

全文检测报告

基本信息

报告编号: 20230627126139574A2D1B9D60

文档名称: 奶牛腹泻主要病原微生物的多重PCR检测方法的建立与应用
文档作者: 刘博文
提交方式: 上传文档检测
提交时间: 2023年06月27日
正文字符数: 10807
检测范围: 大雅全文库

总体结论

文献相似度: 23.61%
文献原创度: 76.39%
去除参考文献相似度: 23.61%
单篇最大相似度: 3.49%
去除本人已发表论文相似度: 23.61%
单篇最大重复数: 387
重复字符数: 2551
最相似文献题名: 国家级大学生创新创业训练计划工作手册

相似片段分布



典型相似文献

相似图书

序号	题名	作者	出处	相似度
1	国家级大学生创新创业训练计划工作手册	国家级大学生创新创业训练计划专家工作组	南京: 东南大学出版社, 2013.06	3.49%
2	大学生创新创业指导	牟顺海;王海军;马秋林;姜友维;刘进;张建设	北京: 现代教育出版社, 2014.12	1.22%
3	现代动物病毒学	扈荣良	北京: 中国农业出版社, 2014.12	0.97%
4	免疫学基础与病原生物学 新世纪第4版	袁嘉丽;刘永琦	北京: 中国中医药出版社, 2016.08	0.86%
5	医学免疫学与病原生物学	邱全瑛;关洪全	北京: 科学出版社, 2005.01	0.86%
6	大学生创新创业基础	罗晓彤;汤咏梅;刘志东;赵齐阳	成都: 四川科学技术出版社, 2018.06	0.75%
7	营养与食品卫生学 第4版	陈炳卿	北京: 人民卫生出版社, 1981.07	0.69%
8	微生物学与免疫学 供中药学、药学类专业用 新世纪第3版	袁嘉丽	北京: 中国中医药出版社, 2017.07	0.69%
9	营养与食品卫生学	吴坤;王玉;包大跃;刘烈刚	北京: 人民卫生出版社, 1981.07	0.69%
10	肺部细菌感染临床与影像解析	张嵩	北京: 科学出版社, 2019.08	0.68%
11	微生物学检验	胡生梅;陈应国	南京: 江苏科学技术出版社, 2015.07	0.68%

12	临床医学丛书 妇产科与儿科学分册	《临床医学丛书》 编委会	北京：中医古籍出版社，2009.06	0.68%
13	妇儿分册	《当代临床医学丛 书》编委会	北京：中医古籍出版社，2008.12	0.68%
14	临床微生物学检验技术	刘运德;楼永良;王辉 ;孙自镛;吴爱武;王辉 ;张晓延;王明永;陈茶 ;王海河	北京：人民卫生出版社，2015.03	0.67%
15	医师考核培训规范教程 检验科分册	沈立松;上海市医师 协会组	上海：上海科学技术出版社，2018.08	0.67%
16	2011'全国海水养殖学术研讨会论文摘要 集		上海水产学会海水养殖分会，2011.11	0.62%
17	临床微生物学检验实验	付玉荣;张文玲;刘永 华;唐玲;张玉妥;李继 红;王欣;付玉荣;吕厚 东	武汉：华中科技大学出版社，2013.08	0.53%
18	食源性寄生虫病及其防治措施	邓明俊;鱼艳荣;肖西 志	中国质检出版社；中国标准出版社，2014.04	0.48%
19	传染病诊断流程与治疗策略	黄祖瑚;李军;周东辉	北京：科学出版社，2008.02	0.42%
20	生命科学与工程概论	高晓蓉;李文利	北京：化学工业出版社，2007.03	0.37%
21	传染病防治技术临床培训教案	赵敏;王传礼;李进	北京：军事医学科学出版社，2014.04	0.34%
22	甜高粱苗期对苏打盐碱胁迫的适应性机 制	戴凌燕	北京：科学出版社，2017.05	0.33%
23	银杏资源优化配置及高效利用	中国林学会银杏分 会;山东黄河河务局 组	北京：中国农业出版社，2007.07	0.27%
24	动物细胞病理学	邓普辉	北京：中国农业出版社，1997.05	0.24%
25	2011年中国水产学会学术年会论文选集	中国水产学会	北京：海洋出版社，2012.11	0.24%
26	特禽饲养与疾病防治	张振兴	北京：中国农业出版社，2001.05	0.23%
27	农村养牛实用新技术	李培合	北京：中国农业出版社，2002.12	0.22%
28	动物基因工程疫苗原理与方法	童光志;王云峰	北京：化学工业出版社，2009.05	0.21%
29	2018-2019年兽医学学科发展报告	中国畜牧兽医学	北京：中国科学技术出版社，2020.03	0.21%
30	2016临床执业医师（含助理）资格考试 辅导讲义 配增值	程少贵	北京：人民卫生出版社，2015.11	0.21%
31	动物疫病分子诊断技术	邓宇;何学谦;徐睿;李 凤琴;王雪梅参	成都：四川大学出版社，2014.04	0.18%
32	中医养生学导论	马烈光;樊旭	北京：中国中医药出版社，2020.01	0.18%

相似期刊

序号	题名	作者	出处	相似度
1	犬隐孢子虫病研究进展	石凯;邓俊良;陈兆国 ;米荣升;黄燕;周鹏	动物医学进展，2013，第8期	1.15%
2	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	师志海;徐照学;兰亚 莉;张彬;孟红丽;王亚 州;金磊;王文佳	中国兽医学报，2020，第10期	0.89%
3	隐孢子虫和蓝氏贾第鞭毛虫分子流行病 学研究进展	徐宁;尹建海;沈玉娟 ;刘华;曹建平	中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2018，第6期	0.78%
4	哺乳期腹泻犊牛粪便中病原流行状况调 查	王旭;李诗晴;张鑫;曹 杰;马翀	中国奶牛，2021，第11期	0.73%
5	2020 年黑河市某规模化牛场BAstV 检测 及ORF1a 基因遗传变异分析	杨硕;朱庆贺;王笑冉 ;孙东波	黑龙江八一农垦大学学报，2022，第2期	0.69%
6	1989——2011年中国九省成年居民乳类 消费变化特征	汪云;贾小芳;杜文雯 ;王志宏;王惠君;张兵	卫生研究，2017，第3期	0.68%

