

研究报告

奶牛流产三种病原多重 PCR 检测方法的建立与初步应用

李彬^{1,3}, 王辉², 刁梓洋¹, 翟云逸¹, 陈家露¹, 周栋¹, 刘伟¹, 靳亚平¹, 王爱华^{*1}

1 西北农林科技大学 动物医学院 农业农村部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100

2 加格达奇区畜牧水产服务中心, 黑龙江 加格达奇 165000

3 广东海大畜牧兽医研究院有限公司, 广东 广州 511400

李彬, 王辉, 刁梓洋, 翟云逸, 陈家露, 周栋, 刘伟, 靳亚平, 王爱华. 奶牛流产三种病原多重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 613-622.

LI Bin, WANG Hui, DIAO Ziyang, ZHAI Yunyi, CHEN Jialu, ZHOU Dong, LIU Wei, JIN Yaping, WANG Aihua. Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneously detecting three pathogens inducing abortions in dairy cows[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 613-622.

摘要:【背景】布鲁氏菌(*Brucella*)、牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)和犬新孢子虫(*Neospora caninum*)是引起奶牛流产的重要病原, 目前针对上述病原的血清学检测方法, 存在特异性低或操作复杂等问题, PCR 或 RT-PCR 方法仅能对单一病原进行检测; 多重 PCR 可同时对多种病原进行检测, 可极大地提高病原的检测效率。【目的】建立布鲁氏菌、牛传染性鼻气管炎病毒和犬新孢子虫的多重 PCR 检测方法, 对临床样品进行快速检测。【方法】针对布鲁氏菌 *omp25* 基因、牛传染性鼻气管炎病毒 *gB* 基因和犬新孢子虫 *SRS2* 基因设计特异性引物, 优化多重 PCR 的退火温度、引物浓度、延伸时间和循环次数; 以沙门氏菌(*Salmonella*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium*)、弓形虫(*Toxoplasma gondii*)和圆环病毒标准核酸验证多重 PCR 反应的特异性, 以含靶基因的重组质粒验证多重 PCR 的敏感性; 对 55 份流产奶牛阴道拭子进行检测。【结果】多重 PCR 的退火温度为 59 °C, 延伸时间为 40 s, 循环次数为 30, 各引物浓度为 1 μmol/L; 对 *omp25* 基因和 *SRS2* 基因的检测下限为 4×10^1 copies, 对 *gB* 基因的检测下限为 4×10^2 copies; 与其他病原无交叉反应; 55 份样品中检出布鲁氏菌阳性 9 份, 牛传染性鼻气管炎病毒阳性 3 份, 犬新孢子虫阳性 7 份, 其中布鲁氏菌和犬新孢子虫混合感染 1 份。【结论】成功构建了 3 种病原的多重 PCR 检测方法, 能够对临床样品进行快速、准确的检测。

关键词: 奶牛; 流产; 多重 PCR; 布鲁氏菌; 牛传染性鼻气管炎病毒; 犬新孢子虫

资助项目: 国家自然科学基金(32373016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32373016).

*Corresponding author. E-mail: aihuawang1966@163.com

Received: 2024-09-09; Accepted: 2024-12-30; Published online: 2025-01-13

Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneously detecting three pathogens inducing abortions in dairy cows

LI Bin^{1,3}, WANG Hui², DIAO Ziyang¹, ZHAI Yunyi¹, CHEN Jialu¹, ZHOU Dong¹, LIU Wei¹, JIN Yaping¹, WANG Aihua^{*1}

1 Key Laboratory of Animal Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Jiagedaqi District Animal Husbandry and Aquatic Products Service Center, Jiagedaqi 165000, Heilongjiang, China

3 Guangdong Haid Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Guangzhou 511400, Guangdong, China

Abstract: [Background] *Brucella*, infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), and *Neospora caninum* are major pathogens that cause abortions in dairy cows. Current serological methods for detecting the above pathogens are characterized by low specificity and complex operation, while PCR and RT-PCR methods are only capable of detecting single pathogens. Multiplex PCR enabling the detection of multiple pathogens at the same time greatly increases the detection efficiency. [Objective] To establish a multiplex PCR assay for rapidly detecting *Brucella*, IBRV, and *N. caninum* in clinical samples. [Methods] Specific primers were designed for *Brucella omp25*, IBRV *gB*, and *N. caninum SRS2*, and the annealing temperature, primer concentration, extension time, and number of cycles of the multiplex PCR assay were optimized. The specificity of the multiplex PCR assay was examined with the standard nucleic acids of *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma gondii*, and circovirus. The sensitivity of the multiplex PCR assay was tested with the recombinant plasmids carrying the target genes. Finally, the established assay was employed to test 55 vaginal swabs from cows suffering from abortions. [Results] The optimal conditions of the multiplex PCR assay were annealing temperature of 59 °C, the extension time of 40 s, 30 cycles, and the primer concentration of 1 μmol/L. The lower limit of detection was 4×10^1 copies for *omp25* and *SRS2* and 4×10^2 copies for *gB*. The established assay showed no cross-reactivity with other pathogens. Nine out of 55 samples were detected positive for *Brucella*, 3 positive for IBRV, and 7 positive for *N. caninum*. Particularly, one sample was subjected to mixed infection by *Brucella* and *N. caninum*. [Conclusion] A multiplex PCR assay for three pathogens was successfully constructed, enabling rapid and accurate detection of clinical samples.

