网络出版时间:2025-11-26 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.05.012

# 4种牛呼吸道病毒多重TaqMan RT-qPCR检测方法的建立及初步应用

哈蕊[1],常生荣[1],宋晓育[2],鲁强生[1],李萌[1],黄书艳[1],苏明媛[1],张小丽[1],康棣[1]
(1 甘肃农业大学 动物医学院,甘肃 兰州 730070;2 汝阳县农业农村局,河南 洛阳 471200)

[摘 要] 【目的】建立牛冠状病毒(BCoV)、牛呼吸道合胞体病毒(BRSV)、牛副流感病毒3型(BPIV-3)及牛腺病毒3型(BAdV-3)等4种可引起牛呼吸道疾病(BRD)病毒的多重TaqMan RT-qPCR检测方法,为BCoV、BRSV、BPIV-3和BAdV-3的检测提供技术支持。【方法】针对BCoV、BRSV、BPIV-3的*N*基因和BAdV-3的*Hexon*基因保守片段设计特异性引物及探针,对引物和探针浓度、退火温度等条件进行优化,建立四重TaqMan RT-qPCR检测方法,并对该方法的特异性、敏感性及重复性进行评价。用建立的方法对248份临床样品进行检测,同时与常规RT-PCR检测方法的结果进行比较。【结果】建立的检测方法标准曲线线性关系良好,可特异性地检测BCoV、BRSV、BPIV-3和BAdV-3,检测敏感性均为$1\times10^3$拷贝/μL;批内重复变异系数均小于3%,批间重复变异系数均小于5%。248份临床样品检测结果显示,四重TaqMan RT-qPCR检测BCoV、BRSV、BPIV-3及BAdV-3的阳性率分别为12.5%,14.9%,3.63%和5.65%,与常规RT-PCR检测结果符合率分别为97.18%,95.56%,97.58%和97.98%。【结论】建立了BCoV、BRSV、BPIV-3和BAdV-3四重TaqMan RT-qPCR检测方法,该方法具有良好的敏感性、特异性及重复性,检测结果稳定可靠。

[关键词] 牛冠状病毒;牛呼吸道合胞体病毒;牛腺病毒3型;牛副流感病毒3型;多重TaqMan实时荧光定量PCR

[中图分类号] S852.65+3 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)05-0121-09

# Establishment and preliminary application of a quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for detection of 4 bovine respiratory viruses

HA Rui[1],CHANG Shengrong[1],SONG Xiaoyu[2],LU Qiangsheng[1],LI Meng[1],
HUANG Shuyan[1],SU Mingyuan[1],ZHANG Xiaoli[1],KANG Di[1]
(1 *College of Veterinary Medicine,Gansu Agricultural University,Lanzhou,Gansu* 730070,*China*;
2 *Ruyang County Agriculture and Rural Affairs Bureau, Luoyang,Henan* 471200,*China*)

**Abstract**:【Objective】This research aims to establish a multiplex TaqMan RT-qPCR assay for simultaneous detection of four viruses that causes bovine respiratory disease (BRD):bovine coronavirus (BCoV),bovine respiratory syncytial virus (BRSV),bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3),and bovine adenovirus type 3 (BAdV-3),providing technical support for the diagnosis of such viruses.【Method】Specific primers and probes

[收稿日期] 2025-03-07 [修回日期] 2025-04-10
[基金项目] 国家自然科学青年基金项目(3240190813);甘肃省高等学校创新基金项目(2022A-049)
[作者简介] 哈蕊(1997—),女(回族),甘肃天水人,在读硕士,主要从事病毒检测方法研究。E-mail:HaRui0419@163.com
[通信作者] 张小丽(1971—),女,甘肃定西人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事兽医病原微生物致病机理及免疫机制研究。E-mail:zhxl228@qq.com
康棣(1992—),女,甘肃兰州人,讲师,博士,主要从事兽医病毒学及其与宿主相互作用的研究。E-mail:KangDi2021@163.com

were designed for conserved regions of the *N* gene of BCoV, BRSV, BPIV-3, and the *Hexon* gene of BAdV-3. Reaction conditions, including primer and probe concentrations and annealing temperature, were optimized to establish a quadruplex TaqMan RT-qPCR assay. The specificity, sensitivity, and repeatability of the assay were then evaluated. The established assay was applied to test 248 clinical samples, and the results were compared with those obtained by conventional RT-PCR.【Result】The standard curves of the established assay demonstrated good linearity, and the assay specifically detected BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3 with a sensitivity of $1\times10^3$ copies/μL for each target. Intra-assay coefficients of variation (CVs) were less than 3%, and inter-assay CVs were less than 5%. The detection results of 248 clinical samples showed that the positive rates of the quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3 were12.5%, 14.9%, 3.63%, and 5.65%, respectively. The concordance rates of these results with conventional RT-PCR assays were 97.18%, 95.56%, 97.58%, and 97.98% respectively.【Conclusion】A quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for detecting BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3 was established, which exhibited good sensitivity, specificity, repeatability, and reliable performance.

