

DOI:10.13350/j.cjpb.241012

• 论著 •

牛肠道病毒 Syber Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立^{*}

尹柳祯¹, 王建龙², 郭宇², 张璇², 郭帅³, 吕香玉¹, 宋扬^{1**}, 翟景波^{4**}, 温树波^{1,4**}

(1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古自治区动物疫病预防控制中心;
3. 内蒙古通辽市动物疫病预防控制中心; 4. 内蒙古自治区布鲁氏菌病防治工程技术研究中心)

【摘要】 目的 建立一种简便快速、特异性和重复性好、灵敏度高的牛肠道病毒(Bovine Enterovirus, BEV)检测方法。

方法 根据 GenBank 公布的 BEV 基因序列, 选取保守区核苷酸序列, 利用 Primer 5.0 设计引物, 通过 PCR 扩增目的基因片段, 将其连接到 pMD18-T 载体上构建重组标准质粒 pMD18-T-BEV。构建荧光定量 PCR 方法, 利用软件 Quant Studios Design & Analysis Software 自动生成标准曲线及溶解曲线。检测其重复性、特异性和灵敏度并与传统 PCR 方法比较。 **结果** 建立的荧光定量检测方法标准曲线在 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^9$ 拷贝/ μL 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.997, 斜率为 -3.387; 组间变异系数 $< 3.16\%$, 组内变异系数 $< 1.67\%$; 与牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛库布病毒(BKOV)、牛环曲病毒(BTOV)、牛诺如病毒(BNOV)和牛副流感病毒 3 型(BPIV3)的 cDNA 样品无交叉反应; 最低检测限为 3.2×10^1 拷贝/ μL , 是常规 PCR 检测灵敏度的 1 000 倍。利用本研究建立的荧光定量检测方法对采集自内蒙古自治区 9 个盟市的 86 份牛腹泻样品进行检测, 其阳性率为 26.74%, 远高于传统 PCR 检测出的阳性率 4.56%。

结论 本研究成功建立了一种 BEV SYBR Green I Real-time PCR 方法, 该方法具有较高的灵敏度、特异性和可重复性, 适用于规模化养殖场牛肠病毒的快速检测。为内蒙古自治区 BEV 的检测和流行病学调查提供依据。

【关键词】 牛肠道病毒; SYBR Green I 荧光定量 PCR; 特异性

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)10-1177-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Oct.; 19(10): 1177-1181.]

Establishment of a Syber Green I fluorescence quantitative PCR method for the detection of bovine enterovirus

YIN Liuyi¹, WANG Jianlong², GUO Yu², ZHANG Xuan², GUO Shuai³, LV Xiangyu¹, SONG Yang¹, ZHAI Jingbo⁴, WEN Shubo^{1,4} (1. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 2. Inner Mongolia Autonomous Region Epidemic Prevention and Control Center; 3. Animal Disease Prevention and Control Center of Tongliao City; 4. Brucellosis Prevention and Treatment Technology Research Center, Inner Mongolia Autonomous Region) ^{***}

【Abstract】 Objective To establish a simple, rapid, specific, reproducible and sensitive bovine enterovirus (BEV) detection method. **Methods** According to the BEV gene sequence published by GenBank, the nucleotide sequence of the conserved region was selected, the primer was designed with Primer 5.0, the target gene fragment was amplified by PCR and cloned into pMD18-T vector to construct recombinant standard plasmid (PMD18-T-BEV). Fluorescence PCR methods were constructed and standard and dissolution curves were automatically generated using the software Quant Studios Design & Analysis Software. Its repeatability, specificity, and sensitivity were measured and compared with traditional PCR methods, and clinically validated. The data were analysed using IBM SPSS Statistics 22 software.

