

多重qRT-PCR检测犊牛腹泻病方法的建立与应用

朱贵霞，杨树美，钟 丽，王 禹

（山东省临沂市蒙阴县畜牧发展促进中心，山东临沂 276200）

摘 要：[目的]建立一种检测犊牛腹泻病多重qRT-PCR方法，旨在对致犊牛腹泻的多种病原体同时快速检测。[方法]查询多种致犊牛腹泻的病原体保守基因序列作为靶标基因，设计特异性引物和探针，构建质粒标准品，优化引物浓度和退火温度，测试其灵敏度、特异性和临床样本验证。[结果]以 10^3 拷贝/ μ L质粒作为标准品，成功建立检测犊牛腹泻病多重qRT-PCR方法，反应体系为：10 μ L 2×Fast-Start Universal SYBR Green Master，0.5 μ L上游引物，0.5 μ L下游引物，1 μ L模板，8 μ L灭菌超纯水，总反应体积为20 μ L。反应条件为：95 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 20 s、56 $^{\circ}$ C 15 s、72 $^{\circ}$ C 30 s，36 个循环；72 $^{\circ}$ C 5 min。检测犊牛腹泻病多重qRT-PCR方法的灵敏度为1 拷贝/ μ L，与常见其他病原体无交叉反应，组内和组间变异系数均小于2%。在315 份腹泻犊牛的临床粪便样本中，共检测出248 份阳性（78.73%），42 份为混合感染阳性（13.33%），与单一PCR方法的阳性检出率结果完全一致。[结论]本研究成功建立一种可同时检测6 种犊牛腹泻病原体的多重qRT-PCR方法，对质粒DNA的检测灵敏度可达1 拷贝/ μ L，与常见其他病原体无交叉反应，与单一PCR方法对315 份临床样本的检测符合率为100%。
关键词：犊牛；腹泻；多重qRT-PCR；检测；病原体

文章编号：1671-4393（2026）05-0041-06

DOI:10.12377/1671-4393.26.05.07

Establishment and Application of a Multiplex qRT-PCR Method for Detecting Calf Diarrhea Disease

ZHU Guixia, YANG Shumei, ZHONG Li, WANG Yu

（Mengyin County Animal Husbandry Development Promotion Center, Linyi Shandong 276200）

Abstract: [Objective]To establish a multiplex qRT-PCR method for detecting calf diarrhea disease, aiming to simultaneously and rapidly detect multiple pathogens that cause diarrhea in calves.[Method]This study searched for conserved gene sequences of various pathogens causing diarrhea in calves as target genes, designing specific primers and probes, constructing plasmid standards, optimizing primer concentrations and annealing

作者简介：朱贵霞（1980-），女，山东临沂人，本科，高级兽医师，研究方向为兽医；
杨树美（1980-），女，山东临沂人，本科，高级兽医师，研究方向为畜牧兽医；
钟 丽（1982-），女，贵州贵阳人，硕士，高级畜牧师，研究方向为畜牧；
王 禹（1975-），男，山东临沂人，本科，中级兽医师，研究方向为兽医。

temperatures, and testing their sensitivity, specificity, and clinical sample validation.[Result]A multiplex qRT-PCR method for detecting calf diarrhea disease was successfully established using 103 copies/ μ L plasmid as the standard.The reaction system consisted are 10 μ L 2 $\times$ Fast-Start Universal SYBR Green Master, 0.5 μ L upstream primer, 0.5 μ L downstream primer, 1 μ L template, 8 μ L sterilized ultrapure water, and a total reaction volume of 20 μ L.The reaction conditions are: 95 $^{\circ}$ C for 3 minutes; 94 $^{\circ}$ C for 20 seconds, 56 $^{\circ}$ C for 15 seconds, 72 $^{\circ}$ C for 30 seconds, 36 cycles; 72 $^{\circ}$ C for 5 minutes.The detection sensitivity is 1 copy/ μ L, and there is no cross-reactivity with other pathogens.The intra-group and inter-group coefficients of variation are both less than 2%.Among 315 clinical fecal samples of diarrheal calves, a total of 248 are detected as positive (78.73%), and 42 are positive for mixed infections (13.33%), which is completely consistent with the positive detection rate of the single PCR detection method.[Conclusion]This study successfully established a multiplex qRT-PCR method capable of simultaneously detecting six pathogens responsible for calf diarrhea.The method exhibits a detection sensitivity of up to 1 copy/ μ L for plasmid DNA, shows no cross-reactivity with other common pathogens, and achieves a 100% concordance rate with single PCR method in the detection of 315 clinical samples.

