杆菌(*Mansielia haemolyticus*) CVCC4091、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) CVCC593、牛支原体(*Mycoplasma bovis*)分离株 C65-1、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CVCC2259、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*) CVCC390、牛环曲病毒(bovine torovirus, BToV)分离株 XZ1、牛诺如病毒(bovine norovirus, BNoV)分离株 JX1、牛肠道病毒(bovine enterovirus, BEV)分离株 HJ1、牛细小病毒(bovine parvovirus, BPV)分离株 X1、牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)分离株 V1 基因组由本实验室保存。牛星状病毒(bovine astrovirus, BAstV)分离株(2017 年，四川省，某牧场)、牛腺病毒 3 型(bovine adenovirus type 3, BAdV-3) (2022 年，四川省，某牦牛场)、牛轮状病毒(bovine rotavirus, BRoV) G6P[1] (2020 年，

四川省，某奶牛场)、牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)分离株(2020 年，四川省，某肉牛场，呼吸道综合征 3-4 月龄犊牛)、牛病毒性腹泻黏膜病病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)分离株(2022 年，江苏省，某奶牛场)、牛嗜病毒(bovine kobuvirus, BKoV)分离株(2023 年，四川省，牦牛粪便)基因组由西南民族大学汤承教授、岳华教授课题组惠赠。2023 年 12 月至 2024 年 3 月在江苏部分牛场采集牛拭子样品 490 份，由扬州大学王亨教授课题组提供。

1.2 主要试剂和仪器

pMD18-T 载体，青岛麦迪赛斯生物科技有限公司；Trans1-T1 感受态细胞、一步法 RT-PCR 试剂盒，北京全式金生物技术股份有限公司；2×Taq PCR Master Mix，北京博迈德基因技术有限公司；DNA 胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、粪便基因组 DNA 提取试剂盒、无内毒素质粒小提试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；磁珠法全血/唾液/口腔拭子基因组提取试剂盒(一步法)，中联瑞(北京)生物科技有限责任公司。NanoDrop 核酸蛋白测定仪，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；Eppendorf Master-Cycler PCR 仪，北京佰鸥创投生物科技有限公司；全自动核酸提取仪，武汉纳磁生物科技有限公司。

1.3 引物筛选与合成

根据参考文献合成以 *C. perfringens* α -toxin (MH900563.1)、*S. enterica* *invA* (MK017941.1)、*E. coli* K99 (M35282.1)、BEV 5'-UTR (MW579538.1)、BAstV *ORF1a* (KJ620980.1)、BRoV *VP6* (GQ358714.1)、BKoV *D4* (ON730709.1)、BNoV *ORF1* (NC_029645.1)、BCoV *N* (OP820540.1)、BToV *N* (MG663097.1)、BVDV 5'-UTR (OR828551.1) 为靶标序列的特异性引物(表 1)，由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

Agent	Primer name	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Reference
<i>Clostridium perfringens</i>	Cp-F	GGGCTGGGGCATCAACTAAAGTCTA	474	[23]
	Cp-R	CATGTCCTGCGCTATCAACGGC		
<i>Salmonella enterica</i>	Sal-F	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284	[24]
	Sal-R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>Escherichia coli</i>	K99-F	GACTGGTCTGGTTCTATGAAC	190	[22]
	K99-R	CTGAATAGTTAAATGACTGAATTGC		
BEV	BEV-F	GGAGTAGTCCGACTCCGC	416	[25]
	BEV-R	AGCAACACTGGATTGTGCG		
BAstV	BAstV-F	GCACGTTTCCTCGATGT	376	[21]
	BAstV-R	ATACGTTTGGCCTCGCTCACA		
BRoV	BRoV-F	CCACCAGGTATGAATTGGAC	231	[26]
	BRoV-R	CGCCATCTGAGTGATTACTC		
BKoV	BKoV-F	TCCACCATCTATGACGTCACGT	118	This study
	BKoV-R	TCATCCACATAACTGATTGCTC		
BNoV	BNoV-F	GGCAAACCACGCAAACAAC	542	[21]
	BNoV-R	CTTCCGAAAGGGCACAGA		
BCoV	BCoV-F	GCCGATCAGTCCGACCAATC	407	[27]
	BCoV-R	AGAATGTCAGCCGGGTAT		
BToV	BToV-F	CCAAATGCTATGCCATTTTCAGC	297	[27]
	BToV-R	TGCAGTCTCATTTGCCATCAT		
BVDV	BVDV-F	ACAGTGGTGTGATTTCGTTGGATG	189	[28]
	BVDV-R	ACCCTATCAGGCTGTATTCGTAAC		

1.4 核酸的提取

按照病毒基因组提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、拭子基因组提取试剂盒与磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取细菌、病毒及拭子等临床样品的核酸。所有提取的基因组通过 NanoDrop 核酸蛋白测定仪进行浓度测定，并置于-80 °C 冰箱保存备用。

1.5 重组质粒标准品的制备

以对应的核酸为模板，分别进行 PCR 扩增，PCR 反应体系：2×Taq PCR Master Mix 10 μL，模板 1 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL，ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 15 s，55 °C 15 s，72 °C 15 s，35 个循环；72 °C 5 min。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳

检测，用胶回收试剂盒对扩增产物进行回收纯化，连接至 pMD18-T 载体，并分别转化至 Trans1-T1 感受态细胞。经过菌液 PCR (PCR 反应体系和条件同 1.5) 和测序鉴定，挑取鉴定正确的阳性克隆菌进行扩大培养，用质粒提取试剂盒分别提取质粒，通过 NanoDrop 核酸蛋白测定仪进行浓度测定，再分别用无核酸水稀释至 3×10¹⁰ copies/μL，作为 PCR 反应的阳性标准品，于-80 °C 储存备用。

1.6 多重 PCR 反应体系及条件的优化

根据目的片段大小将多重 PCR 分为 3 组，A 组：产气荚膜梭菌、肠道沙门氏菌、产肠毒素大肠杆菌；B 组：牛肠道病毒、牛星状病毒、牛轮状病毒、牛嗜病毒；C 组：牛诺如病毒、

牛冠状病毒、牛环曲病毒和牛病毒性腹泻黏膜病病毒。

通过 NanoDrop 测定核酸浓度, 均用 ddH₂O 稀释至 50 ng/μL, 将各组核酸等体积混合作为多重 PCR 反应模板。用生物信息学软件 DNASTar 分析确定其退火范围, 再用温度梯度法和棋盘法分别优化退火温度(60.0、59.6、58.8、57.5、55.8、54.4、53.5、53.0 °C)、引物浓度(0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 μmol/L), 最后优化循环数(20、25、30、35、40), 取 5 μL 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.7 特异性试验

