

研究报告

猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒三型、猪流感病毒三重 RT-PCR 检测方法建立及初步应用

王梦杰, 张文立, 王欣荣, 陈见兴, 夏长友, 陈洪岩, 张贺*, 王玉娥*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069

王梦杰, 张文立, 王欣荣, 陈见兴, 夏长友, 陈洪岩, 张贺, 王玉娥. 猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒三型、猪流感病毒三重 RT-PCR 检测方法建立及初步应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5092-5099

Wang Mengjie, Zhang Wenli, Wang Xinrong, Chen Jianxing, Xia Changyou, Chen Hongyan, Zhang He, Wang Yu'e. Development and preliminary application of a triplex RT-PCR assay for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type III, and swine influenza virus[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5092-5099

摘要:【背景】猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪圆环病毒三型(porcine circovirus type III, PCV3)和猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)是 3 种影响猪只健康的重要呼吸道病原, 对养猪业造成严重的经济损失, 因此需要建立高效快速的检测方法, 以了解 3 种病原在国内的流行情况。【目的】建立能同时检测 PRRSV、PCV3 和 SIV 的三重 RT-PCR 方法, 为 3 种病毒的流行病学调查和疾病监控提供技术支持。【方法】针对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV), 猪圆环病毒三型(PCV3), 猪流感病毒(SIV)基因序列, 分别设计 3 对特异性引物, 扩增 PRRSV *M* 和 *N* 基因(436 bp)、PCV3 *Cap* 基因(619 bp)和 SIV *M* 基因(199 bp)。通过对退火温度和引物浓度优化建立三重 RT-PCR 检测方法, 并对建立的多重检测方法进行特异性、敏感性、重复性试验验证。【结果】建立了能够同时快速检测 PRRSV、PCV3、SIV 的三重 RT-PCR 方法, 而对猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、猪伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type II, PCV2)、猪细小病毒 2 型(porcine parvovirus II, PPV2)、猪细小病毒 3 型(porcine parvovirus III, PPV3)和猪细小病毒 1 型(torque teno sus virus I, TTSuV1)等 6 种病原的扩增均为阴性, 特异性较好。敏感性结果显示, 同时检测 PRRSV、PCV3、SIV 这 3 种病原的检测下限为 100 copies/ μ L, 批间与批内试验结果均一致。用该方法对黑龙江省部分地区猪场的 67 份临床病料进行检测, 结果显示 PRRSV 阳性率为 16.5%, PCV3 阳性率为 10.5%, SIV 阳性率为 10.5%, 而且存在混合感染。【结论】该方法灵敏度高、特异性强, 能够应用于临床样品检测, 有效预测病原的流行情况。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 猪圆环病毒三型; 猪流感病毒; 三重 RT-PCR

基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(2021YFF0703100)

Supported by: Young Scientists Project of National Key Research and Development Program (2021YFF0703100)

*Corresponding authors: E-mail: ZHANG He: zhanghe01@caas.cn; WANG Yu'e: wangyue@caas.cn

Received: 2022-09-09; Accepted: 2022-10-27; Published online: 2022-11-29

Development and preliminary application of a triplex RT-PCR assay for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type III, and swine influenza virus

WANG Mengjie, ZHANG Wenli, WANG Xinrong, CHEN Jianxing, XIA Changyou, CHEN Hongyan, ZHANG He*, WANG Yu'e*

