

赵硕, 许心婷, 陈婷婷, 等. 猪丁型冠状病毒、猪 A 群轮状病毒多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 92-101.

ZHAO S, XU X T, CHEN T T, et al. Establishment of multiple real-time PCR detection methods for PDCoV and PoRV [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 92-101.

## 猪丁型冠状病毒、猪 A 群轮状病毒多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立

赵硕<sup>1,2</sup>, 许心婷<sup>2</sup>, 陈婷婷<sup>2</sup>, 全琛宇<sup>2</sup>, 许艺兰<sup>2</sup>, 杨讯业<sup>2</sup>, 何春妮<sup>3</sup>,  
林昌华<sup>1,4</sup>, 程珂<sup>1,4</sup>, 吴先华<sup>1,5</sup>, 冯明<sup>5</sup>, 段群棚<sup>1,2</sup>, 秦毅斌<sup>1,2\*</sup>, 何颖<sup>2\*</sup>

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530005; 2. 广西壮族自治区兽医研究所/广西兽医生物技术重点实验室/  
农业农村部中国(广西)-东盟跨境动物疫病防控重点实验室, 广西 南宁 530001;  
3. 南宁市武鸣区动物疫病预防控制中心, 广西 南宁 530199; 4. 广西农垦永新畜牧集团有限公司, 广西 南宁 530016;  
5. 广西农垦永新畜牧集团新兴有限公司, 广西 柳州 545001)

**摘要:** 旨在建立一种猪丁型冠状病毒 (PDCoV)、猪 A 群轮状病毒 (PoRV) 的快速鉴别诊断方法, 根据 PDCoV 的 N 基因、PoRV 的 VP6 基因分别设计了检测引物及 TaqMan 探针, 并设立猪源  $\beta$ -actin 内参基因, 经反应条件优化, 对特异性、敏感性、重复性进行验证并初步应用于临床样品检测, 最终成功建立了一个可通过  $\beta$ -actin 进行质控、同时鉴别诊断 PDCoV、PoRV 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。结果: 该方法可特异性扩增 PDCoV、PoRV 及猪源  $\beta$ -actin 目标基因, 与猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪圆环病毒 3 型 (PCV3)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪星状病毒 (PAstV) 的核酸无交叉反应, 对 PDCoV、PoRV 及  $\beta$ -actin 的最低检出限分别为  $1.64 \times 10^2$ 、 $1.65 \times 10^2$  和  $5.99 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L, 重复性试验中组内及组间变异系数均低于 2%, 说明该方法具有特异、灵敏、稳定的特点。应用该方法对 63 份广西猪腹泻临床样品进行检测, 结果与 PDCoV、PoRV 的商品化荧光定量 PCR 检测试剂盒的结果相一致。综上, 本研究建立了一种可应用于临床、快速鉴别诊断猪腹泻样品中 PDCoV 与 PoRV 的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 该方法特异性好、敏感性高、操作便捷, 可为 PDCoV 与 PoRV 的监测诊断与净化防控提供可行技术支撑。

**关键词:** 猪丁型冠状病毒; 猪 A 群轮状病毒; 多重 TaqMan 荧光定量 PCR

**中图分类号:** S852 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)12-0092-10

## Establishment of multiple real-time PCR detection methods for PDCoV and PoRV

ZHAO Shuo<sup>1,2</sup>, XU Xinting<sup>2</sup>, CHEN Tingting<sup>2</sup>, QUAN Chenyu<sup>2</sup>, XU Yilan<sup>2</sup>, YANG Xunye<sup>2</sup>, HE Chunni<sup>3</sup>,  
LIN Changhua<sup>1,4</sup>, CHENG Ke<sup>1,4</sup>, WU Xianhua<sup>1,5</sup>, FENG Ming<sup>5</sup>, DUAN Qunpeng<sup>1,2</sup>, QIN Yibin<sup>1,2\*</sup>, HE Ying<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Veterinary Research Institute/Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Key Laboratory of China (Guangxi) -ASEAN Cross-border Animal Disease Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Nanning 530001, China;

3. Wuming Animal Disease Prevention and Control Center, Nanning 530199, China;

4. Guangxi State Farm Yongxin Animal Husbandry Group Co., Ltd., Nanning 530016, China;

5. Guangxi State Farm Animal Husbandry Group Xinxing Co., Ltd., Liuzhou 545001, China)

**Abstract:** This study was to establish a rapid differential diagnosis method for porcine delta coronavirus (PDCoV) and porcine group A rotavirus (PoRV). Primers and TaqMan probes were designed according to the N gene of PDCoV and the VP6 gene of PoRV; the porcine-

收稿日期: 2025-02-05; 修回日期: 2025-10-21

基金项目: 国家现代农业产业技术体系广西创新团队建设专项 (nycytxgcxtd-2023-15-02); 南宁市科技重大专项 (20232039); 广西基本科研业务费专项 (22-4, 23-3, 24-3, 24-7, 24-11); 广西农业科技自筹经费项目 (Z202225, Z202222, Z2023034); 广西兽医生物技术重点实验室开放基金项目 (22-035-32-B-02, 23-035-32-B-02, 23-035-32-B-01)

第一作者: 赵硕, 女, 壮族, 博士研究生,

\* 通信作者: 秦毅斌, 高级兽医师, 主要从事动物传染病学研究, E-mail: qinyibin5188@163.com; 何颖, 正高级兽医师, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: heyng21@163.com。

origin  $\beta$ -actin internal reference gene was set up; and the optimization of the reaction conditions, validation of the specificity, sensitivity and repeatability, and preliminary application of clinical samples were carried out. After the optimization of the reaction conditions for specificity, sensitivity and reproducibility, and the preliminary application of clinical samples, a multiplex TaqMan fluorescence quantitative PCR method was successfully established for the quality control of  $\beta$ -actin and the simultaneous differential diagnosis of PDCoV and PoRV. The method specifically amplified the target genes of PDCoV, PoRV and porcine-derived  $\beta$ -actin without cross-reactivity with PCV2, PCV3, CSFV, PEDV, PRV and PAstV nucleic acids; with the lowest detection limits for PDCoV, PoRV and  $\beta$ -actin being  $1.64 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,  $1.65 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L and  $5.99 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L, respectively. The coefficients of variation were lower than 2% within and between the groups in the reproducibility experiments, which indicated that the method was characterized by high specificity, sensitivity and stability. The method was applied to 63 clinical samples of Guangxi pig diarrhea, and the results were consistent with those of the commercialized fluorescent quantitative PCR detection kits for detecting PDCoV and PoRV, respectively. In this study, a multiplex TaqMan fluorescent quantitative PCR method was established for rapid differential diagnosis of PDCoV and PoRV in swine diarrhea samples, which possessed good specificity, high sensitivity, and convenient operation, and would serve as technical support for monitoring and diagnosis, purification, prevention and control of PDCoV and PoRV.