Keywords: calf; diarrhea; multiplex qRT-PCR; detecting; pathogen

近年来随着现代畜牧养殖业的迅猛发展,由细菌和病毒等病原微生物感染所导致的犊牛腹泻病在我国流行越来越广泛,在全年各季节均可发生,属于一种常见病^[1-2]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、牛病毒性腹泻黏膜病病毒(Bovine Viral Diarrhea Mucosal Disease Virus, BVDV)、牛细小病毒(Bovine Parvovirus, BPV)、牛轮状病毒(Bovine Rotavirus, BRV)、牛冠状病毒(Bovine Coronavirus, BCV)等是牛腹泻病的主要病原体,均能造成犊牛腹泻发生^[3-5]。因此,对上述病原体的正确分离和鉴定,对该病的精准防控和监测具有至关重要的意义。

目前,由于犊牛腹泻病的病因多样,多种病原微生物混合感染较常见,常规的临床症状分析和血清学检测难以准确诊断,给临床工作造成较大困扰^[6]。实时荧光定量PCR(Real-time Fluorescence Quantitative PCR, qRT-PCR)是一种可对病原体目标基因片段进行扩增的分子检测技术,具有灵敏度高、特异性强、周期短等优势,现已广泛应用于畜牧动物疫病的检测领域^[7, 8]。单一qRT-PCR检测很

难一次鉴定多种病原体,效率低。有学者建立多重qRT-PCR检测牛腹泻病病原体,在一定程度上可以提高检测效率,节约成本,但是将细菌和病毒同时作为多重qRT-PCR检测对象的相关研究报道较少见,尚缺乏将上述病原微生物同时检测的技术方法。因此,本研究建立一种能够同时检测*Escherichia coli*、*Salmonella enterica*、BVDV、BPV、BRV、BCV 6种病原体的多重qRT-PCR方法,为犊牛腹泻病的快速精准诊断和鉴别提供参考,也为其他动物疾病检测方法的研制奠定新思路和新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本来源

Escherichia coli、*Salmonella enterica*、BVDV、BPV、BRV、BCV、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、牛支原体(*Mycoplasma bovis*)、牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus, IBRV)、牛犊病毒(Bovine Kobuvirus, KBV)、牛多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella*

multocida)、猪圆环病毒2型(Porcine Circovirus Type 2, PCV-2)等病原体均来源于江苏地区各养牛场分离株,并保存于实验室。采集2023年1月至2024年12月在江苏地区各养牛场内315份腹泻犊牛粪便,分装后,置于4℃条件下保存于实验室,作为临床检测样本。

1.1.2 引物设计与合成

根据GenBank公布的*Escherichia coli* (M35282.1)、*Salmonella enterica* (MK017941.1)、BVDV (OR828551.1)、BPV (DQ335247.1)、BRV (PQ274862.1)、BCV (OP820540.1)基因序列作为靶标序列进行引物设计,引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司负责,具体引物序列信息如表1所示。

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer Sequence Information

病原体 Pathogen	引物名称 Primer name	引物序列 5 ‘—>3’
<i>Escherichia coli</i>	EcK99-F	actggtctggttctatgaac
	EcK99-R	tgaatagttaaatgactgaat
<i>Salmonella enterica</i>	Salme-F	tgaaattatcgccacgttcgg
	Salme-R	atcgcacccgtcaaaggaac
BVDV	BVDVutr-F	cagtggtgagttcgttgatg
	BVDVutr-R	cctatcaggctgtayycgtaa
BPV	BPVVP2-F	gatgtacaatccactggtcagaag
	BPVVP2-R	taccttgaccatattggattgta
BRV	BRVVP6-F	ctcaatgcgggatcagaaattcag
	BRVVP6-R	tggtgtcatatttggtgtctcat
BCV	BCVN-F	cgatcagtcgacccaatc
	BCVN-R	gaatgtcagccggggtat