State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus type III (PCV3), and swine influenza virus (SIV), the major respiratory pathogens threatening pig health, lead to great economic loss in swine industry. Therefore, it is an urgent task to develop efficient and rapid detection assay for clarifying the prevalence of these pathogens in China. [Objective] We aim to establish a rapid and accurate triplex RT-PCR method for simultaneous detection of PRRSV, PCV3, and SIV and facilitate epidemiological investigation and disease surveillance. [Methods] Three pairs of specific primers were designed according to the gene sequences of PRRSV, PCV3 and SIV and the *M* and *N* genes (436 bp) of PRRSV, *Cap* gene (619 bp) of PCV3, and *M* gene (199 bp) of SIV were amplified. The annealing temperature and primer concentration were optimized and the specificity, sensitivity and reproducibility of the triplex RT-PCR were tested. [Results] The triplex RT-PCR can rapidly detect PRRSV, PCV3 and SIV, but there was no amplification for classical swine fever virus (CSFV), porcine pseudorabies virus (PRV), porcine circovirus type II (PCV2), porcine parvovirus II (PPV2), porcine parvovirus III (PPV3) and torque teno sus virus I (TTSuV1). Thus, it was highly specific. The lower limit of detection for PRRSV, PCV3 and SIV was 100 copies/ μ L and the inter-batch and intra-batch test results were consistent. The method was applied to detect the 67 clinical samples in some farms in Heilongjiang Province. The result indicated that the detection rate of PRRSV, PCV3 and SIV was 16.5%, 10.5% and 10.5% respectively, and suggested mixed infection. [Conclusion] The triplex RT-PCR is highly sensitive and specific, which can be used for the detection of clinical samples and prediction of disease prevalence.

Keywords: PRRSV; PCV3; SIV; triplex RT-PCR

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRSV)属于动脉炎病毒科(Arteriviridae)动脉炎病毒属(Arterivirus)正链 RNA 病毒, 包含有 11 个开放阅读框, 13–15 kb 长^[1-2]。PRRSV 感染猪只后引起体温升高、厌食、嗜睡、病毒血症、皮肤出现瘀点、红斑性漂白皮疹、发绀、腹泻和明显的呼吸症状^[3]。猪圆环病

毒(porcine circovirus type, PCV)是已知最小的单链环状病毒之一, 已发现 PCV1、PCV2、PCV3 和 PCV4 这 4 种亚型, 主要编码病毒复制蛋白酶(Rep)和核衣壳蛋白(Cap)^[4]。感染 PCV3 后引起猪只肾脏肿大、苍白并出现皮质淤血点等猪皮炎肾炎病综合征和母猪生殖障碍^[5]。猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)属于正黏病毒科

(Orthomyxoviridae)单链负义 RNA 病毒,是由 A 型流感病毒感染猪只后引起的一种群发性呼吸道疾病,主要以 H1N1、H1N2 和 H3N2 在猪场中流行,感染此病毒后主要表现咳嗽、嗜睡、厌食、呼吸困难或呼吸过度等症状^[6-7]。PRRSV、PCV3 和 SIV 是危害我国生猪养殖业中较常见的 3 种重要猪呼吸道疾病病原,而且存在混合感染特征。也有研究报道与呼吸道疾病相关的混合感染中检测到猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV) 2 型、3 型和 6 型(PPV-2、PPV-3 和 PPV-6)及猪细小环病毒 1 型(torque teno sus virus1, TTsuV1),与其他病原相比,PCV2 和 PRRSV 混合感染有更高的检出率^[8]。新发现的 PCV3 在全国流行且能够加剧 PCV2 和 PRRSV 的混合感染率,这预示着 PCV3 是危害猪场养殖的另一重要的病原^[9]。PRRSV 不仅引起严重的呼吸道类症状,而且引起怀孕母猪流产、死胎、木乃伊胎等症状,危害动物健康,依旧是最具经济破坏性猪病原^[10]。SIV 是一种人畜共患传染病,不仅对养猪业危害巨大,而且还威胁着人类健康,对猪群具有较高的发病率与低致死率^[11]。因此,有必要建立快速检测上述病原的方法为相关猪病的防控、流行病学调查等提供重要的技术手段,也是制定有效防控政策的前提。