**Keywords:** porcine delta coronavirus; porcine rotavirus; multiplex TaqMan fluorescence quantitative PCR

腹泻是猪养殖过程中的常发疫病,可由传染性 & 非传染性因素引起,病毒是该病的主要传染性因素之一。猪丁型冠状病毒病 (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 与猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) A 群是引起猪腹泻的 2 种主要病毒性病原,各年龄段猪均可感染且以新生仔猪最易感,发病后临床症状主要为呕吐、腹泻及死亡等,对猪的生长发育影响极大。近年来,PDCoV、PoRV 在广西地区呈现新发和多发的趋势<sup>[1-3]</sup>,给养猪业造成了严重的经济损失<sup>[4-7]</sup>,且 PDCoV、PoRV 均为猪源人畜共患疫病病原,具有跨越种间屏障传播的能力,对公共卫生安全具有重要的意义<sup>[8-15]</sup>。近年的流行病学调查结果显示,猪腹泻类病原多为混合感染<sup>[16]</sup>,以二重感染情况较为常见<sup>[3]</sup>,如 PEDV 与 PDCoV 混合感染率可达 20.65%<sup>[17]</sup>。大多数猪肠道腹泻病毒表现的临床症状相似<sup>[16]</sup>,仅通过临床症状难以鉴别致病病原,导致在猪群中针对性防控 PDCoV、PoRV 的困难较大。

早期诊断及针对性防控是防治疫病最有效、合理的措施,因此拥有敏感、特异、稳定和快捷的检测方法是不可或缺的。国内外学者已针对猪腹泻类疫病病原建立了多种诊断和检测方法,包括 PCR、荧光定量 PCR、LAMP 和 CRISPR/Cas12a 等。其中荧光定量 PCR 方法因其灵敏、高效、可应用于大量临床样品检测等优点,在病原的核酸检测中已被广泛应用。然而在大多数已建立的多重荧光定量 PCR 方法中,无法对样品进行有效质控,导致样品质量不佳或核酸提取失误时,会出现检测结果的假阴性,最终对病原的感染情况出现误判。为此,在检测方法中增加对样品及操作的质控指标,有利于提高检测的准确性及可靠性。

研究显示,PDCoV 的 N 蛋白在不同亚型的毒株中高度保守,已广泛地应用于 PDCoV 的抗原及血清

学诊断研究<sup>[18-19]</sup>;PoRV 的 VP6 蛋白占病毒总编码蛋白的 50% 以上,特异性及保守度高,介导 PoRV 的黏膜反应,有较强的疫苗开发价值与诊断学意义<sup>[20-24]</sup>; $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 基因在猪的各组织细胞中恒定表达,是分子生物学试验中常用的内参基因,可用于校正上样量、校正上样过程中存在的试验误差,从而保证结果的准确性及有效性。本研究选择 PDCoV 的 N 基因与 PoRV 的 VP6 基因为靶基因,以猪源  $\beta$ -actin 基因为内参基因,建立了一种可快速鉴别、诊断 PDCoV 和 PoRV 并可对提取的核酸样品进行质控的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,为 PDCoV 和 PoRV 的鉴别诊断、早期感染检测及相关猪群病毒性腹泻疫病的监测和防控提供可行技术支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 质粒、病毒及临床样品

$\beta$ -actin 阳性重组质粒,PDCoV 病毒液,PoRV 病毒液,PDCoV、PoRV、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪星状病毒 (PAstV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪圆环病毒 3 型 (PCV3)、猪瘟病毒 (CSFV)、伪狂犬病病毒 (PRV) 等病毒阳性组织样品以及腹泻猪临床样品,于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存于广西壮族自&治区兽医研究所。

### 1.2 主要试剂

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自简石生物技术 (北京) 有限公司;HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;2 $\times$ Bench Top<sup>TM</sup> Taq Master Mix 购自杭州倍沃医学科技有限公司;DNA Marker DL2000、pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector Cloning Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技 (北京) 有限公司;质粒提取试剂盒

购自 OMEGA 公司；2×TaqMan Fast qPCR 预混液购自生工生物工程（上海）有限公司；猪德尔塔冠状病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒、猪轮状病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒均购自百沃特生物技术有限公司；其他试剂均为分析纯级别。

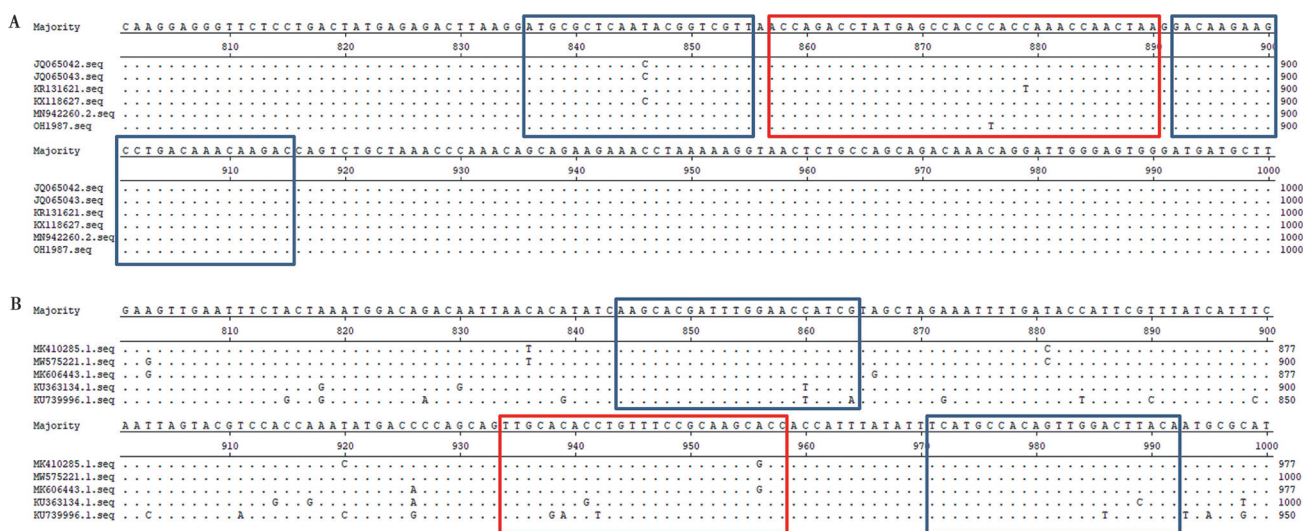
### 1.3 核酸提取与反转录

根据病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书，提取 PDCoV 病毒液、PoRV 病毒液、各病毒（PDCoV、PoRV、PEDV、PAstV、PRV、PCV2、PCV3、CSFV）阳性样品、待检猪腹泻样品及总 DNA/RNA，使用 HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA，将总 DNA 及 cDNA 保存于 -80 °C 备用。反转录反应体系如下，5×RT Buffer 4 μL，DTT 2 μL，dNTP Mix 4 μL，HiFiScript 1 μL，Primer Mix 2 μL，RNA 模板 7 μL。反转录反应程序如下，42 °C 50 min，85 °C 5 min。

