

牛冠状病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用

何琪富¹, 郭紫晶¹, 李然¹, 周军¹, 岳华^{1,2}, 张斌^{1,2}, 汤承^{1,2*}

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 国家民委青藏高原动物疫病防控创新团队, 成都 610041)

摘要: 本试验的目的是建立更加灵敏的检测牛冠状病毒(BCoV)的 RT-PCR 方法, 并对川西北草原牦牛病料进行 BCoV 病原检测。选择 BCoV 聚合酶基因 *Nsp7-Nsp9* 片段设计引物, 通过反应条件和体系优化, 建立检测 BCoV 的 RT-PCR 方法并应用于临床样本检测。结果显示: 所建方法特异性和重复性好, 灵敏性达到 $1 \times 10^{-2} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 该方法对肉牛和牦牛 BCoV 都有良好的检测效果, 优于比较的两种以 BCoV *N* 基因为靶点的 RT-PCR 方法; 对 2016 年采集的川西北草原牦牛病料进行了 BCoV 的检测, 结果显示: 125 份腹泻牦牛粪便样本中 BCoV 的检出率为 71.20%, 98 份患呼吸道疾病的牦牛鼻腔棉拭子中 BCoV 的检出率为 72.45%。此次建立的 BCoV RT-PCR 检测方法特异性和重复性好、灵敏度高; BCoV 是当前川西北草原牦牛腹泻和呼吸道疾病综合征的重要病原。

关键词: 牛冠状病毒; RT-PCR 方法; 牦牛; 腹泻; 呼吸道疾病综合征

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)10-2292-07

Establishment and Application of a RT-PCR Assay for Detecting Bovine Coronavirus

HE Qi-fu¹, GUO Zi-jing¹, LI Ran¹, ZHOU Jun¹,

YUE Hua^{1,2}, ZHANG Bin^{1,2}, TANG Cheng^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University,

Chengdu 610041, China; 2. Innovation Team for Animal Epidemic Diseases Prevention and Control on Qinghai-Tibet Plateau, State Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a more sensitive RT-PCR assay for detecting BCoV and to detect CoV from clinically ill yak in the northwest grasslands of Sichuan. The RT-PCR assay was established through designing primers targeted to *Nsp7-Nsp9* fragment of BCoV polymerase gene and optimizing the reaction conditions and system, and the clinical samples were detected by the RT-PCR assay. Results revealed that the RT-PCR assay have good specificity and stability, and the detection limit of viral nucleic acid of the assays was $1 \times 10^{-2} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Comparing to two RT-PCR assays targeted to the *N* gene of BCoV, the RT-PCR assay in this study has a remarkable detection rate for BCoV in clinical samples both of bovine and yak. In 125 diarrhea samples of yak in the northwest grasslands of Sichuan in 2016, the CoV detection rate was 71.20%, In 98 nasal cavity samples of yak in the northwest grasslands of Sichuan in 2016, the CoV detection rate was 72.45%. The RT-PCR assay for detecting BCoV established in this study has a good specificity and stability. BCoV is an important causative agent of yak diarrhea and respiratory disease syndrome in the northwest grasslands of Sichuan.

Key words: bovine coronavirus; RT-PCR assay; yak; diarrhea; bovine respiratory disease syndrome

收稿日期: 2018-01-19

基金项目: 十三五国家重点研发计划课题(2016YFD0500907); 国家民委“青藏高原动物疫病防控创新团队”(13TD0057); 西南民族大学研究生“创新型科研项目”(CX2017SZ061)

作者简介: 何琪富(1993-), 男, 甘肃庆阳人, 硕士生, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: 1024456192@qq.com

* 通信作者: 汤承, 教授, 博士, 主要从事动物病原生物学研究, Tel: 028-85528276, E-mail: tangcheng101@163.com

牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV) 可以引起新生犊牛腹泻、成年牛冬痢和呼吸道疾病,该病毒在世界范围内流行,给养牛业造成了巨大的经济损失^[1]。BCoV 属于冠状病毒科,冠状病毒属 2a 亚群,其基因组是 RNA 病毒中最大的,长度为 27~32 kb,主要包括 2 个开放阅读框 (ORF1a 和 ORF1b) 和 5 个结构蛋白:血凝素酯酶蛋白 (HE)、纤毛蛋白 (S)、小膜蛋白 (E)、跨膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N)。编码核衣壳蛋白的 *N* 基因高度保守,常作为 BCoV 的分子检测的靶基因^[2]。