目前,虽然有针对 PRRSV、PCV3 和 SIV 的血清学及病原学检测,如 ELISA 和 qPCR 检测等,但都存在一定缺点。ELISA 检测虽然具有快速、高效的优点,但不能一次多检;与 qPCR 相比,多重 RT-PCR 更经济。多重 RT-PCR 检测技术通过在反应体系中加入多对引物,能够快速准确地检测多种病原,具有省时、敏感和成本低等优点。目前,针对此 3 种病原同时检测的多重 PCR 方法尚未见报道。因此,本研究针对 PRRSV、PCV3 和 SIV 基因组保守区域设计特异性引物,通过优化反应体系与条件,以期建立同时检测上述 3 种病毒的多重 RT-PCR 方法,为病毒的快速

鉴定与猪病防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 病毒与临床样品

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)分离株、猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)分离株、均为本实验室提供和保存。猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)疫苗株、猪圆环病毒 2 型疫苗株(PCV2)、猪细小病毒 2 型、3 型(PPV-2, PPV-3)及猪细小环病毒 1 型(TTSuV1)均由中国兽医药品监察所赠送。PCV3 *Cap* 基因片段和 SIV *M* 基因片段由库美公司合成。67 份临床样品来自黑龙江某猪场。

1.2 主要试剂和仪器

病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒,天根生物有限公司; pMD18-T 和 PrimeScript™ RT reagent Kit, 宝日医生物技术(北京)有限公司; Gel Extraction Kit, 北京索莱宝科技有限公司; 2×*Taq* RT-PCR StarMix with Loading Dye, 北京依珊汇通科技有限公司。核酸蛋白测定仪,赛默飞世尔公司; Eppendorf Master-cycler RT-PCR 仪,北京佰鸥创投生物科技有限公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的 PRRSV *M* 和 *N* (EF635006.1)、PCV3 *Cap* (MF318451.1)、SIV *M* (MN418820.1)的参考株基因序列,分别设计了 3 对特异性引物(表 1),均由睿博生物科技有限公司合成。

1.4 模板的制备

按照病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书分别提取 PRRSV、CSFV 和 SIV 的总 RNA,然后利用 PrimeScript™ RT reagent Kit 进行反转录获取 cDNA,并保存于-20 °C 备用;根据病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取 PRV、PCV2、PPV1、PPV2 和 TTSuV1 的 DNA,并保存-20 °C 备用。

表 1 三重 RT-PCR 引物信息

Table 1 Primers for the triple RT-PCR

Primer name	Gene	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
PRRSV-F	<i>M</i> and <i>N</i>	TTGTGCTTGCTAGGCCGC	436
PRRSV-R		ACTAGGGGTAAAGTGATG	
SIV-F	<i>M</i>	TTCACGCTCACCGTGCCC	199
SIV-R		GGCCCATACAACCTGGCAAGT	
PCV3-F	<i>Cap</i>	CAGCCCCCTAGCCACGGC	619
PCV3-R		ACTTCATTACCCGCCTAA	

1.5 重组质粒标准品的制备

分别以 PRRSV 的 cDNA、合成的 PCV3 *Cap* 基因和 SIV *M* 基因为模板, 采用表 1 中相应引物进行 PCR, 反应体系和反应条件按照 2×*Taq* RT-PCR StarMix with Loading Dye 说明书操作, 55 °C 退火 1 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收与纯化, 连接至 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 均匀涂布于含有 50 mg/L 氨苄的 LB 培养基中 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定并进行测序。提取质粒测其浓度并换算成拷贝数。

1.6 三重 RT-PCR 反应条件的优化

以构建的 3 种重组质粒标准品为模板, 采用温度梯度与引物浓度梯度优化反应温度及引物浓度。反应体系(20 μ L): 2×*Taq* PCR StarMix 10 μ L, 3 对引物不同终浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μ mol/L 确定最适添加量, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 51.0、51.8、53.2、54.2、55.0 °C 退火 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.7 三重 RT-PCR 特异性试验