**Key words**: bovine coronavirus; bovine respiratory syncytial virus; bovine adenovirus type 3; bovine parainfluenza virus type 3; multiple TaqMan RT-qPCR

牛呼吸道疾病是一种影响所有年龄段牛群的多因素疾病,病毒、细菌、支原体等病原体单独或合并感染都可导致发病[1]。牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)、牛呼吸道合胞体病毒(bovine respiratory syncytial virus, BRSV)、牛副流感病毒3型(bovine parainfluenza virus type 3, BPIV-3)和牛腺病毒3型(bovine adenovirus type 3, BAdV-3)感染是引发牛呼吸道和消化道疾病的常见病毒,给牛群健康带来严重威胁[2-3]。BCoV感染症状具有年龄差异性,犊牛主要表现为水样腹泻、脱水和食欲减退,成年牛则以呼吸道症状(如咳嗽、流涕)为主,该病毒在低温环境下传播尤为迅速[4-5]。BRSV感染常诱发高热、咳嗽及呼吸困难,犊牛因免疫系统不完善,易继发细菌性肺炎,导致生长停滞,呈秋末至早春地方性流行特征[6-7]。BAdV-3感染可引起呼吸道症状、腹泻或结膜炎,该病毒易在应激或免疫抑制条件下爆发,给养殖管理带来诸多风险[8-9]。BPIV-3感染后,牛只以发热、呼吸急促及支气管炎为典型特征,重症病例可发展为间质性肺炎,该病在冬春季节的高密度牛群中传播迅速,常与其他病原体协同作用,加剧混合感染风险[10-12]。

目前,针对牛呼吸道病毒性疾病的检测方法仍存在诸多局限性。传统的病毒分离鉴定方法虽为检测的"金标准"[13],但其操作流程极为复杂繁琐,需要耗费大量时间,对实验设备及专业技术人员的要求高且检测灵敏度有限,难以满足快速、高效检测的实际需求[14]。分子生物学检测方法,如普通聚合酶链反应(PCR)[15],虽然检测时间较短,但敏感性相对较低,低病毒载量的样本可能出现假阴性结果。血清学检测方法,如酶联免疫吸附测定(ELISA)等,操作相对简便,适合大规模样本的初步筛查[16-17],然而该法存在窗口期漏检的问题,即在病毒感染初期,机体尚未产生足够可检测到的抗体或抗原时,容易出现假阴性结果[18]。多重实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测方法直接针对病毒的基因序列进行检测,在感染早期甚至潜伏期就能检测到病毒核酸,能够更精准地反映病毒感染的真实情况,特异性更强,降低了假阳性和假阴性结果出现的概率[19]。为改善现有牛呼吸道病毒性疾病检测方法的不足,本研究建立了一种TaqMan RT-qPCR检测方法,旨在全面、快速、准确地检测上述4种牛呼吸道病毒,为牛呼吸道病毒性疾病的早期诊断、精准治疗以及科学防控策略的制定提供技术支撑与理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 *生物材料* 用于检测BAdV-3和BPIV-3的标准质粒,由北京擎科生物公司合成。用于构建BCoV和BRSV标准质粒的cDNA,由BCoV和BRSV核酸阳性鼻拭子RNA反转录获得。用于TaqMan RT-qPCR方法特异性检测的牛轮状病毒和牛病毒性腹泻病毒cDNA及多杀性巴氏杆菌(ATCC12948)、溶血性曼氏杆菌(ATCC33396)、牛支原体(Y98),由甘肃农业大学动物医学院兽医微生物实验室保存。临床样本为甘肃省不同养殖场

采集的235份牛鼻拭子和13份肛拭子。

1.1.2　*主要试剂*　大肠杆菌DH5α感受态细胞，购自生工生物（上海）股份有限公司；反转录试剂，购自武汉塞维尔生物科技有限公司；pMD19-T载体、单重 TaqMan RT-qPCR 试剂盒等，均购自 Takara 公司。病毒核酸提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒及多重TaqMan RT-qPCR试剂盒，均购自南京诺维赞生物科技股份有限公司。

1.1.3　*主要仪器*　凝胶成像分析系统：Bio-Rad Gel Doc XR＋；Eppendorf PCR 仪，德国 Eppendorf 公司产品；LightCycler 96，瑞士罗氏公司产品；Pultton超微量紫外分光光度计，美国 Plextech 公司产品；CFX 96 Real-Time System，美国伯乐公司产品。

1.2　**方　法**

1.2.1　*标准质粒的构建*　利用病毒核酸提取试剂盒（货号：DC201）提取BCoV及BRSV核酸阳性鼻拭子RNA，反转录为cDNA。以cDNA为模板，利用表1中的引物进行靶基因（*N*基因）扩增，扩增程序为：72 ℃预变性 1 min；95 ℃变性 15 s，58 ℃（BCoV）、56 ℃（BRSV）退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，35个循环；72 ℃延伸5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后，利用胶回收试剂盒（货号：DC301）回收目的基因。将回收后的目的片段克隆至pMD-19T载体，并转化至DH5α感受态细胞，过夜培养后进行菌落PCR检测，阳性克隆委托西安擎科生物有限公司鉴定，鉴定正确后提取质粒并测定浓度，分别命名为BCoV-19T、BRSV-19T。

为了获得BAdV-3及BPIV-3的标准质粒，选择BAdV-3 *Hexon*基因（GenBank登录号：OQ594952.1）的保守序列（890 bp）和BPIV-3 *N*基因（GenBank登录号：OM621819.1）保守序列（990 bp），委托北京擎科生物科技股份有限公司合成，并连接至pMD-19T载体，分别命名为BAdV-3-19T、BPIV-3-19T。

根据下式计算4种重组质粒含量：质粒含量（拷贝/μL）＝（$6.02\times10^{23}$）[质粒质量浓度（ng/μL）×$10^{-9}$]/（质粒长度×660）。

