

研究报告

四种常见猪肠道病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用

辛忠昊¹, 焦安琪², 朱彤¹, 刘丽萍¹, 黄兵¹, 于江², 郭效珍^{*1}, 吴家强^{*2}

1 山东省农业科学院家禽研究所 山东省家禽疫病诊断与免疫重点实验室, 山东 济南 250000

2 山东省农业科学院畜牧兽医研究所 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250000

辛忠昊, 焦安琪, 朱彤, 刘丽萍, 黄兵, 于江, 郭效珍, 吴家强. 四种常见猪肠道病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5126-5137

Xin Zhonghao, Jiao Anqi, Zhu Tong, Liu Liping, Huang Bing, Yu Jiang, Guo Xiaozhen, Wu Jiaqiang. Establishment and clinical application of multiplex RT-PCR assay for four common porcine enteroviruses[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5126-5137

摘要: 【背景】猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪 δ 冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)和猪轮状病毒(porcine rotavirus, PoRV)是当前导致猪群发生病毒性腹泻的 4 种主要病原, 并且常发生混合感染。【目的】建立一种可鉴别诊断这 4 种腹泻病毒病的检测方法, 对于临床诊断具有重要意义。【方法】针对 PEDV 的 M 蛋白基因、TGEV 的 N 蛋白基因、PDCoV 的 N 蛋白基因和 PoRV 的 VP7 蛋白基因分别设计特异性引物, 进而构建相应的重组质粒标准品。通过对 PCR 反应条件优化, 建立可同时检测 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 的多重 RT-PCR 检测方法。随后通过敏感性、特异性和重复性试验对该方法的有效性进行验证。【结果】敏感性试验结果显示, 对 PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 重组质粒标准品的最低检测下限分别为 1.75×10^2 、 1.5×10^3 、 1.6×10^2 和 1.6×10^2 copies/ μ L; 特异性试验结果显示, 仅可检出本研究中的 4 种靶病毒, 而猪群常见病毒 CSFV、PRRSV、PCV2 和 PRV 未能检出。重复性试验结果显示, 选取 10^8 、 10^6 和 10^4 copies/ μ L 3 个不同浓度的重组质粒作为模板, 其他条件不变, 分别进行 5 次重复试验, 5 次试验均扩增出清晰、均匀的条带。对山东各地区送检的 52 份临床腹泻样品通过建立的四重 RT-PCR 方法进行检测, 发现 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 的阳性率分别为 37% (19 份)、6% (3 份)、10% (5 份) 和 25% (13 份)。其中 PEDV 和 PoRV 混合感染 2 份(4%), PEDV 和 TGEV 混合感染 2 份(4%), PEDV 和

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目(ZR2021QC054); 山东省重大科技创新工程(2020CXGC010801); 山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-08-01); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019XM007); 高层次人才工程项目

Supported by: Youth Project of Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QC054); Major Science and Technology Innovation Project of Shandong Province (2020CXGC010801); Modern Agricultural Industry Technology System Project of Shandong Province (SDAIT-08-01); Major Applied Technology Innovation Project in Agriculture of Shandong Province (SD2019XM007) and High-Level Talent Project

*Corresponding authors: E-mail: GUO Xiaozhen: gxz0821@163.com; WU Jiaqiang: wujiaqiang2000@sina.com

Received: 2022-06-17; Accepted: 2022-09-07; Published online: 2022-10-11

PDCoV 混合感染 1 份(2%)。通过单重 RT-PCR 对该多重 RT-PCR 临床样品检测结果进行重复验证, 结果显示多重 RT-PCR 与常规单重 RT-PCR 结果符合率为 100%。最后随机挑选 5 个检测为阳性的临床样本进行测序验证, 结果均为相应病毒的基因片段。【结论】本研究建立了可同时检测 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 的四重 RT-PCR 检测方法, 研究结果为临床 4 种猪腹泻病毒病的鉴别诊断及流行病学调查提供了技术手段。

关键词: 多重 RT-PCR; 猪流行性腹泻病毒; 猪传染性胃肠炎病毒; 猪 δ 冠状病毒; 猪轮状病毒

Establishment and clinical application of multiplex RT-PCR assay for four common porcine enteroviruses

XIN Zhonghao¹, JIAO Anqi², ZHU Tong¹, LIU Liping¹, HUANG Bing¹, YU Jiang²,
GUO Xiaozhen^{*1}, WU Jiaqiang^{*2}