用优化后的 PCR 反应体系及条件, 分别以溶血性曼氏杆菌、化脓链球菌、牛支原体分离株、金黄色葡萄球菌、牛多杀性巴氏杆菌、牛细小病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛腺病毒 3 型的基因组为模板进行多重 PCR 扩增。A 组以 *C. perfringens*、*S. enterica*、*E. coli* K99 的核酸混合物, B 组以 BEV、BAstV、BRoV、BKoV 的核酸混合物, C 组以 BNoV、BCoV、BToV 和 BVDV 的核酸混合物为模板的阳性对照, ddH₂O 为阴性对照, 以评估该方法的特异性。

1.8 敏感性试验

用 ddH₂O 将构建的标准质粒进行 10 倍倍比稀释至 3×10^{-1} – 3×10^{10} copies/μL, 按分组等体积混合后作为模板, 以无核酸水为阴性对照, 用优化后的反应条件分析多重 PCR 最低检测限, 评价该方法的敏感性。

1.9 重复性试验

以 50 ng/μL 相应核酸混合物作为模板, ddH₂O 作为阴性对照, 利用所建立的多重 PCR 方法每隔 1 个月分别检测 1 次, 共 3 次, 每次检测设置 4 个重复, 以此确定检测结果的可靠性和重复性。

1.10 临床病料的检测

从江苏地区不同牛场收集临床牛拭子样品共 490 份, 用全自动核酸提取仪提取核酸, 用所建立的一步法多重 PCR/RT-PCR 方法进行检测。同时, 通过参考相关文献, 合成特异性引物并对临床样品分别进行 *C. perfringens*^[29]、*S. enterica*^[30]、*E. coli*^[31]、BEV^[32]、BAstV^[33]、BRoV^[34]、BKoV^[35]、BNoV^[35]、BCoV^[34]、BToV^[36] 和 BVDV^[34] 单重 PCR 检测, 结果与多重 PCR 结果进行复核。随机挑选 50 个检测为阳性样本的 PCR 扩增产物进行测序验证。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的制备结果

分别以产气荚膜梭菌、肠道沙门氏菌、产肠毒素大肠杆菌、牛轮状病毒、牛冠状病毒、牛冠状病毒和牛病毒性腹泻黏膜病病毒核酸为模板, 利用设计的特异性引物进行单一 PCR/RT-PCR 扩增, 结果显示扩增的目的片段与预期一致。将回收的产物分别连接 pMD18-T 载体, 构建重组质粒 pMD-*C. perfringens* α-toxin、pMD-*S. enterica* invA、pMD-*E. coli* K99、pMD-BRoV VP6、pMD-BKoV D4、pMD-BCoV N、pMD-BVDV 5'-UTR、pMD-BToV N、pMD-BNoV ORF1、pMD-BAstV ORF1a、pMD-BEV 5'-UTR 并转化至 Trans1-T1 感受态细胞。经 PCR 扩增和测序鉴定, 结果显示扩增的 11 条目的片段与预期一致。用 Nano-Drop 核酸蛋白测定仪检测 11 种重组质粒浓度并稀释至 3×10^{10} copies/μL, 存放于 -80 °C 备用。

2.2 多重 PCR 方法的建立及优化结果

温度梯度优化结果显示, 退火温度为 54.4 °C 时条带最清晰(图 1)。运用棋盘法对引物浓度进行优化, *C. perfringens*、*S. enterica*、*E. coli*、BEV、BAstV、BRoV、BKoV、BNoV、

BCoV、BToV 和 BVDV 对应基因最优引物浓度分别为 0.20、0.25、0.25、0.20、0.25、0.25、0.35、0.50、0.25、0.25、0.30 $\mu\text{mol/L}$ 。优化循环次数为 20–40，结果显示 35 个循环为最佳循环数(图 2)。优化后的 PCR 反应体系(20 μL)为：

A 组：2 \times Taq PCR Master Mix 10 μL ，模板 3 μL ，*C. perfringens* 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL ，*S. enterica* 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ，*E. coli* 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ，ddH₂O 补足 20 μL ；B 组：2 \times ES One-Step Reaction Mix 10 μL ，One-Step Enzyme Mix

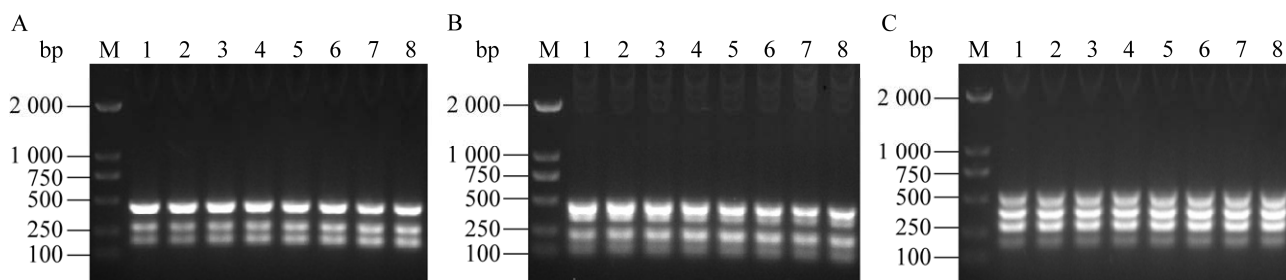


图 1 退火温度优化 A: A 组(产气荚膜梭菌、沙门氏菌、大肠杆菌); B: B 组(牛肠道病毒、牛星状病毒、牛轮状病毒、牛脊病毒); C: C 组(牛诺如病毒、牛冠状病毒、牛环曲病毒、牛病毒性腹泻黏膜病病毒)。M: DL2000 DNA Marker; 1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 59.6 $^{\circ}\text{C}$; 3: 58.8 $^{\circ}\text{C}$; 4: 57.5 $^{\circ}\text{C}$; 5: 55.8 $^{\circ}\text{C}$; 6: 54.4 $^{\circ}\text{C}$; 7: 53.5 $^{\circ}\text{C}$; 8: 53 $^{\circ}\text{C}$ 。

Figure 1 Optimized temperature of multiple PCR. A: Group A (*C. perfringens*, *S. enterica*, *E. coli*); B: Group B (BEV, BAstV, BRoV, BKoV); C: Group C (BNoV, BCoV, BToV, BVDV). M: DL2000 DNA Marker; 1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 59.6 $^{\circ}\text{C}$; 3: 58.8 $^{\circ}\text{C}$; 4: 57.5 $^{\circ}\text{C}$; 5: 55.8 $^{\circ}\text{C}$; 6: 54.4 $^{\circ}\text{C}$; 7: 53.5 $^{\circ}\text{C}$; 8: 53 $^{\circ}\text{C}$.