**表 1**　BCoV-19T和BRSV-19T标准质粒构建所需引物序列

Table 1　Primer sequences required for the construction of standard plasmids for BCoV-19T and BRSV-19T

| 引物 Primer | 靶基因 Target genes | 序列（5′→3′） Sequences（5′→3′） | 产物大小/bp Product size |
|---|---|---|---|
| BCoV-19T-F1 | *N* | GAGCGTCCTTTGGAAATCGT[20] | 735 |
| BCoV-19T-R1 | | GCTTAGTTACTTGCTGTGGC | |
| BRSV-19T-F1 | *N* | CTCAATAAGTTGTGTGGTATGC | 769 |
| BRSV-19T-R1 | | AACCAGCTTCTCCACCTAAC | |

1.2.2　*TaqMan RT-qPCR方法引物及探针的设计*　根据制备的标准质粒序列，利用Oligo 6.0软件分别设计BCoV、BRSV、BPIV-3、BAdV-3的TaqMan RT-qPCR引物（F/R）及探针（P），探针5′端设有发光基团，3′端设有淬灭基团。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成，探针由苏州金唯智生物科技有限公司合成，相关信息见表2。

1.2.3　*单重TaqMan RT-qPCR方法引物及探针浓度的优化*　分别以梯度稀释的BCoV-19T、BRSV-19T、BPIV-3-19T、BAdV-3-19T标准质粒为阳性对照，无菌无酶水为阴性对照，对单重荧光定量反应体系中不同引物和探针浓度的组合进行优化。试验设A～F共6组反应体系，具体如表3所示。扩增程序为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火20 s，40个循环。通过比较不同浓度引物探针组合标准曲线的相关系数（$R^2$），筛选出最适探针引物浓度。

1.2.4　*四重TaqMan RT-qPCR方法退火温度的优化*　将BCoV-19T、BRSV-19T、BPIV-3-19T、BAdV-3-19T标准质粒分别10倍梯度稀释后等体积混合，使其含量为（$1\times10^8$）～（$1\times10^1$）拷贝/μL。以混合标准质粒作为模板进行四重TaqMan RT-qPCR扩增。按照已优化好的单重荧光定量引物及探针浓度，配制四重TaqMan RT-qPCR反应体系，设置不同退火温度，扩增程序为：37 ℃污染消化2 min；95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，55，56，57，58，60 ℃退火30 s，40个循环。根据循环阈值（Ct）构建标准曲线，选择$R^2$最接近1组的退火温度为最佳退火温度。

1.2.5　*四重TaqMan RT-qPCR方法标准曲线的建立*　将BCoV-19T、BRSV-19T、BPIV-3-19T、BAdV-3-19T标准质粒分别10倍梯度稀释后等体积混合，使其含量为（$1\times10^8$）～（$1\times10^3$）拷贝/μL，根据已优化的反应体系及条件进行扩增，利用CFX

96 Real-Time System扩增仪及软件生成4种病毒的标准曲线及扩增曲线。

**表2** BCoV、BRSV、BAdV-3和BPIV-3 TaqMan RT-qPCR**扩增引物及探针序列**

Table 2 TaqMan RT-qPCR amplification primer and probe sequences for BCoV, BRSV, BAdV-3, and BPIV-3

| 引物和探针 Primer and probe | 靶基因 Target genes | 序列(5′→3′) Sequences (5′→3′) | 产物大小/bp Product size |
|---|---|---|---|
| qBCoV-19T-F | | CTAGTAACCAGGCTGATGTC | |
| qBCoV-19T-R | *N* | ACCTAGTCGGAATAGCCT | 81 |
| BCoV-19T-P | | FAM-CCGGCTGACATTCTCGATCGGGACCCAA-BHQ1 | |
| qBRSV-19T-F | | TCTTTGCAGGGTTATTCATG | |
| qBRSV-19T-R | *N* | CTGGCATGACCAAGCATAAT | 103 |
| BRSV-19T-P | | HEX-TGCATATGGAGCAGGTCAAGTGATGT-BHQ1 | |
| qBAdV-3-19T-F | | TTGCAAATGGGTGTGAATGAG | |
| qBAdV-3-19T-R | *Hexon* | GCCTTCAATGCCGAGTTGAGG | 84 |
| BAdV-3-19T-P | | CY5-TGTGAATGAGCGCCAGCAACCCGTG-BHQ1 | |
| qBPIV-3-19T-F | | ACAAGACGGGACAGTCAAAT | |
| qBPIV-3-19T-R | *N* | GTCTCGACCATAAGCGTAACC | 108 |
| BPIV-3-19T-P | | Texas Red-CACAGTCTCTATATTTGCCCTTGGTCCC-BHQ1 | |

注:FAM、HEX、CY5、Texas Red为发光基团;BHQ1为淬灭基团。

Note: FAM, HEX, CY5, and Texas Red were used as fluorophores; BHQ1 was used as the quencher.

**表3** BCoV、BRSV、BAdV-3和BPIV-3**单重**TaqMan RT-qPCR**反应体系**

Table 3 Single-plex TaqMan RT-qPCR reaction system for BCoV, BRSV, BAdV-3, and BPIV-3

| 项目 Item | A组 Group A | B组 Group B | C组 Group C | D组 Group D | E组 Group E | F组 Group F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 预混酶 Ex *Taq*/μL Premix Ex *Taq* | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 10 μmol/L正向引物/μL 10 μmol/L forward primer | 0.8(0.4) | 0.4(0.2) | 0.4(0.20) | 0.4(0.2) | 0.3(0.15) | 0.3(0.15) |
| 10 μmol/L反向引物/μL 10 μmol/L reverse primer | 0.8(0.4) | 0.4(0.2) | 0.4(0.20) | 0.4(0.2) | 0.3(0.15) | 0.3(0.15) |
| 10 μmol/L探针/μL Probe | 0.4(0.2) | 0.4(0.2) | 0.3(0.15) | 0.2(0.1) | 0.3(0.15) | 0.2(0.10) |
| 质粒模板/μL Plasmid template | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 补灭菌水后体积/μL Sterile water | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

注:括号中的数据为正、反向引物及探针在反应体系中的浓度(μmol/L)。

Note: The values in parentheses indicate the concentrations (μmol/L) of the forward primer, reverse primer, and probe in the reaction system.