1 Key Laboratory of Poultry Disease Diagnosis and Immunity in Shandong Province, Poultry Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250000, Shandong, China

2 Key Laboratory of Animal and Poultry Disease Control and Breeding, Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250000, Shandong, China

Abstract: [Background] Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine deltacoronavirus (PDCoV), and porcine rotavirus (PoRV) are the four main pathogens that cause viral diarrhea in pigs and often occur in mixed infections. [Objective] To establish a method for simultaneous detection of the four viruses in clinical practice. [Methods] The specific primers were designed for the M protein gene of PEDV, N protein gene of TGEV, N protein gene of PDCoV, and VP7 protein gene of RoRV, and the corresponding recombinant plasmids were constructed. By optimizing the PCR conditions, a multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of PEDV, TGEV, PDCoV, and PoRV was successfully established. Further, the sensitivity, specificity, and reproducibility of the established method were evaluated. [Results] The sensitivity test showed that the multiplex RT-PCR assay had the lower limits of detection of 1.75×10^2 , 1.5×10^3 , 1.6×10^2 and 1.6×10^2 copies/ μ L for PEDV-M, TGEV-N, PDCoV-N, and PoRV-VP7 recombinant plasmid standards, respectively. The results of specificity test showed that only the four target viruses in this study could be detected, while other common porcine viruses such as classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus type 2 (PCV2), and porcine pseudorabies virus (PRV) could not be detected. The five replicate tests with 10^8 , 10^6 and 10^4 copies/ μ L of recombinant plasmids as templates and other conditions unchanged all produced clear and uniform bands. The 52 clinical diarrhea samples from various regions in Shandong Province were tested by the established quadruple RT-PCR assay. The results showed that the positive rates of PEDV, TGEV, PDCoV, and PoRV were 37% (19 samples), 6% (3 samples), 10% (5 samples) and 25% (13 samples), respectively. 2 (4%), 2 (4%), and 1 (2%) samples showed mixed infections of PEDV and PoRV, mixed infections of PEDV and TGEV, and mixed infections of PEDV and PDCoV, respectively. Further, the results of the multiplex RT-PCR assay were validated by monoplex RT-PCR, which showed 100% compliance. Finally, five positive clinical samples were randomly selected and sent

for sequencing to verify the results, and all of them were the gene fragments of the corresponding viruses. **[Conclusion]** In this study, a quadruple RT-PCR assay for the simultaneous detection of PEDV, TGEV, PDCoV and PoRV was established, and the results provide a technical tool for the differential diagnosis and epidemiological investigation of four clinical porcine diarrhea virus diseases.

Keywords: multiplex RT-PCR; porcine epidemic diarrhea virus; transmissible gastroenteritis virus; porcine deltacoronavirus; porcine rotavirus

近年来,猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪 δ 冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)和猪轮状病毒(porcine rotavirus, PoRV)被认为是导致猪群发生腹泻的4种主要病毒。这4种疾病均以腹泻、呕吐和厌食为主要特征^[1],只根据临床症状和剖检病变极难区分,而且4种病毒的混合感染现象在临床上十分常见^[2]。因此,建立一种高效、灵敏和经济的检测方法对于猪群病毒性腹泻病的鉴别诊断与防控具有重要意义。孔维欢等^[3]针对PEDV的M蛋白基因和PDCoV的N蛋白基因设计引物,建立了一种高灵敏性的双重RT-PCR方法。Ding等^[4]基于PEDV、TGEV和PDCoV的N蛋白基因设计引物,建立了一种针对猪群腹泻病毒的三重RT-PCR检测方法。截至目前,对可同时检测并可对PEDV、TGEV、PDCoV和PoRV这4种腹泻病毒病鉴别诊断的多重RT-PCR检测方法极少。本研究针对PEDV、TGEV、PDCoV和PoRV这4种病毒的保守基因区设计特异性引物,通过优化多重PCR反应条件,以期建立一种可同时检测并区别以上4种病毒的RT-PCR方法,为猪群腹泻病毒病的鉴别诊断和分子流行病学调查及防控提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 病毒及病料来源