1.2 方法

1.2.1 质粒阳性标准品制备

应用生物基因组DNA/RNA提取试剂盒提取相应的核酸作为模板,进行PCR扩增。PCR反应体系为:2 μL 10× PCR buffer, 1 μL dNTPs, 0.5 μL rTaq酶, 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物, 1 μL 模板, 补齐灭菌超纯水至总体积20 μL。PCR扩增条件: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 49℃ 25 s, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃继续反应10 min。将PCR扩增反应产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳割胶回收并纯化,连接

至pMD-19T载体,转化至DH5α大肠杆菌感受态细胞,体外培养获取单克隆重组质粒,然后进行测序鉴定。正确的菌株质粒经测定浓度,计算拷贝数,转移至-40℃条件下保存,作为阳性标准品,备用。

1.2.2 检测犊牛腹泻病多重qRT-PCR方法的建立

本研究建立的是基于SYBR Green I染料法的检测犊牛腹泻病多重qRT-PCR方法。以构建的质粒阳性标准品作为模板,建立多重qRT-PCR方法。将质粒阳性标准品以10倍依次稀释成0、0.1、1、10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶拷贝/μL等不同浓度梯度,且每个稀释浓度均设置5个平行试验。多重qRT-PCR反应体系为: 10 μL 2×Fast-Start Universal SYBR Green Master, 0.1~2.0 μL之间依次递增筛选上下游引物(10 μmol/L), 1 μL模板, 8 μL灭菌超纯水, 总反应体积为20 μL。反应条件为: 95℃ 3 min, 94℃ 20 s、42~60℃(依次递增筛选退火温度) 15 s、72℃ 30 s, 36个循环, 72℃ 5 min。

1.2.3 灵敏度试验

选择浓度分别为0、0.1、1、10、10²、10³、10⁴拷贝/μL的阳性标准品作为模板,按照方法1.2.2中建立的反应体系和反应条件进行多重qRT-PCR检测,测试灵敏度,判断最低检测限。每个浓度分别平行测试5次,观察和记录荧光信号,当反应结束后,在整个36循环内出现明显的荧光信号,判定为阳性,否则判定为阴性。

1.2.4 特异性试验

将临床收集的*Escherichia coli*、*Salmonella enterica*、BVDV、BPV、BRV、BCV等样本混合,应用生物基因组DNA/RNA试剂盒提取病原体基因组,标记为Sample1。同时,选择*Staphylococcus aureus*、*Pasteurella multocida*、*Mycoplasma bovis*、IBRV、BKV、PCV-2等样本混合,采用同样的方法提取基因组,标记为Sample2。分别以Sample1、Sample2、10³拷贝/μL阳性质粒标准品、灭菌超纯水作为模板,进行多重qRT-PCR检测,反应体系和反应条件按照方法1.2.2中筛选确定的,测试特异性。

1.2.5 重复性试验

选择1、10²、10⁴ 拷贝/μL阳性质粒标准品作为检测模板，同一批次的每个样本检测5 次，同时对不同批次样本进行检测5 次，分别观察和记录荧光信号，计算其组内和组间变异系数。分析和评价多重qRT-PCR方法检测犊牛腹泻病的重复性。

1.2.6 临床样本验证

分别向315 份腹泻犊牛粪便样本中加入10 倍体积的PBS溶液，充分震荡使其混悬，然后反复冻融3 次，10 000 r/min离心10 min，收集上层清液，应用生物基因组DNA/RNA试剂盒提取病原体基因组，作为多重qRT-PCR检测的临床样本模板，计算阳性检出率。同时，应用单一qRT-PCR对上述临床样本进行检测，计算其阳性检出率情况。比较分析多重qRT-PCR与单一qRT-PCR两种检测方法的阳性检出率。