1.2.6 四重TaqMan RT-qPCR方法敏感性检测

将BCoV-19T、BRSV-19T、BPIV-3-19T、BAdV-3-19T标准质粒分别10倍梯度稀释后等体积混合,使其含量为($1\times10^8$)~($1\times10^1$)拷贝/μL,进行四重TaqMan RT-qPCR扩增,通过分析不同含量标准质粒的Ct值,确定该方法能够检测到的最低模板含量,即为敏感性。

1.2.7 四重TaqMan RT-qPCR方法特异性检测

将BCoV-19T、BRSV-19T、BPIV-3-19T、BAdV-3-19T标准质粒分别10倍梯度稀释后等体积混合,选取$1\times10^6$拷贝/μL的混合标准质粒作为阳性标准对照,以无菌无酶水为阴性对照,以牛轮状病毒和牛病毒性腹泻病毒cDNA及多杀性巴氏杆菌(ATCC12948)、溶血性曼氏杆菌(ATCC33396)、支原体(Y98)基因组DNA为模板,用所建立的四重TaqMan RT-qPCR方法进行扩增,观察特异性扩增曲线和Ct值。

1.2.8 四重TaqMan RT-qPCR方法重复性检测

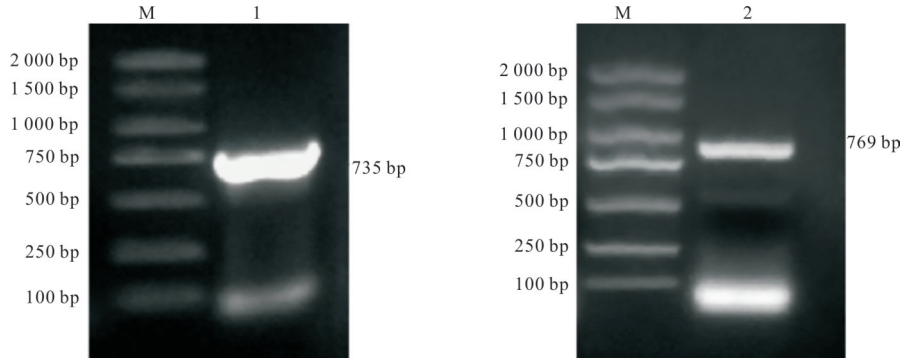
将构建的BCoV-19T、BRSV-19T、BPIV-3-19T、BAdV-3-19T标准质粒分别10倍梯度稀释后等体积混合,使其含量为($1\times10^8$)~($1\times10^3$)拷贝/μL,进行四重TaqMan RT-qPCR扩增,每个含量梯度设置3个重复,用于计算批内变异系数;上述方法分别独立重复3次,用于计算批间变异系数。变异系数(coefficient of variation, CV)=(标准差/平均值)×100%。

1.2.9　临床样本检测　利用本研究所建立的四重 TaqMan RT-qPCR 方法，检测 2024 年从甘肃省各地区牛场采集的疑似或出现 BRD 症状牛的的 235 份鼻拭子和 13 份肛拭子中 BCoV、BRSV、BPIV-3、BAdV-3 的感染情况，同时进行常规 RT-PCR 检测，对比检测结果。

## 2　结果与分析

### 2.1　标准质粒的鉴定

利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析，对构建的标准质粒进行验证，结果表明，获得的特异性条带与预期大小（BCoV-19T 为 735 bp、BRSV-19T 为 769 bp）一致（图 1），菌液 PCR 产物经擎科生物公司测序后结果正确，无突变。




M. DL2000II DNA Marker；1. 标准质粒 BCoV-19T；2. 标准质粒 BRSV-19T。
M. DL2000II DNA Marker；1. Standard plasmid BCoV-19T；2. Standard plasmid BRSV-19T.

图 1　标准质粒 BCoV-19T 和 BRSV-19T 的鉴定

Fig. 1　Identification of standard plasmids BCoV-19T and BRSV-19T

### 2.2　单重 TaqMan RT-qPCR 方法引物及探针浓度优化

试验结果为：BCoV-19T 的引物和探针浓度分别为 0.2 和 0.1 μmol/L，BRSV-19T 的引物和探针浓度均为 0.2 μmol/L，BPIV-3-19T 的引物和探针浓度分别为 0.4 和 0.2 μmol/L，BAdV-3-19T 的引物和探针浓度均为 0.2 μmol/L。

### 2.3　四重 TaqMan RT-qPCR 方法退火温度优化

试验结果表明，在所有设定的退火温度下，4 种标准质粒扩增曲线均表现良好，但退火温度为 56 ℃时，其相关系数 $R^2$ 值最接近 1，扩增曲线的线性关系最为理想，因此确定 56 ℃作为四重 TaqMan RT-qPCR 方法的最佳退火温度。