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic

diarrhea, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis, TGEV)、猪 δ 冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)、猪轮状病毒(porcine rotavirus, PoRV)、猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)、猪圆环病毒2型(porcine circovirus type 2, PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)和猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)阳性病料均由山东省农业科学院家禽研究所监测中心鉴定与保存。临床检测样品来源于2021–2022年山东省各地区发病猪场送检的52份临床腹泻病料,主要包括小肠、肠内容物和粪便等。

1.2 主要试剂、仪器和培养基

无内毒素质粒小量快速提取试剂盒、PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix、DL1000 DNA Marker、DL2000 DNA Marker、pMD18-T载体和大肠杆菌Trans 5 α 感受态细胞, TaKaRa公司; Simply P病毒DNA/RNA提取试剂盒、胶回收试剂盒, BioFlux公司; 琼脂糖凝胶粉, Scientific Chemical公司。电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR仪, 杭州朗基科学仪器有限公司。LB培养基: 胰化蛋白胨2 g, 酵母提取物1 g, 氯化钠2 g, 加入200 mL去离子水搅拌至完全溶解, 1 \times 10⁵ Pa高压灭菌15 min后保存备用。

1.3 引物的设计及合成

用于设计引物的参考毒株均来自于GenBank登录的基因序列。根据毒株PEDV-HNAY 2016

(登录号为 MT338518.1)、TGEV-KT2 (登录号为 JQ693059.1)、PDCoV-USA/Ohio 137/2014 (登录号为 KJ601780.1) 和 PoRV-DZ-2 (登录号为 KT820775.1) 分别针对 PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 基因设计引物(表 1)。4 对特异性引物均在 Primer-BLAST 进行设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 病料样品的处理

将用于临床检测的 52 份送检样品(小肠组织及其内容物)分别置于匀浆仪中进行粉碎处理, 然后用生理盐水稀释 5 倍、混匀, 置于 -80°C 超低温冰箱中。反复冻融 3 次, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 规格的滤器过滤取上清, 置于 -80°C 超低温冰箱中备用。

1.5 病毒核酸的提取与反转录

将本实验室保存猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪 δ 冠状病毒(PDCoV)、猪轮状病毒(PoRV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪瘟病毒(CSFV)的病毒液反复冻融 2 次后, 按照 Simply P 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒使用说明书进行核酸提取, 将提取的 PEDV、TGEV、PDCoV、PoRV 和 CSFV 的总 RNA 进行反转录, 提取的病毒核酸和反转录产物置于 -80°C 保存。

1.6 重组质粒标准品的制备

分别以 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 的 cDNA 为模板, 用表 1 中的相应引物对目的基因片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: $2\times\text{Taq PCR StarMix with Loading Dye}$ 10 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 质粒模板 2 μL , ddH₂O 7 μL 。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 9 min; 4°C 保存。将 PCR 扩增产物进行胶回收纯化, 分别与 pMD18-T 载体进行连接, 转化至大肠杆菌 Trans 5 α 感受态细胞中, 涂至加入氨苄抗性的 LB 板(氨苄青霉素终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$)后放置于 37°C 的细菌培养箱中培养过夜, 挑取阳性克隆至 4 mL 氨苄抗性的液体 LB 培养基中(氨苄青霉素终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$), 在 37°C 、200 r/min 进行菌液扩大培养, 培养 10–12 h 后提取重组质粒进行 PCR 及测序鉴定。

1.7 四重 RT-PCR 反应条件的优化

以上述构建的 4 种重组质粒标准品作为四重 RT-PCR 模板, 建立总体系为 20 μL 的四重 RT-PCR 反应体系, 分别对该体系的引物浓度、退火温度和循环数进行优化。RT-PCR 反应体系为: 4 对上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 4 个重组质粒各取 1 μL , $2\times\text{Taq PCR StarMix with Loading Dye}$ 10 μL , ddH₂O 2 μL 。四重 RT-PCR

表 1 多重 RT-PCR 引物序列信息

Table 1 Multiple RT-PCR primer information

目的基因	引物序列	产物大小
Target gene	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
PEDV-M	F: TTTGAGCATCCTTATGGCTT R: TAGCAACCTTATAGCCCTCT	236
TGEV-N	F: GGAAGAGAAGTGCAGGTA R: ATCTCAACCTGTGTGTCATC	418
PDCoV-N	F: TTAAGTGGGTTAAGGGTTCG R: AGGCTTCTTGTCTTAGTTG	620
PoRV-VP7	F: TCAGCAAACAGATGAAGCTA R: AGTTTATTGACTCCGTC	186