### 1.4 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法特异性引物、探针及阳性标准品重组质粒构建

根据 GenBank 收录的国内外 PDCoV、PoRV 的全

基因序列，应用 Primer 5.0 软件针对 PDCoV 的 N 基因（MN942260.2）以及 PoRV 的 VP6 基因（MW575221.1）相对保守区域，设计构建标准品阳性重组质粒引物（PDCoV-Z-F/R、PoRV-Z-F/R），在 PDCoV-Z-F/R、PoRV-Z-F/R 扩增的片段中，选择适当区域设计所建立检测方法的引物（PDCoV-F/R、PoRV-F/R）及 TaqMan 荧光探针信息详见表 1。所有引物及探针均在生工生物工程（上海）股份有限公司合成。对选定的 PDCoV 的 N 基因和 PoRV 的 VP6 基因目的片段进行基因克隆，获得阳性重组质粒，分别命名为 PDCoV-Z（ $1.64 \times 10^{10}$  copies/μL）、PoRV-Z（ $1.65 \times 10^{10}$  copies/μL）。课题组保存的内参标准品质粒 β-actin-Z 浓度为  $5.99 \times 10^9$  copies/μL<sup>[20]</sup>。



蓝色方框表示引物区域；红色方框表示探针区域。

图 1 PDCoV N 基因（A）及 PoRV VP6 基因（B）引物及探针序列比对

表 1 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的引物与探针序列

引物	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
PDCoV-Z	F: CGCATCATGGCTCTAGC	348
	R: CTACGCTGCTGATTCCT	
PoRV-Z	F: GGCTTTTAAACGAAGTCTTC	1 356
	R: GGTACATCCTCTCACTA	
β-actin-Z	F: CTCCATCATGAAGTGTGACGT	114
	R: GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC	

续表1

引物	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
PDCoV	F: ATGCGCTCAATACGGTCGTT	80
	R: GTCTTGTTCAGGCTTCTGTGC	
	Probe: VIC- ACCAGACCTATGAGCCACCCACCAAACCAA -BHQ1	
PoRV	F: AAGCACGATTTGGAACCATCG	149
	R: AGTAAGTCCAACCTGTGGCATGA	
	Probe: FAM-TTGCACACCTGTTTCGCAAGCACC-BHQ1	
$\beta$ -actin	F: CTCCATCATGAAGTGTGACG	110
	R: TCTCCTTCTGCATCCTGTCC	
	Probe: ROX-AGGACCTCTACGCCAACACGGTGTCTGT-BHQ2	

### 1.5 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法建立

验证 2×TaqMan Fast qPCR 预混液的单重反应体系。初始反应体系为, 2×TaqMan Fast qPCR Mix 10  $\mu$ L; 单对特异性检测引物 0.4  $\mu$ L (浓度 10  $\mu$ mol/L); 单条 TaqMan 检测探针 0.3  $\mu$ L (浓度 10  $\mu$ mol/L); 病原 DNA/cDNA 扩增模板: 4  $\mu$ L; 无核酸水: 补齐至 20  $\mu$ L。初始反应程序为: 94  $^{\circ}$ C, 3 min; 94  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

将验证成功的 PDCoV、PoRV 和  $\beta$ -actin 单重荧光定量 PCR 方法组合成多重荧光定量 PCR 方法。基于初始反应条件, 选择 1 : 3、1.5 : 2.5、1 : 1、2.5 : 1.5、3 : 1 的 PDCoV 及 PoRV 引物候选浓度比例, 进行 PDCoV、PoRV 引物/探针的比例进行优化; 基于确定的 PDCoV 引物/探针与 PoRV 引物/探针比例条件, 选择总反应体系中 0.5、1、1.5、2  $\mu$ L 的总引物/探针候选体积, 进行总反应体系的优化; 基于确定的总反应体系条件, 选择 56、58、60、61、62、63  $^{\circ}$ C 的候选退火温度, 进行优化反应程序中退火温度的优化。最终筛选获得该方法的最优反应体系和反应条件。

### 1.6 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法标准曲线

按 1.5 优化的反应条件, 应用所建立多重 TaqMan 荧光定量方法对 10 倍倍比稀释阳性标准品质粒 PDCoV-Z ( $1.64 \times 10^{10} \sim 1.64 \times 10^{-5}$  copies/ $\mu$ L)、PoRV-Z ( $1.65 \times 10^{10} \sim 1.65 \times 10^{-5}$  copies/ $\mu$ L) 和  $\beta$ -actin-Z ( $5.99 \times 10^9 \sim 5.99 \times 10^{-6}$  copies/ $\mu$ L) 进行扩增, 反应结束后, 以 Ct 值为横坐标、阳性标准品质粒起始拷贝数浓度对数为纵坐标, 绘制阳性标准质粒的标准曲线。

### 1.7 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的特异性、敏感性、重复性试验

用所建立的多重 TaqMan 荧光定量方法对 PDCoV-Z、PoRV-Z 和  $\beta$ -actin-Z 及各病毒 (PDCoV、PoRV、

PEDV、PAstV、PRV、PCV2、PCV3、CSFV) 阳性样品的核酸进行扩增, 以验证所建立方法的特异性。

用所建立的多重 TaqMan 荧光定量方法, 对 10 倍倍比稀释的阳性标准品质粒 PDCoV-Z ( $1.64 \times 10^9 \sim 1.64 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L)、PoRV-Z ( $1.65 \times 10^9 \sim 1.65 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L) 及  $\beta$ -actin-Z ( $5.99 \times 10^7 \sim 5.99 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L) 进行扩增, 同时应用普通 PCR 方法 (对应引物为表 1 中 PDCoV-Z-F/R、PoRV-F/R) 进行对比扩增, 以验证所建立方法的敏感性以及与普通 PCR 方法的敏感性差异。

用所建立的多重 TaqMan 荧光定量方法, 在 10 倍倍比稀释后的阳性标准品质粒中, 选取 PDCoV-Z ( $1.64 \times 10^6 \sim 1.64 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L)、PoRV-Z ( $1.65 \times 10^6 \sim 1.65 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L)、 $\beta$ -actin-Z ( $5.99 \times 10^6 \sim 5.99 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L) 各 3 个不同浓度的质粒为模板进行扩增, 以验证所建立方法的重复性。