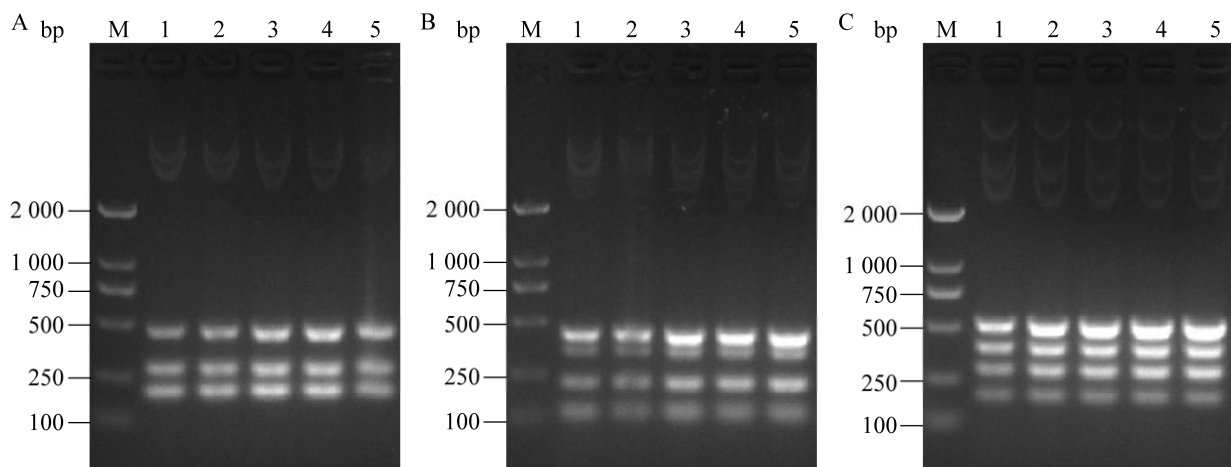


图 2 循环次数优化 A: A 组(产气荚膜梭菌、沙门氏菌、大肠杆菌); B: B 组(牛肠道病毒、牛星状病毒、牛轮状病毒、牛脊病毒); C: C 组(牛诺如病毒、牛冠状病毒、牛环曲病毒、牛病毒性腹泻黏膜病病毒)。M: DL2000 DNA Marker; 1: 20 次循环; 2: 25 次循环; 3: 30 次循环; 4: 35 次循环; 5: 40 次循环。

Figure 2 Optimized cycle times of multiple PCR. A: Group A (*C. perfringens*, *S. enterica*, *E. coli*); B: Group B (BEV, BAstV, BRoV, BKoV); C: Group C (BNoV, BCoV, BToV, BVDV). M: DL2000 DNA Marker; 1: 20 cycles; 2: 25 cycles; 3: 30 cycles; 4: 35 cycles; 5: 40 cycles.

0.4 μL , 模板 4 μL , BEV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , BAstV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , BRoV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , BKoV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.7 μL , ddH₂O 补足 20 μL ; C 组: 2 \times ES One-Step Reaction Mix 10 μL , One-Step Enzyme Mix 0.4 μL , 模板 4 μL , BNoV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , BCoV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , BToV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , BVDV 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.6 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。优化后的 PCR 反应条件为: A 组: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54.4 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。B、C 组: 45 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54.4 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

2.3 特异性试验结果

用优化后的反应体系及条件对溶血性曼氏杆菌、化脓链球菌、牛支原体分离株等基因组进行多重 PCR 扩增, 阳性对照为 3 组相应病原核酸混合物, ddH₂O 为阴性对照, 结果显示, 仅阳性对照扩增出目的条带, 其他核酸均未扩

增出目的条带(图 3), 表明该方法具有良好的特异性。

2.4 敏感性试验结果

将 2.2 中构建的重组质粒用无核酸水进行 10 倍倍比稀释, 等体积混合后作为 PCR 模板。结果显示(图 4), A 组 pMD-*C. perfringens* α -toxin、pMD-*S. enterica invA*、pMD-*E. coli* K99 的最低检测限分别为 7.5×10^3 、 7.5×10^4 、 7.5×10^3 copies/ μL ; B 组 pMD-BEV 5'-UTR、pMD-BAstV *ORF1a*、pMD-BRoV *VP6*、pMD-BKoV *D4* 的最低检测限分别为 7.5×10^1 、 7.5×10^4 、 7.5×10^2 、 7.5×10^3 copies/ μL , C 组 BpMD-BNoV *ORF1*、pMD-BCoV *N*、pMD-BToV *N*、pMD-BVDV 5'-UTR 的最低检测限分别为 7.5×10^2 、 7.5×10^2 、 7.5×10^4 、 7.5×10^3 copies/ μL , 表明该方法敏感性较好。

2.5 重复性试验结果

以 ddH₂O 为阴性对照, 以对应核酸混合物为模板, 采用建立的方法每间隔 1 个月分别检

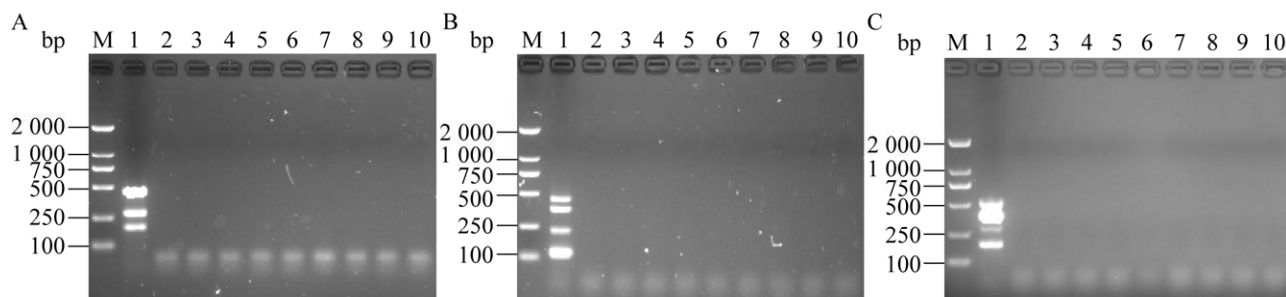


图3 多重 PCR 的特异性 A: A 组(产气荚膜梭菌、沙门氏菌、大肠杆菌); B: B 组(牛肠道病毒、牛星状病毒、牛轮状病毒、牛嗜病毒); C: C 组(牛诺如病毒、牛冠状病毒、牛环曲病毒、牛病毒性腹泻黏膜病病毒)。M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照; 2: 溶血性曼氏杆菌; 3: 化脓链球菌; 4: 牛支原体分离株; 5: 金黄色葡萄球菌; 6: 牛多杀性巴氏杆菌; 7: 牛细小病毒; 8: 牛传染性鼻气管炎病毒; 9: 牛腺病毒 3 型; 10: 阴性对照。