2 结果

2.1 检测犊牛腹泻病多重 qRT-PCR 方法的建立

构建的重组质粒经NCBI库中Blast比对分析，目标基因序列与基因库中所查询的标准参考菌株、毒株基因序列完全相同，同源性达到100%，将其稀释调配成10³ 拷贝/μL，作为多重qRT-PCR检测的质粒阳性标准品模板。经不同浓度引物和退火温度筛选，建立多重qRT-PCR检测方法。多重qRT-PCR反应体系为：10 μL 2×Fast-Start Universal SYBR Green Master，0.5 μL上游引物，0.5 μL下游引物，1 μL模板，8 μL灭菌超纯水，总反应体积为20 μL。反应条件为：95 ℃ 3 min；94 ℃ 20 s、56 ℃ 15 s、72 ℃ 30 s，36 个循环；72 ℃ 5 min。

2.2 多重 qRT-PCR 方法的灵敏度测试

由图1可知，当质粒阳性标准品浓度为1 拷贝/μL 时，在30~32个循环开始明显起峰，且质粒标准品浓度越高，起峰越快，峰值越高。当质粒标准品浓度为0和0.1 拷贝/μL时，在36 个循环内均未出现任何显著的荧光信号峰。结果表明，本研究建立的多重qRT-PCR检测犊牛腹泻病的灵敏度为1 拷贝/μL。

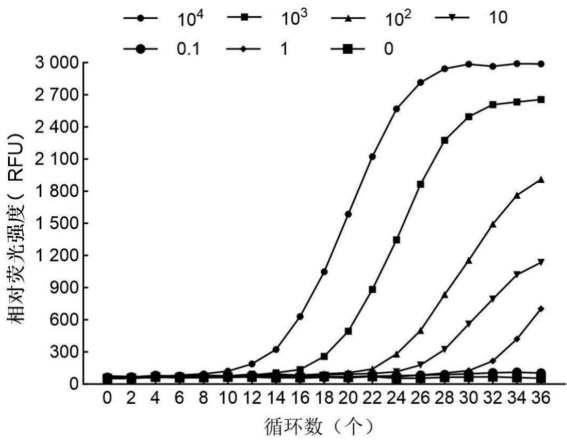


图 1 多重 qRT-PCR 方法的灵敏度测试
Fig.1 Sensitivity Test of the Multiplex qRT-PCR Method

2.3 多重 qRT-PCR 方法的特异度测试

由图2可知，*Escherichia coli*、*Salmonella enterica*、BVDV、BPV、BRV、BCV混合临床样本1和阳性质粒标准品的多重qRT-PCR检测结果为阳性，出现典型的扩增曲线。*Staphylococcus aureus*、*Pasteurella multocida*、*Mycoplasma bovis*、IBRV、BKV、PCV-2混合临床样本2和灭菌超纯水的多重qRT-PCR检测结果为阴性，没有出现任何明显的扩增曲线。结果表明，本研究建立的多重qRT-PCR方法对犊牛腹泻病检测具有良好的特异性，与其他病原体无交叉反应。

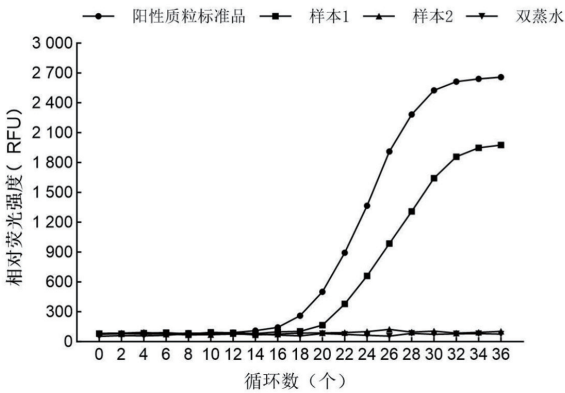


图 2 多重 qRT-PCR 方法的特异度测试
Fig.2 Specificity Test of the Multiplex qRT-PCR Method

2.4 多重 qRT-PCR 方法的重复性试验

如表2所示，选择1、10²、10⁴ 拷贝/μL 3种浓度标准品作为检测样本，进行多重qRT-PCR检测重

复性，其组内重复试验的变异系数（CV值）均小于1.00%（分别为0.94%、0.78%、0.63%），组间重复试验的变异系数（CV值）均小于2.00%（分别为1.57%、1.22%、0.84%），表明同一批次和不同批次间的检测重复性良好。