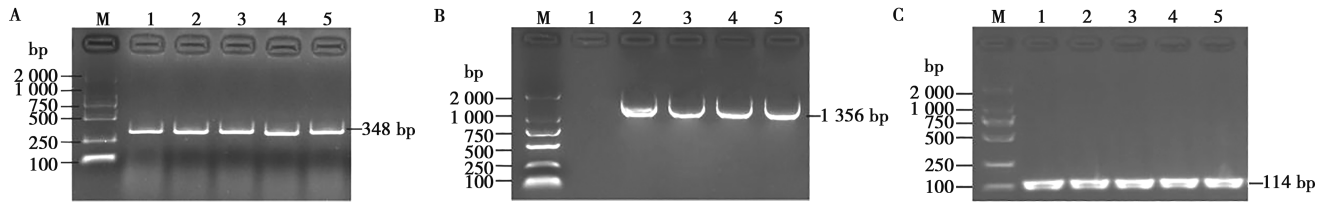
### 1.8 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的初步应用

用所建立的多重 TaqMan 荧光定量方法, 对本课题组采集并保存的 63 份广西地区猪腹泻临床样品进行 PDCoV 及 PoRV 核酸检测, 以阳性重组质粒为阳性对照, 以双蒸水为阴性对照, 同时使用商品化荧光 PCR 试剂盒进行对比检测, 以验证所建立方法在生产实际中的应用可行性。

## 2 结果

### 2.1 含重组阳性质粒的菌液 PCR 鉴定

由图 2 可知, 使用 PDCoV 及 PoRV 病毒液, 分别扩增 N 及 VP6 基因并连接至载体, 构建重组阳性质粒 PDCoV-Z、PoRV-Z。将新构建的 PDCoV-Z、PoRV-Z 及冻存的  $\beta$ -actin-Z 转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 经菌液 PCR 鉴定出阳性菌液并提取阳性重组质粒。



A. PDCoV 阳性标准质粒菌液 PCR, M 为 DNA 分子量标准, 1~5 为 PDCoV-Z 菌液; B. PoRV 阳性标准质粒菌液 PCR, M 为 DNA 分子量标准, 1~5 为 PoRV-Z 菌液; C.  $\beta$ -actin; M 为 DNA 分子量标准, 1~5 为  $\beta$ -actin-Z 菌液。

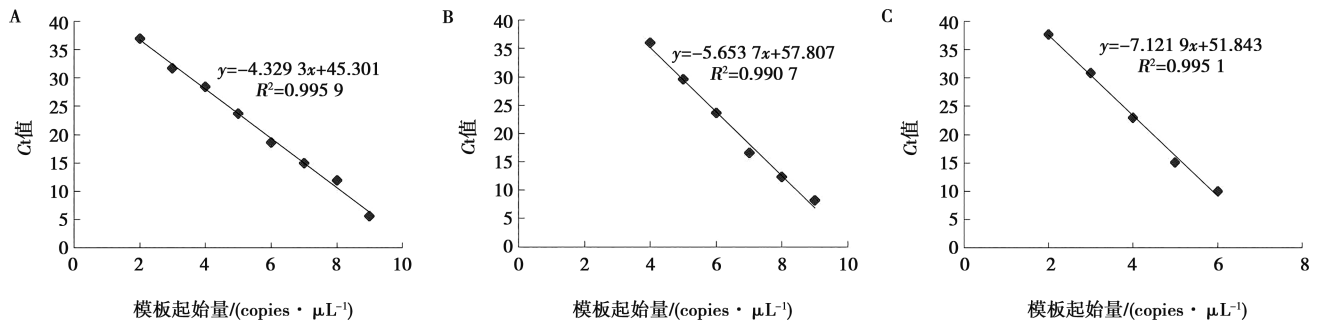
图 2 PDCoV-Z、PoRV-Z 与  $\beta$ -actin-Z 菌液 PCR 鉴定

### 2.2 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立与优化

经过特异性引物及探针浓度、扩增体系、反应程序的退火温度优化, 最终确定了扩增效率好、成本相对低的条件作为所建立的多重 TaqMan 荧光定量方法的反应体系与反应程序。20  $\mu$ L 反应体系如下。2 $\times$  TaqMan Fast qPCR: 10  $\mu$ L; 3 对特异性检测引物: 各 0.2  $\mu$ L (浓度 10  $\mu$ mol/L); 3 条 TaqMan 检测探针: 各 0.1  $\mu$ L (浓度 10  $\mu$ mol/L); 病原 DNA/cDNA 扩增模板: 4  $\mu$ L; 无核酸水: 补齐至 20  $\mu$ L。反应程序如下: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

### 2.3 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的标准曲线

使用优化后的多重 TaqMan 荧光定量方法对 10 倍倍比稀释标准品质粒进行扩增, 以  $C_t$  值为纵坐标、阳性重组质粒的拷贝数浓度的对数为横坐标, 得到 3 检测靶标的标准曲线 (图 3)。在所建检测方法中, PDCoV 的标准曲线为  $y = -4.329 3x + 45.301$ ,  $R^2$  为 0.995 9; PoRV 的标准曲线为  $y = -5.637x + 52.153$ ,  $R^2$  为 0.990 7;  $\beta$ -actin 的标准曲线为  $y = -7.121 9x + 58.965$ ,  $R^2$  为 0.995 1。3 个标准曲线的  $R^2$  均大于 0.99, 说明扩增曲线能够较好地拟合试验数据, 荧光信号检测准确, 所建立的多重 TaqMan 荧光定量方法扩增效率稳定。



A. PDCoV-Z ( $1.64 \times 10^9 \sim 1.64 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L); B. PoRV-Z ( $1.19 \times 10^8 \sim 1.19 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L); C.  $\beta$ -actin-Z ( $5.99 \times 10^7$  copies/ $\mu$ L  $\sim 5.99 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L)。

图 3 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 的标准曲线

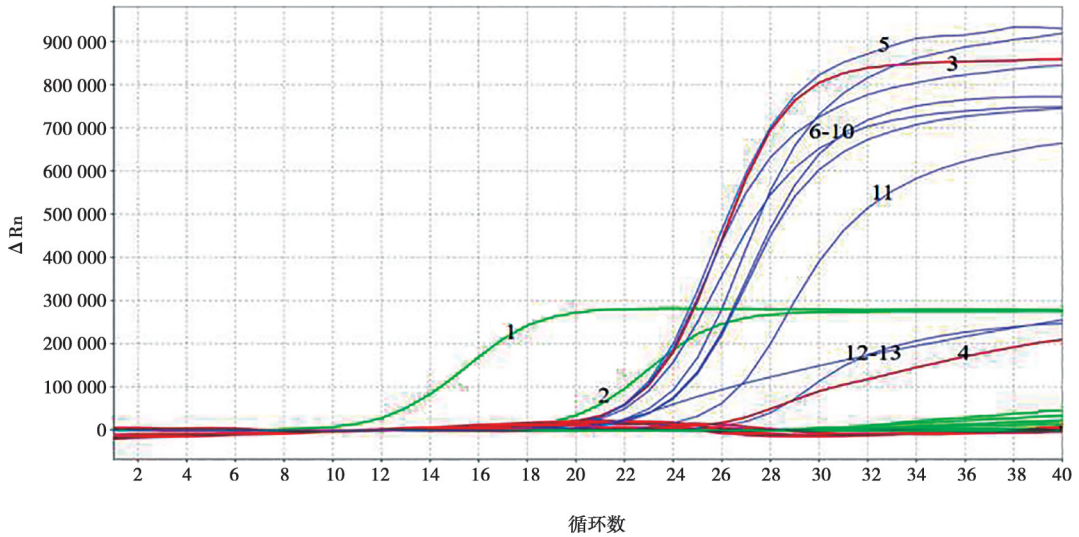
### 2.4 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的特异性验证