Figure 3 The specificity of multiplex PCR. A: Group A (*C. perfringens*, *S. enterica*, *E. coli*); B: Group B (BEV, BAstV, BRoV, BKoV); C: Group C (BNoV, BCoV, BToV, BVDV). M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control; 2: *Mansella haemolyticus*; 3: *Streptococcus pyogenes*; 4: *Mycoplasma bovis*; 5: *Staphylococcus aureus*; 6: *Pasteurella multocida*; 7: Bovine parvovirus; 8: Infectious bovine rhinotracheitis virus; 9: Bovine adenovirus type 3; 10: Negative control.

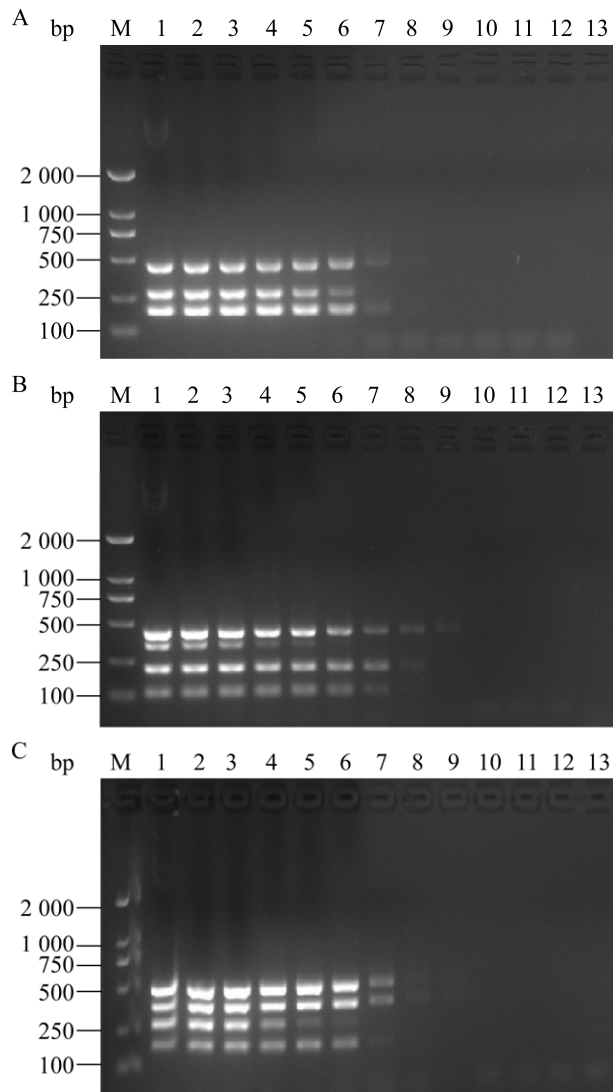


图 4 多重 PCR 的敏感性 A: A 组(产气荚膜梭菌、沙门氏菌、大肠杆菌); B: B 组(牛肠道病毒、牛星状病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒); C: C 组(牛诺如病毒、牛冠状病毒、牛环曲病毒、牛病毒性腹泻黏膜病病毒)。M: DL2000 DNA Marker; 1-12: 重组质粒浓度 $7.5 \times 10^9 - 7.5 \times 10^{-2}$ copies/ μL ; 13: 阴性对照。

Figure 4 The sensitivity of multiplex PCR. A: Group A (*C. perfringens*, *S. enterica*, *E. coli*); B: Group B (BEV, BAstV, BRoV, BKoV); C: Group C (BNoV, BCoV, BToV, BVDV). M: DL2000 DNA Marker; 1-12: Recombinant plasmid concentration $7.5 \times 10^9 - 7.5 \times 10^{-2}$ copies/ μL ; 13: Negative control.

测 1 次, 共 3 次, 每个批次样本重复 4 次。结果显示, 建立的多重 PCR 方法对 3 个批次、4 个批内重复(图 5)的样本均能扩增出目的基因, 电泳条带清晰, 该方法重复性及稳定性良好。

2.6 多重 PCR/RT-PCR 方法结果判定

DNA Marker 出现标准条带, 阴性对照无条带出现, 阳性对照应有分子量相符的特异扩增产物(图 5)时判定为试验有效。否则, 此次试验视为无效。若多重 PCR 检测结果出现与病原对应大小的扩增条带, 则判定为该样品中存在被检病原核酸。若存在多个病原对应大小的扩增条带, 则判定为该样品中存在多个被检病原核酸。若多重 PCR 检测无任何扩增条带, 则判定为阴性。

2.7 临床样品检测结果

用建立的多重 PCR 检测方法检测江苏地区 490 份临床牛拭子样品, 结果显示, 共检测到阳性 164 份(图 6A), 其中 BEV 阳性 3 例(0.61%), BAstV 阳性 2 例(0.41%), BRoV 阳性 3 例(0.61%), BKoV 阳性 1 例(0.21%), BNoV 阳性 133 例(27.14%), BCoV 阳性 16 例(3.27%), BToV 阳性 1 例(0.21%), BVDV 阳性 5 例(1.02%)。样品存在混合感染情况(图 6B), 其中 BAstV、BCoV 混合感染 1 例, BEV、BCoV 混合感染 1 例, BEV、BNoV 混合感染 1 例, BNoV、BCoV 混合感染 9 例, BNoV、BToV 混合感染 1 例, BNoV、BVDV 混合感染 5 例, BEV、BAstV、BKoV、BNoV、BCoV 混合感染 1 例。通过单重 PCR 对该多重 PCR 临床样品检测结果进行重复验证, 结果显示多重 PCR 与常规单重 PCR 结果一致。随机挑选 50 个检测结果为阳性样本的 PCR 产物进行切胶纯化测序验证并在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 结果显示(表 2)均为相应病原的特异性基因片段。