Results The standard curve of the fluorescence quantitative detection method established in this study has a good linear relationship in the range of $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^9$ copies/ μL , with a correlation coefficient of 0.997 and a slope of -3.387, a coefficient of variation between groups $< 3.16\%$, and a coefficient of variation within groups $< 1.67\%$. There was no cross-reactivity with cDNA samples of bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine Kobuvirus (BKOV), bovine cyclovirus (BTOV), bovine norovirus (BNOV) and bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3); The dissolution temperature of the standard plasmid was about 84.2 °C. The minimum detection limit was 3.2×10^1 copies/ μL , which was 1000 times more sensitive than conventional PCR detection. Whereafter, the fluorescence quantitative detection method

^{*} **【基金项目】** 内蒙古自治区青年科技英才项目(No. NJYT22053, NJYT23095); 2024 中央支持地方高校科研平台项目—人兽共患病防控自治区高等学校重点实验室项目; 自治区直属高校基本科研业务费(No. GXKY22096); 内蒙古自治区博士启动基金项目(No. KYQD18072, KYQD19079)。

^{**} **【通讯作者】** 宋 扬, E-mail: yangyang2130@126.com; 翟景波, E-mail: jbzhai@imn.edu.cn; 温树波, E-mail: wen0516@126.com

【作者简介】 尹柳祯(2000-), 女, 河南人, 研究生, 研究方向: 兽医微生物及分子病毒学。E-mail: yly2366526874@163.com

established in this study was used to detect 86 faecal specimens randomly collected from cattle with diarrhea in 9 cities of Inner Mongolia Autonomous Region. The positive rate was much higher than that detected by the traditional PCR (26.74% vs 4.56%). **Conclusion** In this study, a BEV SYBR Green I Real-time PCR method was successfully established, which has high sensitivity, specificity and reproducibility, and is suitable for the rapid detection of bovine enterovirus in large-scale farms. To provide a basis for the detection and epidemiological investigation of BEV in Inner Mongolia Autonomous Region.

【Keywords】 bovine enterovirus; SYBR Green I real-time PCR; specificity

牛肠道病毒(Bovine enterovirus, BEV)感染是近年来国内出现的一种新发传染病,病畜临床症状主要以消化系统、呼吸系统为主要特征,表现为腹泻、脱水、发热、咳嗽、呼吸困难,还有可能造成生殖障碍^[1-4]。BEV感染在牛群中较为常见,且易与其他病原发生混合感染和继发感染,在某些牛群中可造成较高的死亡率,严重威胁养牛业的健康发展。BEV是一种小RNA病毒^[5-6],是小RNA病毒科,肠道病毒属成员。病毒粒子呈球形,结构简单,大小约为20~30 nm^[7-8]。其基因组为单股正链RNA,全长约为7.5 kb,包含一个开放阅读框,编码一个多聚蛋白。该多聚蛋白可通过蛋白酶水解形成4个结构蛋白(VP1~4)和7个非结构蛋白(2A~C, 3A~D)。根据病毒基因型的不同,肠道病毒可分为12种肠道病毒种(A~L)和3种鼻病毒(A~C),其中肠道病毒E型、F型常见于牛,G型常感染猪、羊等^[9]。

本研究前期通过接种MDBK细胞,从1份出现严重腹泻的犊牛粪便样品中分离到1株可使MDBK细胞出现显著病变的毒株,经鉴定,该病毒为BEV。为了解内蒙古自治区不同盟市BEV毒株流行情况,本研究拟建立一种操作简便、重复性和特异性好,灵敏度高的Syber Green I BEV荧光定量PCR检测方法并应用于BEV感染的诊断。

材料与方法

1 材料

病毒核酸 BVDV、BKOV、BTOV、BNOV 和 BPIV3 病毒核酸均来自内蒙古民族大学动物科技学院预防兽医学实验室临床检测样品。

主要仪器与试剂 Ex Taq 酶, T4 DNA 连接酶, pMD18-T 载体, DNA Marker DL2000, DNA Marker DL2000 购自大连 TaKaRa 公司;质粒小提试剂盒购自杭州 AXYGEN 公司;总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;SYBR Green I PCR Master Mix 购自美国 Promega 公司。梯度 PCR 仪, Quant Studio 3 型荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司生产。

2 方法

2.1 引物设计与合成 以本研究前期分离的 BEV 毒

株全基因序列为模板,选择保守区域,利用 Primer 5.0 软件设计 1 对特异性引物,扩增片段大小为 127 bp。BEV4502F2: 5'-CGTACTCTGGCATCCACACGAA-3'; BEV4628R2: 5'-CAGTGAAGTCCCCGACCT-3'。引物由吉林省库美生物工程有限公司合成。