表 2 多重 qRT-PCR 检测犊牛腹泻病的组内和组间重复性试验

Table 2 Intra-group and Inter-group Repeatability Tests of Multiplex qRT-PCR for Detecting Calf Diarrhea Disease

标准品浓度 (拷贝/μL)	n	组内重复试验		组间重复试验	
		($\bar{x} \pm s$ false)	CV (%)	($\bar{x} \pm s$ false)	CV (%)
1	5	711±14	0.94	708±19	1.57
10 ²	5	1 908±36	0.78	1 913±41	1.22
10 ⁴	5	2 992±47	0.63	2 986±65	0.84

2.5 临床样本验证

如表3所示，应用本研究建立的多重qRT-PCR对315份腹泻犊牛的粪便临床样本基因组进行检测，共检测出248份阳性（78.73%），其中*Escherichia coli*阳性数为5（1.59%），*Salmonella enterica*阳性数为12（3.81%）、BVDV阳性数为176（55.87%）、BPV阳性数为3（0.95%）、BRV阳性数为37（11.75%）、BCV阳性数为15（4.76%）。在248份阳性样本中，有42份（占阳性样本的16.94%，占总数的13.33%）为两种或以上病原体的混合感染。结果表明，多重qRT-PCR方法与单一PCR方法的阳性率完全一致，结果符合率为100%，本研究建立的检测犊牛腹泻病多重qRT-PCR方法具有准确、可靠的结果。

3 讨论

目前临床对犊牛腹泻病检测的主要方法有病原体分离鉴定、血清ELISA检测和分子生物学检

测等^[9-11]。例如刘英玉等^[10]对新疆某奶牛养殖场内的49份腹泻犊牛粪便进行病原体分离培养与鉴定，共检测出3种病原菌，分别为奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、都柏林沙门氏菌。彭龙^[11]建立一种检测犊牛病毒性腹泻的ELISA方法，成功从新疆某养殖场内发生腹泻犊牛的178份粪便样本中检测出牛病毒性腹泻黏膜病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒。然而，随着现代牧业的发展，犊牛腹泻通常由多种病原体混合感染，这给临床诊断造成更大难度。

多重qRT-PCR方法可以一步检测出犊牛腹泻可能存在的病原体，节省人力、物力和时间成本，与单一PCR方法相比，显示出较高的优越性能^[12]。近年来，已有多位学者建立了犊牛腹泻病多重PCR的检测方法。王文佳等^[13]建立一种牛环曲病毒和牛诺如病毒的双重PCR检测方法，可以同时检测这两种病毒，灵敏度分别为1.86×10⁴拷贝/μL、1.90×10⁴拷贝/μL，且与单一PCR检测结果完全一致。高亚桃等^[14]建立一种同时检测牛传染性鼻气管炎病毒、牛轮状病毒、牛病毒性腹泻病毒的多重PCR方法，灵敏度为10⁵拷贝/μL，且与其他病原体没有交叉发应，特异性较高。但是，这些传统的多重PCR方法的灵敏度仍然较低，步骤繁琐，时间长，很难在临床大样本检测中推广应用。

荧光定量PCR检测方法是利用荧光染料标记特异性探针和特异性引物对目的基因片段进行体外扩增，从而实现定量的目标。张梦媛等^[15]基于荧光定量PCR技术，建立一种检测犊牛腹泻病的多重qRT-PCR方法，可以同时检测牛细小病毒、牛轮状病毒、牛冠状病毒、牛病毒性腹泻病毒4种病原体，灵敏度达到10²拷贝/μL，高于普通的多重PCR检测方法，且保持良好的特异性，值得推广应用。本研究建立一种可同时检测细菌和病毒混合感染导致犊牛

表 3 多重 qRT-PCR 检测临床样本结果

Table 3 Results of Clinical Sample Detection by Multiplex qRT-PCR

类别	总数(例)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	BVDV	BPV	BRV	BCV	混合感染
阳性数(例)	248	5	12	176	3	37	15	42
阳性率(%)	78.73	1.59	3.81	55.87	0.95	11.75	4.76	13.33