7	1株EPEC:O44:K74 (L) 致泻性大肠埃希菌检出情况	胡海燕;许照美;张娅楠;崔清荣;庞天兰;沈伟伟	中国卫生检验杂志, 2021, 第5期	0.68%
8	牛诺如病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用	师志海;王文佳;兰亚莉;张彬;孟红丽;王亚州;滑留帅;徐照学	畜牧兽医学报, 2020, 第7期	0.66%
9	广西地区水牛群牛星状病毒分子流行病学调查	李名洋;方庆励;黄伟坚	中国畜牧兽医, 2020, 第9期	0.63%
10	奶牛牛病毒性腹泻病毒与冠状病毒混合感染的PCR诊断	高亚桃;张明勇;李林;武二斌;马亚宾;常丽云;关一凡;秦建华;赵月兰	畜牧与兽医, 2019, 第12期	0.58%
11	猪嗜病毒RT-PCR检测方法的建立及应用	张文波;冷闯;段俊;邓舜洲	中国畜牧兽医, 2013, 第1期	0.51%
12	多重PCR技术及其在病原体检测中的应用	侯瑞生;王丽;张勤;李丽;张蕾;薛云红;王凯娟	中华全科医学, 2011, 第8期	0.51%
13	牛冠状病毒RT-LAMP检测方法的建立	韩廷义;汪生贵	动物医学进展, 2013, 第5期	0.43%
14	陕西省犊牛安氏隐孢子虫多位点序列分型研究	任冠静;王雪婷;张会军;宋军科;赵光辉	畜牧兽医学报, 2017, 第10期	0.43%
15	隐孢子虫病及其在牦牛中的流行现状	韩梦妮;马丽;周璐露;任玫;王丹;林青	动物医学进展, 2020, 第1期	0.41%
16	产肠毒素大肠杆菌研究进展和面临挑战	陈盼霖;周明旭;朱国强	中国预防兽医学报, 2015, 第10期	0.41%
17	双创背景下大学生创新创业项目指导实践①	戴永辉;冯彦杰;徐波	中国商论, 2019, 第24期	0.4%
18	河北省致犊牛腹泻主要病原多重PCR检测方法的建立	高亚桃;李妍;刘立元;王猛;郭姚蕊;刘胜丽;马亚宾;蒋桂娥;刘志勇;秦建华;赵月兰	中国兽医学报, 2021, 第10期	0.39%
19	和田羊FGF5基因的鉴定及特征分析	郝科兴;王帅;凌芳;王静;胡广东	畜牧与兽医, 2019, 第11期	0.36%
20	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	王文佳;徐照学;兰亚莉;师志海	中国兽医学报, 2020, 第7期	0.35%
21	牛冠状病毒SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测方法的建立及初步应用	沈付尧;杨建乐;赵贵民;朱彤;程凯慧;王洪梅;何洪彬	中国兽医杂志, 2016, 第6期	0.32%
22	沙门氏菌检测方法研究进展	赵春阳;江强世;刘畅;张文劲;陈颖钰;郭爱珍;胡长敏	中国奶牛, 2018, 第10期	0.32%
23	蓝氏贾第鞭毛虫和微小隐孢子虫双重荧光定量PCR两步法检测技术的建立	李佳;黄达娜;张晓敏;牛丛;万成松;张仁利	中国人兽共患病学报, 2020, 第1期	0.32%
24	冬季蛋鸡饲料调整方案	董焕竹	养禽与禽病防治, 2016, 第7期	0.31%
25	犊牛腹泻病原实验室诊断研究进展	尹德琦;何润霞;龙淼	畜牧与饲料科学, 2015, 第1期	0.3%
26	氯化铵对紫色红曲霉固态发酵红曲色素和桔霉素合成的双向调控作用	周文斌;黄梓芮;洪家丽;李路;郭伟灵;蒋雅君;刘斌;倪莉;饶平凡;陈劲星;吕旭聪	中国食品学报, 2019, 第6期	0.27%
27	鸡线粒体ND1基因变异异质性及其与性状的关联分析	徐媛媛;侯玲灵;姬杰菲;王焕杰;李思露;陈文;康相涛;黄艳群	中国农业科学, 2019, 第16期	0.26%
28	牦牛犊牛腹泻的预防与治疗	卓玛措	畜牧业环境, 2021, 第9期	0.25%
29	腹泻病原体检测技术研究进展	王健;王鑫淼;李青凤;年庆功	国际检验医学杂志, 2018, 第9期	0.25%
30	湖州市非细菌性急性胃肠炎暴发中诺如病毒的分子生物学特点初步研究	纪蕾;吴晓芳;徐德顺;龚黎明	病毒学报, 2011, 第5期	0.24%
31	陕北黑山羊隐孢子虫种类鉴定及遗传进	宋军科;赵光辉;彭先	中国兽医学报, 2017, 第4期	0.23%



	化分析	启;王雪婷;胡雄峰;于三科;林青;张彦明		
32	多重PCR技术在实验动物病原检测中的应用	张飞燕;赵玲;金洁;王芸;吕龙宝	中国比较医学杂志, 2018, 第10期	0.23%
33	隐孢子虫病原分类研究进展	杨建伟;李国清	热带医学杂志, 2008, 第7期	0.23%
34	112例小儿难治性支原体肺炎的药物治疗评价	王清;陈书忠;冯绪强;吕佳	中国实用医刊, 2014, 第6期	0.23%
35	PCV-2、PPV和PRV多重PCR检测方法的建立及初步应用	陈光达;许信刚;童德文	西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 第11期	0.23%
36	猪伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的多重PCR鉴别	姜子义;李碧;蔡瑶;颜久淇;龚双燕;樊毅;黄剑波;朱玲;徐志文	江苏农业学报, 2018, 第6期	0.23%
37	乳铁蛋白在犊牛生产中的应用及其生物信息学分析	张蓉;刁其玉	乳业科学与技术, 2007, 第1期	0.22%
38	家禽安卡拉病研究进展	刘畅;图门巴雅尔;路振香;宁康健;姜锦鹏;李磊	畜牧与饲料科学, 2019, 第8期	0.22%
39	规模化奶牛场犊牛腹泻产气荚膜梭菌的分离与鉴定	秦玉明;李伟杰;许冠龙;沈青春;杜吉革;谢士杰;孙石静;丁家波;范学政;董浩	中国兽医杂志, 2021, 第5期	0.22%
40	生鲜牛乳中产肠毒素大肠埃希菌环介导等温扩增技术的建立与应用	林芳明;蔡其刚;张红见;赵静	动物医学进展, 2019, 第2期	0.21%
41	三重PCR检测黄瓜靶斑病菌、炭疽病菌和细菌性角斑病菌	高士刚;曾蓉;徐丽慧;罗金燕;陈磊;戴富明	中国农业科学, 2016, 第16期	0.21%
42	结核分枝杆菌mpt64基因突变研究	毛欣茹;张诗蒙;尹小毛	实验与检验医学, 2016, 第2期	0.2%
43	3种藻类植物对矿石磷转化利用程度的研究	卿人韦;唐东山;傅华龙	四川大学学报(自然科学版), 2002, 第1期	0.2%
44	猪呼吸道疾病综合征的诊疗及防治方案	陈平;董俊	甘肃畜牧兽医, 2020, 第6期	0.16%

相似报纸

序号	题名	作者	出处	相似度
1	新迎中学 校园文化彰显特色		昆明日报, 2017.04.19	0.14%

相似网络文档

序号	题名	作者	相似度
1	河北部分地区四种肉犊牛腹泻病原调查及BVDV抗体检测方法建立	刘勃兴	1.38%
2	新疆部分地区新生犊牛微小隐孢子虫流行病学调查	张宽宽	1.27%
3	福建省规模化猪场四种肠道原虫分子流行病学调查和人兽共患风险分析	张宁	1.13%
4	陕西省奶牛肠道寄生虫种类及安氏隐孢子虫基因分型研究	任万欣	1.13%
5	奶牛安氏隐孢子虫巢氏PCR检测方法建立及华中地区初步应用	刘洋	1.11%
6	秦岭部分珍稀动物蓝氏贾第虫、隐孢子虫和毕氏肠微孢子虫种群结构研究	杜帅之	0.96%
7	东北地区宠物猫肠道病毒组学分析及腹泻相关病毒的分子检测与进化研究	伊淑帅	0.63%
8	郑州地区人源隐孢子虫分离株种类基因型基因亚型研究	朱惠丽	0.62%
9	蜜蜂免移虫技术研究与应	张波	0.59%
10	浙江省教育厅办公室关于报送2016年国家级大学生创新创业训练计划立项项目的通知		0.58%
11	粪便中隐孢子虫卵囊FTAPCR检测方法的建立及初步应用	龚运娅	0.57%



