

宫英杰, 扈富哥, 王蕾, 等. 犬冠状病毒和犬细小病毒双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 74-78.  
GONG Y J, HU F G, WANG L, et al. Development of a duplex TaqMan real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of canine coronavirus and canine parvovirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 74-78.

## 犬冠状病毒和犬细小病毒双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立

宫英杰<sup>1,2</sup>, 扈富哥<sup>1,2</sup>, 王蕾<sup>3</sup>, 毕振威<sup>2,4</sup>, 钱晶<sup>2,4</sup>, 王建发<sup>1\*</sup>, 谭业平<sup>2,4\*</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014;

3. 南通伊仕生物技术股份有限公司, 江苏 南通 226010;

4. 兽用生物制品(泰州) 国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 旨在建立犬冠状病毒 (CCoV) 和犬细小病毒 (CPV) 双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。针对 CCoV 的 3'UTR 与 CPV 的 VP2 设计引物与探针, 通过对反应体系与条件进行优化, 建立了 CCoV 与 CPV 的双重荧光定量 PCR 检测方法, 并对该方法进行敏感性、特异性、重复性验证与临床样品检验。结果: CCoV 与 CPV 阳性参考质粒浓度在  $10^2 \sim 10^7$  copies/ $\mu$ L, CCoV 与 CPV 的标准曲线  $R^2$  分别为 0.999 与 0.996, 线性关系良好, CCoV 与 CPV 的最低检测限均为 5 copies/ $\mu$ L, 与其他病原无交叉反应, 组内与组间的变异系数均小于 1.38%, 说明该方法灵敏度高、特异性强、重复性良好; 对 113 份临床样本进行检测, 与普通 PCR 比较, 该方法对 CCoV 和 CPV 的检出率较高, 分别为 37.2% 和 40.7%。研究表明, 本试验建立的 CCoV 和 CPV 双重荧光定量 PCR 方法检测效果良好, 为相关疾病的临床诊断、流行病学调查等提供了有力工具。

**关键词:** 犬冠状病毒; 犬细小病毒; 双重实时荧光定量 PCR; TaqMan 探针

中图分类号: S854.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)01-0074-05

## Development of a duplex TaqMan real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of canine coronavirus and canine parvovirus

GONG Yingjie<sup>1,2</sup>, HU Fuge<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>3</sup>, BI Zhenwei<sup>2,4</sup>,

QIAN Jing<sup>2,4</sup>, WANG Jianfa<sup>1\*</sup>, TAN Yeping<sup>2,4\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. Nantong Engens Biotechnology Co., Ltd., Nantong 226010, China;

4. Guotai (Taizhou) Center for Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** A dual TaqMan fluorescence quantitative PCR assay for detection of canine coronavirus and canine parvovirus was established in this study. Primers and probes were designed for 3'UTR of CCoV and VP2 of CPV. After the reaction system and conditions were optimized, the sensitivity, specificity and repeatability of the method were verified and clinical samples were tested. The results showed that the standard curves  $R^2$  of CCoV and CPV positive reference plasmids ranged from  $1 \times 10^7$  copies/ $\mu$ L to  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L, and the linear relationship was good. The minimum detection limits of CCoV and CPV were both 5 copies/ $\mu$ L. There was no cross-reaction with other pathogens, and the coefficient of variation within and between groups was less than 1.38%. The results indicated that this method had high sensitivity, strong specificity and good repeatability. Compared with ordinary PCR, the detection rate of CCoV and CPV using this method was 37.2% higher and 40.7% higher. Therefore, the PCR method established in this study had a good effect and could provide help for clinical diagnosis and epidemiological investigation.

**Keywords:** canine coronavirus; canine parvovirus; dual real-time fluorescent quantitative PCR; TaqMan probe

收稿日期: 2024-01-19; 修回日期: 2024-10-30

第一作者: 宫英杰, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 王建发, 副教授, 研究方向: 兽医分子诊断学, E-mail: wjflw@sina.com; 谭业平, 副研究员, 研究方向: 宠物疾病防治和生物药物研发, E-mail: yepingtan@163.com。