反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 6 min; 4 °C 保存。

1.8 四重 RT-PCR 的特异性、敏感性和重复性试验

分别以 PEDV、TGEV、PDCoV、PoRV、PRRSV 和 CSFV 的 cDNA, 以及 PCV2、PRV 的 DNA 为模板, ddH₂O 为阴性对照, 对该四重 RT-PCR 方法进行特异性试验。用于扩增 CSFV、PRRSV、PCV2、PRV 的 4 对特异性引物序列见表 2。

分别将构建的 4 个重组质粒用超微量紫外分光光度计进行浓度测定, 然后将其浓度统一到 13 ng/μL, 根据下列公式计算获得 4 个重组质粒的拷贝数。然后对这 4 种质粒分别进行 10 倍倍比的梯度稀释, 将同浓度的 4 种质粒分别进行等比例混合, 对该四重 RT-PCR 方法进行敏感性试验。

$$\text{Plasmid copies} = \frac{(6.02 \times 10^{23}) \times (X \times 10^{-9})}{\text{Plasmid length} \times 660}$$

式中: Plasmid copies 浓度单位为 copies/μL, X 单位为 ng/μL, Plasmid length 单位为 bp。

选取高、中、低 3 个不同浓度(10⁸、10⁶ 和 10⁴ copies/μL)的重组质粒标准品, 等比例混合后, 通过 5 次重复性试验对该四重 RT-PCR 方法的稳定性及重复性进行验证。

1.9 四重 RT-PCR 临床样品的检测

利用上述建立的四重 RT-PCR 方法对本实验室保存的临床送检样本进行 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 4 种腹泻病毒的检测, 共 52 份。病料处理方式见 1.4, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳查看结果。通过常规单重 RT-PCR 对该四重 RT-PCR 临床样品的检测结果进行重复验证, 以比对 2 种检测方法的符合率。最后随机挑选 5 个检测为阳性的样本进行测序鉴定, 以验证该方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准品的构建

用 4 对特异性引物分别对构建的 4 个重组质粒进行 PCR 扩增验证, 产物大小与测序鉴定结果均符合预期, 见图 1。

2.2 四重 RT-PCR 退火温度的优化

四重 RT-PCR 反应中退火温度分别以 48.6、49.5、50.9、52.6、54.2 和 55.6 °C 进行温度优化, 结果见图 2。以上退火温度均可扩增出明亮条带, 但由于退火温度过低会产生非特异性扩增, 过高又会导致特异性产物减少, 所以选定 50.9 °C 为四重 RT-PCR 的最佳退火温度。

表 2 特异性试验引物序列信息

Table 2 Specificity test primer sequence information

目的基因	引物序列	产物大小
Target gene	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
CSFV	F: AAACGGAGGGACTAGCCGT R: GATTCAACTCCATGTGCCATG	266
PRRSV	F: ATGCCAAATAACAACGGCA R: ACAGACACAATTGCCGCTC	252
PCV2	F: CACGGATATTGTAGTCTGGT R: CGCACCTTCGGATATACTGTC	564
PRV	F: TTTGGATCCATGCGGCCCTTCTG R: TTTGAATTCTTACGACACGGCGTCGCA	618

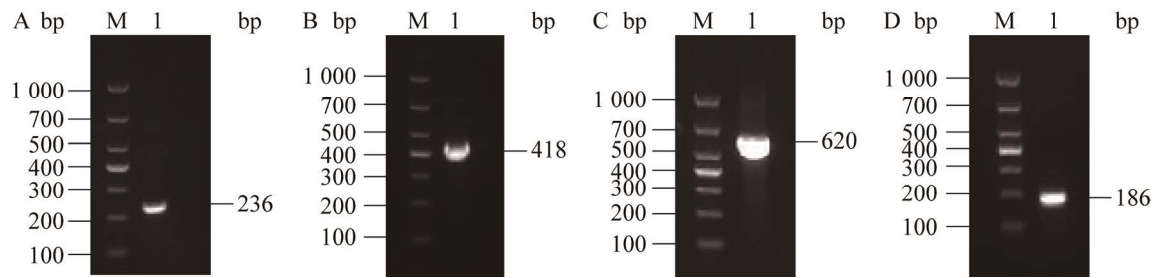


图 1 PEDV (A)、TGEV (B)、PDCoV (C)和 PoRV (D)重组质粒的构建

Figure 1 Construction of PEDV (A), TGEV (B), PDCoV (C), and PoRV (D) recombinant plasmids. M: DL1000 DNA Marker; 1: PCR products.