12	牛冠状病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用	沈付饶	0.51%
13	基因芯片技术检测性传播泌尿生殖道感染常见病原体的研究	吴黎明	0.51%
14	遵循科学发展		0.48%
15	裂谷热病毒核酸和抗体检测研究	韩秋雪	0.47%
16	2015-2016年中国猪流行性腹泻病毒S1基因分子流行病学调查及病毒分离与鉴定	王恩雨	0.46%
17	新现和再现猪主要肠道腹泻病毒及腹泻猪肠道微生物群落宏基因组学研究	宋德平	0.44%
18	微小隐孢子虫感染HCT-8细胞的lncRNAs筛选及其对隐孢子虫增殖的影响	刘婷丽	0.42%
19	2015?2018年中国部分地区猫冠状病毒检测及S基因遗传进化分析	刘秋瑾	0.39%
20	BVDV RT-LAMP检测方法的建立及BRV和BVDV二联灭活疫苗的初步研制	王腾	0.38%
21	四川省教育厅关于申报2009年度思想政治教育研究课题的通知		0.36%
22	单增李斯特菌表面蛋白基因lmo0159、lmo0160缺失株的构建及部分生物学特性研究	张奇文	0.36%
23	微小隐孢子虫感染小鼠肠道细胞因子和抗菌肽表达	黄清花	0.35%
24	学校即将启动2008年大学生创新性实验计划项目的申报		0.33%
25	奶牛冠状病毒的分子检测、基因组特征及ELISA试剂盒的研制	阿比克哈莫	0.33%
26	南京中医药大学		0.32%
27	中国学位与研究生教育学会		0.29%
28	多重PCR方法快速检测临床常见病原菌方法的建立与应用	胡翀	0.28%
29	Irisin在溃疡性结肠炎小鼠中的作用及其可能的治疗机制	皇甫鹿辛	0.25%
30	2019年广西部分地区水牛星状病毒检测及其序列分析	李名洋	0.24%
31	隐孢子虫通过microRNA-MAPK信号通路调控细胞自噬的机制	蒋衡	0.23%
32	浙江师范大学体育与健康科学学院学生科研项目		0.23%
33	猪圆环病毒Ⅱ型(PCV2)噬菌体免疫纳米抗体库构建及抗Cap纳米抗体的筛选	刘丹丹	0.23%
34	犊牛细菌性腹泻快速诊断方法的建立与流行病学研究	马广强	0.23%
35	某些啮齿目动物肠道寄生虫感染情况调查及隐孢子虫遗传特征分析	吕超超	0.23%
36	外源性胆汁酸缓解肉鸡热应激作用的研究	尹畅	0.23%
37	兔支气管败血波氏杆菌fimN基因的克隆表达及快速检测方法的建立	章春桃	0.22%
38	奶牛BVDV、Pm与Kp多重PCR检测方法的建立	王紫燕	0.22%
39	猪病毒性腹泻病原相关蛋白在植物系统中的表达	唐玉营	0.22%
40	河南省部分地区家兔隐孢子虫病流行病学调查及兔源隐孢子虫遗传特征研究	史柯	0.21%
41	GhERF108调控棉纤维细胞次生壁发育的机制研究	何绍萍	0.2%
42	TIGAR对脂代谢的调控及机制	王明明	0.2%
43	河南某规模化猪场猪伪狂犬病的诊断与净化试验	李春禄	0.2%

全文对比

* MERGEFORMAT d

黑龙江八一农垦大学大学生创新训练项目计划申请书

项目编号

项目名称奶牛腹泻主要病原的多重PCR



检测方法的建立与应用

项目负责人刘博文联系电话15046109674

所在学院动物科技学院

学号20215032412专业班级动物医学

指导教师

E-mail

申请日期2023年6月18日

项目期限一年期

黑龙江八一农垦大学 教务处

填写说明

本申请书所列各项内容均须实事求是，认真填写，表达明确严谨，简明扼要。

申请人可以是个人，也可为创新团队，首页只填负责人。“项目编号”一栏不填。

本申请书为大16开本（A4），左侧装订成册。可网上下载、自行复印或加页，但格式、内容、大小均须与原件一致。

负责人所在学院认真审核，经初评和答辩，签署意见后，将申请书（一式两份）报送项目管理办公室。

一、基本情况

项目名称奶牛腹泻主要病原的多重PCR检测方法的建立与应用

所属学科一级门：农学。学科二级类：动物医学类

项目来源 A、学生自主选题，来源于自己对课题的长期积累与兴趣

(B、学生来源于教师科研项目选题

C、学生承担社会、企业委托项目选题

D、拔尖专项

E、竞赛专项

F、研修专项

G、其他

申请金额5000.00 元 项目期限一年期 拟申报项目级别省级

负责人刘博文 性别男 民族汉族 出生年月2003年5月

学号20215032412 联系电话手机：15046109674

指导教师

联系电话手机：15846164036

项目简介奶牛腹泻是养殖业中常见的一种世界性疾病，对牛养殖业危害较大。多种因素可导致犊牛腹泻，其中由细菌、病毒、寄生虫导致的



腹泻具有较强传染性。传染性腹泻发病迅速，犊牛极易引起死亡，常为混合感染，因此快速诊断对于及早确认病因，及时进行针对性治疗，降低死亡率至关重要。本研究对常见腹泻相关病原牛轮状病毒、牛星状病毒、牛冠状病毒、大肠埃希氏菌、鞭毛虫、隐孢子虫6种病原，建立多重PCR检测方法，可快速确证腹泻病原。