2.2 标准品质粒的制备 使用上海生工生物工程有限公司的 RNA 提取试剂盒,按照说明书提取牛粪便样品中的总 RNA,将其反转录为 cDNA。以之为模板,使用方法 2.1 中设计合成的 PCR 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。使用凝胶回收试剂盒回收目的基因并将其克隆到 pMD18-T 载体上构建标准品质粒,将经酶切验证正确的质粒交由吉林库美生物科技有限公司进行测序。用 Nanodrop 分光光度计测得 pMD18-T-BEV 质粒浓度,挑选 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间的质粒用做标准品。计算 pMD18-T-BEV 质粒为 3.2×10^{10} 拷贝/ μL 。将重组质粒 10 倍梯度稀释,取 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^9$ 拷贝/ μL , 9 个稀释度的重组质粒作为标准品模板。

2.3 BEV 荧光定量 PCR 方法的构建

2.3.1 荧光定量 PCR 反应体系及条件 反应体系: Green Permixon EX Taq II 10 μL , 上下游引物各 0.8 μL , ROX II 0.4 μL , 无核酸水 6 μL , 总体积共 20 μL 。同时设置不加质粒模板阴性对照。反应条件:95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s(95 °C 5 s, 60 °C 34 s)40 个循环。

2.3.2 标准曲线的建立 选用 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^9$ 拷贝/ μL 的 pMD18-T-BEV 重组质粒为模板进行 SYBR Green I Real-time PCR 扩增,利用软件 Quant Studios Design & Analysis Software 自动生成标准曲线及溶解曲线。

2.3.3 重复性检测 以 10 倍倍比稀释的 3 个梯度($3.2 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^5$ 拷贝/ μL)标准质粒 DNA 为模板,采用组间及组内平行实验,连续扩增 3 次,计算各组间及组内 Ct 误差,评估其可重复性。

2.3.4 特异性检测 以 BEV 质粒、BVDV、BKOV、BTOV、BNOV、BPIV3 基因组 cDNA 为模板,进行 SYBR Green I Real-time PCR,分析检测方法的特异

性,试验设无核酸水阴性对照。

2.3.5 灵敏度检测 将10倍倍比稀释的标准品质粒作为模板分别进行SYBR Green I Real-time PCR和普通PCR扩增,比较荧光定量检测方法和普通PCR检测的灵敏度,设空白对照。

2.4 临床样本检测 收集内蒙古自治区不同盟市牛腹泻粪便样品86份,采用上海生工生物技术有限公司的总RNA抽提试剂盒提取粪便样品总RNA并将其反转录为cDNA,对所得cDNA进行实时荧光定量PCR与常规PCR法对比分析。

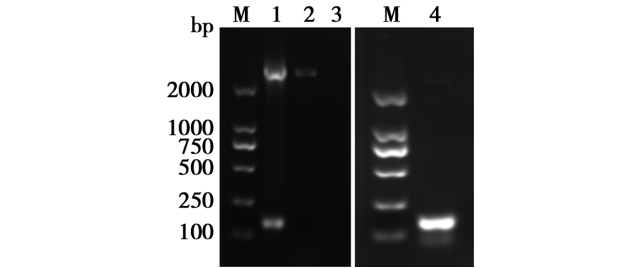
3 统计分析

利用IMB SPSS Statistics 22软件对数据进行分析,各组间的比较采用比较平均值,计量资料用($\bar{x} \pm s$)进行表示,计算变异系数(CV%)进行重复性验证,要求 $CV\% \leq 5\%$,通过 χ^2 检验和Kappa一致性分析对检测结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 标准质粒的制备

用BEV特异性引物对目标基因进行扩增,将该片段克隆到pMD18-T质粒上构建pMD18-T-BEV质粒,经双酶切鉴定,产物大小符合预期(图1)。测序结果显示,pMD18-T-BEV与BEV TL21G15病毒基因对应片段序列一致。



M DNA标志物(DL2000) 1 pMD18-T-BEV质粒PCR产物
2 pMD18-T-BEV双酶切产物 3 阴性对照 4 BEV PCR产物
图1 重组质粒pMD18-T-BEV酶切鉴定及目的基因PCR鉴定
M DL2000 DNA Marker 1 pMD18-T-BEV plasmid PCR product
2 pMD18-T-BEV double enzyme digestion product 3 Negative control 4 BEV PCR product