Keywords: dairy cow; abortion; multiplex PCR; *Brucella*; infectious bovine rhinotracheitis virus; *Neospora caninum*

奶牛流产是阻碍奶牛养殖业发展的重要因素,不仅造成胎儿损失,还可引起母牛繁殖障碍,对产奶量也有很大影响^[1]。布鲁氏菌(*Brucella*)、犬新孢子虫(*Neospora caninum*)、牛传染性鼻气

管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)是引起奶牛流产的3种常见病原^[2-4]。

布鲁氏菌可感染人、牛、羊、猪、鹿和犬等动物,引发重要的人畜共患传染病,即布鲁

氏菌病(brucellosis), 简称布病。该病属于二类动物疫病, 病原菌主要侵害生殖系统, 引起母畜不孕、流产、早产、产死胎、胎衣不下等, 公畜主要表现发热、关节炎、睾丸炎等^[5]。新孢子虫病(neosporosis)是由犬新孢子虫感染引起的多宿主原虫病, 主要宿主包括牛、羊、马等, 可引起孕畜流产、死胎、新生胎儿神经系统疾病等, 是世界性奶牛流产的主要病因^[6]。牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis) 又称“红鼻病”, 是由牛传染性鼻气管炎病毒感染引起的一种热性、急性接触性传染病, 可导致奶牛子宫炎、阴道炎、流产、死胎等^[7], 我国将该病列为二类动物疫病。

随着分子生物学技术的快速发展, PCR 或 RT-PCR 已广泛用于上述病原的检测^[8-10], 但现有方法多是针对单一病原的检测。因此, 本研究旨在建立一种准确性高、灵敏性强的多重 PCR 方法, 对上述 3 种流产病原进行快速诊断和及时防控。

1 材料与方法

1.1 样品

布鲁氏菌、犬新孢子虫、牛传染性鼻气管炎病毒、沙门氏菌(*Salmonella*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium*)、弓形虫(*Toxoplasma gondii*)及圆环病毒标准核

酸, 西北农林科技大学动物医学院实验室保存。55 份流产奶牛阴道拭子样品, 宁夏回族自治区灵武市某规模化奶牛养殖场。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒及质粒小提试剂盒, 北京 Tiangen 生化科技公司; PrimeSTAR DNA Polymerase、pMD-19T Vector、DH5 α 感受态细胞和 DNA marker, TaKaRa 公司; 羧苄青霉素, 北京索莱宝科技有限公司; Quick Taq HS DyeMix, 东洋纺(上海)生物科技有限公司。核酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 核酸扩增仪和凝胶成像系统, 伯乐生命医学产品公司; 台式高速离心机, 艾本德股份公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 上 *Brucella omp25* 基因(GenBank 登录号: X79284.1)、IBRV *gB* 基因(GenBank 登录号: KJ652520.1)、*Neospora caninum* *SRS2* 基因(GenBank 登录号: JQ410454.1) 的序列, 选择保守片段, 利用 Primer 5 软件设计 3 组特异性引物(表 1)。引物由西安擎科生物科技有限公司合成。

1.4 重组质粒的构建

按照 DNA 提取试剂盒说明书提取实验室保存的布鲁氏菌、犬新孢子虫和牛传染性鼻气管炎病毒的核酸, 利用 3 组引物分别扩增目的基因

表 1 多重 PCR 引物

Table 1 Primers for multiplex PCR

病原名称及基因	引物名称	序列	扩增片段长度
Pathogen and gene	Primer name	Sequence (5'→3')	Fragment length (bp)
<i>Brucella</i> <i>omp25</i> gene	Omp25-F Omp25-R	ACCCTCGATATGTCACCCCT GAACTTGTAGCCGATGCCGA	744
<i>Neospora caninum</i> <i>SRS2</i> gene	SRS2-F SRS2-R	GCGTCGTTTTAGCAGTTGGG CTTGTCCCTTCGCGTTTTGGG	953
IBRV <i>gB</i> gene	<i>gB</i> -F <i>gB</i> -R	GTACGCGCCATTACAAACC CAAAAAGTTCCGCGAGACC	502

片段。PCR 反应体系(50 μL): PrimeSTAR DNA Polymerase 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 基因组 DNA 2 μL , 无酶水 21 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环。将回收产物与 pMD-19T Vector 连接并转化至 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后, 提取质粒使用 *Sal* I 限制性内切酶进行鉴定并测序。鉴定正确的 3 种重组质粒分别命名为 pMD-19T-omp25、pMD-19T-SRS2 和 pMD-19T-gB, 采用分光光度计测定并计算各重组质粒的浓度(ng/ μL), 再根据相对分子量计算 3 种质粒的浓度(表 2), -20°C 保存。