负责人曾经参与科研的情况

指导教师承担科研课题情况

指导教师对本项目的支持情况

项目组主要成员姓名学号学院专业班级联系电话项目分工

刘博文 20215032412 动物科技学院 动物医学 15046109674 项目的总体分工与实施

杨文静 20215032441 动物科技学院 动物医学 18139592028 单重PCR的设计与优化

张红洋 20215032532 动物科技学院 动物医学 15636360815 单重PCR的设计与优化

程达 20215032502 动物科技学院 动物医学 15546402346 多重PCR的优化

指导教师姓名工号学院部门职称联系电话电子邮件

二、立项依据（可加页）

（1）研究目的

养牛业是畜牧业的重要组成部分，奶牛腹泻是制约奶牛和肉牛产业安全的重要因素。腹泻是一种症状或症候群，并不是一种单一的疾病。黑龙江地区冬季寒冷漫长，犊牛极易发生消化道传染病，犊牛腹泻发病率和死亡率长期居高不下，平均发病率约为50%，患病个体死亡率可达30%以上。由犊牛腹泻导致的犊牛死亡是直接造成奶牛和肉牛牛源不足的主要因素，从根本上制约了牛奶和牛肉产能增长，影响我国牛奶牛肉安全供给。造成腹泻的原因非常复杂，包括传染性因素以及非传染性因素。而病原微生物感染如病毒、细菌和寄生虫感染是牛腹泻病发生的原发性因素。在过去几十年中，全世界范围内研究者已经针对牛腹泻病病原微生物开展了大量研究，已经揭示几十种与牛腹泻病发生相关的病原微生物，其中，包括细菌性腹泻（大肠杆菌、产气荚膜梭菌等）、病毒性腹泻（冠状病毒、轮状病毒、星状病毒等）和寄生虫腹泻（鞭毛虫、隐孢子虫等）。因此，对于常发生混合感染、症状相似的奶牛腹泻，建立一种针对奶牛腹泻主要病原的多重PCR方法，快速检测出病原体的类别，为快速弄清腹泻病因，准确做出诊断，及时治疗，尤为重要。本研究针对BRVA、BAstV、BCoV、E.coli、鞭毛虫、隐孢子虫进行多重PCR建立，快速检测多种病原的特异性扩增，使微生物诊断变得更加快捷便捷。为奶牛腹泻病的诊断，治疗，预防提供更快速，便捷的方法。

（2）研究内容

1.病料采集及引物设计：

采集腹泻牛粪便，将采集的牛粪便样品在无菌磷酸缓冲溶液（PBS）中以5:1稀释充分，涡旋振荡10 min制成匀浆，4℃ 6000×g离心20 min，取上清保存于-80℃。

根据BRVA、BAstV、BCoV、E.coli、鞭毛虫、隐孢子虫的序列，设计六对特异性引物，引物序列如下：

病毒

引物名称

引物序列（5' - 3'）

长度（bp）

BRV

842-F

842-R



CCACCAGGTATGAATTGGAC

CGCCATCTGAGTGATTACTC

BAstV

376-F

376-R

GCACGTTTCGTCCTCGATGT

ATACGTTTGGCCTCGCTCACA

BCoV

230-F

230-R

CGAGTTGAACACCCAGAT

GAGACGGGCATCTACT

E.coli

498-F

498-R

CGCGGATCCAATACAGGTACTATTAAC

CCGCTCGAGTTACATATAAGTGACT

G. lamblia

156-F

156-R

ACTCCAACGGGACCATTGTC

AGCACTCCCAAGGCTTCTTG

Cryptosporidium

1325-F

1325-R

TTCTAGAGCTAATACATGCG

CCCATTTCCTTCGAAACAGGA

2.核酸提取:

用RNA提取试剂盒对BRV、BAstV、BCoV进行RNA提取, 用DNA试剂盒对E.coli、鞭毛虫、隐孢子虫进行DNA提取。使用反转录试剂盒对BRV、BAstV、BCoV的RNA进行反转录。反转录产物置于-20℃保存备用。



3.单重PCR扩增方法建立:

将BRVA、BAstV、BCoV、E.coli、鞭毛虫、隐孢子虫的基因进行单重PCR扩增,用2%琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳分析,将阳性PCR产物用DNA纯化回收试剂盒进行纯化回收。将分装好的上下游引物、部分回收产物送到生物公司进行测序;另外部分回收产物进行连接和连接产物的转化,最后进行菌液PCR测定和阳性质粒浓度测定。经过单重PCR退火温度优化,单重PCR引物浓度优化后,进行特异性验证和敏感性验证。

4.多重PCR扩增方法建立与评价检测:

先建立BRV与BAstV双重PCR方法,确定双重PCR反应中BRV与BAstV模板比例,优化双重PCR反应引物浓度,根据琼脂糖凝胶电泳结果,最终确定双重PCR反应引物的最佳比例组合。接着在此基础上进行三重PCR方法建立,优化三重PCR反应中BCoV的引物浓度。在保持BRV与BAstV双重PCR已优化条件及确定了三重PCR反应中BCoV模板量的情况下,设定多个BCoV引物的添加量,根据琼脂糖凝胶电泳结果,最终确定三重PCR反应中BRV和BAstV共用引物的最佳浓度。接着依次添加一种病原进行四重、五重、六重PCR扩增方法建立。

特异性验证:利用上述已经建立并优化好的多重PCR检测方法对单一模板、双重模板、三重模板至多重模板进行PCR检测,并同时设置其他牛常见病毒进行PCR检测作为阴性对照,PCR扩增反应完成后,将扩增产物进行凝胶电泳检测。用以评价该多重PCR检测方法的特异性。

敏感度验证:用Nanodrop 2000蛋白核酸测定仪检测已制备完成的六种阳性标准品浓度,并将初始浓度统一调制 3×10^6 copies μ L,等体积比混合后,用去离子双蒸水对六种模板分别采用倍率梯度法进行稀释(稀释倍数:101、102、103、104、105、106),然后用PCR技术对不同浓度的BRV、BAstV、BCoV、E.coli、鞭毛虫、隐孢子虫序列进行DNA模板检测。由此来评估其灵敏度。

5.应用:

利用多重PCR技术对采集腹泻病料进行病原检测,确证检测方法。

(3) 国、内外研究现状和发展动态

牛腹泻尤其是犊牛腹泻是一种非常重要的牛病,也是造成牛养殖户经济损失的主要原因之一。最近的研究显示,病原微生物感染是牛腹泻病发生的原发性因素。在过去几十年中,全世界范围内研究者已经针对牛腹泻病病原微生物开展了大量研究,已经揭示几十种与牛腹泻病发生相关的病原微生物,大肠杆菌(escherichia coli, E coli)被认为是20世纪前几十年引起传染性腹泻疾病的主要原因。1970年,从内布拉斯加州牧场的腹泻疾病病例中分离出两种病毒。分离出的第一种病毒是BRV,通常在出生后96h内诱发疾病,导致犊牛以主要排出黄色液体粪便为特征的腹泻。分离出的第二种病毒是BCoV,据报道,它主要感染5~6周龄的犊牛。近年来,在患有胃肠炎的犊牛的粪便中也发现了其他病毒,如牛小核糖核酸病毒(bovine picornavirus, BoPV)、BToV、BoAstV、牛诺如病毒(bovine norovirus, BoNoV)、牛纽布病毒(bovine nebovirus, BoNeV)、牛嵴病毒(bovine kobuvirus, BKV)和牛肠道病毒(bovine enterovirus, BEV)等等。这些病原为牛腹泻病发病机制以及防控提供了病原学基础信息。

牛轮状病毒(Bovine Rotavirus, BRV)