分别以 PRRSV、SIV、CSFV 的 cDNA 及 PCV3、PRV、PCV2、PPV1、PPV2 和 TTSuV1 的 DNA 为模板, 利用优化后的三重 RT-PCR 方法进行检测, 同时以重组质粒 pMD-PRRSV、pMD-SIV 和 pMD-PCV3 为阳性对照, 以 ddH₂O 为阴性对照, 评估该方法的特异性。

1.8 三重 RT-PCR 灵敏性试验

将 3.22×10^8 copies/ μ L 的重组质粒 pMD-PRRSV、 2.17×10^8 copies/ μ L 的重组质粒 pMD-SIV 和 1.65×10^8 copies/ μ L 的重组质粒 pMD-PCV3 稀释到同一拷贝混合后, 按照 10 倍比稀释, 利用已经优化的多种 RT-PCR 反应条件进行三重 RT-PCR 试验评估该方法的灵敏性。

1.9 三重 RT-PCR 重复性试验

应用建立的三重 RT-PCR 方法进行重复性实验, 批内试验: 以 pMD-PRRSV、pMD-SIV 和 pMD-PCV3 为模板进行 RT-PCR 扩增, 每个实验做 3 次重复; 批间试验: 分批提取质粒 pMD-PRRSV、pMD-SIV 和 pMD-PCV3, 等体积混合后, 在相同条件下分别进行 3 次 RT-PCR 扩增, 以评估该方法的重复性。

1.10 临床样品的检测

在黑龙江省部分地区猪场中, 采集 67 份肺组织样品, 应用所建立的三重 RT-PCR 方法检测 PRRSV、SIV 和 PCV3, 评估其临床应用效果。病料中核酸提取方法: 将采集的病料样品取 2 g 于 2 mL 离心管并加入 PBS 利用漩涡振荡器充分研磨后, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 取上清, 按照病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取病毒总 RNA, 然后用 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录获得病毒 cDNA, 各取 2 μ L 作为模板。应用本研究所建立的 RT-PCR

检测方法与已经建立的单重检测方法进行比较,以确定该方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准品的构建

构建的3种重组质粒经菌液PCR和测序结果显示,插入基因片段与PRRSV、SIV和PCV3的目的片段相似度均为100%,表明正确构建了重组质粒标准品。利用分光光度计分别测定重组质粒标准品的浓度,依据公式,拷贝数=质粒浓度 \times 6.02 \times 10²³/660 \times 质粒总长度,经计算各质粒标准品拷贝数分别是:pMD-PRRSV为3.22 \times 10⁸ copies/ μ L、pMD-SIV为2.17 \times 10⁸ copies/ μ L和pMD-PCV3为1.65 \times 10⁸ copies/ μ L。

2.2 三重RT-PCR反应条件优化结果

通过温度梯度RT-PCR对退火温度、引物浓度优化。最终确定三重RT-PCR反应最佳体系:2 \times Taq PCR StarMix 10 μ L,上、下游引物(PCV3和PRRSV引物浓度为0.2 μ mol/L,SIV引物浓度为0.3 μ mol/L)均为1 μ L,模板各1 μ L,ddH₂O补足至20 μ L。RT-PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;

94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。以最佳反应体系与反应程序进行RT-PCR扩增,结果见图1。

2.3 三重RT-PCR特异性试验结果

分别以PRRSV、CSFV、SIV的cDNA和PRV、PPV1、PPV2、PCV3、TTSuV1和PCV2的DNA为模板,利用优化后的三重RT-PCR方法进行检测,同时以ddH₂O为阴性对照。结果显示,仅对PRRSV、SIV和PCV3检测为阳性,而对PCV2、PRV、CSFV、PPV1、PPV2和TTSuV1等均为阴性,结果如图2所示,表明该方法具有较好的特异性。