1.5 单重 PCR 反应条件的优化

PCR 反应体系(20 μL): *Taq* Mix 酶 10 μL , 质粒模板(浓度为 2×10^{10} copies) 2 μL , 上、下游引物各 1 μL , 无酶水 6 μL 。Omp25-F/Omp25-R、SRS2-F/SRS2-R 和 gB-F/gB-R 引物浓度设为 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 退火温度依次设置为 51、53、55、57、59 和 61 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 多重 PCR 反应条件的优化

PCR 反应体系(20 μL): *Taq* Mix 酶 10 μL , 质粒模板(3 种质粒浓度均为 2×10^{10} copies) 2 μL , 上、下游引物各 1 μL , 无酶水 6 μL , 在同一 PCR 反应体系中同时加入 Omp25-F/Omp25-R、SRS2-F/SRS2-R、gB-F/gB-R 和 3 种质粒。引物浓度分别设为 2.0、1.0、0.8、0.5、0.4、0.2、0.1 $\mu\text{mol/L}$, 退火温度分别设为 53、55、57、59、61 $^{\circ}\text{C}$, 延伸时间分别设为 55、45、40、35 s,

循环次数分别设为 35、30、25、20 次, 优化多重 PCR 反应条件。

1.7 多重 PCR 反应的特异性验证

采用优化后的多重 PCR 反应体系和条件分别对大肠杆菌、沙门氏菌、弓形虫、隐孢子虫和圆环病毒的标准核酸进行扩增, 验证多重 PCR 反应的特异性。

1.8 单重和多重 PCR 反应的敏感性验证

三种重组质粒按照 4×10^{10} – 4×10^0 copies/ μL 浓度进行梯度稀释, 以 4×10^5 – 4×10^0 copies/ μL 浓度质粒为模板, 分别用单重和多重 PCR 反应进行扩增, 确定检测下限。

1.9 多重 PCR 反应的重复性验证

采用优化后的反应条件, 以 3 种质粒混合液为模板, 重复进行 3 次 PCR 反应, 验证多重 PCR 反应的重复性。

1.10 临床样品检测

使用 DNA 提取试剂盒提取 55 份流产奶牛阴道拭子基因组 DNA, 用建立的多重 PCR 方法进行检测, 将阳性扩增产物送至西安擎科生物科技有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 标准核酸扩增产物特征

以布鲁氏菌、犬新孢子虫和牛传染性鼻气管炎病毒的标准核酸为模板进行 PCR 反应, 经琼脂糖凝胶电泳, 分别在 744、953 和 502 bp 处出现特异性条带(图 1)。

表 2 质粒信息

Table 2 Plasmid information

Item	pMD-19T-gB	pMD-19T-omp25	pMD-19T-SRS2
Target gene length (bp)	502	744	953
Plasmid length (bp)	3 190	3 432	3 641
Concentration (ng/ μL)	232	373	247
Copies	4.7×10^{10}	4.3×10^{10}	3.5×10^{10}

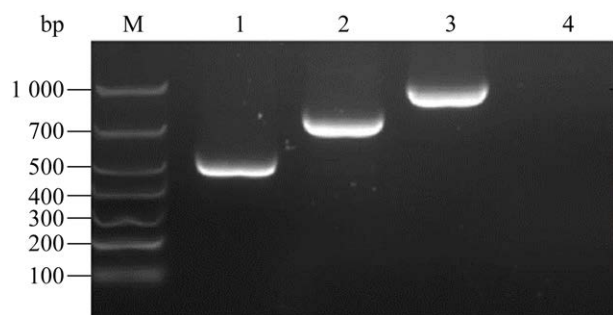


图1 标准核酸扩增产物的电泳图 M:DNA 分子质量标准; 1: 牛传染性鼻气管炎病毒; 2: 布鲁氏菌; 3: 犬新孢子虫; 4: 阴性对照。

Figure 1 Electropherogram of amplification products of standard nucleic acid. M: DNA marker; 1: Infectious bovine rhinotracheitis virus; 2: *Brucella*; 3: *Neospora caninum*; 4: Negative control.