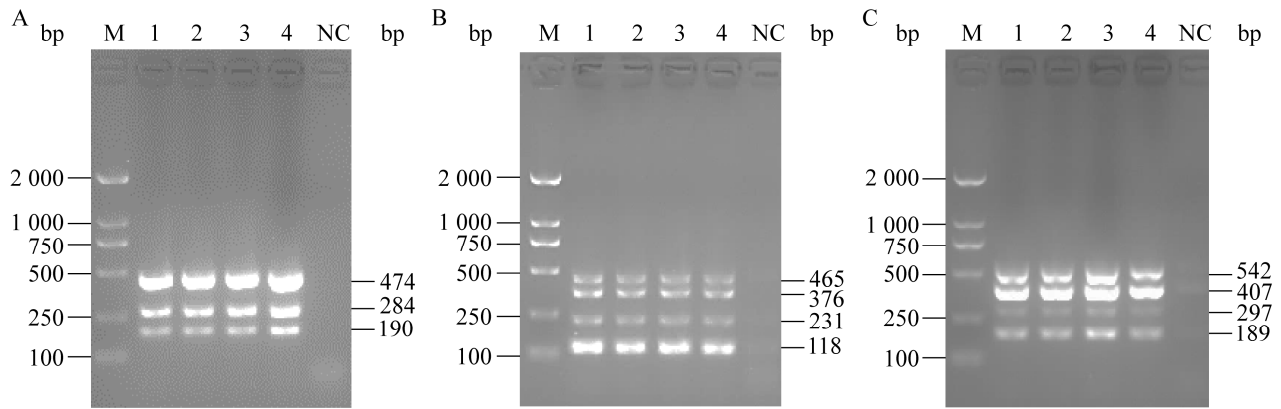


图 5 多重 PCR 的重复性(批号: 20240401) A: A 组(产气荚膜梭菌、沙门氏菌、大肠杆菌); B: B 组(牛肠道病毒、牛星状病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒); C: C 组(牛诺如病毒、牛冠状病毒、牛环曲病毒、牛病毒性腹泻黏膜病病毒)。M: DL2000 DNA Marker; 1-4: 同一批次 4 个重复; NC: 阴性对照。
Figure 5 Repeatability of multiple PCR (batch number: 20240401). A: Group A (*C. perfringens*, *S. enterica*, *E. coli*); B: Group B (BEV, BAstV, BRoV, BKoV); C: Group C (BNoV, BCoV, BToV, BVDV). M: DL2000 DNA Marker; 1-4: Four groups of plasmids from the same batch; NC: Negative control.

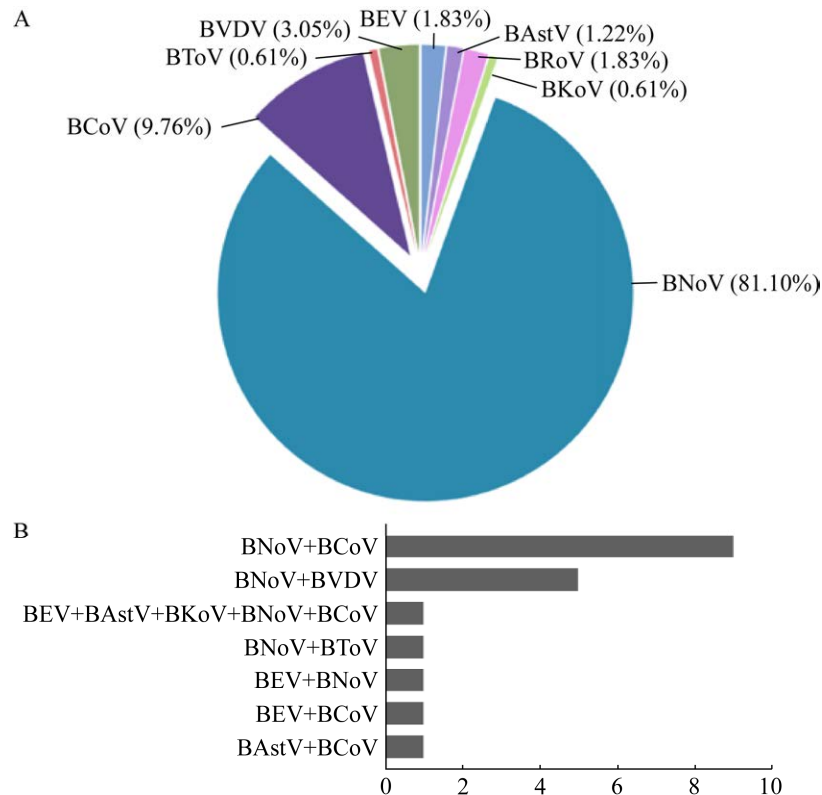


图 6 临床样品检测结果 A: 阳性样品分布情况; B: 阳性样品混合感染情况。

Figure 6 Result of clinical sample detection. A: The distribution of clinical samples; B: The co-infection incidence.

表 2 部分阳性样品的 PCR 扩增产物测序结果

Table 2 Sequencing results PCR amplification products of some positive samples

Number of samples	Positive sample	BLAST Result	
		Target	Similarity percentage (%)
C22, 284, 289	BEV 3 samples	5'-UTR	99.14–99.35
289, 394	BAstV 2 samples	ORF1a	98.69–99.21
2J1, 64, 248016	BRoV 3 samples	VP6	98.05–98.43
289	BKoV 1 samples	D4	99.12
N1, N7, R5, V3, Q1, Y4, G5, I2, I8, S2, S5, C22, C2, A7, J4, Z4, P3, 2S1, 2K1, 2M4, 2T5, 2X3, ☆1, Δ3, 289	BNoV 25 samples	ORF1	98.15–99.45
B8, C26, C2, A7, J4, 2D1, 2G2, 2S1, 2T5, 2X3	BCoV 10 samples	N	98.54–99.75
Z4	BToV 1 samples	N	98.65
T3, T4, K1, P3, 2Δ3	BVDV 5 samples	5'-UTR	98.40–99.47

3 讨论与结论

牛腹泻病是一种病因复杂的疾病，包括环境、饲养管理和感染因素多方面^[37]。临床上，牛腹泻病可表现为急性腹泻，成年牛消瘦、生产性能下降，也是犊牛出生后第一个月死亡的主要原因^[37-40]。据报道，因牛腹泻病死亡的断奶犊牛约占总死亡的 50%以上^[27-30]。