由图 4 可知, 本研究所建立方法仅能特异性对 PDCoV (VIC 通道)、PoRV (FAM 通道) 进行扩增, 其他病毒核酸模板和空白对照在“FAM”和“VIC”通道均无扩增荧光曲线; 本研究所建立方法能扩增所有临床样品中的猪源  $\beta$ -actin (ROX 通道)。表明, 该方法特异性强, 能对样品中的 PDCoV 与 PoRV 进行鉴别诊断, 并通过扩增  $\beta$ -actin 基因对临床样品的

提取、反应体系的配制进行质控。

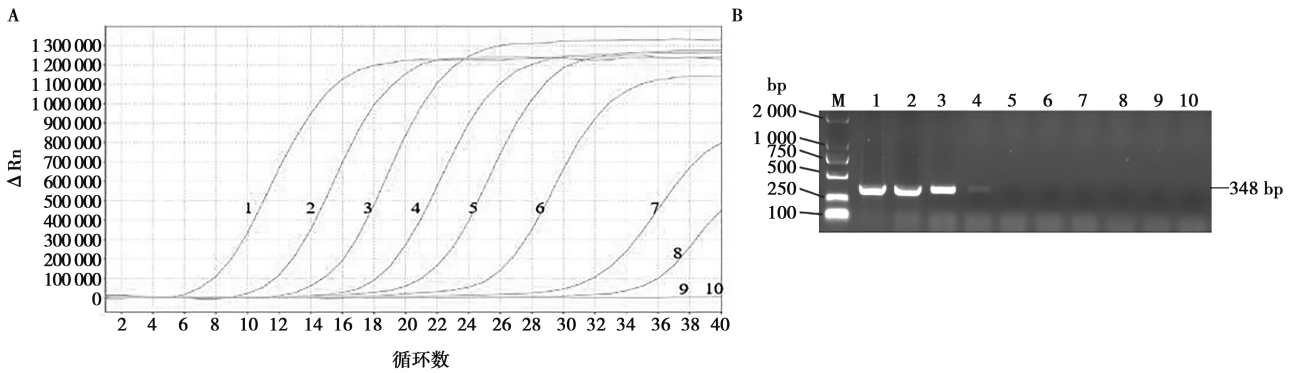
### 2.5 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的敏感性验证

由图 5~7 可知, 本研究所建立方法对阳性标准品质粒的最低检测限分别为 PDCoV-Z  $1.64 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L、PoRV-Z  $1.65 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L、 $\beta$ -actin-Z  $5.99 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L, 与普通 PCR 方法相比, 所建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法敏感性分别提高了  $10^4$  倍、 $10^3$  倍和  $10^2$  倍。



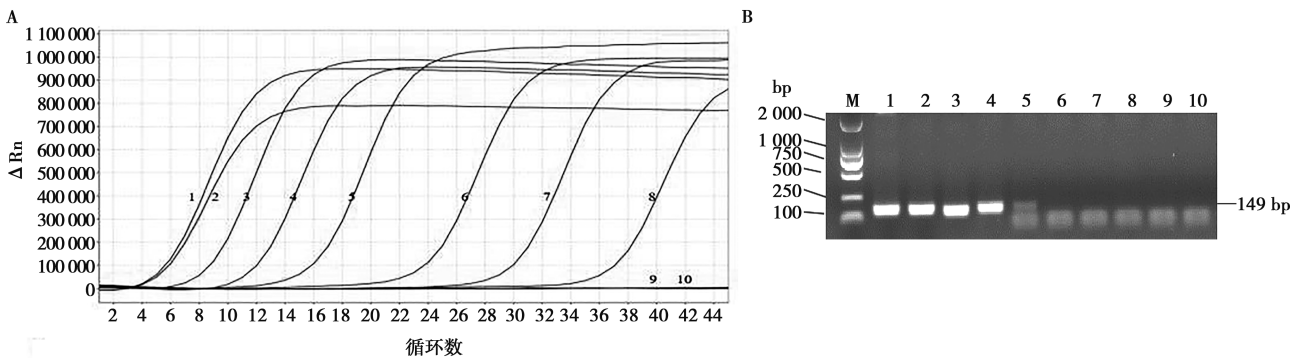
1. PDCoV-Z; 2. PDCoV 阳性样品; 3. PoRV-Z; 4. PoRV 阳性样品; 5.  $\beta$ -actin-Z; 6-13. PDCoV、PoRV、PCV2、PCV3、CSFV、PEDV、PRV、PastV 阳性样品的  $\beta$ -actin。

图 4 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 特异性试验



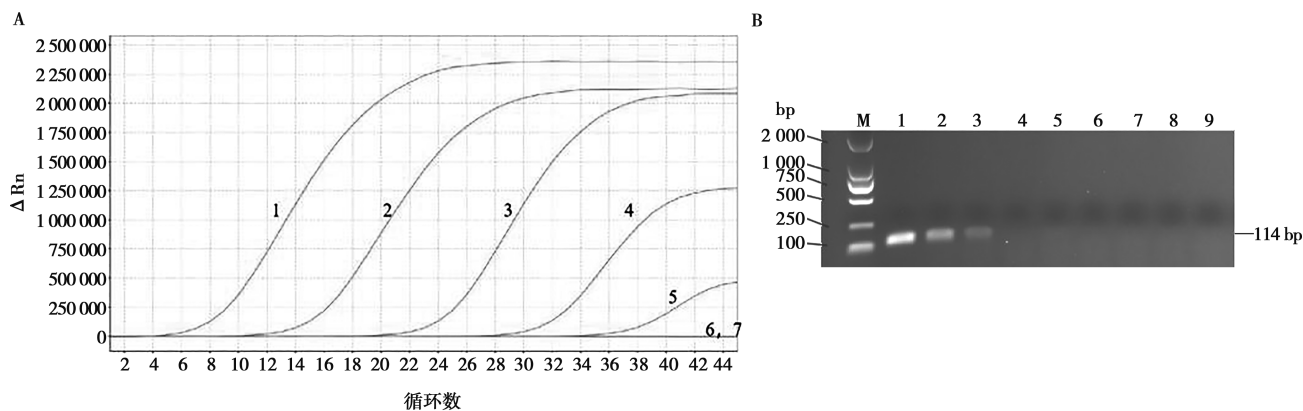
A. 多重 TaqMan 荧光定量 PCR, 1~9 分别为  $1.64 \times 10^9 \sim 1.64 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 PDCoV, 10 为阴性; B. 普通 PCR, M 为 DNA 分子量标准, 1~9 分别为  $1.64 \times 10^9 \sim 1.64 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 PDCoV, 10 为阴性。