2.4 三重RT-PCR灵敏度试验结果

将3.22 \times 10⁸ copies/ μ L的重组质粒pMD-PRRSV、2.17 \times 10⁸ copies/ μ L的重组质粒pMD-SIV和1.65 \times 10⁸ copies/ μ L的重组质粒pMD-PCV3,各用ddH₂O进行10倍倍比稀释且等体积混合后作为模板,利用优化后的三重RT-PCR方法进行检测。结果显示,PRRSV、PCV3、SIV重组质粒标准品的检测下限分别为10、10、100 copies/ μ L,结果如图3所示,表明该方法灵敏度较高。

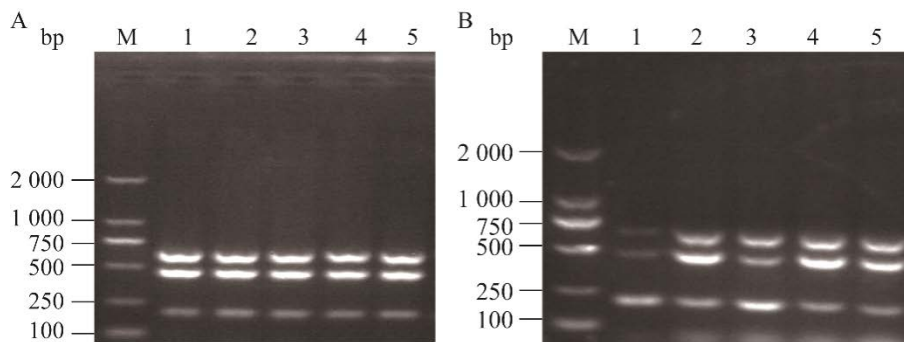


图1 三重RT-PCR反应温度及引物浓度优化 A:1-5:退火温度分别为51.0、51.8、53.2、54.2和55.0 $^{\circ}$ C; B:1-5:引物浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4和0.5 μ mol/L; M:DL2000 DNA Marker

Figure 1 Optimization of reaction temperature and primer concentration for triple RT-PCR. A: 1-5: Annealing temperatures are 51.0, 51.8, 53.2, 54.2 and 55.0 $^{\circ}$ C, respectively; B: 1-5: Primer concentrations are 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 μ mol/L, respectively; M: DL2000 DNA Marker.

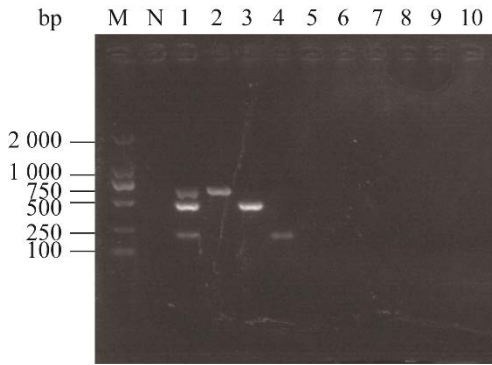


图 2 三重 RT-PCR 特异性 M: DL2000 DNA Marker; N: 阴性对照; 1: PRRSV、PCV3、SIV 混合标准质粒; 2: PCV3; 3: PRRSV; 4: SIV; 5: CSFV; 6: PRV; 7: PCV2; 8: PPV1; 9: PPV2; 10: TTSuV1

Figure 2 Specificity test of the triple RT-PCR. M: DL2000 DNA Marker; N: Negative control; 1: Standard plasmid mixed PRRSV, PCV3 and SIV; 2: PCV3; 3: PRRSV; 4: SIV; 5: CSFV; 6: PRV; 7: PCV2; 8: PPV1; 9: PPV2; 10: TTSuV1.

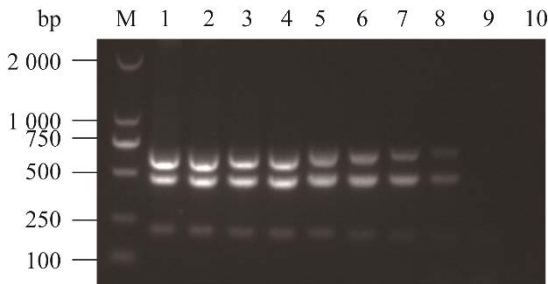


图 3 三重 RT-PCR 敏感性 M: DL2000 DNA Marker; 1-9: 重组质粒标准品 10 倍倍比稀释终浓度依次为 $1 \times 10^8 - 1 \times 10^0$ copies/ μ L; N 为阴性对照

Figure 3 Sensitivity test of the triple RT-PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1-9: Recombinant plasmid standard was diluted from $1 \times 10^8 - 1 \times 10^0$ copies/ μ L; N: Negative control.