犬冠状病毒 (canine coronavirus, CCoV) 最早于 1974 年由 Binn 发现<sup>[1]</sup>, 属于冠状病毒属, 为一种单链正股 RNA 病毒, 基因组大小在 28 ~ 32 kb 之间。CCoV 包含 11 个开放阅读框 (ORF), 分别编码 ORF1a、ORF1b、S、ORF3a、ORF3b、ORF3c、E、M、N、ORF7a 和 ORF7b<sup>[2]</sup>, 有 2 个非编码区为 5'UTR 和 3'UTR, 基因组在缺失 3'UTR 多聚 Poly A 尾结构情况下病毒不能复制, 因此 3'UTR 的多聚 Poly A 尾结构在冠状病毒复制过程中较重要<sup>[3]</sup>, 3'UTR 序列经对比发现保守性较强。CCoV 感染犬临床上主要表现为急性肠炎, 出现呕吐、腹泻、排便呈水样甚至血便且有恶臭、腹痛加重、脱水、肛门括约肌松弛无弹性等症状<sup>[4]</sup>。CCoV 还可以感染犬以外的多种动物<sup>[5]</sup>。

犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 最早于 1978 年发现<sup>[6]</sup>, 属于细小病毒属, 为一种单链 DNA 病毒, 基因组大小约 5 200 bp, CPV 包含 2 个 ORF, 编码结构蛋白 VP1 和 VP2, 以及非结构蛋白 NS1 和 NS2<sup>[7-8]</sup>, 其中 VP2 对 CPV 的抗原特异性与宿主的分布具有重大影响。CPV 感染犬临床上引起的病例多数呈现肠炎, 少数呈现心肌炎, 该病毒传染性强, 感染犬出现呕吐、腹泻、脱水、血便且有难闻的恶臭味<sup>[9]</sup>。CPV 可感染犬、狐、貉和狼等。

CCoV 与 CPV 在临床上症状相似, 且这 2 种病毒混合感染后加剧疾病的恶化, 在诊断过程中缺少能够准确将 2 种病原区分的方法, 给临床诊断造成一定的困难<sup>[10]</sup>。目前对 CCoV 与 CPV 的普通单重 PCR 与双重 PCR 等检测方法多有报道, 但是普通 PCR 时间长, 操作繁琐, PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳过程

易发生污染<sup>[11]</sup>。另外, 病毒分离培养、ELISA 对样本和环境要求较高, 电子显微镜观察对设备要求较高, 在临床应用上难以开展<sup>[12]</sup>。本研究利用 TaqMan 探针建立了可同时检测 CCoV 与 CPV 的荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法, 具有特异性强、敏感性高等优点, 可做到 CCoV 与 CPV 同时鉴别诊断, 且能提高临床检验结果的准确性, 为临床诊断与流行病学调查提供技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

CCoV 与 CPV 核酸样本均由江苏省农科院兽医研究所宠物创新团队保存; 113 份样本采集于南京市宠物医院伴有消化道疾病犬的肛拭子, 经核酸试剂盒提取得到核酸; 犬腺病毒 2 型 (CAV-2)、犬瘟热病毒 (CDV)、犬钩端螺旋体 (Lep)、犬副流感病毒 2 型 (CPIV-2) 核酸由疫苗毒株中获得。

### 1.2 主要试剂及仪器

病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒, 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、2×HyperProbe OneStep RT-qPCR Kit (UNG), 购自康为世纪生物科技股份有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 由南通伊仕生物科技股份有限公司生产。

### 1.3 引物探针的设计与合成

利用 Primer Express 3.0.1 软件针对 CCoV (登录号: GQ477367.1) 的 3'UTR 片段与 CPV (登录号: KU508407.1) 的 VP2 片段设计引物和探针 (见表 1)。

表 1 CCoV 与 CPV 的特异性引物及探针

| 引物探针   | 序列 (5'→3')                  | 扩增片段大小/bp |
|--------|-----------------------------|-----------|
| CCoV-F | GATTTGATTTGGCAATGCTAGATTT   |           |
| CCoV-R | AACAATCACTAGATCCAGACGTTAGCT | 102       |
| CCoV-P | FAM-TCCATTGTTGGCTCGTCA-MGB  |           |
| CPV-F  | GCAATGGATCAAACCGAAGAA       |           |
| CPV-R  | GCTTTTTGGCGAGACTATCAACTT    | 66        |
| CPV-P  | CY5-AATGGACTGGAATCG-MGB     |           |