Fig. 1 Identification of pMD18-T-BEV and PCR amplification of target gene

2 实时荧光定量标准曲线的建立

用倍比稀释法对pMD18-T-BEV标准品质粒进行10倍稀释,选择 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^9$ 拷贝/ μL 进行荧光定量PCR扩增,软件自动生成标准曲线见(图2)。其斜率为-3.387,截距为43.797,相关系数为0.997。本研究所建立的荧光定量PCR检测方法扩增效率高,为97.354%。对照组未见非特异的扩增。

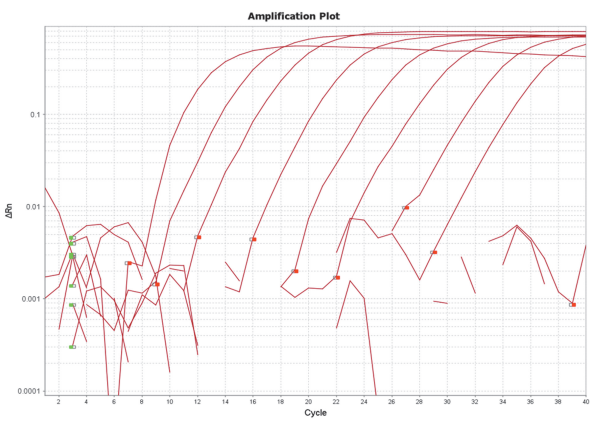


图2 BEV荧光定量PCR标准曲线
Fig. 2 Establishment of the standard curve with recombinant plasmid

3 重复性试验

重复性是对同一样品多次重复检测结果的一致性评估,变异系数(CV)越小,精确性越好。为验证本研究建立的荧光定量检测方法的重复性,以不同拷贝浓度的标准品质粒进行组间和组内重复试验,各组间的比较采用比较平均值,结果见表1和表2,组间变异系数在2.44%~3.16%之间,组内变异系数在0.33%~1.67%之间,表明该方法具有较好的重复性。

表1 荧光定量PCR检测BEV的组间统计
Table 1 Statistics of BEV detection by florescence quantitative real-time PCR between the groups

标准模板(拷贝/ μL) Positivetemplatecopies	不同批次3个重复的Ct值 Ctvalueof intraassay			平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)	变异系数 CV(%)
	1	2	3		
3.2×10^5	21.95	23.21	23.17	22.78 ± 0.71	3.13
3.2×10^4	25.17	26.72	26.44	26.11 ± 0.82	3.16
3.2×10^3	29.28	30.40	30.67	30.12 ± 0.73	2.44

表2 荧光定量PCR检测BEV的组内统计
Table 2 Statistics of BEV detection by florescence quantitative real-time PCR within the groups

标准模板(拷贝/ μL) Positivetemplatecopies	同一批次3个重复的Ct值 Ctvalueof intraassay			平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)	变异系数 CV(%)
	1	2	3		
3.2×10^5	21.95	23.23	21.84	21.87 ± 0.07	0.33
3.2×10^4	25.17	24.39	24.55	24.71 ± 0.41	1.67
3.2×10^3	29.28	28.73	28.77	29.93 ± 0.31	1.03

4 特异性试验

本研究用BEV、BVDV、BKOV、BTOV、BNOV和BPIV3等cDNA样品作为模板,对其特异性进行验证。结果如图3所示,在整个试验中,对照样本均未发生特异性扩增,说明该荧光定量PCR检测方法有较高的特异性。

5 溶解曲线

利用本研究建立的实时荧光定量PCR检测方法扩增标准品质粒,分析其溶解曲线。由图4可知,标准

品质粒的溶解温度均为 84.2℃ 左右,标准品质粒拷贝浓度呈正相关,标准品的拷贝浓度对溶解温度有明显的影响。

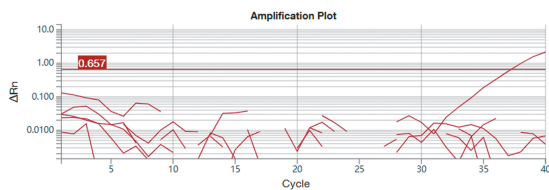


图 3 BEV 荧光定量 PCR 的特异性检测
Fig. 3 Specificity analysis of the SYBR Green I Real-time PCR