牛轮状病毒(Bovine Rotavirus, BRV)是轮状病毒属呼肠孤病毒科的成员。它们根据外部衣壳抗原VP7和VP4以及内部衣壳蛋白VP6的抗原和遗传差异进行分类。病毒表面蛋白VP4(蛋白酶裂解或P蛋白)和VP7(糖蛋白或G蛋白)是中和抗体的靶标,能够使疫苗失活。A组轮状病毒株的抗原性通过G型和P型双重分类系统描述。迄今为止,在人类和各种动物物种的轮状病毒中,至少有41种G型和57种P型基于VP7和VP4基因的核苷酸序列被描述。在人类轮状病毒中,主要基因型是G1, G2, G3, G4和G9,它们与P[4], P[6]和P[8]结合。虽然BRV组A中至少报道了6种P基因型(P6[1], P7[5], P8[11], P11[14], P17[1]和P21[1])和8种G基因型(G1, G3, G5, G6, G7, G8, G10和G15) [1,2],但只有G6、G8和G10联合P[5], P[11]和P[1]被认为具有流行病学重要性[6]。全球最常见的BRVA基因型被认为是G6 (39.8%—78.3%),其次是美洲,欧洲,亚洲和澳大利亚的G10 (21%)和非洲的G8 (3%)。关于P型, P[5]菌株 (37.1%—50%) 在欧洲,美洲,亚洲和澳大利亚最普遍,其次是P[11] (15.4%—34.8%) 和P[1] (2%)。

BRV广泛分布于世界牛群中,根据Debelo (2021) 等人报道,在埃塞俄比亚, BRV的患病率为3.64% (4110) (95%CI: 0.99-9.04) [3]。根据Nasir Uddin Ahmed (2022) 等人报道,在孟加拉国, BRV的总体患病率为22.5%(45200)(95%CI: 17.0-29.0)[4]。根据Bertoni (2020) 等人报道,在阿根廷西北部, BRV的阳性率为9.5% (46484) 95%[5]。在我国, BRV汇总患病率为46% (663510677), 东北地区牛BRV汇总患病率(40%)显著低于其他地区。根据中国6个省23个奶牛场的269份犊牛腹泻病料分析: 71%的样本被确定为BRV阳性。鉴定出两种G基因型(G6, G10)和两种P基因型(P[1], P[5]), G6P[1] BRV为优势菌株。研究结果表明, BoRVA在中国犊牛中广泛流行,流行的优势基因型为G6P[1][6]。

牛星状病毒(Bovine Astrovirus, BAstV)

牛星状病毒 (Bovine Astrovirus, BAstV) 属于星状病毒科、哺乳动物星状病毒属的单股正链RNA病毒, 全长6.0~6.5 kb。于1978年在英国犊牛的排泄物中首次分离。牛星状病毒 (Bovine Astrovirus, BAstV) 可引起牛回肠圆顶上皮细胞中的M细胞发生病变, 当宿主感染BAstV时可以加剧其他病毒感染宿主时引起的腹泻。近些年研究发现, BAstV感染可能会引起脑炎和脑膜炎并造成宿主严重的神经症状。目前已发现BAstV有肠道型和神经型2种, 且二者基因组在结构上有明显差异, 在国内尚未发现神经型BAstV。

为调查BAstV的患病率, 在黑龙江地区调查发现, 在1120份牛粪便样品中, BAstV感染阳性率为10.18% (114/1120), 其中腹泻粪便样本中BAstV感染阳性率为10.43% (106/1016), 健康粪便样本中BAstV检测阳性率为7.69% (81/104)。其中, 鸡西地区BAstV感染阳性率最高为20.87% (24/115), 佳木斯地区感染阳性率最低为0。进一步分析BAstV感染相关性表明, BAstV的感染与牛的年龄、养殖模式、牛的类型、牧场纬度、牛的性别等因素有关 ($P < 0.05$), 但与临床症状腹泻无关 ($P > 0.05$) [39]。

牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus, BCoV)

牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus, BCoV) 属于冠状病毒目、冠状病毒科、原冠状病毒亚科、冠状病毒属和胚胎病毒亚属。于1984年从一只患有支气管炎的犊牛的肺中分离出。是第一个发现可能导致犊牛严重腹泻的病毒, 随后通过组织学、免疫荧光和免疫电镜将该病毒鉴定为冠状病毒[7]。BCoV属于单股正链RNA病毒, 极易发生基因重组和突变, 与其他冠状病毒成员类似, S基因编码的纤突蛋白决定病毒的组织嗜性和跨种间传播能力[7]。

BCoV可同时感染多种肠道病原体, 包括寄生虫、细菌和病毒, 导致腹泻。其中, 与大肠杆菌合并感染是最常见的, 阳性率为0.7~36.84%。与轮状病毒合并感染是引起犊牛病毒性腹泻的主要原因, 合并感染率为2.43%—13.15%。对合并感染寄生虫的调查显示, 和隐孢子虫合并感染的发生率为5.4%[8,9,10]。该病毒不仅引起犊牛腹泻, 还引起成年牛冬痢疾以及各年龄段牛呼吸道疾病, 危害巨大[11]。对该基因的监测分析至关重要。据报道, BCoV在美洲、欧洲和亚洲引起肠道症状。其中美国、加拿大和阿根廷在美洲的阳性率较高, 达到2.41%—84%[12,13,14,15]。在欧洲, 英国 (1986年) 和比利时 (1999年) 的阳性率分别为14%和8%[16,17]。荷兰和意大利的阳性率分别为2.80%和46.74%[18]。2000年至2009年, 在亚洲地区土耳其和韩国的BCoV阳性率分别为10.8~28.1%和5.6~58.2%[19,20,21~23]。而在南美洲, 巴西的阳性率较高, 为68.6%[24,25,26]。从2010年到2019年, BCoV开始在整个大洋洲出现和传播。来自澳大利亚和新西兰的粪便样本中BCoV的阳性率分别为21.6%和14.0%[27,28]。与此同时, 该病毒也出现在非洲。来自阿尔及利亚和加纳的粪便样本的阳性率分别为20.73%和0.30%[29]。此外, 同期亚洲还报告了新型冠状病毒暴发。在包括伊朗、中国、泰国、印度和越南在内的许多国家的腹泻型粪便样本中均检测到BCoV, 阳性率分别为7.2%, 12.20~69.05%, 12%, 8.88%—16.00%和6.9%[30,31,32]。可以看出, BCoV首先在美洲被发现, 然后先后出现在亚洲、欧洲、大洋洲和非洲。特别是在2010年后, BCoV在五大洲的许多国家表现出流行趋势, 并引起了腹泻的肠道表现。

产肠毒素大肠埃希菌 (Enterotoxigenic E.Coli, ETEC)

产肠毒素大肠埃希菌 (Enterotoxigenic E.Coli, ETEC) 是导致犊牛腹泻的主要病原菌之一[33]。人和家畜中引起腹泻的ETEC菌株之间的高特异性水平主要是由于寄主和寄生虫相互作用期间细菌定植因子和上皮受体之间的特定识别决定。当犊牛被ETEC菌毛定殖肠道时, 致病菌释放的肠毒素会快速被肠道上皮细胞受体GM-1神经节苷脂及鸟氨酸环化酶C识别且紧密结合, 通过一系列信号激活囊性纤维化跨膜通道, 最终导致细胞内的氯离子流出及大量水分进入小肠导致腹泻[34]。患病机体抵抗力迅速降低, 腹泻的同时, 还会引起其他病原菌的趁虚而入, 导致多病并发的状况, 造成犊牛较高的死亡率, 给牛业养殖带来较为严重的经济损失。在我国内蒙古部分地区调查发现, 乌兰察布地区ETEC检测总阳性率为11.71%, 鄂尔多斯地区ETEC总阳性率为9.44%。李文豪[35]研究结果发现, 通过检测ST、LT基因, 对呼和浩特地区周边采集的85份临床样品进行ETEC菌株鉴定, 共检测出ETEC阳性样品15份, 阳性率为17.6%, 呼和浩特地区犊牛腹泻病例ETEC菌株检出总阳性率略高于乌兰察布 (11.71%) 和鄂尔多斯地区 (9.44%)。根据通辽市地区ETEC的发病及流行情况和流行情况表明, 集约化养殖牛场的发病率约为18.49%, 死亡率为5.20%, 而养殖户犊牛发病率为32.72%, 死亡率12.92%。