2.2 重组质粒特征

使用 *Sal* I 限制性内切酶酶切鉴定 3 种重组质粒, 并对酶切产物进行 PCR 鉴定后经凝胶电泳检测, 结果显示, 酶切片段及扩增产物与预期大小符合(图 2)。

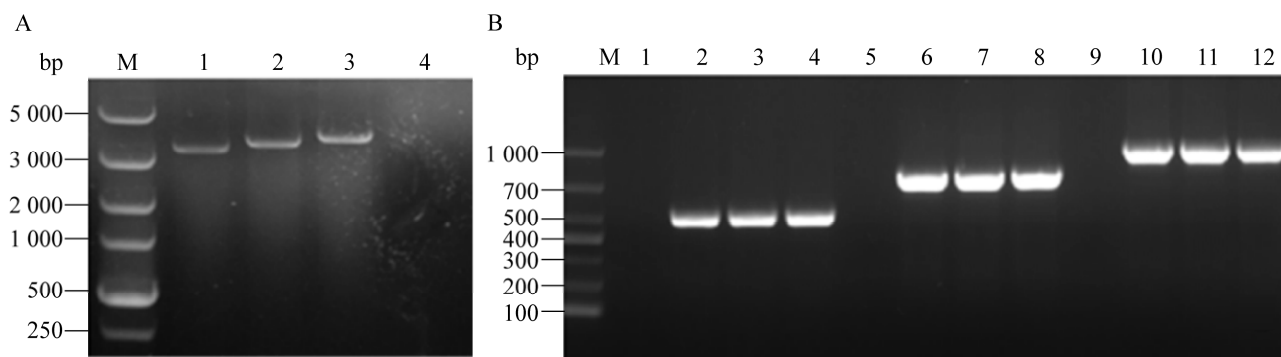


图2 重组质粒扩增产物的电泳图 A: 酶切质粒电泳图谱(M: DNA 分子质量标准; 1: pMD-19T-gB 质粒; 2: pMD-19T-omp25 质粒; 3: pMD-19T-SRS2 质粒; 4: 阴性对照)。B: 质粒 PCR 产物电泳图谱(M: DNA 分子质量标准; 1、5、9: 阴性对照; 2-4: pMD-19T-gB 质粒, 6-8: pMD-19T-omp25 质粒, 10-12: pMD-19T-SRS2 质粒)。

Figure 2 Electropherogram of recombinant plasmid products. A: Electropherogram of enzyme digested plasmids (M: DNA marker; 1: pMD-19T-gB; 2: pMD-19T-omp25; 3: pMD-19T-SRS2; 4: Negative control). B: Electropherogram of plasmid PCR products (M: DNA marker; 1, 5, 9: Negative control; 2-4: pMD-19T-gB; 6-8: pMD-19T-omp25; 10-12: pMD-19T-SRS2).

2.3 优化的单重 PCR 反应条件

单重 PCR 反应中, 设定引物退火温度为 55 °C, 引物浓度为 0.8 μmol/L 时, 单独扩增各目的基因均可得到清晰的目的条带(图 3)。

2.4 优化的多重 PCR 反应条件

多重 PCR 反应中, 设定引物退火温度为 59 °C, 各引物浓度为 1.0 μmol/L, 延伸时间为 40 s, 循环次数为 30 次时, 扩增的 3 条目的基因条带最清晰且扩增效率高(图 4)。

2.5 多重 PCR 反应的特异性

特异性结果显示, 布鲁氏菌、犬新孢子虫、牛传染性鼻气管炎病毒标准核酸样品均可扩增出特异性条带, 对照样品无条带(图 5)。

2.6 单重和多重 PCR 反应的敏感性

敏感性结果显示, 单重 PCR 对 *omp25* 基因、*SRS2* 基因和 *gB* 基因的检测下限为 4×10^1 copies/μL; 多重 PCR 对 *omp25* 基因和 *SRS2* 基因的检测下限为 4×10^1 copies/μL, 对 *gB* 基因的检测下限为 4×10^2 copies/μL (图 6)。