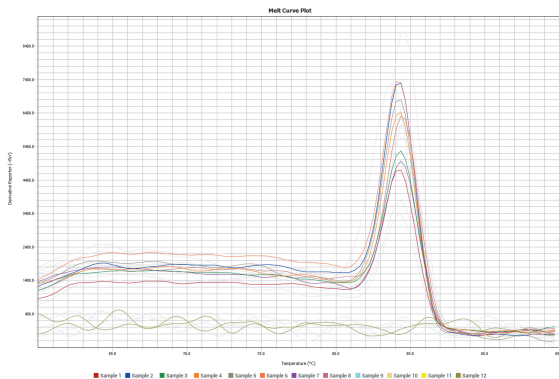
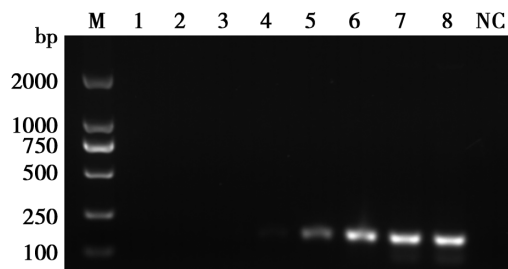


图 4 BEV 荧光定量 PCR 扩增产物溶解曲线
Fig. 4 Melting curve of the SYBR Green I Real-time PCR

6 敏感性试验

分别用 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^8$ 拷贝/ μL 标准品进行普通 PCR 和 SYBR Green I Real-time PCR 扩增,结果如图 5 和图 6 所示。普通 PCR 最低检出限为 3.2×10^4 拷贝/ μL ,SYBR Green I Real-time PCR 实时荧光定量 PCR 为 3.2×10^1 拷贝/ μL ,荧光定量 PCR 检测方法的灵敏度是普通 PCR 方法的 1 000 倍。



M DNA 标志物 DL2000 1~8 模板量分别为 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^8$ 拷贝/ μL NC 阴性对照

图 5 普通 PCR 检测 BEV 的敏感性

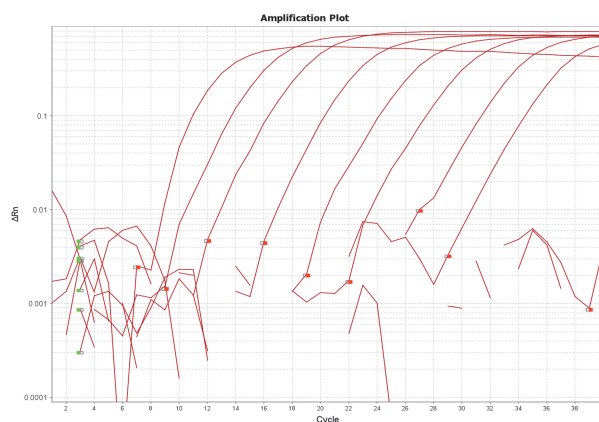
M DL2000 DNA Marker The template amount is respectively $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^8$ copies/ μL NC Negative control

Fig. 5 Sensitivity analysis of the traditional PCR

7 临床样品检测

对采自内蒙古自治区 9 个盟市的 86 份牛粪便样品通过 SYBR Green I Real-time PCR 方法进行 BEV 检测,其中阳性样品 23 份,阳性率为 26.74%;普

通 PCR 方法检出阳性样品 4 份,阳性率为 4.56%,结果见表 3。



1~8 $3.2 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^8$ 拷贝/ μL

图 6 实时荧光定量 PCR 检测 BEV 的敏感性

Fig. 6 Sensitivity analysis of the SYBR Green I Real-time PCR

表 3 SYBR Green I Real-time PCR 和 PCR 数据对比
Table 3 SYBR Green I Comparison of Real-time PCR and PCR data

盟市	检测样品数	SYBR Green I Real-time PCR 检测阳性样品数	SYBR Green I Real-time PCR 检测阳性率(%)	普通 PCR 检测阳性样品数	普通 PCR 检测阳性率(%)
阿拉善	10	5	50(5/10)	1	10(1/10)
赤峰	10	1	10(1/10)	1	10(1/10)
锡林郭勒	10	5	50(5/10)	0	0
巴彦淖尔	10	2	20(2/10)	0	0
呼伦贝尔	10	3	30(3/10)	0	0
乌兰察布	6	3	50(5/10)	0	0
包头	10	2	20(2/10)	0	0
兴安盟	10	0	0	0	0
通辽	10	2	20(2/10)	2	20(2/10)
合计 Total	86	23	26.74	4	4.56