### 1.4 阳性参考质粒制备

将构建的 CCoV 和 CPV 的阳性质粒命名为 pUC57-CCoV 和 pUC57-CPV。经分光光度计测定质粒 DNA 浓度 (ng/μL), 按以下公式计算质粒拷贝数:

$$\text{拷贝数 (copies/}\mu\text{L)} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{质粒}$$

浓度 $\times 10^{-9}$ ) / (质粒长度 $\times 660$ )。

### 1.5 双重 RT-qPCR 体系优化

采用方阵法对 25 μL 反应体系优化, 其中加入 2×HyperProbe OneStep RT-qPCR Kit (UNG) 12.5 μL, 浓度为 10 μmol/L 上下游引物加入 0.1~0.5 μL, 浓度为 10 μmol/L 探针加入 0.1~0.5 μL, 模板加入

5  $\mu\text{L}$ ，模板采用阳性样本核酸，最后使用去离子水补齐 25  $\mu\text{L}$  体系。退火温度在 56~60  $^{\circ}\text{C}$  进行体系优化，以获得最佳反应条件。

### 1.6 标准曲线的建立

将测得的质粒浓度使用 DNA 稀释液依次对其进行 10 倍梯度稀释，将  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  浓度的阳性参考质粒进行 PCR 扩增，制作标准曲线。

### 1.7 特异性试验

使用病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒对 CCoV、CPV、CAV-2、CDV、Lep 和 CPIV-2 提取核酸，进行 RT-qPCR 扩增，阴性样本为去离子水。

### 1.8 灵敏度检测

对稀释成  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^{0.5}$  copies/ $\mu\text{L}$  的 CCoV 和 CPV 阳性参考质粒使用优化后的反应体系进行扩增，确定最低检测浓度。

### 1.9 重复性试验

选取 3 个梯度的样品 ( $10^6$ 、 $10^5$  和  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 同一时间内重复检测 3 次，不同时间对 3 个稀释度样品重复检测 3 次，根据阈值循环数 (Ct) 计算变异系数，检测重复性。

### 1.10 临床检测

利用本试验创建的 CCoV 和 CPV 双重 RT-qPCR 检测方法和常用的普通 PCR 检测方法<sup>[13-14]</sup>对南京市宠物医院采集的犬消化道拭子样本 113 份进行检测，并对结果进行分析。

### 1.11 数据统计分析

试验数据用 SPSS 软件中 *t* 检验统计方法进行分析，结果用“平均数 $\pm$ 标准差”表示，根据得到的 Ct 值计算平均值、标准差、变异系数，以确定该方法重复性。

## 2 结果

### 2.1 双重 RT-qPCR 体系的建立与优化

采用方阵法对 CCoV 和 CPV 退火温度与体系优化后，最终确定总体系为 25  $\mu\text{L}$ ，其中：2  $\times$  HyperProbe OneStep RT-qPCR Kit (UNG) 12.5  $\mu\text{L}$ ，CCoV 和 CPV 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.2  $\mu\text{L}$ ，探针 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ ，模板 5  $\mu\text{L}$ ，去离子水补齐 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序：37  $^{\circ}\text{C}$  2 min；55  $^{\circ}\text{C}$  5 min；95  $^{\circ}\text{C}$  3 min；95  $^{\circ}\text{C}$  10 s，60  $^{\circ}\text{C}$  30 s，45 个循环。

### 2.2 标准曲线的建立

使用优化后的反应体系对 ( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ) CCoV 和 CPV 阳性参考质粒进行扩增，以阳性参考质粒浓度对数值为横坐标、Ct 值为纵坐

标，分别绘制 CCoV 和 CPV 标准曲线。结果，CPV 的标准曲线方程为： $y = -3.149x + 38.373$ ， $R^2 = 0.999$ ；CCoV 的标准曲线为： $y = -3.187x + 38.189$ ， $R^2 = 0.996$ ，表明 2 种阳性参考质粒有良好的线性关系 (图 1)。