### 2.4　四重 TaqMan RT-qPCR 方法反应体系与程序的建立

根据 2.2 和 2.3 节结果，可确定四重 TaqMan RT-qPCR 的反应体系和条件。反应体系优化参数如下：2× All-Powerful qPCR Premix 10 μL，BCoV、BRSV、BAdV-3 10 μmol/L 上下游引物均各 0.4 μL，BPIV 10 μmol/L 的上下游引物各 0.8 μL，BCoV 10 μmol/L 探针 0.2 μL，BRSV、BPIV、BAdV 10 μmol/L 探针各 0.4 μL，混合 cDNA 模板 2.0 μL，加无菌无酶水至 20 μL。反应程序为：37 ℃污染消化 2 min；95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 10 s，56 ℃退火 30 s，40 个循环。

### 2.5　四重 TaqMan RT-qPCR 方法标准曲线的建立

四重 TaqMan RT-qPCR 标准曲线如图 2 所示。

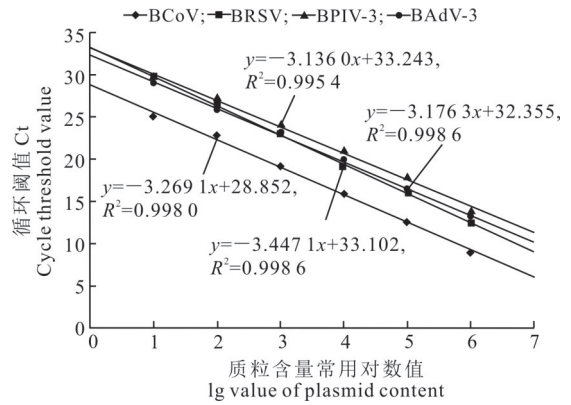



图 2　BCoV、BRSV、BPIV-3 和 BAdV-3 四重 TaqMan RT-qPCR 标准曲线

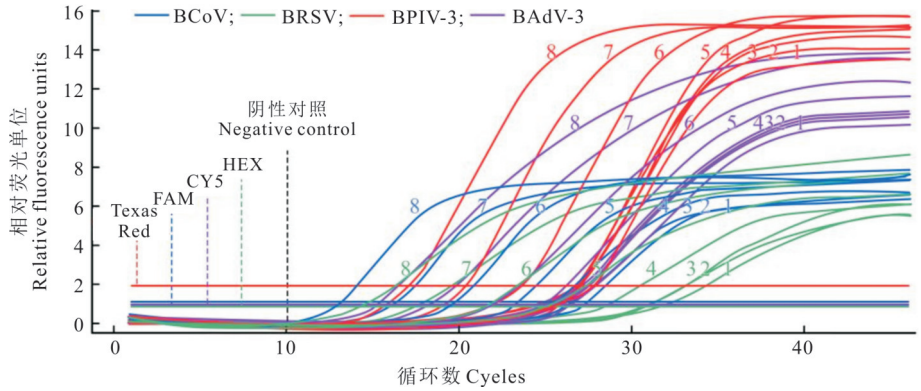
Fig. 2　Standard curves for quadruplex TaqMan RT-qPCR of BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3

由图 2 可知，BCoV 标准曲线 $R^2$ 为 0.998 0，扩增效率为 103.1%，线性方程为 $y=-3.269\ 1x+28.852$；BRSV 标准曲线 $R^2$ 为 0.998 6，扩增效率为 95.0%，线性方程为 $y=-3.447\ 1x+33.102$；BPIV-3 标准曲线 $R^2$ 为 0.995 4，扩增效率为 107.7%，线性方程为 $y=-3.136\ 0x+33.243$；

BAdV-3 标准曲线 $R^2$ 为 0.998 6,扩增效率为 105.7%,线性方程为 $y=-3.176\ 3x+32.355$。4 种病毒的标准曲线 $R^2$ 均大于 0.995,扩增效率均在 90%~110%,表明标准质粒含量的常用对数值与循环阈值(Ct)呈现了良好的线性关系,引物与探针扩增效率较高,建立的四重 TaqMan RT-qPCR 反应体系稳定。

### 2.6 四重 TaqMan RT-qPCR 方法敏感性检测

由图 3 可知,四重 TaqMan RT-qPCR 方法检测 BCoV-19T 的最低模板浓度为 $1\times10^1$ 拷贝/μL,检测 BRSV-19T 和 BAdV-3-19T 的最低模板浓度均为 $1\times10^2$ 拷贝/μL,检测 BPIV-3-19T 的最低模板浓度为 $1\times10^3$ 拷贝/μL。受样本复杂背景的干扰,不同靶标的扩增效率及信号稳定性具有差异性,在多重检测体系中,统一敏感性指标可有效避免因背景干扰导致的假阴性,为确保四重检测体系的可靠性并平衡多靶标同步检测的稳定性,本研究将最低检测限设定为 $1\times10^3$ 拷贝/μL。




1~8. 分别代表质粒含量为($1\times10^1$)~($1\times10^8$)拷贝/μL 时的扩增曲线

1—8. Represent the amplification curves corresponding to plasmid concentrations ranging from $1\times10^1$ to $1\times10^8$ copies/μL

图 3 BCoV、BRSV、BPIV-3 和 BAdV-3 四重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的敏感性

Fig. 3 Sensitivity of the quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3

### 2.7 四重 TaqMan RT-qPCR 方法特异性检测

特异性检测结果(图 4)显示,BCoV、BRSV、BPIV-3 和 BAdV-3 均呈现典型的 S 型扩增曲线,而牛轮状病毒、牛病毒性腹泻病毒、多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌及支原体等其他非靶标病原体均无扩增曲线。根据 ISO 16140-2:2016 计算交叉反应率[21],结果表明四重 TaqMan RT-qPCR 的交叉反应率为 0%,证实该方法在复杂样本背景下仍能精准地区分目标病原,具有较强的特异性。