8 实时荧光定量 PCR 检测方法的临床验证

将两种方法的检测出的 86 份临床样品结果用四格表 χ^2 检验(表 4)和 Kappa 一致性检验统计分析 2 种检测方法的检测($\chi^2 = 11.491, P = 0.01$),表示检测结果的差异具有统计学意义;Kappa 一致性检验 $P = 0.001$,Kappa 值为 0.236,说明两者一致性一般。86 份样品中有 19 份检测结果不一致,存在病毒含量过低而无法检出的情况,采用 SYBR Green I Real-time PCR 检测方法可以提高低浓度样本的检出率。结果表明 SYBR Green I Real-time PCR 检测 BEV 方法与普通 PCR 相比较,前者更敏感。

表 4 实时荧光定量 PCR 检测方法的临床验证
Table 4 Clinical validation of SYBR Green I Real-time PCR

SYBR Green I Real-time PCR 检测方法	普通 PCR 检测		合计
	阳性	阴性	
阳性	4	19	23
阴性	0	63	63
合计 Total	4	82	86

讨 论

BEV 感染由 Moll 等^[10]于 20 世纪 50 年代后期首次报道,此后,该病陆续在多个国家被报道^[11-13]。直到 2011 年,我国李英利等才首次报道并从内蒙古自治区某奶牛场病牛样品中分离到 BEV 毒株^[14]。随后,在吉林^[15]、北京^[16]、天津^[17]、山东^[18]、宁夏^[19]、青海^[20]、河南^[21]、河北^[22]、新疆^[21]、广西^[23]、四川^[24]、辽宁^[25]等地的牛场样品中检测到了该病毒,表明 BEV 已在我国大范围流行。

通过 RT-PCR 检测进行的 BEV 流行病学调查发现,广西河池地区 BEV 检出率为 3.23%~19.51%,且与 BCov 存在共感染现象,共感染率为 2.44%~4.44%^[26]。四川攀西地区 BEV 感染率为 13.98%^[24]。青海省海北州出现腹泻症状的牦牛粪便样品中 BEV 阳性率高达 43.65%,而健康牦牛粪便样品中的 BEV 的阳性率为 12.11%^[20]。BEV 可通过粪、口途径传播,发病牛和无症状病毒携带者是主要的传染源^[27],该病毒对我国养牛业的绿色健康发展构成了一定的威胁。内蒙古自治区作为我国畜牧业大省,牛群中 BEV 的流行现状尚不清楚。

本研究建立了一种 BEV SYBR-Green I Real-time PCR 检测方法。该方法具有较好的重复性,其组间变异系数为 2.44%~3.16%。组内变异系数为 0.33%~1.67%。具有较好的敏感性,敏感度为 3.2×10^1 拷贝/ μ L 显著优于普通 PCR 检测方法。该方法还具有很好的特异性与 BVDV、BKOV、BTOV、BNOV、BPIV3 等病毒基因均无交叉反应。采用统计学的方法对 SYBR Green I Real-time PCR 检测与普通 PCR 检测方法的检测结果进行比较,卡方检验 $P=0.01$,Kappa 值为 0.236,进一步说明 SYBR-Green I Real-time PCR 检测方法更为敏感。

利用本研究建立的荧光定量检测方法对随机采自内蒙古自治区 9 个盟市的 86 份腹泻牛粪便样品进行检测,除兴安盟外,其它 8 个盟市的牛腹泻样品中均能检测到 BEV。此外,采自阿拉善盟、锡林郭勒盟和乌兰察布盟的牛腹泻样品中,BEV 阳性率高达 50.00%。表明目前内蒙古自治区 BEV 感染范围较广,部分地区流行率较高,需引起足够重视。

【参考文献】

- [1] 董坤,胡俊英,张芷源,等. 吉林省牛病毒性腹泻病毒与牛肠道病毒混合感染的流行病学调查[J]. 中国兽医学报,2022,42(6):1143-1148.
- [2] 李英利,常继涛,于力. 牛肠道病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2011,33(5):388-390.
- [3] 常晓冉,林倩,钱明珠,等. 河南省牛肠道病毒的遗传变异分析[J]. 中国兽医学报,2022,42(10):1982-1987,2000.
- [4] McCarthy FM,Smith GA,Mattick JS. Molecular characterisation