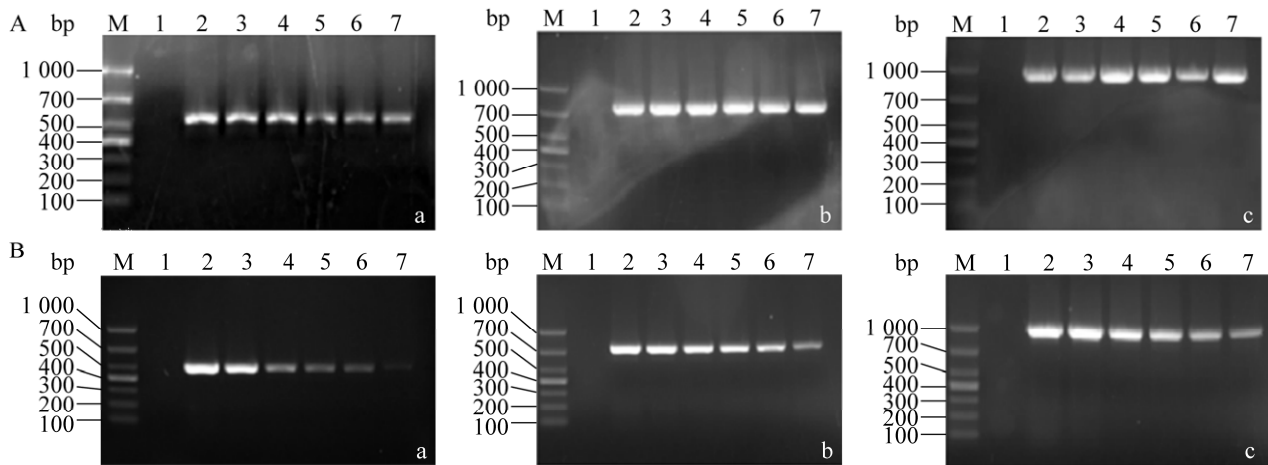


图3 应用引物gB (a)、Omp25 (b)和SRS2 (c)在优化退火温度(A)和引物浓度(B)条件下建立的单重PCR扩增产物电泳图谱 M: DNA分子质量标准; 1: 阴性对照; A: 2-7: 退火温度分别设定为51、53、55、57、59、61 °C; B: 2-7: 引物浓度分别设定为1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μmol/L。

Figure 3 Electropherogram of single-fold PCR amplification products established by applying primers gB (a), Omp25 (b) and SRS2 (c) under optimized annealing temperature (A) and primer concentration (B) conditions. M: DNA marker; 1: Negative control; A: 2-7: The temperature in sequence as 51, 53, 55, 57, 59, 61 °C; B: 2-7: The concentration in sequence as 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 μmol/L.

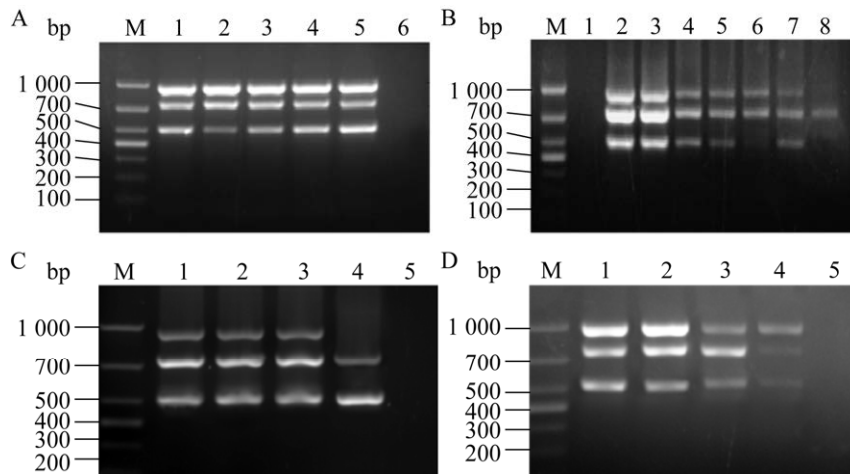


图4 应用混合引物在优化退火温度(A)、引物浓度(B)、延伸时间(C)和循环次数(D)条件下建立的多重PCR扩增产物电泳图 M: DNA分子质量标准。A: 1-5: 退火温度设定为53、55、57、59和61 °C; 6: 阴性对照。B: 1: 阴性对照; 2-8: 引物浓度设定为2.0、1.0、0.8、0.5、0.4、0.2和0.1 μmol/L。C: 1-4: 延伸时间设定为55、45、40和35 s; 5: 阴性对照。D: 1-4: 循环次数设定为35、30、25和20次; 5: 阴性对照。

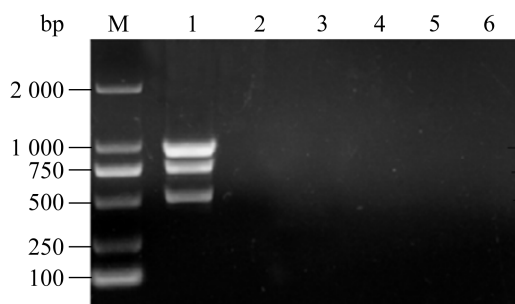


图5 特异性试验的PCR产物电泳图 M:DNA分子质量标准; 1: 布鲁氏菌、犬新孢子虫、牛传染性鼻气管炎病毒标准核酸混合样品; 2-6: 大肠杆菌、沙门氏菌、弓形虫、隐孢子虫、圆环病毒标准核酸。

Figure 5 Electropherogram of PCR products for specificity tests. M: DNA marker; 1: Mixed standard nucleic acid samples of *Brucella*, *Neospora caninum*, and infectious bovine rhinotracheitis virus; 2-6: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Circovirus* standard nucleic acid samples.