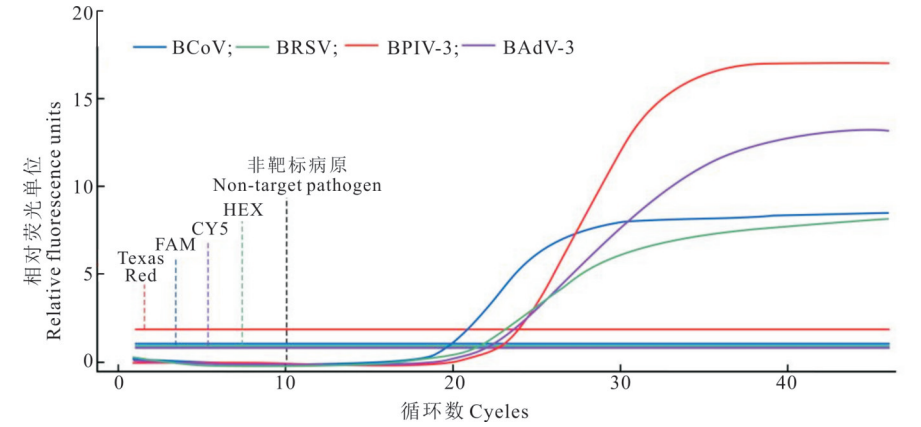



图 4 BCoV、BRSV、BPIV-3 和 BAdV-3 四重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的特异性

Fig. 4 Specificity of the quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3

### 2.8 四重 TaqMan RT-qPCR 方法重复性检测

四重 TaqMan qPCR 方法的重复性验证结果表明,批内 CV 均≤2.02%,批间 CV 均≤4.38%(表 4)。批内和批间 CV 均低于 ISO 16140-2:2016 的阈值要求(批内 CV<5%,批间 CV<10%)[21],证实该方法在不同病毒载量下均具有较高的可靠性,表明

该方法重复性较好。

**表 4　BcoV、BRSV、BPIV-3 和 BAdV-3 四重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的重复性**

Table 4　Repeatability of the quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3

| 病原 Etiology | 质粒含量/（拷贝·μL$^{-1}$） Plasmid content | 变异系数/% CV | | 病原 Etiology | 质粒含量/（拷贝·μL$^{-1}$） Plasmid content | 变异系数/% CV | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 批内重复 Inter-assay | 批间重复 Intra-assay | | | 批内重复 Inter-assay | 批间重复 Intra-assay |
| 牛冠状病毒 BCoV | $1\times10^6$ | 1.23 | 1.93 | 牛副流感病毒 3 型 BPIV-3 | $1\times10^6$ | 2.02 | 2.36 |
| | $1\times10^5$ | 1.41 | 4.58 | | $1\times10^5$ | 0.60 | 4.38 |
| | $1\times10^4$ | 0.68 | 2.73 | | $1\times10^4$ | 1.55 | 3.91 |
| 牛呼吸道合胞体病毒 BRSV | $1\times10^6$ | 0.73 | 2.64 | 牛腺病毒 3 型 BAdV-3 | $1\times10^6$ | 1.08 | 2.51 |
| | $1\times10^5$ | 1.77 | 2.31 | | $1\times10^5$ | 1.45 | 3.51 |
| | $1\times10^4$ | 0.35 | 0.67 | | $1\times10^4$ | 0.08 | 3.12 |

### 2.9　四重 TaqMan RT-qPCR 法对临床样本的检测

临床样本检测结果显示，四重 TaqMan RT-qPCR 方法对 BCoV、BRSV、BPIV-3、BAdV-3 的检出率分别为 12.50%，14.90%，3.63% 和 5.65%，常规 RT-PCR 检出率分别为 9.68%，10.48%，1.21% 和 3.63%，2 种检测方法的符合率分别为 97.18%，95.56%，97.98% 和 97.58%（表 5）。

**表 5　BCoV、BRSV、BPIV-3 和 BAdV-3 四重 TaqMan RT-qPCR 方法对临床样本的检测结果**

Table 5　Detection results of the clinical samples using the quadruplex TaqMan RT-qPCR assay for BCoV, BRSV, BPIV-3, and BAdV-3

| 病原 Etiology | 四重 TaqMan RT-qPCR Quadruplex TaqMan RT-qPCR assay | | 常规 RT-PCR Conventional RT-PCR | | 符合率/% Coincidence rates |
|---|---|---|---|---|---|
| | 阳性样品数 Number of positive samples | 阳性率/% Positive rates | 阳性样品数 Number of positive samples | 阳性率/% Positive rates | |
| 牛冠状病毒 BCoV | 31 | 12.50 | 24 | 9.68 | 97.18 |
| 牛呼吸道合胞体病毒 BRSV | 37 | 14.90 | 26 | 10.48 | 95.56 |
| 牛副流感病毒 3 型 BPIV-3 | 9 | 3.63 | 3 | 1.21 | 97.58 |
| 牛腺病毒 3 型 BAdV-3 | 14 | 5.65 | 9 | 3.65 | 97.98 |