- of Australian bovine enteroviruses[J]. Vet Microbiol,1999,68(1-2):71-81.
- [5] Zhang H,Liu H,Bao J,et al. Characterization of an Enterovirus species E isolated from naturally infected bovine in China[J]. Virus Res,2014,191:101-107.
- [6] Shaukat S,Angez M,Alam MM,et al. Molecular identification and characterization of a new type of bovine enterovirus[J]. Appl Environ Microbiol,2012,78(12):4497-4500.
- [7] Putnak J R,Phillips B A. Picornaviral structure and assembly[J]. Microbiol Rev,1981,45(2):287-315.
- [8] Smyth M,Tate J,Hoey E,et al. Implications for viral uncoating from the structure of bovine enterovirus[J]. Nat Struct Biol,1995,2(3):224-231.
- [9] Ji C,Zhang Y,Sun R,et al. Isolation and identification of two clinical strains of the novel genotype enterovirus E5 in China[J]. Microbiol Spectr,2022,10(3):e02662-21.
- [10] Moll T,Davis AD. Isolation and characterization of cytopathogenic entero viruses from cattle with respiratory disease[J]. Am J Vet Res,1959,20:27-32.
- [11] Carthew P,Martin SJ. The iodination of bovine enterovirus particles[J]. J Gen Virol,1974,24(3):525-534.
- [12] Dunne HW,Huang CM,Lin WJ. Bovine enteroviruses in the calf: an attempt at serologic, biologic, and pathologic classification[J]. JAm Vet Med Assoc,1974,164(3):290-294.
- [13] Nollens HH,Rivera R,Palacios G,et al. New recognition of Enterovirus infections in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus)[J]. Vet Microbiol,2009,139(1-2):170-175.
- [14] Li Y,Chang J,Wang Q,et al. Isolation of two Chinese bovine enteroviruses and sequence analysis of their complete genomes [J]. Arch Virol,2012,157(12):2369-2375.
- [15] Zhu L,Xing Z,Gai X,et al. Identification of a novel enterovirus E isolates HY12 from cattle with severe respiratory and enteric diseases[J]. PloS One,2014,9(5):e97730.
- [16] 彭小微,董浩,吴丹,等. 牛肠道病毒 2 型的分离与鉴定[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(5):823-828.
- [17] 朱彤,赵贵民,沈付尧,等. 牛肠道病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 病毒学报,2015,31(5):488-493.
- [18] 李欣,胡俊英,林倩,等. 山东省某地区牛、羊肠道病毒感染的流行病学调查[J]. 中国兽医学报,2019,39(2):223-227.
- [19] 林倩,胡俊英,李卓宸,等. 宁夏地区牛场 E 种肠道病毒的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医,2019,51(11):123-127.
- [20] 宋维彪,马存寿,郭俊梅,等. 青海省海北州 2016-2017 年牦牛感染牛病毒性腹泻病毒、牛肠道病毒的病原学调查与分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2019,43(2):88-90.
- [21] 钱明珠,胡俊英,林倩,等. 河南省牛肠道病毒感染的流行病学调查与分析[J]. 中国兽医学报,2021,41(10):1937-1941.
- [22] Ji C,Zhang Y,Sun R,et al. Isolation and identification of type F bovine enterovirus from clinical cattle with diarrhoea [J]. Viruses,2021,13(11):2217.
- [23] Luo Y,Liu H,Zou Y,et al. Molecular epidemiology of bovine enteroviruses and genome characterization of two novel bovine enterovirus strains in Guangxi, China[J]. Microbiol Spectr,2023,11(2):e03785-22.
- [24] 杨佳欣,张涛,淦雨洁,等. 攀西地区牛肠道病毒遗传变异分析[J]. 中国动物传染病学报,2022,30(4):130-134.
- [25] 姜久华. 牛病毒性腹泻病毒、牛肠道病毒的流行病学调查分析——以辽宁铁岭地区为例[J]. 中国乳业,2023(7):10-13.
- [26] 罗宇航,刘黄豪,李德政,等. 广西河池地区牛肠道病毒和牛冠状病毒流行病学调查及遗传变异分析[J]. 中国兽医杂志,2023,59(7):32-39.
- [27] Blas-Machado U,Saliki J T,Sanchez S,et al. Pathogenesis of a bovine enterovirus-1 isolate in experimentally infected calves [J]. Vet Pathol,2011,48(6):1075-1084.

【收稿日期】 2024-05-21 【修回日期】 2024-08-17