贾第鞭毛虫 (G. lamblia)

贾第鞭毛虫 (G. lamblia) 属于鞭毛虫的一种, 最早于1681年发现于腹泻患者的粪便中 (吴观陵 2004), 目前已被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 列入重要人兽共患寄生虫, 其宿主谱广泛, 可感染包括人类在内的多种哺乳动物、鸟类、啮齿类、两栖类、爬行类动物等。据统计, 每年可有2.5亿至3亿人感染贾第鞭毛虫, 还会因为水源污染等问题导致大规模的水源性疫病的爆发。此外, 贾第虫病的再感染率也非常高, 再感染率可达到90%[36,37], 在一些贾第虫病暴发严重和流行的区域, 环境污染严重的区域也非常危险, 并且其在没有适当水资源管理的地区是严重的地方性疾病。被贾第鞭毛虫感染的人或动物会产生多种临床症状, 包括腹部绞痛、腹泻、吸收不良导致的体重减少和使人疲惫等隐性感染症状, 但是却没有明显的临床症状。对贾第虫病受影响最大的群体是儿童, 患有贾第虫的儿童会出现营养不良, 认识障碍等症状, 并且有可能长期感染[38]。

G. lamblia也是造成牛腹泻的主要原因之一, 感染后可造成牛的乳肉产量下降, 给养殖业带来巨大的经济损失。世界范围内已有多个国家报道了牛感染G. lamblia的情况, 其分布具有一定的地域、品种和年龄差异。美国牛G. lamblia感染率为19.1% (Hoar et al. 2009); 澳大利亚犊牛

G. lamblia感染率为26.9% (Ng et al. 2011) ; 加拿大圈养和放养奶牛的G. lamblia感染率分别为40%和41%, 肉牛感染率为27% (Uehlinger et al. 2011) ; 马来西亚奶牛感染率为12.5%, 其中断奶前犊牛和断奶后犊牛感染率分别为16.7%和8.3% (Muhid et al. 2012) 。中国新疆奶牛感染率为13.4%, 其中断奶前犊牛感染率为9.7%, 断奶后犊牛感染率为16.6% (Qi et al. 2016) , 河南奶牛平均感染率为7.2%, 其中断奶前犊牛感染率为22.7% (Wang et al. 2014) , 黑龙江各年龄段肉牛感染率2.87% (Liu et al. 2012) , 其中2月龄以下的断奶前犊牛感染率最高 (16.7%) 。

隐孢子虫 (Cryptosporidium)

隐孢子虫 (Cryptosporidium) 属于顶复门, 最早发现于试验小鼠体内 (Tyzzer 1907) , 后又发现于多种宿主。其宿主谱广, 涵盖了人等哺乳动物、啮齿类动物、爬行类动物、鱼类、鸟类和多种野生动物。隐孢子虫是专性细胞内寄生原虫, 主要寄生于小肠上皮细胞的刷状缘纳虫空泡内, 动物感染隐孢子虫后, 常发生腹痛、腹泻、呕吐等消化道症状。对免疫缺陷的动物可引发长期慢性腹泻, 降低动物生产性能和存活率。我国主要的一些经济性动物猪、羊、牛等均属于这种病原体的宿主。目前发现的隐孢子虫大约有40多个有效种, 60多个基因型, 其中有20多个种或基因型是人兽共患的。寄生于牛的隐孢子虫有4种, 包括C. parvum、C. andersoni、C. bovis 和 C. ryanae, C. andersoni在形态学上与C. muris 相似, 在很长一段时间内曾被认为是C. muris, 后被确定为新种, 主要寄生于断奶后牛胃, 引起牛的胃黏膜损伤、体重下降 (Lindsay et al. 2000) 。利用分子生物学标记可用于鉴别Cryptosporidium的虫种、基因型或基因亚型, 常用的有18S rRNA基因、Cryptosporidium卵囊壁蛋白 (Cryptosporidium oocyst wall protein, COWP) 基因、70 kDa 热休克蛋白 (70 kDa Heat Shock Protein, HSP70) 基因、肌动蛋白 (actin) 基因、60 kDa 糖蛋白 (60 kDa glycoprotein, GP60) 基因等。尽管有诸多分子标记可供选择, 但COWP、HSP70和Actin基因引物特异性仍有待提高。18S rRNA基因中存在拷贝重复序列, 具有保守区和高变区, 因此可据此设计种属特异性引物, 区分Cryptosporidium的种属。

Cryptosporidium对犊牛的感染具有明显的地区、品种和年龄差异。对比比利时10周龄以下犊牛进行的流行病学调查发现, 奶牛感染率为37%, 同地区肉牛感染率为12 (Geurdenetal.2007) 。对加拿大奶牛和肉牛犊牛的PCR结果显示, 奶牛的感染率为46%, 肉牛感染率为0 (Dixonetal.2011) 。在我国, 奶牛隐孢子虫感染率为1.68%~47.68%, 平均感染率为10.44%, 肉牛感染率为4.49%~26.5%, 平均感染率为8.09% (Gongetal.2017) 。新疆奶牛的感染率为4.3%, 本地肉牛品种新疆褐牛的感染率为2.3% (Qietal.2016a) 。在韩国的感染率为9.9%, 在美国的感染率为35.5%。国内研究表明, 牛隐孢子虫病最早在1986年发现于甘肃兰州 (陈义民等1986) , 此后20个省市均发生隐孢子虫感染, 其中台湾、内蒙古、山东、湖南和青海感染率最高, 陕西、广西、四川、宁夏和甘肃感染率最低, 且各省市之间感染率差异显著 (P<0.05) (Gongetal.2017; Lietal.2016) 。西班牙加利西亚1月龄以下犊牛感染率为58.5%。马来西亚断奶前犊牛的感染率30.8%, 断奶后犊牛感染率为23.3% (Muhidetal.2011) 。国内断奶前犊牛和断奶后犊牛的隐孢子虫病平均感染率分别为9.0%和19.5%。