图 5 PDCoV 的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法与普通 PCR 敏感性



A. 多重 TaqMan 荧光定量 PCR, 1~9 分别为  $1.65 \times 10^9 \sim 1.65 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 PoRV, 10 为阴性; B. 普通 PCR, M 为 DNA 分子量标准, 1~9 分别为  $1.65 \times 10^9 \sim 1.64 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 的 PoRV, 10 为阴性。

图 6 PoRV 的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法与普通 PCR 敏感性



A. 多重 TaqMan 荧光定量 PCR, 1~6 分别为  $5.99 \times 10^7 \sim 5.99 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$  的  $\beta$ -actin, 7 为阴性; B. 普通 PCR, M 为 DNA 分子量标准, 1~8 分别为  $5.99 \times 10^7 \sim 5.99 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$  的  $\beta$ -actin, 9 为阴性。

图 7  $\beta$ -actin 的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法与普通 PCR 敏感性

### 2.6 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的重复性验证

Ct 值变异系数 (CV) 均小于 2%, 说明该方法重复性良好, 能较好满足生产实际的检测需要。

表 2 可知, 3 个检测指标的批内与批间检测结果

表 2 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法重复性试验

项目	标准质粒浓度/ (copies · $\mu\text{L}^{-1}$ )	组内		组间	
		Ct 值	CV/%	Ct 值	CV/%
PDCoV-Z	$1.64 \times 10^6$	18.63±0.09	0.50	18.47±0.33	1.77
	$1.64 \times 10^5$	23.74±0.18	0.77	23.84±0.27	1.15
	$1.64 \times 10^4$	28.33±0.26	0.91	28.67±0.30	1.02
	$1.65 \times 10^6$	12.39±0.12	1.00	12.50±0.24	1.93
PoRV-Z	$1.65 \times 10^5$	16.67±0.12	0.74	17.00±0.27	1.56
	$1.65 \times 10^4$	23.50±0.15	0.62	23.85±0.29	1.21
$\beta$ -actin-Z	$5.99 \times 10^6$	14.97±0.12	0.83	15.11±0.22	1.45
	$5.99 \times 10^5$	23.11±0.21	0.92	23.46±0.46	1.96
	$5.99 \times 10^4$	30.69±0.22	0.73	31.81±0.45	1.42

### 2.7 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的初步应用

如表 3 所示, 本研究建立多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的检测结果中, 共检出 PDCoV 阳性样品 29 份, 阳性率为 46.03%; PoRV 阳性样品 7 份, 阳性率为 11.11%,  $\beta$ -actin 在所有样品中均检出。使用商

品化试剂盒检测, 检出的 PDCoV 阳性样品 30 份, 阳性率为 47.62%, 较整体符合率为 96.66%, 仅 1 份样品结果不符合; PoRV 阳性样品 7 份, 阳性率为 11.11%, 整体符合率为 100%, 2 个商品化试剂盒均无内参指标。

表 3 不同检测方法临床样品检测 (n=63)

方法	指标	阳性数/份	阳性率/%	阴性数/份	阴性率/%	总计/份	平均 Ct 值
本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法	PDCoV	29	46.03	34	53.97	63	25.83±7.17
	PoRV	7	11.11	56	88.88	63	20.42±5.04
	$\beta$ -actin	63	100	0	0	63	24.08±4.55
猪德尔塔冠状病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒	PDCoV	30	47.62	33	52.38	63	24.06±8.56
猪轮状病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒	PoRV	7	11.11	56	88.88	63	25.52±3.98

### 3 讨论

腹泻是各规模猪场的常见疫病，其中病毒性腹泻是目前仔猪生长受阻和高死亡率的主要病因之一，也是当前猪场疫病防控的难点和痛点。根据近年来广西地区腹泻猪群的病毒性腹泻疫病病原流行病学调查结果<sup>[3,25-27]</sup>，发现 PoRV 的流行呈上升趋势，新发疫病 PDCoV 在广西大部分地区均有检出，临床上猪腹泻类疫病病原常为混合感染且症状相似。若无法鉴别引起猪腹泻的病原，将导致难以对猪腹泻进行针对性的预防与有效控制。

为了能对此类疫病病原进行鉴别诊断，已有较多研究者建立了多重病原的荧光定量 PCR 检测方法，俞赵荣等<sup>[28]</sup>建立了针对猪 4 种冠状病毒的四重荧光定量 PCR 检测方法，可对猪急性腹泻综合征冠状病毒 (SADS - CoV)、猪血凝性脑脊髓炎病毒 (PHEV)、PDCoV 和猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 实现最低检测限达  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L 的鉴别诊断，李金海等<sup>[29]</sup>建立了可检测最低毒价为 10 TCID<sub>50</sub>/mL 的 PEDV 和 PDCoV 的双重 TaqMan 荧光 RT-PCR 检测方法，高艺祥等<sup>[30]</sup>建立了可检测  $1 \times 10^3$  和  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L 的 PDCoV、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、PoRV、PEDV 的四重实时荧光 RT-PCR 方法等。然而在现有研究者建立的以及大多数商品化荧光定量 PCR/RT-PCR 检测方法中，仅对目标病原的核酸进行检测，而缺乏对参与反应的 cDNA/RNA 模板质量以及荧光定量 PCR/RT-PCR 反应体系配制过程的质控，可能导致阳性样品的检测结果被误判为阴性。虽已有部分商品化荧光定量 PCR/RT-PCR 试剂盒在反应体系中引入了外源性内标，以监控样本扩增情况并提高检测结果的可靠性，但添加内标的反应体系对优化程度及稳定性要求高，否则可能出现内标与其他试剂竞争性抑制导致扩增效率下降的问题，且反应体系配制时加入的外源性内标无法对监控样品的采集和提取过程进行质控，因此外源性内标仍不是解决荧光定量 PCR/RT-PCR 检测方法质控问题的最优解<sup>[31-32]</sup>。为了在快速鉴别诊断 PDCoV 和 PoRV 2 种猪病毒性腹泻疫病病原的同时，对样品的有效获取、核酸提取过程、检测反应体系的配制进行质控，本研究在所建立的荧光定量 PCR 方法中引入了内参基因的检测通道，在一次检测中完成对 PDCoV、PoRV 鉴别的同时，可对体系配制操作、cDNA 模板的质量及含量进行监控。

内参基因又被称为管家基因，最初常在分子生物学试验中被用于规范基因表达<sup>[33-34]</sup>。内参基因可在各种条件下稳定表达，选择适当的内参基因，可有效