RT-PCR 方法是病原检测和流行病学调查的主要方法,目前国内外已建立了多种检测 BCoV RT-PCR 方法,靶基因多为 *N* 基因^[2-9],也有选择编码跨膜蛋白的 *M* 基因^[10]。最近作者实验室采用国外 BCoV 诊断和流行病学调查常用的 RT-PCR 方法^[2],以及国内常用的 RT-PCR 方法^[3] 复核宏病毒组技术证实为 BCoV 阳性的牛腹泻粪便样本时,结果两种方法均未能检出 BCoV,其原因有待于进一步研究。本试验的目的是建立灵敏度更高的 BCoV RT-PCR 检测方法,应用该方法对川西北草原牦牛腹泻粪便样本和患呼吸道疾病综合症的牦牛鼻腔棉拭子进行 BCoV 的检测。

1 材料与方法

1.1 病毒(菌)株、临床样本

BCoV 阳性株,用于特异性验证的病毒(菌)株及核酸样本:牛轮状病毒 (bovine rotavirus virus, BRV)、牛病毒性腹泻/黏膜病病毒 (bovine viral diarrhoea virus, BVDV) Swun0603、牛星状病毒 (bovine astrovirus, BAstV) Swun0201、牛肠炎病毒 (bovine enterovirus, BEV) Swun0510、牛细小病毒 (bovine parvovirus, BPV)、牛 kobu 病毒 (bovine Kobu virus, BKV)、牛源 K99 大肠杆菌 Swun4025、牛源都柏林沙门菌 Swun3736、牛源产气荚膜梭菌 Swun2930、牛源空肠弯曲杆菌 Swun1639、牛源艾美尔球虫、牛源安氏隐孢子虫的核酸样本由本实验室保存。

用于检测方法比较的样本:56 份 3~6 月龄肉牛腹泻粪便样本 (2017 年采自四川省 4 个养殖场)、57 份 3~6 月龄肉牛有明显呼吸道疾病症状的鼻拭子 (2017 年采自四川省 4 个养殖场)、20 份 3 月龄以内牦牛腹泻粪便样本 (2015 年采自四川省红原县)、20 份 3 月龄以内牦牛有明显呼吸道疾病症状的鼻

拭子 (2015 年采自四川省红原县)。

用于流行病学调查的样本:125 份 3 月龄以内牦牛腹泻粪便样本 (2016 年 6~8 月采自四川省阿坝藏羌自治州红原县、若尔盖县、阿坝县的 8 个牧场)、98 份 6 月龄以内有咳嗽、流鼻涕等明显呼吸道疾病症状牦牛的深部鼻腔拭子样本 (2016 年 7~10 月采自四川省阿坝藏羌自治州红原县、若尔盖县、阿坝县的 7 个牧场)。所有样本于 -80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol™ Reagent、PrimeScript™、PMD19-T 克隆载体等购于 TaKaRa 公司;DNA Marker、DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒购于宝生物工程 (大连) 股份有限公司;AXY prep™ DNA 胶回收试剂盒购于 Axygen 公司;紫外分光光度计 Cary50Probe (Vatian 公司, 美国);凝胶成像系统 Doc2000 (Bio-Rad 公司, 美国);高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 德国)。

1.3 检测引物的设计与合成

在对 GenBank 收录的全部 19 条 BCoV 全基因组序列及本实验室宏病毒组数据 (GenBank accession number: srp 108885) 生物信息学分析的基础上,选择比 *N* 基因更为保守的聚合酶基因 *Nsp7-Nsp9* 片段设计特异性检测引物,引物序列:F:5'-CGAGTTGAACACCCAGAT-3' R:5'-GAGACGG-GCATCTACTACT-3',见表 1,扩增长度为 230 bp,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 核酸提取

将临床粪便样本及呼吸道样本与 PBS (1:5) 充分重悬混匀,-80 °C 冰箱中反复冻融 3 次,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃沉淀,再以 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清,然后按照 Trizol Reagent 说明书提取总 RNA,并按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA,-20 °C 保存备用;DNA 提取采用酚-氯仿法,-20 °C 保存备用。

1.5 阳性质粒的制备

以 BCoV 阳性 cDNA 为模板,加入本试验设计检测引物进行 PCR 反应,PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,用胶回收试剂盒回收目的片段,并将其克隆至 pMD19-T 载体,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选出阳性克隆接入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养 8 h,用质粒提取试剂盒提取重组质粒,送生工生物有限公司测序。