2.7 多重PCR反应的重复性

重复性结果显示, 以布鲁氏菌、犬新孢子虫、牛传染性鼻气管炎病毒的混合核酸样品为模板进行3次重复PCR扩增, 均在对应大小处出现特异性条带(图7)。

2.8 临床样品检测

采用建立的多重PCR方法对55份流产奶牛的阴道拭子样品进行PCR检测及电泳(图8)。结果显示, 9份检出布鲁氏菌, 7份检出犬新孢子虫, 3份检出牛传染性鼻气管炎病毒, 另有1份同时检出布鲁氏菌和犬新孢子虫(表3)。

3 讨论与结论

选择合适的基因片段进行引物设计是建立PCR检测方法的关键。*omp25*基因是布鲁氏菌的特异性基因, 与其他细菌毒力基因无同源性^[1], 是布鲁氏菌分子检测(如PCR、荧光PCR等)的

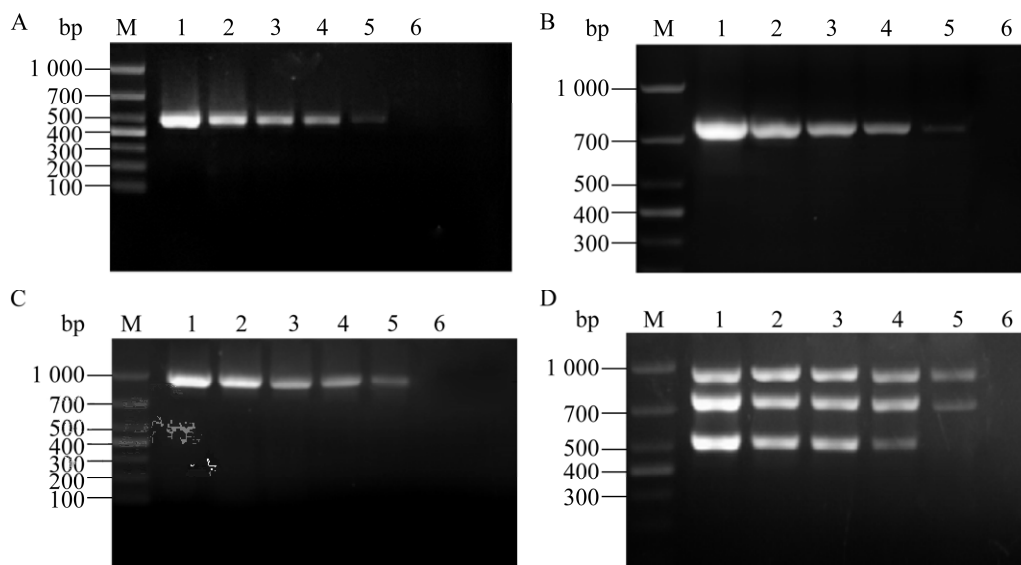


图6 对pMD-19T-gB质粒(A)、pMD-19T-omp25质粒(B)、pMD-19T-SRS2质粒(C)和混合质粒(D)敏感性试验的PCR产物电泳图谱 M: DNA分子质量标准; 1-6: 质粒浓度为 4×10^5 、 4×10^4 、 4×10^3 、 4×10^2 、 4×10^1 、 4×10^0 copies。

Figure 6 Electropherogram of PCR products from sensitivity tests on pMD-19T-gB (A), pMD-19T-omp25 (B), pMD-19T-SRS2 (C) and mixed plasmids (D). M: DNA marker; 1-6: The plasmid concentration as 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 4×10^0 copies.

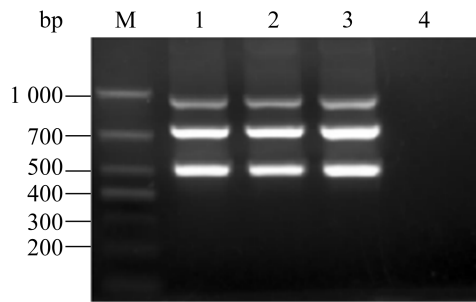


图 7 对布鲁氏菌、犬新孢子虫、牛传染性鼻气管炎病毒的重复性试验 PCR 扩增产物电泳图谱 M: DNA 分子质量标准; 1-3: 标准核酸的重复验证; 4: 阴性对照。

Figure 7 Electropherogram of PCR products from reproducibility tests for *Brucella*, *Neospora caninum*, and infectious bovine rhinotracheitis virus. M: DNA marker; 1-3: Replicates of standard nucleic acids; 4: Negative control.

首选基因之一^[12]。gB 蛋白是牛传染性鼻气管炎病毒的主要糖蛋白, gB 基因具有高度的保守性, 因而是建立 IBRV 检测方法的首选基因之一^[13]。SRS2 蛋白广泛存在于犬新孢子虫的速殖子和缓殖子阶段, 因此, SRS2 基因常用于急性期和慢性期感染检测^[14]。因此, 本研究选择 *Brucella omp25* 基因、IBRV gB 基因、*Neospora caninum* SRS2 基因作为引物设计的目的序列。各引物的退火温度较高, 以保证反应的特异性, 其次, 扩增片段均大于 500 bp, 并且 3 种片段大小差异在 200 bp 以上, 易于观察。

本研究所选用的 Quick Taq HS DyeMix 预先对 dNTP、聚合酶和 Mg^{2+} 浓度进行了优化, 在保证扩增效率和准确性的前提下, 提高检测效率。