潜在病原数量多和可能的混合感染是诊断牛腹泻病主要难点。为了更便捷、更高效确定病原，我们建立了一种一步法多重 PCR/RT-PCR 检测方法，用于检测 11 种牛腹泻相关病原体：*C. perfringens*、*S. enterica*、*E. coli* K99、BEV、BAstV、BRoV、BKoV、BNoV、BCoV、BToV 和 BVDV。该方法特异性较强，与牛多杀性巴氏杆菌、牛细小病毒等病原均无交叉反应。重复性较好，批间与批内检测结果均一致。敏感性较高，孙睿雪等^[35]建立的三重 RT-PCR 对 BNoV、BKoV 质粒标准品的最低检测限分别为 2.73×10^4 、 2.87×10^4 copies/ μ L；李沫萱等^[34]建立的四重 PCR 检测方法对 BCoV、BRV 的最低检出限分别为 1.0×10^3 、 1.0×10^4 copies/ μ L；Meng 等^[9]报道的多重 PCR 检测方法对 BNoV、BEV、BToV、BRV、BCoV 和 BVDV 的最低检测限为

1.91×10^4 、 9.6×10^4 、 1.28×10^4 、 1.64×10^5 、 1.82×10^4 、 6.53×10^5 copies/ μ L，均高于本方法的最低检测限。

本实验建立的一步法多重 PCR/RT-PCR 方法将 11 种病原检测的反应条件统一。其优点在于，检测过程中，B、C 组完成 45 °C 15 min 的逆转录后，即可将 3 组同时放入 PCR 仪中反应，避免 RNA 逆转录后再开盖加样造成污染，使检测过程更简单，节约检测时间。其难点在于既要保证体系中引物 T_m 值差异小，控制引物二聚体产生，又要保证扩增片段长度间隔均匀，使目的条带均匀分布。在引物的设计和筛选时，对每种病原选择了 Primer BLAST 打分最高的 10 条引物，进行试验。

本实验目的条带均在 600 bp 以下，由于片段较小，实验用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，发现目的条带难以分离，所需电泳时间长，条带模糊，后期使用 1.5%、2%、2.5%、3% 的琼脂糖凝胶进行比较发现，目的条带在 2% 的琼脂糖凝胶上分离均匀、条带清晰。实验中我们还发现，对于同一个样品用自动核酸提取仪提取的核酸浓度较手动提取较低，扩增后条带较暗。这提示我们，在样品检测时，除各种方法的敏感性不同外，选择不同的核酸提取方式也会影

响样品检测结果。自动核酸提取仪操作简单、快捷高效,适用于进行大规模检测、初筛时使用。若需对样品进行精准检测,还需对比不同核酸提取方法。

本研究采集 490 份临床样品,用建立的多重 PCR 方法进行检测,结果显示, BEV、BAstV、BRoV、BKoV、BNoV、BCoV、BToV、BVDV 阳性率分别 0.61%、0.41%、0.61%、0.21%、27.14%、3.27%、0.21%、1.02%,其中 BNoV 阳性率最高,其次是 BCoV 和 BVDV,产气荚膜梭菌、沙门氏菌和大肠杆菌未检出。本研究检测的 490 份临床样本中也存在多种病毒混合感染的情况, BAstV、BCoV 混合感染 1 例, BEV、BCoV 混合感染 1 例, BEV、BNoV 混合感染 1 例, BNoV、BCoV 混合感染 9 例, BNoV、BToV 混合感染 1 例, BNoV、BVDV 混合感染 5 例, BEV、BAstV、BKoV、BNoV、BCoV 混合感染 1 例。该检测结果与许多研究报告中一致,牛群中 BNoV 感染率高^[17,41-47]。BNoV 感染的临床意义目前尚未完全清晰,有研究发现健康的牛中也检出了该病毒^[41,48],一项动物研究表明 BNoV 对牛具有致病性^[16],一项研究评估了健康小牛和腹泻小牛粪便样品中 BNoV 含量的差异^[47],结果发现腹泻牛显著高于健康牛,这表明疾病的进程可能与病毒的初始暴露量和复制滴度有关。BCoV 长期以来被认为是牛腹泻病的主要病原^[14],该病原的携带可能导致其他病原更容易入侵^[47],本研究检测结果也证实了这一点,16 例 BCoV 阳性样品中,有 12 例呈混合感染,其中 BNoV 和 BCoV 的混合感染率最高,应重视对该病原的临床监测。

综上所述,本研究建立的一步法多重 PCR/RT-PCR 检测方法效果良好,适用于牛腹泻快速诊断和流行病学调查。

致谢

感谢西南民族大学汤承教授、岳华教授课题组为本实验提供的病原核酸。感谢扬州大学王亨教授课题组为本实验提供临床样品。

REFERENCES

- [1] UMAÑA SEDÓ SG, WINDER CB, RENAUD DL. Graduate student literature review: the problem of calf mortality on dairy farms[J]. *Journal of Dairy Science*, 2023, 106(10): 7164-7176.
- [2] REITEN M, ROUSING T, THOMSEN PT, OTTEN ND, FORKMAN B, HOUE H, SØRENSEN JT, KIRCHNER MK. Mortality, diarrhea and respiratory disease in Danish dairy heifer calves: effect of production system and season[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 155: 21-26.
- [3] CHO YI, YOON KJ. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2014, 15(1): 1-17.
- [4] HUR TY, JUNG YH, CHOE CY, CHO YI, KANG SJ, LEE HJ, KI KS, BAEK KS, SUH GH. The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea[J]. *Korean Journal of Veterinary Research*, 2013, 53(2): 103-108.
- [5] ØSTERÅS O, GJESTVANG MS, VATN S, SØLVERØD L. Perinatal death in production animals in the Nordic countries: incidence and costs[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2007, 49(1): S14.
- [6] GULL T. Bacterial causes of intestinal disease in dairy calves: acceptable control measures[J]. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 2022, 38(1): 107-119.
- [7] MEDINA JE, CASTAÑEDA S, PÁEZ-TRIANA L, CAMARGO M, GARCIA-CORREDOR DJ, GÓMEZ M, LUNA N, RAMÍREZ AL, PULIDO-MEDELLÍN M, MUÑOZ M, RAMÍREZ JD. High prevalence of Enterovirus E, Bovine Kobuvirus, and Astrovirus revealed by viral metagenomics in fecal samples from cattle in Central Colombia[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2024, 117: 105543.
- [8] GOOSSENS E, VALGAEREN BR, PARDON B, HAESBROUCK F, DUCATELLE R, DEPREGZ PR, van IMMERSEEL F. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 9.
- [9] MENG WX, CHEN ZH, JIANG QF, CHEN JP, GUO XY, MA ZH, JIA K, LI SJ. A multiplex real-time fluorescence-based quantitative PCR assay for calf diarrhea viruses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 14: 1327291.
- [10] 亓爱杰, 王丽静, 仇弦, 王春霞, 刘东莲, 张欣欣. 牛病毒性腹泻病毒检测方法研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2024, 41(4): 64-70.
QI AJ, WANG LJ, ZHANG X, WANG CX, LIU DL, ZHANG XX. Research progress in the detection methods for bovine viral diarrhea virus[J]. *China*