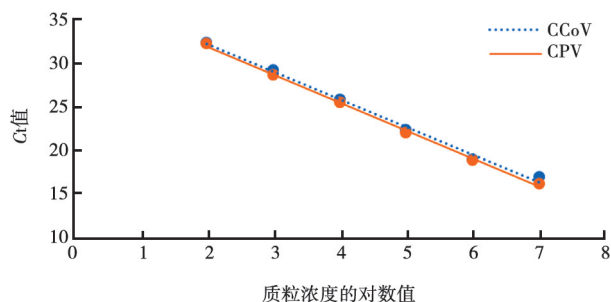
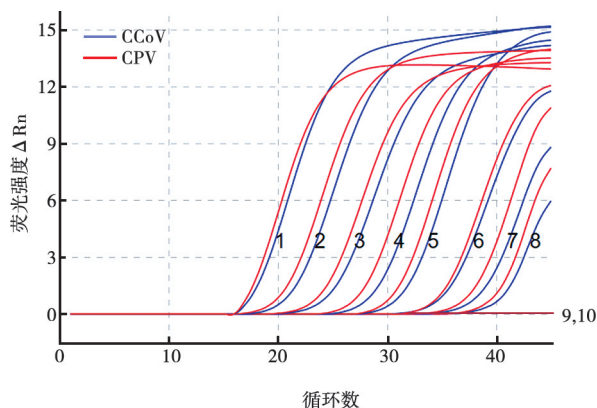


图 1 CCoV 与 CPV 标准曲线

### 2.3 灵敏度测试

采用所建立的 CCoV 和 CPV 双重 TaqMan RT-qPCR 方法对 CCoV 和 CPV ( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{0.5}$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 的阳性质粒进行检测。检测结果显示 (图 2)，25  $\mu\text{L}$  体系中均能够检测到  $1 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ，因体系中加入 5  $\mu\text{L}$  模板，故 CCoV 与 CPV 的最低检测限为 5 copies。

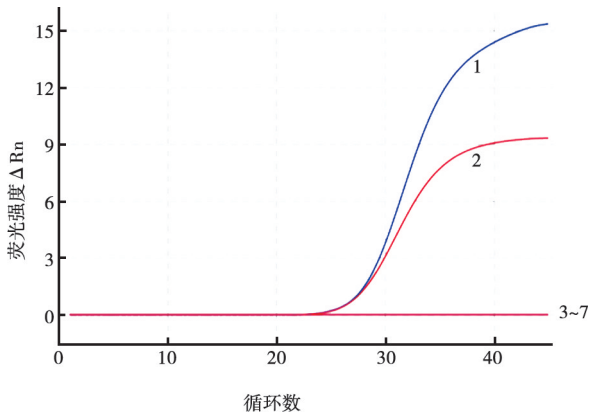


1~8. 质粒浓度按照  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$  依次 10 倍倍比稀释；  
9. 质粒浓度为  $1 \times 10^{0.5}$  copies/ $\mu\text{L}$ ；10. 阴性对照。

图 2 CCoV 与 CPV 灵敏度检测

### 2.4 特异性试验

结果显示 (图 3)，该方法仅对 CCoV 和 CPV 病原核酸扩增结果为阳性，对 CAV-2、CDV、Lep、CPIV-2 核酸的扩增结果均为阴性，表明本试验建立的方法与其他病原无交叉反应，特异性较强，符合预期。



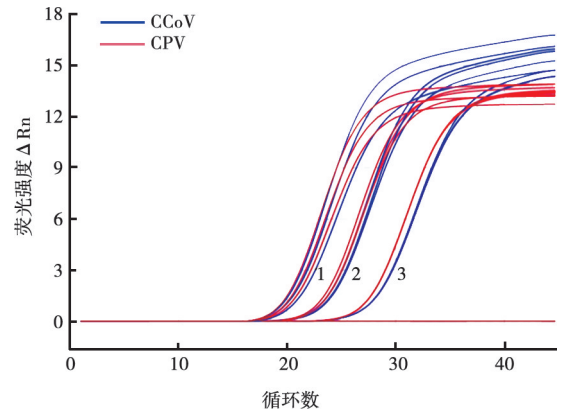
1. CCoV 阳性对照; 2. CPV 阳性对照; 3~7. 分别为 CAV-2、CDV、Lep、CPiV-2 和阴性对照。

图3 双重 TaqMan 探针荧光定量 PCR 特异性

### 2.5 重复性试验

重复性试验结果显示 (图 4 和表 2), 使用以优

化后的反应体系对 3 个不同浓度的模板的组内变异系数范围为 0.27% ~ 1.38%, 组间变异系数范围为 0.52% ~ 1.38%, 均小于 1.38%, 表明该方法的重复性和稳定性良好。