避免 PCR 检测中因 DNA/RNA 提取效率、逆转率、反应体系配置、实际反应发生等几个方面引起的偏差，从而提高基因检测的准确性及再现性<sup>[35]</sup>。不同组织类型中，或经过不同处理，内参基因的表达可能存在很大差异<sup>[36-37]</sup>。常用的候选猪源内参基因主要包括选  $\beta$ -actin、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、核糖体蛋白 L4 (RPL4)、次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT)、肽基脯氨酸异构酶 A (PPIA)、酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶活化蛋白 (YWHAZ)、TATA 结合蛋白 (TBP) 以及  $\beta$ -2 微球蛋白 (B2M)。目前最常用于研究的内参基因是  $\beta$ -actin 和 GAPDH，其中 GAPDH 主要存在于细胞质中，而  $\beta$ -actin 存在于细胞质和细胞骨架中，且 GAPDH 可能受因腹泻引起的机体代谢紊乱情况影响<sup>[38]</sup>，因此本研究选择  $\beta$ -actin 作为内参基因。

根据 GenBank 中 PDCoV N 基因、PoRV VP6 基因的保守区域设计阳性重组质粒扩增引物，本研究使用在猪源细胞中分离获得的 PDCoV、PoRV 毒株病毒液，分别扩增 N 基因与 VP6 基因构建阳性重组标准质粒，在质粒的病毒序列相对保守区设计了特异性检测引物和探针，同时设立了猪源  $\beta$ -actin 基因作为内参基因。经过特异性试验可知，本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法在多种常见主要猪消化道疫病病原的临床组织样品中，能特异性扩增 PDCoV、PoRV 及猪源  $\beta$ -actin，且根据建立的标准曲线方程及检测 Ct 值可实现对检测样品中的病毒含量的定量分析。本方法对 PDCoV、PoRV 及  $\beta$ -actin 的最低检测限分别可达  $1.64 \times 10^2$ 、 $1.65 \times 10^2$  和  $5.99 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L，在敏感性试验中使用  $\beta$ -actin-Z 作为模板时，显示  $\beta$ -actin 通道敏感性较低，而在特异性试验中使用组织样品核酸作为模板时， $\beta$ -actin 却可以得到稳定扩增，导致此情况的原因尚不明确，有待进一步研究分析。重复性试验表明，应用所建立方法对不同批次的 3 个不同相同浓度的阳性重组质粒标准品的组内和组间检测 Ct 值结果，变异系数均在 2% 以内，说明该方法的重复性良好。应用所建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法和本实验室所用的单重分别检测 PDCoV、PoRV 的商品化试剂盒，对保存的广西地区内猪腹泻临床样品共 63 份进行检测病原核酸检测，检测出 PDCoV 与 PoRV 阳性符合率分别为 96.66% (PDCoV)、100% (PoRV)，仅有 1 份样品检测结果不相符 (该样品来自腹泻猪肠内容物，应用本研究建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法未检出)。导致结果不一致的原因尚无法确定，可能是由于本研究所建立的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法敏感性仍有欠缺所导致。

## 4 结论

本研究成功建立了一种能通过猪源内参基因  $\beta$ -actin 对样品进行质控、同时鉴别诊断被检样品中 PDCoV 和 PoRV 的多重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法。该方法可在 45 min 左右完成反应程序,缩短了检测时间,提高了检测效率,且具备敏感、特异和准确等特点,适用于大批量样品的快速检测,可以为生产实际中 PDCoV 和 PoRV 的单独/混合感染的监测、早期诊断、流行病学调查和及时预警与有效防控 PDCoV 和 PoRV 引起的猪腹泻提供可行技术支持。

## 参考文献:

- [1] 张利卫,曹贝贝,张云飞,等.猪 $\delta$ 冠状病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25 (6): 969-975.
- [2] WANG L, HAYES J, SARVER C, et al. Porcine deltacoronavirus: histological lesions and genetic characterization [J]. Arch Virol, 2016, 161 (1): 171-175.
- [3] 段群棚,李晓玉,赵硕,等. 2016—2019 年广西部分猪场仔猪病毒性腹泻的流行病学调查 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (2): 564-574.
- [4] JING Z, ZHANG X, SHI H, et al. A G3P [13] porcine group A rotavirus emerging in China is a reassortant and a natural recombinant in the VP4 gene [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (2): e317-e328.
- [5] 乔成鹏. 2015~2016 年中国部分地区猪轮状病毒感染检测及病毒分离与鉴定 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [6] VLASOVA A N, AMIMO J O, SAIF L J. Porcine rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies [J]. Viruses, 2017, 9 (3): 48.
- [7] 丁光明. 猪病毒性腹泻六重 RT-PCR 检测方法的建立应用及猪流行性腹泻病毒的分离鉴定 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [8] EDWARDS C E, YOUNT B L, GRAHAM R L, et al. Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117 (43): 26915-26925.
- [9] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, et al. Emergence of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution [J]. medRxiv, 2021, 25: 3391.
- [10] THEUNS S, HEYLEN E, ZELLER M, et al. Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses [J]. J Virol, 2015, 89 (2): 1043-1057.
- [11] MARTHALER D, HOMWONG N, ROSSOW K, et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples [J]. J Virol Meth, 2014, 209: 30-34.
- [12] CHEN D, ZHOU L, TIAN Y, et al. Genetic characterization of a novel G9P [23] rotavirus A strain identified in southwestern China

with evidence of a reassortment event between human and porcine strains [J]. Arch Virol, 2019, 164 (4): 1229-1232.