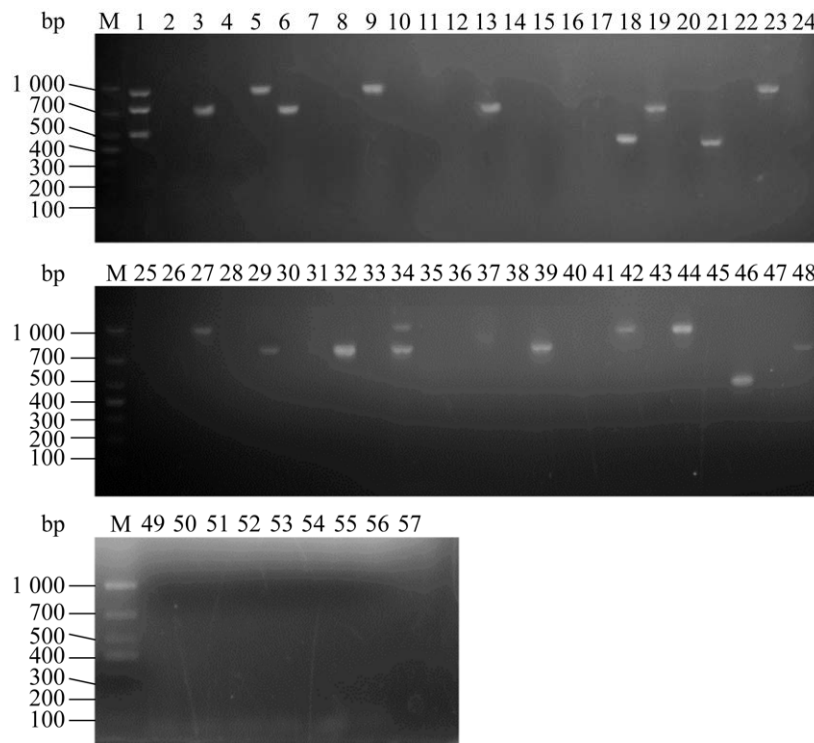


图 8 临床样品的多重 PCR 扩增产物电泳图谱 M: DNA 分子质量标准; 1: 布鲁氏菌、犬新孢子虫、牛传染性鼻气管炎病毒的标准核酸; 2-56: 阴道拭子样品; 57: 阴性对照。

Figure 8 Electropherogram of multiplex PCR products from clinical samples. M: DNA marker; 1: Standard nucleic acids for *Brucella*, *Neospora caninum*, and infectious bovine rhinotracheitis virus; 2-56: Vaginal swab samples; 57: Negative control.

表 3 临床样品中的病原检出率(抗原阳性数/样品总数)

Table 3 Pathogen detection rate in clinical samples (number of antigen positives/total samples)

病原 Pathogen	阳性率 Positivity rate (%)
布鲁氏菌 <i>Brucella</i>	16.40 (9/55)
犬新孢子虫 <i>Neospora caninum</i>	12.73 (7/55)
牛传染性鼻气管炎病毒 Infectious bovine rhinotracheitis virus	5.45 (3/55)
布鲁氏菌+犬新孢子虫 <i>Brucella+Neospora caninum</i>	1.80 (1/55)

在 PCR 反应中, 延伸时间和循环次数对检测效率也十分重要, 本研究分别对这 2 个条件进行了优化, 最终将整个反应的时间缩短至 1 h。在对 PCR 产物进行凝胶电泳时发现, 1% 琼脂糖凝胶电泳时会出现条带区分不明显和拖带的现象, 将琼脂糖凝胶浓度提高到 2%, 拖带和区分不明显问题得到明显改善。

王建东等^[15]对宁夏回族自治区银川市和吴忠市奶牛场的流产样品进行 PCR 检测, 布鲁氏菌总阳性率为 9.2%。康晓冬等^[16]对宁夏回族自治区 9 个奶牛养殖场的奶牛进行新孢子虫抗体检测, 平均阳性率 24.11%, 最高可达 30.77%。鲍显伟等^[17]利用双重 PCR 检测方法对 79 份奶牛流产样品进行检测, 结果显示 IBRV 阳性率为 12.66%。本研究的奶牛流产样品采自流产情况较为严重的奶牛养殖场, 而国内有关研究大多采用随机取样, 这可能是本研究中布鲁氏菌及犬新孢子虫检出率远高于其他报道的主要原因。

REFERENCES

[1] FERRAZ PA, POIT DAS, FERREIRA PINTO LM, GUERRA AC, LAURINDO NETO A, DO PRADO FL, AZRAK AJ, CIHAN Ç, BARUSELLI PS, PUGLIESI G. Accuracy of early pregnancy diagnosis and determining pregnancy loss using different biomarkers and machine

learning applications in dairy cattle[J]. *Theriogenology*, 2024, 224: 82-93.

[2] YENI DK, BALEVI A, ASHRAF A, SHAH M, BÜYÜK F. Molecular detection of bacterial zoonotic abortive agents from ruminants in Turkey[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2024, 55(2): 1997-2004.