## 3　讨　论

本研究建立了一种可同步检测 BCoV、BRSV、BPIV-3 及 BAdV-3 的四重 TaqMan RT-qPCR 方法，填补了现有技术中针对这 4 种病毒多靶标同步筛查的技术空白，其核心在于靶基因的精准选择及反应体系的优化。选择 BCoV、BRSV、BPIV-3 的 *N* 基因与 BAdV-3 的 *Hexon* 基因作为特异性靶标，所设计的引物探针组可精准地区分目标病毒与其他病原体，避免了交叉反应导致的假阳性[22]。其中，BCoV 的 *N* 基因在病毒复制中起关键作用，其高度保守的序列特征确保了检测的特异性[23]；BRSV 的 *N* 基因与病毒核衣壳的形成与复制有关，可作为感染状态的分子标识[24]；BAdV-3 的 *Hexon* 基因作为病毒颗粒组装的核心结构，其保守性可确保检测的灵敏性[25]；BPIV-3 的 *N* 基因因其高度特异性而成为检测该病毒的重要分子标记[26]。此外，通过对引物、探针浓度及退火温度等关键参数的优化，成功实现了单管四靶标的高效扩增，显著提升了多重检测的效能。

相较于现有的 BCoV[27]、BRSV[28]、BPIV-3[29] 及 BAdV-3[30] 单靶标检测技术，本研究通过设计多荧光通道探针，显著降低了背景荧光的干扰效应，突破了病原的样本限制，可以兼容鼻拭子及肛拭子等多样化样本，并显著缩短了检测周期。该方法可精准地区分 4 种目标病毒，扩增曲线峰型明确，且与其他常见牛病原体无交叉反应；灵敏度可达 $1\times10^3$ 拷贝/μL，虽略低于部分单靶标检测技术的灵敏度，但符合世界动物卫生组织对临床样本病毒载量检测的实用性要求（≥$10^3$ 拷贝/μL，可覆盖 99% 的阳性样本）[31]；批内与批间重复性变异系数分别低于 3% 和 5%。临床样本检测中，该方法阳性检出率较常规 RT-PCR 提升显著，符合率≥95.56%。在实际应用中，该方法能够迅速且准确地识别牛呼吸道样本中的病毒，有助于及时实施针对性治疗，降低疾病传播的风险。同时，该方法操作简便，对实验

人员的专业技能要求不高,便于在基层兽医站和养殖场广泛推广使用。

## [参考文献]


[1] 石柯. 牛呼吸道疾病综合征病原多重PCR检测方法建立及应用[D]. 贵阳:贵州大学,2021.
SHI K. The multiplex PCR detection method of the main cause of bovine respiratory disease complex establishment and application[D]. Guiyang:Guizhou University,2021.

[2] CECCATO A,CAMPAÑA-DUEL E,ARENY-BALAGUERÓ A,et al. Respiratory infections and acute respiratory distress syndrome[J]. Signa Vitae:Journal for Intensive Care and Emergency Medicine,2022,18(5):44-50.

[3] 郭利,王炜,杨艳玲,等. 牛呼吸道疾病综合征多重PCR检测试剂盒及其制备方法:CN103498009B[P]. 2015-01-21.
GUO L,WANG W,YANG Y L,et al. Multiplex PCR detection kit for bovine respiratory disease complex and its preparation method:CN103498009B[P]. 2015-01-21.

[4] AWADELKAREEM E A,HAMDOUN S. Insilco vaccine design of spike and hemagglutinin esterase proteins of bovine coronavirus [J]. Translational Medicine Communications,2024,9(1):28.

[5] 李长乐,姚鑫炎,肖毅,等. 牛冠状病毒流行病学及检测方法研究进展[J/OL]. 特产研究,2024(2024-01-03)[2025-03-01]. https://link.cnki.net/urlid/22.1154.S.20240102.0900.001.
LI C L,YAO X Y,XIAO Y,et al. Research progress in epidemiology and detection methods of bovine coronavirus[J/OL]. Special Animal Research,2024(2024-01-03)[2025-03-01]. https://link.cnki.net/urlid/22.1154.S.20240102.0900.001.

[6] 梁晓珊,宁鹏,赵辉,等. 牛呼吸道合胞体病诊断和预防研究进展[J]. 中国兽医杂志,2023,59(6):112-116.
LIANG X S,NING P,ZHAO H,et al. Research advances on diagnosis and prevention of bovine respiratory syncytial disease [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2023,59(6):112-116.

[7] FERELLA A,STREITENBERGER N,PÉREZ AGUIRRE-BURUALDE M S,et al. Bovine respiratory syncytial virus infection in feedlot cattle cases in *Argentina*[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,2023,35(5):535-542.

[8] 何姝凡,岳华,汤承,等. 牛腺病毒3型的研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2022,53(4):1030-1040.
HE S F,YUE H,TANG C,et al. Research advances in bovine adenovirus type 3[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2022,53(4):1030-1040.

[9] ANAND S K,SINGH J,GABA A,et al. Effect of bovine adenovirus 3 on mitochondria[J]. Veterinary Research,2014,45(1):45.

[10] GUERICHE A,GALIULLIN A K,GUMEROV V G,et al. The etiological role of the parainfluenza-3 virus in the respiratory pathology of young cattle[J]. BIO Web of Conferences,2020,17:00080.

[11] 赵月娟. 牛副流感病毒3型流行现状与防控研究进展[J]. 中国畜牧业,2023(24):47-48.
ZHAO Y J. Research progress on epidemic situation and prevention and control of bovine parainfluenza virus type 3[J]. China Animal Industry,2023(24):47-48.

[12] 蒋磊. 牛副流感病毒3型研究进展[J]. 湖南畜牧兽医,2022(6):40-43.
JIANG L. Research progress of bovine parainfluenza virus type 3[J]. Hunan Journal of Animal Science & Veterinary Medicine,2022(6):40-43.