腹泻病的多重qRT-PCR方法，既可检测细菌又可检测病毒，灵敏度为1 拷贝/ μ L，远远高于国内相关文献报道^[13-15]。

本研究灵敏度高，可能由于选择的靶基因区域具有较高的保守性和高效扩增能力。同时，精心优化引物浓度和退火温度，更好消除引物二聚体并提高扩增效率。本研究中，高性能的预混液应用也是提高灵敏度的关键因素之一。与以往研究相比，本研究的多重qRT-PCR方法能够同时涵盖犊牛腹泻病的多种细菌和病毒，为将来临床大规模混合感染的快速精准诊断提供参考。

此外，本研究建立的多重qRT-PCR方法特异性较高，且在315 份临床样本中阳性率达到78.73%，混合感染有42 份（13.33%），与单一PCR检测结果的阳性率完全一致。这进一步表明本研究建立的检测方法更准确、可靠。

4 小结

本研究成功建立了一种可同时检测6 种犊牛腹泻病原体的多重qRT-PCR方法，对质粒DNA的检测灵敏度可达1 拷贝/ μ L，与常见其他病原体无交叉反应，与单一PCR方法对315 份临床样本的符合率为100%，适于大规模流行病学调查和临床混合感染的快速诊断，可推广应用。

参考文献

[1] 王娜, 戴伶俐, 白帆, 等. 犊牛感染性腹泻的诊断及综合防治措施[J]. 当代畜禽养殖业, 2024, 44 (6) : 46-47.
[2] 郭明华. 犊牛腹泻病的兽医治疗及其防控[J]. 中国动物保健,

2024, 26 (11) : 57-58.
[3] 乔波, 石慧, 温书香. 某新建肉牛场犊牛腹泻病原检测及治疗[J]. 现代牧业, 2024, 8 (2) : 11-16.
[4] 张亮, 张云飞, 蒋仁新, 等. 2017—2018年山东省奶牛场犊牛腹泻相关病毒病原学检测[J]. 中国动物检疫, 2020, 37 (6) : 16-20.
[5] 段新华, 李建军, 杨学云, 等. 致犊牛腹泻肠毒素大肠杆菌多重PCR检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2010, 27 (1) : 33-34.
[6] 许会会, 张东, 张如, 等. 多病源犊牛腹泻病原感染特征及实验室诊断[J]. 特产研究, 1-8[2025-01-14].
[7] 师志海, 王文佳, 兰亚莉, 等. 牛诺如病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51 (7) : 1728-1736.
[8] 王梦佳, 刘莹, 彭志豪, 等. 牛诺如病毒RdRp基因TaqMan 荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J]. 北方牧业, 2021 (Z1) : 22-23.
[9] 苗书魁, 王俊伟, 陆桂丽, 等. 犊牛腹泻症的病原学检测及鉴定[J]. 新疆农业科学, 2024, 61 (6) : 1535-1543.
[10] 刘英玉, 郑晓琴, 李瑞鹏, 等. 新疆某奶牛场犊牛腹泻病原菌检测及鉴定[J]. 家畜生态学报, 2023, 44 (11) : 68-71, 86.
[11] 彭龙. 犊牛病毒性腹泻病原检测及牛冠状病毒ELISA方法建立[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
[12] 向敏, 周源, 胡修忠, 等. 致犊牛腹泻大肠杆菌毒力因子多重PCR检测方法的建立[J]. 中南农业科技, 2024, 45 (1) : 28-30.
[13] 王文佳, 徐照学, 张彬, 等. 牛诺如病毒和牛环曲病毒双重PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2020, 40 (5) : 892-896.
[14] 高亚桃, 李妍, 刘立元, 等. 河北省致犊牛腹泻主要病原多重PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2021, 41 (10) : 1930-1936.
[15] 张梦媛, 钟林翰, 韩言言, 等. 致牛腹泻主要病毒多重实时荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J]. 动物医学进展, 2023, 44 (11) : 26-32.