犊牛腹泻病程进展迅速, 极易引起死亡, 因此快速诊断对于快速确认病因, 及时进行针对性的治疗, 降低死亡率至关重要。犊牛腹泻相关病原体的检测主要包括现场快速检测和实验室检测。现场病原检测主要采用犊牛腹泻相关病原的抗原检测试剂盒, 主要包括BRoV、BCoV、K99 型大肠杆菌、隐孢子虫和贾第鞭毛虫检测试剂盒。由于引起犊牛腹泻的传染性病原较为复杂, 因此需借助实验室检测以准确诊断。基于核酸的技术已常用于快速检测腹泻牛临床标本中的各种病原体。Ag-ELISA已在人类诊断医学等许多领域得到应用, 如利用双夹心ELISA、捕获ELISA和间接ELISA对病毒抗原、抗体进行检测[40]。随着分子生物学的不断发展, PCR检测变得越来越普遍, 多重PCR、实时荧光定量PCR、逆转录PCR等衍生技术相继出现[41]。环介导等温扩增检测技术 (LAMP) 是一种近年来新出现的核酸扩增方法, 因耗时短、灵敏度高, 可在等温条件下完成反应等优点, 被广泛用作病原体快速检测[42]。韩廷义, 汪生贵. 牛冠状病毒 RT-LAMP 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2013, 34 (5) : 80-83., 但具有一定的局限性。

参考文献

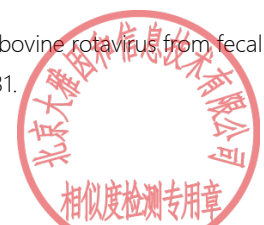
- [1] Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev Med Virol. 2005;15(1):29–56. doi: 10.1002/rmv.448
- [2] Rao CD, Gowda K, Reddy BY. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. Virol. 2000;276(1):104–13. doi: 10.1006/viro.2000.0472
- [3] Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. Vet Microbiol. 2004;99(3–4):167–73. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.029
- [4] Debello M, Abdela H, Tesfaye A, Tiruneh A, Mekonnen G, Asefa Z, Moje N. Prevalence of Bovine Rotavirus and Coronavirus in Neonatal Calves in Dairy Farms of Addis Ababa, Ethiopia: Preliminary Study. Biomed Res Int. 2021 Nov 9;2021:5778455. doi: 10.1155/2021/5778455.
- [5] Uddin Ahmed N, Khair A, Hassan J, Khan MAHNA, Rahman AKMA, Hoque W, Rahman M, Kobayashi N, Ward MP, Alam MM. Risk factors for bovine rotavirus infection and genotyping of bovine rotavirus in diarrheic calves in Bangladesh. PLoS One. 2022 Feb 25;17(2):e0264577. doi: 10.1371/journal.pone.

- [6] Bertoni E, Aduriz M, Bok M, Vega C, Saif L, Aguirre D, Cimino RO, Miño S, Parreño V. First report of group A rotavirus and bovine coronavirus associated with neonatal calf diarrhea in the northwest of Argentina. *Trop Anim Health Prod.* 2020 Sep;52(5):2761-2768. doi: 10.1007/s11250-020-02293-8. Epub 2020 Jun 2.
- [7] Shuiyun Chen, Wei Zhang, Junjun Zhai, Xuelong Chen, Yanping Qi,
Prevalence of bovine rotavirus among cattle in mainland China: A meta-analysis,
Microbial Pathogenesis, Volume 170,2022,105727,ISSN 0882-4010.
- [8] Zhu Q, Li B, Sun D. Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology. *Viruses.* 2022 May 21;14(5):1109. doi: 10.3390/v14051109.
- [9] Duckmanton L., Carman S., Nagy E., Petric M. Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea from Ontario farms. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:1266–1270. doi: 10.1128/JCM.36.5.1266-1270.1998.
- [10] Hasoksuz M., Hoet A.E., Loerch S.C., Wittum T.E., Nielsen P.R., Saif L.J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2002;14:308–313. doi: 10.1177/104063870201400406.
- [11] de Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H., Peeters J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 1999;29:1269–1287. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00076-4.
- [12] Amoroso MG, Lucifora G, Uberti BD, et al. Fatal Interstitial Pneumonia Associated with Bovine Coronavirus in Cows from Southern Italy [J] *Viruses*, 2020, 12 (11): 1331
- [13] Duckmanton L., Carman S., Nagy E., Petric M. Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea from Ontario farms. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:1266–1270. doi: 10.1128/JCM.36.5.1266-1270.1998.
- [14] Heckert R.A., Saif L.J., Hoblet K.H., Agnes A.G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. *Vet. Microbiol.* 1990;22:187–201. doi: 10.1016/0378-1135(90)90106-6.
- [15] Hasoksuz M., Hoet A.E., Loerch S.C., Wittum T.E., Nielsen P.R., Saif L.J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2002;14:308–313. doi: 10.1177/104063870201400406.
- [16] Zhang M., Hill J.E., Fernando C., Alexander T.W., Timsit E., van der Meer F., Huang Y. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. *Transbound Emerg. Dis.* 2019;66:1379–1386. doi: 10.1111/tbed.13172.
- [17] Reynolds D.J., Morgan J.H., Chanter N., Jones P.W., Bridger J.C., Debney T.G., Bunch K.J. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet. Rec.* 1986;119:34–39. doi: 10.1136/vr.119.2.34.
- [18] de Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H., Peeters J.E. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 1999;29:1269–1287. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00076-4.
- [19] Decaro N, Mari V, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Greco G, Cirone F, Colaianni ML, Cordioli P, Buonavoglia C. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. *Vet Microbiol.* 2008 Jan 1;126(1-3):30-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.024. Epub 2007 Jun 28.
- [20] Mawatari T., Hirano K., Ikeda H., Tsunemitsu H., Suzuki T. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011. *Microbiol. Immunol.* 2014;58:530–535. doi: 10.1111/1348-0421.12174.
- [21] Hasoksuz M., Kayar A., Dodurka T., Ilgaz A. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in Northwestern Turkey. *Acta Vet. Hung.* 2005;53:137–146. doi: 10.1556/avet.53.2005.1.13.
- [22] Jeong JH, Kim GY, Yoon SS, Park SJ, Kim YJ, Sung CM, Jang OJ, Shin SS, Koh HB, Lee BJ, Lee CY, Kang MI, Kim HJ, Park NY, Cho KO. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002–2004. *J Vet Med Sci.* 2005 Feb;67(2):187-9. doi: 10.1292/jvms.67.187.