- Animal Health Inspection, 2024, 41(4): 64-70 (in Chinese).
- [11] 秦璞, 陈崇波. 2 种 RT-PCR 技术检测肠道病毒 RNA 的对比研究[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(2): 94-95.
QIN P, CHEN CB. Comparison of two different PCR assays for detection of enterovirus RNA in central nervous system[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2004, 22(2): 94-95 (in Chinese).
- [12] HOET AE, SMILEY J, THOMAS C, NIELSEN PR, WITTUM TE, SAIF LJ. Association of enteric shedding of bovine torovirus (Breda virus) and other enteropathogens with diarrhea in veal calves[J]. American Journal of Veterinary Research, 2003, 64(4): 485-490.
- [13] HOET AE, NIELSEN PR, HASOKSUZ M, THOMAS C, WITTUM TE, SAIF LJ. Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2003, 15(3): 205-212.
- [14] BOILEAU MJ, KAPIL S. Bovine coronavirus associated syndromes[J]. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 2010, 26(1): 123-146.
- [15] BLAS-MACHADO U, SALIKI JT, BOILEAU MJ, GOENS SD, CASELTINE SL, DUFFY JC, WELSH RD. Fatal ulcerative and hemorrhagic typhlocolitis in a pregnant heifer associated with natural bovine enterovirus type-1 infection[J]. Veterinary Pathology, 2007, 44(1): 110-115.
- [16] OTTO PH, CLARKE IN, LAMBDEN PR, SALIM O, REETZ J, LIEBLER-TENORIO EM. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection[J]. Journal of Virology, 2011, 85(22): 12013-12021.
- [17] KAPLON J, GUENAU E, ASDRUBAL P, POTHIER P, AMBERT-BALAY K. Possible novel neobovirus genotype in cattle, France[J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(6): 1120-1123.
- [18] 朱杰, 祁明普, 姜传文. 我国牛星状病毒流行病学调查和新型基因型的鉴定[C]//中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十九次全国学术研讨会论文集. 长春, 2021.
ZHU J, QI MP, JIANG CW. Epidemiological investigation and identification of novel genotypes of bovine astrovirus in China[C]//Proceedings of the 19th National Symposium of Animal Infectious Diseases Branch of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. Changchun, Jilin, China, 2021 (in Chinese).
- [19] 苗艳. 牛嶂病毒研究进展[J]. 现代畜牧科技, 2024(6): 119-121.
MIAO Y. Research progress of bovine kobuvirus[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2024(6): 119-121 (in Chinese).
- [20] 林初文, 沈志强. BVDV、BCV 和 BRV 三重 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(7): 61-64.
LIN CW, SHEN ZQ. Establishment and application of triple RT-PCR detection method for BVDV, BCV and BRV[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 45(7): 61-64 (in Chinese).
- [21] 师志海, 徐照学, 兰亚莉, 张彬, 孟红丽, 王亚州, 金磊, 王文佳. 牛诺如病毒、牛星状病毒和牛环曲病毒多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(10): 1924-1928.
SHI ZH, XU ZX, LAN YL, ZHANG B, MENG HL, WANG YZ, JIN L, WANG WJ. Establishment and application of a multiple PCR for detection of BNoV, BAstV and BToV[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(10): 1924-1928 (in Chinese).
- [22] PEDROSO NH, SILVA JVJ Jr, BECKER AS, WEIBLEN R, FLORES EF. An end-point multiplex PCR/reverse transcription-PCR for detection of five agents of bovine neonatal diarrhea[J]. Journal of Microbiological Methods, 2023, 209: 106738.
- [23] 刘晓丹, 孟祥莉, 徐凝, 张文龙, 王君伟. 多重 PCR 方法快速检测 3 种消化道病原菌[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(4): 308-311.
LIU XD, MENG XL, XU N, ZHANG WL, WANG JW. Development of a multiplex PCR for simultaneous detection of three conditioned pathogen bacteria of alimentary tract diseases[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(4): 308-311 (in Chinese).
- [24] 张开琴, 李天娇, 李登宇, 班马泽郎, 杨美琪, 王刚, 宋仁德, 索朗斯珠. 青海牦牛源沙门氏菌的分离鉴定、耐药表型及毒力基因分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(21): 78-83, 133.
ZHANG KQ, LI TJ, LI DY, BAN M, YANG MQ, WANG G, SONG RD, SUO L. Isolation and identification, drug resistance phenotype and virulence gene analysis of Qinghai yak-derived *Salmonella*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(21): 78-83, 133 (in Chinese).
- [25] HE H, TANG C, CHEN XN, YUE H, REN YP, LIU Y, ZHANG B. Isolation and characterization of a new enterovirus F in yak feces in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Archives of Virology, 2017, 162(2): 523-527.
- [26] 周芳, 岳华, 张斌, 李凡, 陈曦, 汤承. 牦牛轮状病毒 VP6 基因序列分析及 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(7): 1465-1473.
ZHOU F, YUE H, ZHANG B, LI F, CHEN X, TANG C. Establishment and application of an RT-PCR assay for yak rotavirus based on the sequence analysis of yak rotavirus VP6 gene[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2016, 47(7): 1465-1473 (in Chinese).
- [27] THANTHRIGE-DON N, LUNG O, FURUKAWA-STOFFER T, BUCHANAN C, JOSEPH T, GODSON DL, GILLEARD J, ALEXANDER T, AMBAGALA A. A novel multiplex PCR-electronic microarray assay for rapid and simultaneous detection of bovine respiratory and enteric pathogens[J]. Journal of Virological Methods, 2018, 261: 51-62.
- [28] 高亚桃, 刘智慧, 李妍, 刘胜丽, 郭姚蕊, 马亚宾, 蒋桂娥, 刘志勇, 秦建华, 赵月兰. 河北省部分地区致犊牛腹泻主要病原分布特征[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(6): 1149-1155.
GAO YT, LIU ZH, LI Y, LIU SL, GUO YR, MA YB, JIANG GE, LIU ZY, QIN JH, ZHAO YL. Distribution characteristics of main pathogens causing calf diarrhea in some areas of Hebei Province[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(6): 1149-1155 (in Chinese).
- [29] 国境口岸产气荚膜梭菌毒素检测方法: SN/T 2709—2010[S]. 行业标准-商品检验, 2010.