表 2 三重 RT-PCR 临床样品检测

Table 2 Detection for clinical samples of triple RT-PCR

Virus	Reported detection method ^[12-14] positive rate (%)	Triple RT-PCR positive rate (%)	Coincidence rate (%)
SIV	3.0 (2/67)	3.0 (2/67)	100.0
PRRSV	9.0 (6/67)	9.0 (6/67)	100.0
PCV3	1.5 (2/67)	1.5 (2/67)	100.0
PRRSV+PCV3	3.0 (4/67)	3.0 (4/67)	100.0
PRRSV+SIV	1.5 (1/67)	1.5 (1/67)	100.0
SIV+PCV3	3.0 (2/67)	3.0 (2/67)	100.0
PRRSV+SIV+PCV3	3.0 (2/67)	3.0 (2/67)	100.0

2.5 三重 RT-PCR 重复性试验结果

应用建立的三重 RT-PCR 方法进行重复性试验, 批内试验以 pMD-PRRSV、pMD-SIV 和 pMD-PCV3 为模板进行 RT-PCR 扩增, 每次实验做 3 次重复; 批间试验分批提取质粒 pMD-PRRSV、pMD-SIV 和 pMD-PCV3 等体积混合后, 在相同条件下分别进行 3 次 RT-PCR 扩增, 结果显示, 批间与批内试验均一致, 结果如图 4 所示, 表明该方法具有良好的重复性。

2.6 临床样品检测结果

应用本研究建立的三重 RT-PCR 方法对 67 份临床样品检测, 结果显示 PRRSV 和 PCV3 混合感染率为 9%, PRRSV 和 SIV 混合感染率为 1.5%, SIV 和 PCV3 混合感染为 3%, 3 种病原混合感染率为 3%, 建立的三重 RT-PCR 检测方法与已报道的 PCR 检测符合率达到 100%, 结果如表 2 所示, 表明该方法具有良好的临床应用效果。

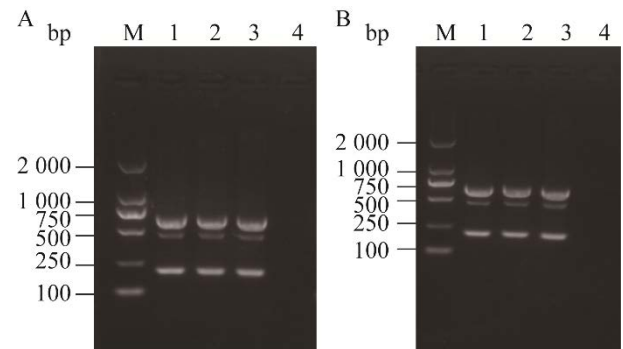


图 4 三重 RT-PCR 重复性 A: 批间试验; B: 批内试验; M: DL2000 DNA Marker

Figure 4 Repeatability test of the triple RT-PCR. A: Intra batch repetition; B: Inter batch repetition; M: DL2000 DNA Marker.