- [23] Lee S.H., Kim H.Y., Choi E.W., Kim D. Causative agents and epidemiology of diarrhea in Korean native calves. J. Vet. Sci. 2019;20:e64. doi: 10.4142/jvs.2019.20.e64.
- [24] Headley S.A., Okano W., Balbo L.C., Marcasso R.A., Oliveira T.E., Alfieri A.F., Negri Filho L.C., Michelazzo M.Z., Rodrigues S.C., Baptista A.L., et al. Molecular survey of infectious agents associated with bovine respiratory disease in a beef cattle feedlot in southern Brazil. J. Vet. Diagn. Investig. 2018;30:249–251. doi: 10.1177/1040638717739945.
- [25] Al Mawly J., Grinberg A., Prattley D., Moffat J., French N. Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. N. Z. Vet. J. 2015;63:147–152. doi: 10.1080/00480169.2014.966168.
- [26] Izzo M.M., Kirkland P.D., Mohler V.L., Perkins N.R., Gunn A.A., House J.K. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. Aust. Vet. J. 2011;89:167–173. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x.
- [27] Burimuah V., Sylverken A., Owusu M., El-Duah P., Yeboah R., Lamptey J., Frimpong Y.O., Agbenyega O., Folitse R., Emikpe B., et al. Molecular-based cross-species evaluation of bovine coronavirus infection in cattle, sheep and goats in Ghana. BMC Vet. Res. 2020;16:405. doi: 10.1186/s12917-020-02606-x.
- [28] Lotfollahzadeh S., Madadgar O., Reza Mohebbi M., Reza Mokhber Dezfouli M., George Watson D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. Vet. Med. Sci. 2020;6:686–694. doi: 10.1002/vms3.277.
- [29] Shin J., Tark D., Le V.P., Choe S., Cha R.M., Park G.N., Cho I.S., Nga B.T.T., Lan N.T., An D.J. Genetic characterization of bovine coronavirus in Vietnam. Virus Genes. 2019;55:415–420. doi: 10.1007/s11262-019-01647-1.
- [30] Zhu Q., Su M., Li Z., Wang X., Qi S., Zhao F., Li L., Guo D., Feng L., Li B., et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. Virus Res. 2021;308:198632. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198632.
- [31] 钱英红,贾燕,谢梦圆等.内蒙古部分地区致犊牛腹泻产肠毒素大肠杆菌的调查研究[J].中国畜禽种业,2023,19(03):109-113.
- [32] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic E.coli[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2:123-140.
- [33] 蔺旭光. 通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定及产肠毒素型大肠杆菌F41菌毛基因的克隆表达[D].内蒙古民族大学,2018.
- [34] 李文豪. 呼和浩特牛腹泻部分细菌性病原检测及三重 PCR 检测方法的建立[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2021.
- [35] Kulakova L, Galkin A, Chen C, et al. Discovery of novel anti giardiasis drug candidates[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2014, 58(12):7303-7311.
- [36] Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd S G. An up-date on Giardia and giardiasis[J]. Current opinion in microbiology, 2016, 34:47-52.
- [37] Argüello-García R, Leitsch D, Skinner-Adams T, et al. Drug resistance in Giardia: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis[J]. Advances in parasitology,2020,107:201-282.
- [38] 王雪婷. 陕西部分地区犊牛隐孢子虫和蓝氏贾第虫种群结构研究[D].西北农林科技大学,2017.
- [39] Alfred N, Liu H, Lan L I et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of diverse bovine astroviruses associated with diarrhea in cattle and water buffalo calves in China[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2015, 77(6): 643-651.
- [40] MATEUSA M, OZOLIŅA Z, TERENTJEVA M, et al. Giardia duodenalis styles, 1902 prevalence in cattle (Bos taurus Linnaeus, 1758) in Europe: a systematic review[J]. Microorganisms, 2023, 11 (2) : 309.
- [41] ZHU W, DONG J, HAGA T, et al. Rapid and sensitive detection of bovine coronavirus and group a bovine rotavirus from fecal samples by using one-step duplex RT PCR assay[J]. Journal of veterinary medical science, 2011, 73 (4) : 531.

(4) 创新点与项目特色

利用多重PCR技术对病原进行扩增和检测，相较于对单一的病原体进行特异性扩增和检测普通PCR，多重PCR具有操作简单、快速、特异性



和敏感性更高，经济简便性，能够大大地节省时间，节省试剂，节约经费开支，为临床提供更多更准确的诊断信息。

本研究多重PCR的建立是对病毒，细菌，寄生虫这三种病原加入同一PCR管中进行扩增和检测，使检测的病原不只局限于一类病原。增大了对犊牛腹泻病原混合感染临床诊断的范围，能够只使用一个试剂就能检测出多种不同种类的抗原，可快速做出诊断。

(5) 技术路线、拟解决的问题及预期成果

1.技术路线

2.拟解决的问题

较普通PCR操作更简单、快速，特异性和敏感性更高，经济简便性，能够大大地节省时间，节省试剂，节约经费开支，为临床提供更多更准确的诊断信息。将病毒，细菌，寄生虫这三种病原加入同一PCR管中进行扩增和检测，使检测的病原不只局限于一个物种。增大了对犊牛腹泻病原混合感染临床诊断的范围，更加的省时，省试剂，省费用。

3.预期成果

建立一种快速诊断奶牛腹泻病原的多重PCR方法。

发表研究论文1篇。

(6) 项目研究进度安排

2023年6月-2023年8月 引物设计

2023年8月-2024年1月 单重PCR方法的建立

2024年1月-2024年4月 多重PCR方法的建立

2024年4月-2024年6月 多重PCR方法的应用

(7) 已有基础

1.与本项目有关的研究积累和已取得的成绩

前期研究揭示了10种常见牛肠道病毒（牛轮状病毒、牛冠状病毒、牛肠道病毒、牛冠状病毒、牛星状病毒、牛环曲病毒、牛诺如病毒、牛冠状病毒、牛小核糖核酸病毒和牛病毒性腹泻病毒）在黑龙江地区腹泻牛中流行和遗传演化特性。

2.已具备的条件，尚缺少的条件及解决方法

利用宏基因组组学已确认了黑龙江省腹泻牛混合样本中肠道病原的存在情况，但无寄生虫流行情况统计，因此本研究利用多重PCR方法，快速检测腹泻牛病原。

三、经费预算

开支科目 预算经费（元） 主要用途 阶段下达经费计划（元）

前半阶段后半阶段

预算经费总额 5000.00 仪器设备购置3000.00 2000.00

1. 业务费 0.00 无 0.00 0.00

(1) 计算、分析、测试费 0.00 无 0.00 0.00

(2) 能源动力费 0.00 无 0.00 0.00

(3) 会议、差旅费 0.00 无 0.00 0.00



(4) 文献检索费 0.00 无 0.00 0.00

(5) 论文出版费 0.00 无 0.00 0.00

2. 仪器设备购置费 5000.00 用于基因组提取试剂盒、2×premix酶、琼脂糖、TAE缓冲液的购买3000.00 2000.00

3. 实验装置试制费 0.00 无 0.00 0.00

4. 材料费 0.00 无 0.00 0.00

学校拨款

财政拨款

四、项目组成员签名

五、指导教师意见

导师（签章）：

年 月 日

六、院系大学生创新创业训练计划专家组意见

教学负责人（签章）：

年 月 日

七、学校大学生创新创业训练计划专家组意见

负责人（签章）：

年 月 日

* MERGEFORMAT d PAGE18 NUMPAGES18

病料采集及处理

核酸的提取

单重PCR扩增方法建立

退火温度优化

特异性验证

引物浓度优化化

多重PCR扩增方法建立与评价检测

建立双重至六重PCR方法

敏感性验证

特异性验证

敏感性验证

对采集腹泻病料进行病原检测，确证检测方法



说明：

- 1.文献相似度 = 送检文章中与检测范围所有文献的相似字符数/送检文章正文字符数
- 2.去除参考文献相似度 = 送检文章中检测范围所有文献（不包括参考文献）的相似字符数/送检文章正文字符数
- 3.去除本人已发表论文相似度 = 送检文章中与检测范围所有文献（不包括自引）的相似字符数/送检论文正文字符数
- 4.单篇最大相似度：送检文章与某一文献的相似度高于全部其他文献
- 5.正文字符数：送检文章正文部分的总字符数，包括汉字、非中文字符、标点符号、阿拉伯数字（不计入空格），正文不包括关键词、目录、图片、附录、参考文献等