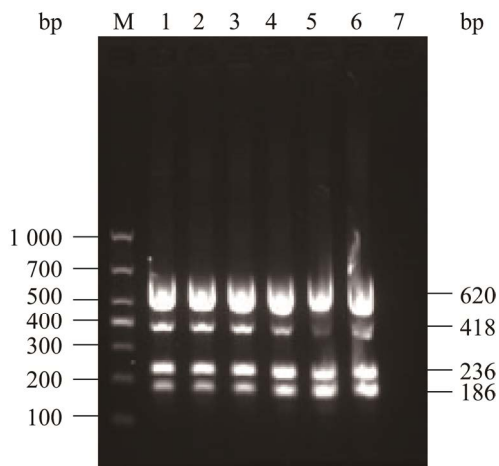


图 2 四重 RT-PCR 退火温度的优化电泳图

Figure 2 Optimization of annealing temperature for quadruple RT-PCR. M: DL1000 DNA Marker; 1: 48.6 °C; 2: 49.5 °C; 3: 50.9 °C; 4: 52.6 °C; 5: 54.2 °C; 6: 55.6 °C; 7: Control.

2.3 引物浓度的优化

在 20 μL 反应体系中首先进行单重引物的浓度优化, 退火温度固定为 50.9 °C, 其他扩增条件不变。将 4 对引物的终浓度分别固定为 0.250、0.375、0.500、0.625 和 0.750 $\mu\text{mol/L}$, 优化结果显示, 引物浓度为 0.375 $\mu\text{mol/L}$ 的扩增条带清晰干净、不冗余, 因此确定最佳单重引物浓度为 0.375 $\mu\text{mol/L}$, 见图 3。并在此基础上进行四重引物浓度的优化, 其他条件不变。结果显示, 四重引物最佳终浓度同为 0.375 $\mu\text{mol/L}$, 见图 4。

2.4 四重 RT-PCR 循环数的优化

建立 20 μL 四重 PCR 反应体系, 固定最佳引物浓度和退火温度, 其他条件不变, 将循环数分别设置为 20、25、30、35、40 和 45 个循环, 进行四重 PCR 循环数的优化。当循环数为 30 时扩增条带的清晰度最佳, 结果见图 5。

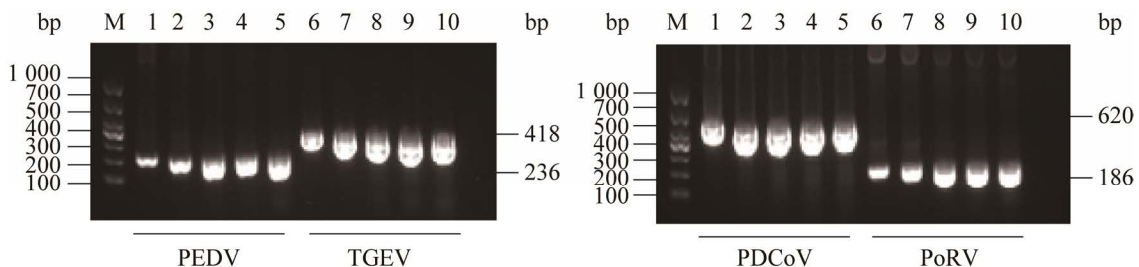


图 3 单重 RT-PCR 引物浓度的优化 M: DL1000 DNA Marker; 1-5: 引物浓度分别为 0.250、0.375、0.500、0.625 和 0.750 $\mu\text{mol/L}$; 6-10: 引物浓度分别为 0.250、0.375、0.500、0.625 和 0.750 $\mu\text{mol/L}$

Figure 3 Optimization of single RT-PCR primer concentration. M: DL1000 DNA Marker; 1-5: Primer concentrations were 0.250, 0.375, 0.500, 0.625, and 0.750 $\mu\text{mol/L}$, respectively; 6-10: Primer concentrations were 0.250, 0.375, 0.500, 0.625 and 0.750 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