1.6 反应体系及条件的优化

采用 25 μL 体系(预混酶 12.5 μL , BCoV 阳性标准品 1.5 μL , 上、下游引物各 1 μL , ddH₂O 补足至 25 μL), 对退火温度从 45~55 $^{\circ}\text{C}$ 进行优化, 再以优化的退火温度对浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的引物用量(0.5~1.5 μL)进行优化。

1.7 特异性评价

用本实验建立的 RT-PCR 方法对“1.1”中待检病原的核酸样本进行检测, 并设立标准阳性样本和阴性对照, 以评价该方法的特异性。

1.8 重复性评价

用本试验建立的 RT-PCR 方法对 3 个阳性模板及 3 份阴性样本进行 3 次重复检测, 以评价方法

的重复性。

1.9 敏感性测定

将牛 CoV 阳性标准品 10 倍递增稀释后作为模板(1×10^0 、 1×10^{-1} ~ 1×10^{-6}), 对本试验建立的 RT-PCR 方法进行检测, 确定检测下限。

1.10 三种 RT-PCR 方法的比较

1.10.1 三种方法对临床样本中 BCoV 检出率的比较 采用所建立的 RT-PCR 方法和文献[2]、[3]报道的检测 BCoV 的 RT-PCR 方法同时对 56 份肉牛、20 份牦牛腹泻粪便样本、57 份肉牛及 20 份牦牛呼吸道鼻腔拭子进行检测, 比较这 3 种方法的检出率, 引物信息见表 1, 三种方法检测为阳性的 PCR 产物全部送公司测序。

表 1 RT-PCR 方法的引物信息表

Table 1 Primers information for three kinds of RT-PCR assay

检测方法 Test method	靶基因 Target gene	引物序列 Primer sequence	引物来源 Source of primers
1	聚合酶基因	F:5'-CGAGTTGAACACCCAGAT-3' R:5'-GAGACGGGCATCTACTACT-3'	本研究
2	N	F:5'-GCAATCCAGTAGTAGAGCGT-3' R:5'-CTTAGTGGCATTCTTGCCAA-3'	[2]
3	N	F:5'-GAGCGTCCTTTGGAAATCGT-3' R:5'-GCTTAGTACTTGTGTGGC-3'	[3]

1.10.2 三种方法的灵敏度比较 利用文献[2]和文献[3]中检测引物进行 PCR 反应, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 并将其克隆至 pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选出阳性克隆接入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h, 用质粒提取试剂盒提取重组质粒, 送生工生物有限公司测序。将阳性质粒 10 倍递增稀释后作为模板(1×10^0 、 1×10^{-1} ~ 1×10^{-6}), 比较三种 RT-PCR 检测方法的检测下限。

1.11 临床样本中 BCoV 的检测

采用本试验建立的 RT-PCR 方法对 2016 年采自川西北草原的 125 份牦牛腹泻粪便样本以及 98 份有咳嗽、流鼻涕等明显呼吸道疾病症状牦牛的深部鼻腔拭子样本进行 BCoV 的检测, 分析牦牛 CoV 在川西北草原的流行情况。

2 结果

2.1 优化的 RT-PCR 反应体系及条件

优化的 RT-PCR 反应体系及条件: 预混酶 12.5 μL , 上、下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)各 1 μL , cDNA 1.5 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应结束。

2.2 方法的特异性

该方法能从 BCoV 阳性样本中检出目的基因片段, 对 BRV、BVDV、BAstV、BEV、牛细小病毒、牛 Kobu 病毒、牛源 K99 大肠杆菌、牛源都柏林沙门菌、牛源产气荚膜梭菌、牛源艾美尔球虫、牛源安氏隐孢子虫的核酸样本无扩增。

2.3 方法的重复性

用本试验设计的检测引物对同一模板 3 次重复检测结果一致,证明该方法有良好的重复性(结果未展示)。

2.4 方法的敏感性

对“1.5”中所制备阳性标准品质粒浓度进行测定,质量浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,敏感性检测结果显示,在 1×10^7 稀释度阳性标准品仍可见目的条带,对 BCoV 的核酸最低检测限为 $1 \times 10^{-2} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,说明本试验设计方法具有较好的灵敏性。