1~3. 质粒浓度分别为  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

图4 CCoV 与 CPV 重复性试验结果

表2 双重 TaqMan RT-qPCR 重复性试验

| 阳性参考质粒 | 模板浓度/<br>(copies · $\mu\text{L}^{-1}$ ) | 组内重复性试验    |        | 组间重复性试验     |        |
|--------|---|------------|--------|-------------|--------|
|        |   | Ct 值       | 变异系数/% | Ct 值        | 变异系数/% |
| CCoV   | $10^6$                                  | 20.00±0.19 | 0.95   | 19.90±0.23  | 1.19   |
|        | $10^5$                                  | 23.57±0.32 | 1.38   | 23.73±0.32  | 1.38   |
|        | $10^4$                                  | 27.02±0.15 | 0.56   | 27.08±0.16  | 0.62   |
| CPV    | $10^6$                                  | 19.27±0.08 | 0.44   | 19.23±0.10  | 0.52   |
|        | $10^5$                                  | 22.95±0.27 | 1.18   | 22.85±0.26  | 1.17   |
|        | $10^4$                                  | 26.65±0.07 | 0.27   | 26.502±0.22 | 0.82   |

### 2.6 临床样本检测

利用本试验建立的 CCoV 和 CPV 双重 RT-qPCR 方法与团体建立的 CCoV 的 RT-qPCR 方法<sup>[14]</sup>以及国家标准中 CPV 的 PCR 方法<sup>[13]</sup>, 对临床 113 份犬消化道拭子进行检测, 结果见表 3。CCoV 的检出率为 37.2%, 相比于单重 RT-qPCR 提高了 6.2%; 对 CPV 的检出率为 40.7%, 相比于普通 PCR 提高了 4.4%; 对 CCoV 与 CPV 双阳性的检出率为 13.3%, 相比于单重 RT-qPCR 和普通 PCR 的联合检测提高了 1.8%。

表3 临床样本检测结果

| 病原       | 样本数 | 双重 RT-qPCR |       | 单重 RT-qPCR 或 PCR |       |
|----------|-----|------------|-------|------------------|-------|
|          |     | 阳性数        | 阳性率/% | 阳性数              | 阳性率/% |
| CCoV     | 113 | 42         | 37.2  | 35               | 31.0  |
| CPV      | 113 | 46         | 40.7  | 41               | 36.3  |
| CPV+CCoV | 113 | 15         | 13.3  | 13               | 11.5  |

### 3 讨论

随着宠物经济的迅速发展, 养宠规模逐渐增大, 宠物临床诊疗在宠物经济中占比较高, 近几年宠物临床诊疗中, 犬因消化道疾病的就诊数量居高不下, 而 CCoV 与 CPV 是引起犬呕吐、脱水、腹泻等消化道疾病的重要病原之一<sup>[15]</sup>。CCoV 感染犬的病死率不高, 成年犬症状较轻, 治愈率较高, 但与 CPV 混合感染后, 病死率有所增加<sup>[16-17]</sup>, 并且这 2 种病毒可从多种途径侵入犬的机体, 在临床诊断过程中使得宠物医生难以区分, 严重危及犬的生命健康。本研究所建立的双重 TaqMan RT-qPCR 有利于对感染初期犬的诊断, 提高治愈率, 该方法适用于样本的检测、病毒的溯源等。RT-qPCR 可分为染料法与探针法, 相比较染料法, TaqMan 探针具有高度特异性, 更加敏感, 并且结果以图像和数据的形式展现, 避免了人为因素产生的影响<sup>[18-19]</sup>。

本试验所采用的双重 TaqMan RT-qPCR 通过标记不同的荧光基团, 针对 CCoV 的 3'UTR 与 CPV 的 VP2 设计引物与探针, 与傅宇飞等<sup>[20]</sup>研究的染料法相比较, 利用了 TaqMan 探针的特点, 设计的探针引物特异性更强, 因为标记不同的荧光基团所显示的颜色不同, 所以通过肉眼在 PCR 仪器可将 CCoV 与 CPV 区分开。与李少晗等<sup>[21]</sup>、沙聪等<sup>[22]</sup>研究的多重 PCR 相比较, 该方法能检测到 5 copies, 灵敏度更高, 更利于早期对病毒的检测。此外, 本研究建立的方法特异性好, 对其他病原 (CAV-2、CDV、Lep 和 CPIV-2) 无扩增出曲线, 变异系数小于 1.38%。临床样本检测结果显示, 双重 TaqMan RT-qPCR 对 CCoV 与 CPV 的检出率分别为 37.2% 和 40.7%, 相比较单重 RT-qPCR 或普通 PCR 对 CCoV 与 CPV 的检出率 31.0% 和 36.3% 有所提高; 对于混合感染情况, 双重 TaqMan RT-qPCR 方法的检出结果也相对较高。