[13] 叶永丽,李梓暄,刘丽娟,等. 病毒感染性检测方法研究进展[J]. 病毒学报,2025,41(1):202-210.
YE Y L,LI Z X,LIU L J,et al. Research progress on detection methods of infectious viruses[J]. Chinese Journal of Virology,2025,41(1):202-210.

[14] RAWAL G,YIM-IM W,ALJETS E,et al. Porcine respiratory coronavirus (PRCV):isolation and characterization of a variant PRCV from USA pigs[J]. Pathogens,2023,12(9):1097.

[15] SINGH M,GUPTA A,AGARWAL A,et al. Precision diagnosis of viral respiratory infections:unleashing the power of multiplex polymerase chain reaction (PCR) for enhanced infection management[J]. Cureus,2024,16(11):e73100.

[16] OHLSON A,BLANCO-PENEDO I,FALL N. Comparison of Bovine coronavirus-specific and Bovine respiratory syncytial virus-specific antibodies in serum versus milk samples detected by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,2014,26(1):113-116.

[17] WERNIKE K,BEER M. Comparison of bovine viral diarrhea virus detection methods:Results of an international proficiency trial[J]. Veterinary Microbiology,2024,290:109985.

[18] 高睿,徐伟,罗艳,等. 4种致牛腹泻病毒多重荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2023,51(10):20-28.
GAO R,XU W,LUO Y,et al. Establishment and application of multiple fluorescent quantitative PCR for detection of 4 bovine diarrhea viruses[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2023,51(10):20-28.

[19] SELIM A,ATTIA K,RAMADAN E,et al. Seroprevalence and molecular characterization of *Brucella* species in naturally infected cattle and sheep[J]. Preventive Veterinary Medicine,2019,171:104756.

[20] 刘合义,孙留霞,王进轶,等. 牛冠状病毒RT-PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志,2009,45(2):25-27.
LIU H Y,SUN L X,WANG J Y,et al. Establishment of RT-PCR detection method for bovine coronavirus[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2009,45(2):25-27.

[21] INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain-method validation-Part 2:protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method [S/OL](2016-06)[2025-03-19]. https://www.iso.org/standard/54870.html.

[22] KAMEKURA N,HOJO T,NITTA Y,et al. Anesthetic mana-

gement of a rett syndrome patient at high risk for respiratory complications[J]. Anesthesia Progress，2021，68(3)：163-167.

[23] 黄琴，杨兵，张怡淼，等. 新疆南疆地区犊牛冠状病毒的分离与鉴定及N基因进化分析[J/OL]. 经济动物学报，2024(2024-04-17)[2025-03-01]. https://kns. cnki. net/kcms/detail/22. 1258. s. 20240412. 1934. 002. html.
HUANG Q，YANG B，ZHANG Y M，et al. Isolation and identification of calf coronavirus and analysis of N gene evolution in southern Xinjiang[J/OL]. Journal of Economic Animal，2024 (2024-04-17)[2025-03-01]. https://kns. cnki. net/kcms/detail/22. 1258. s. 20240412. 1934. 002. html.

[24] GERSHWIN L J，VANEENENNAAM A，TAYLOR J F，et al. Differential gene expression in cattle challenged with single pathogens of the bovine respiratory disease complex[J]. Journal of Animal Science，2016，94：134-135.

[25] SHEN Y，LIU J，ZHANG Y H，et al. Prevalence and characteristics of a novel bovine adenovirus type 3 with a natural deletion fiber gene[J]. Infection，Genetics and Evolution，2020，83：104348.

[26] 薛娟，曹思，张峣，等. 牛副流感病毒3型*N*基因的克隆与系统进化分析[J]. 动物医学进展，2015，36(3)：32-34.
XUE J，CAO S，ZHANG Y，et al. Cloning and phylogenetic analysis of *N* gene of bovine parainfluenza virus type 3 [J]. Progress in Veterinary Medicine，2015，36(3)：32-34.

[27] 高辉，李晓成，刘莹，等. 牛冠状病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立及应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医，2022(6)：86-91.
GAO H，LI X C，LIU Y，et al. Establishment and application of real-time fluorescent quantitative RT-PCR detection method for bovine coronavirus[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine，2022(6)：86-91.

[28] 梁晓珊，宁鹏，李小龙，等. 牛呼吸道合胞体病毒一步法实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医，2024，56(3)：94-98.
LIANG X S，NING P，LI X L，et al. Establishment and application of a one-step real-time fluorescence quantitative PCR assay for bovine respiratory syncytial disease[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine，2024，56(3)：94-98.

[29] 张欣欣. 牛副流感病毒3型实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2016.
ZHANG X X. Establishment of real-time fluorescence quantitative RT-PCR for detection of bovine parainfluenza virus type 3 [D]. Hohhot：Inner Mongolia Agricultural University，2016.

[30] 贺倩，鱼轲，郭敏，等. 牛血清中牛腺病毒3型EvaGreen qPCR检测方法的建立[J]. 微生物学免疫学进展，2022，50(4)：15-20.
HE Q，YU K，GUO M，et al. Establishment of an EvaGreen qPCR for the detection of bovine adenovirus type 3 in bovine serum [J]. Progress in Microbiology and Immunology，2022，50(4)：15-20.

[31] WORLD ORGANISATION for ANIMAL HEALTH. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals[S/OL](2024-11-29)[2025-03-31]. https://www. woah. org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/.

（责任编辑：马秋明）