表 2 三种方法检出率比较

Table 2 The detection rate of three kinds of RT-PCR assay

检测方法 Test method	肉牛样本类型及结果 Sample type and results of beef cattle		牦牛样本类型及结果 Sample type and results of yak		方法来源 Source of primers
	腹泻粪便($n=56$)	呼吸道($n=57$)	腹泻粪便($n=20$)	呼吸道($n=20$)	
	1	12.50%(7/56)	12.28%(7/57)	75.00%(15/20)	
2	5.36%(3/56)	7.02%(4/57)	15.00%(3/20)	20.00%(4/20)	[2]
3	5.36%(3/56)	7.02%(4/57)	15.00%(3/20)	20.00%(4/20)	[3]

2.5.2 三种检测 BCoV 方法的灵敏度 利用核酸蛋白浓度分析仪测量三种阳性标准品质粒浓度均为 $100 \text{ g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,敏感性检测结果显示,本试验所建立的方法的灵敏度为 $1 \times 10^{-2} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,参考文献[2]报道方法和参考文献[3]报道方法的灵敏度分别为 1×10^0 、 $1 \times 10^1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。本试验建立方法灵敏性比参考文献[2]报道的方法的灵敏性高了两个数量级,比参考文献[3]报道的方法的灵敏性高了三个数量级。

表 3 牦牛腹泻样本中 BCoV 的检出率

Table 3 The detection rate of yak BCoV infection in diarrhea samples

牧场 Farms	A	B	C	D	E	F	G	H	合计 Total
样本数/份 Samples	18	19	30	10	10	5	13	20	125
阳性样本数/份 Positive samples	13	13	21	7	7	4	9	15	89
阳性率/% Positive rates	72.22	68.42	70.00	70.00	70.00	80.00	69.23	75.00	71.20

表 4 牦牛呼吸道样本中 BCoV 的检出率

Table 4 The detection rate of yak BCoV infection in nasal cavity samples

牧场 Farms	A	B	C	D	E	F	G	合计 Total
样本数/份 Samples	15	15	10	15	17	14	12	98
阳性样本数/份 Positive samples	11	10	7	11	13	10	9	71
阳性率/% Positive rates	73.33	66.67	70.00	73.33	76.47	71.43	75.00	72.45

2.5 三种检测 BCoV 方法的比较

2.5.1 三种检测 BCoV 方法对临床样本的检出率 三种方法对临床样本中 BCoV 的检出率见表 2,检出的全部阳性 PCR 产物测序结果证实均为 BCoV 基因片段。方法 2 和方法 3 检出 BCoV 阳性的数量和编号一致,且本试验建立的方法检出的阳性样本包含了方法 2、3 检测的全部样本。可见本试验建立的 RT-PCR 方法对肉牛和牦牛的 BCoV 检测都有良好的检测效果。

2.6 临床样本中 BCoV 的检测

利用本试验建立的 RT-PCR 检测方法对 2016 年 6—8 月份采自四川省阿坝藏羌自治州红原县、若尔盖县、阿坝县的 125 份犏牛腹泻粪便样本以及 98 份有呼吸道疾病综合征的牦牛鼻腔拭子进行 BCoV 的检测,结果如表 3、表 4 所示。对检出的阳性样本随机挑选 20% 进行测序,证实检出无误,同时也进一步验证本试验建立的 RT-PCR 方法检测结果的准确性。

3 讨论

犊牛腹泻是临床上最常见的一类疾病,给养牛业造成了严重损失。犊牛腹泻病因复杂,其中病原微生物感染是造成牛腹泻的重要原因,引起犊牛腹泻的常见病毒有 BCoV、BRV、BVDV^[11-12]。并且有新的致腹泻病毒出现,如诺如病毒、Nebovirus 等^[13-14],使诊断更加困难。本实验室前期用宏病毒组技术无偏差鉴定犊牛腹泻样本中病毒种类时,发现存在 BCoV 核酸序列(GenBank accession number: srp 108885),但采用国外 BCoV 诊断和流行病学调查常用的 RT-PCR 方法^[2]以及国内常用的 RT-PCR 方法^[3]进行复核时,两种方法均未能检出。由于 BCoV 是危害养牛业重要病原之一,因此有必要建立新的 RT-PCR 方法,以提高对临床样本中 BCoV 的检出率。鉴于采用的两个以 *N* 基因为检测靶点的 RT-PCR 方法未能检出宏病毒组技术证实为 BCoV 阳性的牛腹泻粪便样本。因此,我们对 GenBank 中全部 19 条 BCoV 的聚合酶基因以及 47 条 *N* 基因的序列进行生物信息学分析,发现 *N* 基因变异率为 0.011,超过 20% 毒株在同一位点发生变异比例为 0.014(20/1 470);聚合酶基因 *Nsp7-Nsp9* 序列变异率为 0.004,超过 20% 毒株在同一位点发生变异比例为 0.003(10/3 193),其变异率显著低于 *N* 基因变异率。同时,聚合酶基因在人和动物的 CoV 中也是常用的分子检测靶点^[15-16]。因此,根据 BCoV 聚合酶基因 *Nsp7-Nsp9* 片段设计引物,成功建立方法,特异性和重复性好,灵敏性是目前 BCoV RT-PCR 检测方法中最高^[2-3],对肉牛和牦牛都有很好的检测效果,为 BCoV 的检测和流行病学调查提供了有力工具。