3 讨论与结论

随着我国集约化和规模化养殖增多,多种病原的混合感染也不断增多。PRRSV、PCV3 和 SIV 作为损害全球养猪业高度传染性疾病,两种或三种病原混合感染在猪群中很常见,而且混合感染要比单一病毒感染引起更加严重的疾病^[15-16]。PRRSV 和 PCV3 混合感染常出现先天性震颤,而且 PRRSV 和 SIV 混合感染影响机体的免疫反应,出现 IL-6 和 IL-10 的 mRNA 表达水平叠加现象及消除 PRRSV MLV 疫苗的保活作用^[17-18]。因此有必要建立同时检测多种病原的检测方法,Zheng 等^[19]利用实时荧光定量 PCR 的方法建立同时检测 PRRSV 和 PCV3 的检测方法;Anderson 等^[20]在猪场建立同时检测猪繁殖与呼吸综合征病毒、圆环病毒、甲型流感病毒环境检测系统。考虑到成本和快速等优点,三重 RT-PCR 是一种较好的检测方法。

本研究针对 PRRSV 的 *M* 和 *N* 基因、PCV3 的 *Cap* 基因和 SIV 的 *M* 基因设计了 3 对特异性引物,经过温度梯度 PCR 与引物浓度梯度稀释,结果显示,最佳退火温度为 55 °C,PCV3 和 PRRSV 引物浓度为 0.2 μmol/L, SIV 引物浓度为 0.3 μmol/L。经过特异性、敏感性、重复性的验证,结果显示该方法仅对 PRRSV、PCV3 和 SIV 这 3 种病毒检测为阳性,而对 CSFV、PRV、PCV2、PPV、PPV2 和 TTSuV1 等其他病毒检测均为阴性,表明该方法具有良好的特异性;PRRSV、PCV3 和 SIV 重组质粒标准品的检测下限分别为 10、10 和 100 copies/μL,与向萌等^[14]建立的检测 PRRSV 的多重 PCR 及崔建涛等^[13]建立的检测 PCV3 的多重 PCR 相比,本方法具有良好的敏感性;与张莉等^[21]建立的检测猪流感的环介导等温扩增检测技术相比,本研究建立的检测方法不仅具有相同的敏感性,而且具有同时检测 3 种病原的优点。批间与批内试验检测结果均一

致,表明该方法具有良好的重复性。此外,利用本研究建立的多重 RT-PCR 检测方法对从黑龙江省部分地区猪场采集的疑似感染此 3 种病毒的 67 份临床样品进行检测,结果显示,PRRSV 和 PCV3 混合感染率为 9%,PRRSV 和 SIV 混合感染率为 1.5%,SIV 和 PCV3 混合感染为 3%,3 种病原混合感染率为 3%,并与已经建立的检测 3 种病原的检测方法进行比较,符合率 100%,表明该方法具有良好的临床应用效果。由于本研究所选取的病料较少,所以不能全面掌握病原的流行情况,有待进一步研究。

综上所述,本研究针对 PRRSV、PCV3 和 SIV 这 3 种病原建立的三重 RT-PCR 检测方法具有良好的特异性与敏感性,能够对临床样品进行准确检测,为疾病的预防和猪场病原检测提供了有效的检测方法。

REFERENCES

- [1] Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. Arterivirus molecular biology and pathogenesis[J]. *The Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt 10): 2141-2163
- [2] Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen NH, Li YH, Rowland B, Renukaradhya GJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4: 129-154
- [3] Ruedas-Torres I, Rodríguez-Gómez IM, Sánchez-Carvajal JM, Larenas-Muñoz F, Pallarés FJ, Carrasco L, Gómez-Laguna J. The jigsaw of PRRSV virulence[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 260: 109168
- [4] 王国超, 吴奇强, 刘慧, 裴党帅, 白鸽, 罗建勋. 猪圆环病毒 3 型研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2022. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20220415.009
Wang GC, Wu QQ, Liu H, Pei DS, Bai G, Luo JX. Research progress of porcine circovirus type 3[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2022. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20220415.009 (in Chinese)
- [5] Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine

- dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(1): e01879-e01816
- [6] Nelson MI, Vincent AL. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface[J]. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(3): 142-153
- [7] Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(7): 3198-3205
- [8] Qin SN, Ruan WQ, Yue H, Tang C, Zhou KL, Zhang B. Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13341
- [9] Ha Z, Li JF, Xie CZ, Yu CD, Hao PF, Zhang Y, Xu W, Nan FL, Xie YB, Li YW, et al. Prevalence, pathogenesis, and evolution of porcine circovirus type 3 in China from 2016 to 2019[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247: 108756
- [10] Kappes MA, Faaberg KS. PRRSV structure, replication and recombination: origin of phenotype and genotype diversity[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 475-486
- [11] Ma WJ. Swine influenza virus: current status and challenge[J]. *Virus Research*, 2020, 288: 198118
- [12] 徐毅, 余良政, 林霜, 任同伟, 王豪, 曾昊, 郭嘉宁, 郭金凡, 黄崇强, 欧阳康, 等. H1-SIV、H3-SIV 和 NA-PRRSV、EU-PRRSV 多重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *中国动物传染学报*, 2021. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211104.007
- Xu Y, Yu LZ, Lin S, Ren TW, Wang H, Zeng H, Guo JN, Guo JF, Huang CQ, Ouyang K, et al. Establishment and application of multiple PCR detection methods for H1-SIV, H3-SIV, NA-PRRSV, EU-PRRSV[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2021. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211104.007 (in Chinese)
- [13] 崔建涛, 侯承尧, 党钰茗, 徐通, 赵宇, 田润博, 陈红英. 猪伪狂犬病病毒、猪圆环病毒 2 型和 3 型三重 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(3): 432-437
- Cui JT, Hou CY, Dang YM, Xu T, Zhao Y, Tian RB, Chen HY. Development of a multiplex PCR for detection of PRV, PCV2 and PCV3[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(3): 432-437 (in Chinese)
- [14] 向萌, 任玉鹏, 王一丹. PRRSV、基因 2 型 CSFV、PRV 和 JEV 一步法多重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(10): 76-81, 85
- Xiang M, Ren YP, Wang YD. One-step multiplex RT-PCR detection method for PRRSV, genotype 2 CSFV, PRV and JEV[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(10): 76-81, 85 (in Chinese)
- [15] Chen NH, Li S, Ye MX, Huang YC, Huang Y, Xiao YZ, Yu X, Dong JB, Tian KG, Zhu JZ. A novel NADC30-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) plays a limited role in the pathogenicity of porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) and PRRSV co-infection[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 28-34
- [16] Crisci E, Fraile L, Montoya M. Cellular innate immunity against PRRSV and swine influenza viruses[J]. *Veterinary Sciences*, 2019, 6(1): 26
- [17] Chrun T, Maze EA, Vatzia E, Martini V, Paudyal B, Edmans MD, McNee A, Manjegowda T, Salguero FJ, Wanasen N, et al. Simultaneous infection with porcine reproductive and respiratory syndrome and influenza viruses abrogates clinical protection induced by live attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 758368
- [18] Sukmak M, Thanantong N, Poolperm P, Boonsoongnern A, Ratanavanichrojn N, Jirawattanapong P, Woonwong Y, Soda N, Kaminsosakul T, Phuttipatimok S, et al. The retrospective identification and molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 (PCV3) in swine in Thailand from 2006 to 2017[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 611-616
- [19] Zheng LL, Chai LY, Tian RB, Zhao Y, Chen HY, Wang ZY. Simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 3 by SYBR Green I-based duplex real-time PCR[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 49: 101474
- [20] Anderson BD, Yondon M, Bailey ES, Duman EK, Simmons RA, Greer AG, Gray GC. Environmental bioaerosol surveillance as an early warning system for pathogen detection in North Carolina swine farms: a pilot study[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 68(2): 361-367
- [21] 张莉, 鄢明华, 李秀丽, 路超, 王利丽, 韩伟, 孙英峰. 猪流感病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(7): 64-68
- Zhang L, Yan MH, Li XL, Lu C, Wang LL, Han W, Sun YF. Establishment of loop-mediated isothermal amplification for detection of swine influenza virus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(7): 64-68 (in Chinese)