综上, 本试验建立的 CCoV 和 CPV 双重 TaqMan RT-qPCR 方法在应用于临床检测时, 能够同时对病原核酸进行精准地检测, 该方法灵敏度高、准确性好、简便快速, 能够大幅提高对 CCoV 与 CPV 病原的检出率, 有助于对早期患犬做出更准确的判断。

## 参考文献:

- [1] BINN L N, LAZAR E C, KEENAN K P, et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea [J]. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc, 1974 (78): 359-366.
- [2] 王静. 犬冠状病毒的分离鉴定及两种检测方法的建立 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [3] SPAGNOLO J F, HOGUE B G, Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly (A) tail for coronavirus defective genome replication [J]. J Virol, 2000, 74: 5053-5065.
- [4] 吕海峰. 犬冠状病毒 M 蛋白单克隆抗体的制备及其在胶体金检测试纸条上的应用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [5] 李少晗, 张广智, 崔尚金, 等. 犬猫冠状病毒研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (12): 4059-4068.
- [6] 马光刚, 陆承平. 从健康狐狸、貉粪中检出犬冠状病毒的两种基因型 [J]. 微生物学报, 2005 (2): 302-305.
- [7] DECARO N, BUONAVOGLIA C. Canine parvovirus: a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c [J]. Vet Microbiol, 2012, 155 (1): 1-12.
- [8] FU P F, HE D C, CHENG X, et al. Prevalence and characteristics of canine parvovirus type 2 in Henan Province, China [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (6): e0185622.
- [9] QI S S, ZHAO J J, GUO D H, et al. A mini-review on the epidemiology of canine parvovirus in China [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 5.
- [10] EREGOWDA C G, DE U K, SINGH M, et al. Assessment of certain biomarkers for predicting survival in response to treatment in dogs naturally infected with canine parvovirus [J]. Microb Pathog, 2020, 149: 104485.
- [11] 俞向前, 艾旻, 张忠海, 等. 犬细小病毒与犬冠状病毒双重 PCR 检测方法的建立 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2017 (4): 10-12.
- [12] 苏霞, 周宏专, 常彦嫣, 等. 犬瘟热病毒、犬细小病毒和犬冠状病毒三重 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50 (7): 103-107.
- [13] 中华人民共和国农业农村部. 犬细小病毒病诊断技术: GB/T 27533-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [14] 张传美, 单虎. 犬冠状病毒 RT-PCR 检测方法: T/CVMA 44-2020 [S]. 北京: 中国兽医协会, 2020.
- [15] 贾燕, 关平原. 209 例宠物犬冠状病毒病流行病学调查 [J]. 畜牧与饲料学, 2017, 38 (4): 97-100.
- [16] YESILBAG K, YILMAZ Z, TORUN S, et al. Canine coronavirus infection in Turkish dog population [J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2004, 51 (7): 353-355.
- [17] NANDI S, KUMAR M. Canine parvovirus: current perspective [J]. Indian J Virol, 2010, 21 (1): 31-44.
- [18] DECARO N, BUONAVOGLIA C, BARRS V R. Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: are we far from disease eradication? [J]. Vet Microbiol, 2020, 247: 108760.
- [19] 侯凯文, 刘婉宁, 王金涛, 等. 犬冠状病毒 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022 (18): 85-88.
- [20] 傅宇飞, 李传峰, 田传龙, 等. 犬冠状病毒与犬细小病毒双重荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2023: 1-10. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230506.001.
- [21] 李少晗, 陈鑫, 张广智, 等. 犬瘟热病毒、犬细小病毒和犬冠状病毒多重 PCR 方法的建立及应用 [J]. 动物医学进展, 2022, 43 (12): 31-36.
- [22] 沙聪, 唐川杰, 何雨薇, 等. 犬细小病毒、犬冠状病毒和犬轮状病毒三重 PCR 方法的建立及初步应用 [J]. 西南民族大学学报 (自然科学版), 2023, 49 (2): 142-148.