- [13] 马鑫,李丹地,郭延青,等. 河北省卢龙地区猪与人 G9 型 A 组轮状病毒进化关系研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28 (4): 252-254.
- [14] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, et al. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children [J]. Nature, 2021, 600 (7887): 133-137.
- [15] 孙连海. 猪常见腹泻性疾病的诊断与防治 [J]. 山东畜牧兽医, 2024, 45 (9): 49-51.
- [16] 强桃艳,成温玉,张犇,等. 猪 $\delta$ 冠状病毒病原检测方法研究进展 [J]. 动物医学进展, 2021, 42 (4): 83-88.
- [17] 丁庆文,闫晓光,张红垒,等. 猪 $\delta$ 冠状病毒、猪流行性腹泻病毒和猪萨佩罗病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及初步临床应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43 (6): 615-620, 632.
- [18] PRADHAN S K, KAMBLE N M, PILLAI A S, et al. Recombinant nucleocapsid protein based single serum dilution ELISA for the detection of antibodies to infectious bronchitis virus in poultry [J]. J Virol Meth, 2014, 209: 1-6.
- [19] ABDELWAHAB M, LOA C C, WU C C, et al. Recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to Turkey coronavirus [J]. J Virol Methods, 2015, 217: 36-41.
- [20] 刘阳阳,冉旭华,闻晓波. 轮状病毒拮抗宿主先天性免疫机制研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32 (7): 659-664.
- [21] VILLENA J, VIZOSO-PINTO M G, KITAZAWA H. Intestinal innate antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects against rotavirus infection [J]. Front Immunol, 2016, 7: 563.
- [22] NAIR N, NEWELL E W, VOLLMERS C, et al. High-dimensional immune profiling of total and rotavirus VP6-specific intestinal and circulating B cells by mass cytometry [J]. Mucosal Immunol, 2016, 9 (1): 68-82.
- [23] NAVARRO R, AUNG M S, CRUZ K, et al. Whole genome analysis provides evidence for porcine-to-Simian interspecies transmission of rotavirus-A [J]. Infect Genet Evol, 2017, 49: 21-31.
- [24] MALM M, HEINIMÄKI S, VESIKARI T, et al. Rotavirus capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-delivered with norovirus VLPs [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 189 (3): 331-341.
- [25] 何颖,秦毅斌,段群棚,等. 2013—2018 年广西部分规模猪场主要病毒性腹泻疫病原流行病学调查研究 [J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27 (3): 86-93.
- [26] 段群棚,秦毅斌,何文娜,等. 2017—2021 年广西腹泻猪群主要病毒性腹泻病原检测 [J]. 中国动物检疫, 2021, 38 (10): 1-8.
- [27] 周洪樵. 猪重要腹泻病毒多重 qRT-PCR 鉴别检测方法 & PEDV、PDCoV 分子流行病学研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- [28] 俞赵荣,孙彤,金雪明,等. 猪冠状病毒四重荧光定量 PCR 检测方法建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2025, 33 (2): 97-105.
- [29] 李金海,李兴玉,康润敏,等. 猪流行性腹泻病毒和猪德尔塔冠状病毒双重 TaqMan 荧光 RT-PCR 检测方法的建立与应用

[J]. 中国动物传染病学报, 2023-08-08. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230807.002.

[30] 高艺祥, 王金凤, 张倩, 等. 同时检测 PDCoV、TGEV、PoRV 和 PEDV 的四重实时荧光 RT-PCR 方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43 (3): 448-454.

[31] 李博, 崔燕, 安静, 等. 鼠疫多重荧光定量 PCR 内标检测方法的建立与应用评价 [J]. 疾病监测, 2022, 37 (5): 657-660.

[32] 陈瑶, 李旻熹, 陈增萍. 一种基于内标法和定量分析模型的荧光定量 PCR 方法: CN110564830A [P]. 2023-07-18.

[33] QUIÑONEZ-FLORES C M, LÓPEZ-LOEZA S M, PACHECO-TENA C, et al. Stability of housekeeping genes in inflamed joints of spontaneous and collagen-induced arthritis in DBA/1 mice [J]. Inflamm Res, 2021, 70 (5): 619-632.

[34] ZHOU L, MENG J Y, RUAN H Y, et al. Expression stability of candidate RT-qPCR housekeeping genes in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2021, 108 (1): e21831.

[35] 陈薪全, 潘宇恒, 敬云鸿, 等. 用 RT-qPCR 方法评价 4 个不同猪品种骨骼肌候选内参基因 [J]. 四川农业大学学报, 2023, 41 (6): 1107-1115.

[36] TANG R, DODD A, LAI D, et al. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2007, 39 (5): 384-390.

[37] GUTIERREZ L, MAURIAT M, GUÉNIN S, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants [J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6 (6): 609-618.

[38] 付雷. miR-145-5p 下调 SOX2 基因表达抑制肺癌干细胞特性的体外和体内研究 [D]. 济南: 山东大学, 2019.

· 信息 ·

## 21 种畜牧、兽医科学类中国科技核心期刊中《畜牧与兽医》 综合评价总分排名第九位

《2024 年版中国科技期刊引证报告 (核心版) 自然科学卷》共收录了在中国 (不含港澳台地区) 正式出版的 1 998 种中文期刊和 167 种英文期刊, 其中畜牧、兽医科学类期刊共收录 21 种, 包括 19 本中文期刊和 2 本英文期刊, 《畜牧与兽医》综合评价总分排名第九位。21 种期刊主要指标详见附表。

**附表 2023 年畜牧、兽医科学类期刊主要指标**

序号	刊名	核心总被引频次			核心影响因子			综合评价总分		学科扩 散指标	学科影 响指标	红点 指标
		数值	排名	离均差率	数值	排名	离均差率	数值	排名			
1	ANIMAL NUTRITION	951	15	-0.49	1.612	2	0.65	51.9	2	6.52	0.81	0.25
2	JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY	1 123	13	-0.40	1.403	4	0.44	46.8	4	6.48	0.81	0.08
3	蚕业科学	627	19	-0.66	0.660	16	-0.32	34.3	13	7.19	0.43	0.25
4	动物医学进展	1 522	9	-0.19	0.670	15	-0.31	41.7	8	16.05	0.90	0.52
5	动物营养学报	7 671	1	3.11	1.990	1	1.04	78.4	1	16.33	1.00	0.82
6	家畜生态学报	1 158	12	-0.38	0.643	17	-0.34	34.6	12	8.90	0.95	0.54
7	经济动物学报	215	21	-0.88	0.510	20	-0.48	26.6	19	3.71	0.71	0.53
8	粮食与饲料工业	807	16	-0.57	0.618	19	-0.37	28.3	18	7.81	0.57	0.22
9	饲料工业	2 549	6	0.36	1.529	3	0.57	45.6	5	11.00	0.90	0.73
10	饲料研究	3 500	3	0.87	1.202	6	0.23	32.2	16	13.43	0.95	0.70
11	畜牧兽医学报	2 563	5	0.37	1.060	8	0.09	44.1	7	12.14	0.95	0.59
12	<b>畜牧与兽医</b>	1 484	11	-0.21	0.730	14	-0.25	39.1	9	9.48	0.86	0.57
13	畜牧与饲料科学	797	17	-0.57	0.620	18	-0.37	36.8	11	8.14	0.86	0.47
14	中国动物传染病学报	648	18	-0.65	0.821	11	-0.16	24.7	20	5.33	0.76	0.56
15	中国家禽	1 966	7	0.05	0.911	10	-0.07	33.6	15	7.71	0.95	0.56
16	中国兽药杂志	572	20	-0.69	0.462	21	-0.53	23.6	21	7.95	0.76	0.25
17	中国兽医科学	1 102	14	-0.41	0.772	12	-0.21	33.8	14	8.05	0.86	0.57
18	中国兽医学报	1 808	8	-0.03	0.761	13	-0.22	37.4	10	11.38	0.95	0.56
19	中国畜牧兽医	3 121	4	0.67	1.004	9	0.03	45.3	6	15.29	0.95	0.65
20	中国畜牧杂志	3 551	2	0.90	1.189	7	0.22	47.4	3	12.95	1.00	0.63
21	中国预防兽医学报	1 484	10	-0.21	1.338	5	0.37	31.0	17	6.52	0.81	0.47

注: 数据来自中国科学技术信息研究所《2024 年版中国科技期刊引证报告 (核心版) 自然科学卷》。