关于牦牛 BCoV 的流行病学资料很少,还没有见到关于病原流行病学调查的报道。但从仅有的 3 篇相关牦牛血清流行病学调查^[17-19]数据表明,BCoV 的血清阳性率很高。川西北草原属青藏高原东南缘,是我国五大牧区之一,也是我国主要的牦牛养殖地区之一。由于青藏高原特殊的自然地理环境,牦牛产犊主要集中在 4—5 月份,犊牛腹泻导致发病率和死亡率都很高,造成严重损失^[20]。作者对 2016 年 6—8 月采自该地区犊牛腹泻粪便样本调查表明,BCoV 场阳性率 8/8,样本阳性率 71.20%,表明川西北牦牛腹泻样本中 BCoV 检出率很高。鉴于 BCoV 是犊牛腹泻、成年牛冬痢的重要病原,可以确

定 BCoV 是川西北牦牛腹泻的重要原因,为犊牛腹泻的防控提供了科学依据。

牛呼吸道疾病综合征是危害养牛业的另一大类疾病^[21-22],其中病毒感染是重要病因。常见的病毒有 BPIV3、BVDV、IBRV、BCoV、BRSV 等^[23-27]。病毒感染后损害呼吸道黏膜的完整性引起发病,在细菌、支原体等混合/继发感染时病情加重^[28-29]。呼吸道疾病综合征也是牦牛多发病,但目前未见关于牦牛呼吸道疾病综合征的病原流行病学资料。对 2016 年川西北草原牦牛 98 份呼吸道样本进行病原学检测,牦牛 CoV 场阳性率是 7/7,样本阳性率 72.45%。BCoV 不仅可以引起新生犊牛腹泻、成年牛冬痢,而且是牛呼吸道疾病综合征的重要病因^[25,30]。因此,在川西北牦牛呼吸道疾病综合征中 BCoV 扮演着重要角色。

4 结论

成功建立 BCoV 的 RT-PCR 检测方法,该方法特异性和重复性好,灵敏性达到 $1 \times 10^{-2} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,为 BCoV 的检测和流行病学调查提供了新的技术手段;流行病学调查结果显示川西北草原牦牛腹泻粪便样本和表现有呼吸道疾病症状牦牛的深部鼻腔拭子中 BCoV 阳性率很高,证明 BCoV 是川西北草原牦牛腹泻和呼吸道疾病综合征的重要病原。

参考文献(References):

- [1] CLARK M A. Bovine coronavirus[J]. *Br Vet J*, 1993, 149(1):51-70.
- [2] CHO K O, HASOKSUZ M, NIELSEN P R, et al. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection[J]. *Arch Virol*, 2001, 146(12):2401-2419.
- [3] 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 method for bovine coronavirus detection[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2009, 45(2):25-27. (in Chinese)
- [4] 沈付烧. 牛冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[D]. 济南: 山东师范大学, 2015.
SHEN F R. Development and application of a SYBR green I real-time PCR assay for detection of bovine