- [30] 陈金顶, 索青利, 廖明, 辛朝安. 沙门氏菌的 *invA* 基因序列分析与分子检测[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(10): 868-871.
CHEN JD, SUO QL, LIAO M, XIN CA. DNA sequence analysis and molecular detection of *invA* gene from *Salmonella* spp.[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2004, 20(10): 868-871 (in Chinese).
- [31] 梁纤纤, 李威, 郑启铭, 李晓卓, 张凌, 刘文锴, 韩翔舒, 苏战强, 夏俊. 牛源大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 草食家畜, 2023(5): 13-17.
LIANG XX, LI W, ZHENG QM, LI XZ, ZHANG L, LIU WK, HAN XS, SU ZQ, XIA J. Isolation, identification and drug resistance analysis of bovine *Escherichia coli*[J]. Grass-Feeding Livestock, 2023(5): 13-17 (in Chinese).
- [32] 吴丹, 吴涛, 张鹤晓, 高志强, 蒲静, 汪琳, 乔彩霞, 谷强, 夏春. 同时检测口蹄疫病毒和牛肠道病毒双重 RT-PCR 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(12): 976-979.
WU D, WU T, ZHANG HX, GAO ZQ, PU J, WANG L, QIAO CX, GU Q, XIA C. Establishment of duplex RT-PCR detection for foot and mouth disease virus and bovine enterovirus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(12): 976-979 (in Chinese).
- [33] 田欣睿, 汤承, 岳华. 川西北牦牛源牛星状病毒的检测及 ORF2 基因序列分析[J]. 动物医学进展, 2019, 40(10): 32-38.
TIAN XR, TANG C, YUE H. Detection of bovine astrovirus in yaks of northwest Sichuan and sequence analysis of *ORF2* gene[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2019, 40(10): 32-38 (in Chinese).
- [34] 李沫萱, 钟林翰, 韩言言. 致牛腹泻主要病毒四重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(4): 67-75.
LI MX, ZHONG LH, HAN YY. Establishment and preliminary application of quadruplex PCR for detection of major virus causing bovine diarrhea[J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Science, 2024(4): 67-75.
- [35] 孙睿雪, 李玉铎, 吴国军, 陈天杰, 车瑞香, 茹毅, 韩欢胜, 赵建军. 牛诺如病毒和牛嗜病毒及牛环曲病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2024, 54(4): 454-464.
SUN RX, LI YD, WU GJ, CHEN TJ, CHE RX, RU Y, HAN HS, ZHAO JJ. Establishment of a triplex RT-PCR assay for detection of bovine norovirus, bovine kobuvirus and bovine torovirus[J]. Chinese Veterinary Science, 2024, 54(4): 454-464 (in Chinese).
- [36] 王文佳, 邓廷贤, 赵丽, 师志海. 牛星状病毒及牛环曲病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(7): 840-844.
WANG WJ, DENG TX, ZHAO L, SHI ZH. Establishment and application of a duplex RT-PCR assay for detection of bovine astrovirus and bovine torovirus[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(7): 840-844 (in Chinese).
- [37] BARKLEY JA, PEMPEK JA, BOWMAN AS, NOLTING JM, LEE J, LEE S, HABING GG. Longitudinal health outcomes for enteric pathogens in preweaned calves on Ohio dairy farms[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2021, 190: 105323.
- [38] CAFFARENA RD, CASAUX ML, SCHILD CO, FRAGA M, CASTELLS M, COLINA R, MAYA L, CORBELLINI LG, RIET-CORREA F, GIANNITTI F. Causes of neonatal calf diarrhea and mortality in pasture-based dairy herds in Uruguay: a farm-matched case-control study[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(2): 977-988.
- [39] AGHAKESHMIRI F, AZIZZADEH M, FARZANEH N, GORJIDOOZ M. Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent productive and reproductive performance of heifer calves[J]. Veterinary Research Communications, 2017, 41(2): 107-112.
- [40] WANG J, ZHU XJ, WANG ZJ, CHEN YY, ROBERTSON ID, GUO AZ, ALERI JW. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* and the enumeration of ESBL *E. coli* in dairy farms in Hubei Province, China[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2023, 212: 105822.
- [41] MIJOVSKI JZ, POLJSK-PRIJATELJ M, STEYER A, BARLIC-MAGANJA D, KOREN S. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2010, 10(3): 413-420.
- [42] REUTER G, PANKOVICS P, EGYED L. Detection of genotype 1 and 2 bovine noroviruses in Hungary[J]. The Veterinary Record, 2009, 165(18): 537-538.
- [43] van der POEL WHM, van der HEIDE R, VERSCHOOR F, GELDERBLUM H, VINJÉ J, KOOPMANS MPG. Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 92(4): 297-309.
- [44] YILMAZ H, TURAN N, ALTAN E, BOSTAN K, YILMAZ A, HELPS CR, CHO KO. First report on the phylogeny of bovine norovirus in Turkey[J]. Archives of Virology, 2011, 156(1): 143-147.
- [45] WISE AG, MONROE SS, HANSON LE, GROOMS DL, SOCKETT D, MAES RK. Molecular characterization of noroviruses detected in diarrheic stools of Michigan and Wisconsin dairy calves: circulation of two distinct subgroups[J]. Virus Research, 2004, 100(2): 165-177.
- [46] PARK SI, JEONG C, KIM HH, PARK SH, PARK SJ, HYUN BH, YANG DK, KIM SK, KANG MI, CHO KO. Molecular epidemiology of bovine noroviruses in Korea[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(1/2): 125-133.
- [47] CHO YI, HAN JI, WANG C, COOPER V, SCHWARTZ K, ENGELKEN T, YOON KJ. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(3/4): 375-385.
- [48] JOR E, MYRMEL M, JONASSEN CM. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169(1): 1-7.