[3] LU ZX, ZHANG JY, ZHOU YH, ZHANG H, AYANNIYI OO, LUO SS, ZHANG YL, XU QM, WANG CR, YANG CS. Functional characterization of three novel dense granule proteins in *Neospora caninum* using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Acta Tropica*, 2024, 256: 107250.

[4] KRISHNAGOPAL A, van DRUNEN LITTEL-VAN den HURK S. The biology and development of vaccines for bovine alphaherpesvirus 1[J]. *The Veterinary Journal*, 2024, 306: 106152.

[5] ELIZALDE-BIELSA A, MUÑOZ PM, ZÚÑIGA-RIPA A, CONDE-ÁLVAREZ R. A review on the methodology and use of the pregnant mouse model in the study of *Brucella* reproductive pathogenesis and its abortifacient effect[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(5): 866.

[6] ALMERÍA S, SERRANO-PÉREZ B, LÓPEZ-GATIUS F. Immune response in bovine neosporosis: protection or contribution to the pathogenesis of abortion[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 109: 177-182.

[7] RIGHI C, FRANZONI G, FELIZIANI F, JONES C, PETRINI S. The cell-mediated immune response against bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) infection and vaccination[J]. *Vaccines*, 2023, 11(4): 785.

[8] ZEYBEK H, ACIKGOZ ZC, DAL T, DURMAZ R. Optimization and validation of a real-time polymerase chain reaction protocol for the diagnosis of human brucellosis[J]. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(2): 353-361.

[9] WITHOEFT JA, MARIAN L, Da COSTA LS, FERNANDES FD, VOGEL FSF, DAS NEVES GB, MILETTI LC, CASAGRANDE RA. Sheep abortions associated with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in multiple flocks from Southern Brazil[J]. *Veterinary Research Communications*, 2024, 48(4): 2699-2705.

[10] XU LH, GE GY, LI DL, LI JM, GONG QL, SHI K, LIU F, DIAO NC, CUI ZZ, LIU YY, LENG X, DU R. Establishment of a real-time fluorescent quantitative PCR detection method and phylogenetic analysis of BoAHV-1[J]. *BMC Veterinary Research*, 2024, 20(1): 180.

[11] DEGOS C, HYSENAJ L, GONZALEZ-ESPINOZA G, ARCE-GORVEL V, GAGNAIRE A, PAPADOPOULOS A, PASQUEVICH KA, MÉRESSE S, CASSATARO J, MÉMET S, GORVEL JP. Omp25-dependent

- engagement of SLAMF1 by *Brucella abortus* in dendritic cells limits acute inflammation and favours bacterial persistence *in vivo*[J]. Cellular Microbiology, 2020, 22(4): e13164.
- [12] LIU QH, WEI J, SUN QS, WANG B, WANG YT, HU Y, WU WR. Detection of brucellosis in Sika Deer (*Cervus nippon*) through loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Journal of Wildlife Diseases, 2017, 53(3): 612-615.
- [13] DELHON G, KHATIWADA S, DOUB D, HARRIS S, CHAULAGAIN S, EL-GAFFARY M, ROCK DL. Bovine papular stomatitis virus as a vaccine vector for cattle[J]. The Journal of General Virology, 2023, 104(11): 001914.
- [14] WANG P, WANG XC, WANG WR, GONG PT, ZHANG N, ZHANG RZ, ZENG H, SUN Q, LI WQ, LI X, CHENG SQ, ZHANG X, HUANG XY, GAO CY, ZHENG YD, LI JH, ZHANG XC. Evaluation of protective immune responses induced in BALB/c mice and goats by the *Neospora caninum* surface SRS proteins and interleukin-18[J]. Animals, 2022, 12(21): 2952.
- [15] 王建东, 郭亚男, 李昕, 唐玉林, 闫背背, 何生虎. 宁夏部分地区肉用母牛流产的病原血清学调查分析[J]. 动物医学进展, 2022, 43(12): 125-128.
WANG JD, GUO YN, LI X, TANG YL, YAN BB, HE SH. Serological investigation and analysis of five pathogens of aborted beef cows in some areas of Ningxia[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(12): 125-128 (in Chinese).
- [16] 康晓冬, 高海慧, 脱征军, 邵怀峰, 张和平, 马振明, 孙文华, 温万. 宁夏地区奶牛新孢子虫病的流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2017, 33(9): 111, 109.
- [17] 鲍显伟, 李小龙, 石亚楠, 梁晓珊, 李昊, 王雪妍, 许立华. 牛传染性鼻气管炎病毒和牛病毒性腹泻病毒双重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国动物检疫, 2023, 40(1): 115-120.
BAO XW, LI XL, SHI YN, LIANG XS, LI H, WANG XY, XU LH. Establishment and application of a dual PCR assay for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhoea virus[J]. China Animal Health Inspection, 2023, 40(1): 115-120 (in Chinese).