- coronavirus[D]. Ji'nan; Shandong Normal University, 2015. (in Chinese)
- [5] 沈付尧, 杨建乐, 赵贵民, 等. 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[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(6):22-24, 27.
- SHEN F R, YANG J L, ZHAO G M, et al. Development and preliminary application of a SYBR Green I real-time PCR assay for detection of bovine coronavirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(6):22-24, 27. (in Chinese)
- [6] AMER H M, ALMAJHDI F N. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus[J]. *Mol Cell Probes*, 2011, 25(2-3):101-107.
- [7] JEONG J H, KIM G Y, YOON S S, et al. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004[J]. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(2):187-189.
- [8] TAKIUCHI E, STIPP D T, ALFIERI A F, et al. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control[J]. *J Virol Methods*, 2006, 131(2):148-154.
- [9] TSUNEMITSU H, SMITH D R, SAIF L J. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR[J]. *Arch Virol*, 1999, 144(1):167-175.
- [10] DECARO N, ELIA G, CAMPOLO M, et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay [J]. *J Virol Methods*, 2008, 151(2):167-171.
- [11] CHO Y I, YOON K J. An overview of calf diarrhea-infectious etiology, diagnosis, and intervention[J]. *J Vet Sci*, 2014, 15(1):1-17.
- [12] BLANCHARD P C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2012, 28(3):443-464.
- [13] DI FELICE E, MAUROY A, DAL POZZO F, et al. Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis[J]. *Vet J*, 2016, 207:53-62.
- [14] GUO Z J, HE Q F, YUE H, et al. First detection of Nebovirus and Norovirus from cattle in China[J]. *Arch Virol*, 2018, 163(2):475-478.
- [15] REST J S, MINDELL D P. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting [J]. *Infect Genet Evol*, 2003, 3(3):219-225.
- [16] STEPHENSEN C B, CASEBOLT D B, GANGOPADHYAY N N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay[J]. *Virus Res*, 1999, 60(2):181-189.
- [17] 姚火春, 杜念兴, 徐为燕, 等. 牛冠状病毒的血清流行病学调查[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(2):117-121.
- YAO H C, DU N X, XU W Y, et al. Seroepizootiological survey of bovine coronavirus in cattle, Human and other animals[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1990, 13(2):117-121. (in Chinese)
- [18] 何美琳, 张焕容, 王永, 等. 川西北牦牛 3 种病毒性腹泻病血清学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3):248-251.
- HE M L, ZHANG H R, WANG Y, et al. Serological survey on three viral diarrhea diseases of yaks in Northwest Sichuan Province[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(3):248-251. (in Chinese)
- [19] 袁立岗, 李静, 蒲敬伟, 等. 天山牦牛 8 种呼吸道相关疫病的流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(12):177-179.
- YUAN L G, LI J, PU J W, et al. Prevalence of 8 pathogens related to respiratory diseases of Tianshan Yak[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(12):177-179. (in Chinese)
- [20] 韩照清. 牦牛几种腹泻相关因素研究及其呼吸道疾病血清学调查[D]. 武汉:华中农业大学, 2016.
- HAN Z Q. Reserch of several correlation factors of diarrhea and epidemiology investigate of two respiratory diseases in yaks[D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [21] 王洪梅, 赵贵民, 侯佩莉, 等. 牛呼吸道疾病综合征流行现状及防控技术研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(16):33-39.
- WANG H M, ZHAO G M, HOU P L, et al. Advance on epidemic status and the researches of prevention and control of bovine respiratory disease complex[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(16):33-39. (in Chinese)
- [22] FULTON R W. Bovine respiratory disease research (1983—2009) [J]. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10(2):131-139.
- [23] GRISSETT G P, WHITE B J, LARSON R L.

- Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex[J]. *J Vet Intern Med*, 2015, 29(3):770-780.
- [24] GERSHWIN L J, VAN EENENNAAM A L, ANDERSON M L, et al. Single pathogen challenge with agents of the bovine respiratory disease complex[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11):e0142479.
- [25] SAIF L J. Bovine respiratory coronavirus[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(2):349-364.
- [26] BOILEAU M J, KAPIL S. Bovine coronavirus associated syndromes[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(1):123-146.
- [27] HICK P M, READ A J, LUGTON I, et al. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease[J]. *Aust Vet J*, 2012, 90(10):381-386.
- [28] GRIFFIN D, CHENGAPPA M M, KUSZAK J, et al. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex[J]. *Vet Clinics North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(2):381-394.
- [29] IVES S E, RICHESON J T. Use of antimicrobial metaphylaxis for the control of bovine respiratory disease in high-risk cattle[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2015, 31(3):341-350.
- [30] KISHIMOTO M, TSUCHIAKA S, RAHPAYA S S, et al. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex[J]. *J Vet Med Sci*, 2017, 79(3):517-523.

(编辑 白永平)

勘误

因作者疏忽,将我刊第 8 期刊登的李小璟稿件《猪繁殖与呼吸综合征病毒对 Marc145 细胞自噬相关基因转录的影响及分析》第 1690 页图 2 的纵坐标误标为“病毒滴度/ $\log\text{TCID}_{50} \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1}$ ”。该表述不严谨,现更正为“拷贝数对数 $\log \text{copies}$ ”,特此勘误,并向读者致歉。