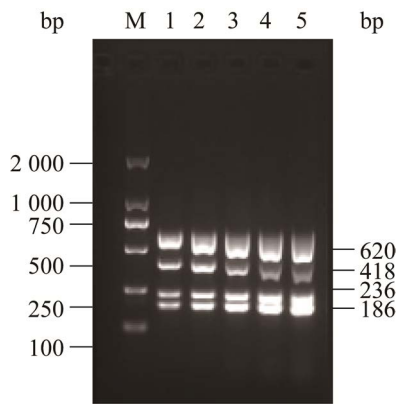


图4 四重 RT-PCR 引物浓度的优化 M: DL2000 DNA Marker; 1-5: 引物浓度分别为 0.250、0.375、0.500、0.625 和 0.750 $\mu\text{mol/L}$

Figure 4 Optimization of concentration of quadruple RT-PCR primers. M: DL2000 DNA Marker; 1-5: Primer concentrations were 0.250, 0.375, 0.500, 0.625 and 0.750 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

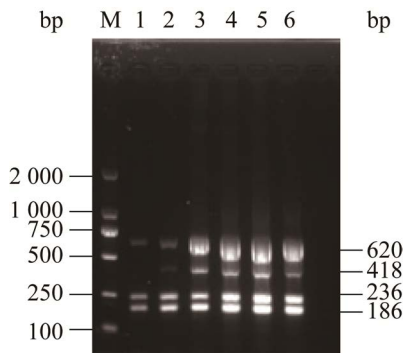


图5 四重 RT-PCR 循环数的优化 M: DL2000 DNA Marker; 1-6: 循环数分别为 20、25、30、35、40 和 45

Figure 5 Optimization of quadruple RT-PCR cycle number. M: DL2000 DNA Marker; 1-6: Cycle numbers of 20, 25, 30, 35, 40 and 45, respectively.

2.5 四重 RT-PCR 反应条件的确定

反应条件经优化后, 最终确定四重 RT-PCR 最佳反应体系为: $2\times\text{Taq PCR StarMix}$ with Loading Dye 10 μL , ddH_2O 2 μL , 4 种 DNA 模板各 1 μL , 4 种正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 4 种反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 总体系为 20 μL 。

四重 RT-PCR 最佳反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 3 min;

95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 50.9 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 共 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 6 min, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

2.6 四重 RT-PCR 特异性试验

对建立的四重 RT-PCR 进行特异性试验, 扩增结果如图 6 所示。仅 4 种靶标模板 PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 可扩增出阳性条带, 而对 CSFV、PRRSV、PCV2 和 PRV 不能扩增出阳性条带, 表明无交叉反应。

2.7 单重 RT-PCR 敏感性试验

分别将 PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 这 4 个重组质粒以 10 倍比梯度稀释, 终浓度拷贝数依次为 10^8 - 10^1 copies/ μL 。单重 RT-PCR 敏感性结果如图 7 所示, PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 4 个重组质粒的最低检测下限分别为 1.75×10^2 、 1.5×10^3 、 1.6×10^2 和 1.6×10^2 copies/ μL 。

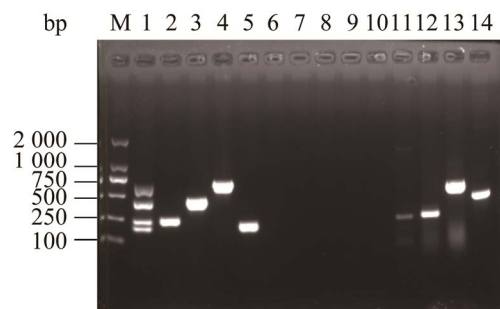


图6 四重 RT-PCR 特异性试验电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 4 种重组质粒混合; 2: PEDV-M; 3: TGEV-N; 4: PDCoV-N; 5: PoRV-VP7; 6: 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV); 7: 猪瘟疫病毒(CSFV); 8: 猪伪狂犬病毒(PRIV); 9: 猪圆环病毒 2 型(PCV2); 10: ddH_2O ; 11-14: 分别为猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟疫病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRIV)和猪圆环病毒 2 型(PCV2)阳性对照

Figure 6 Quadruple RT-PCR specificity test. M: DL2000 DNA Marker; 1: Mixing of four recombinant plasmids; 2: PEDV-M; 3: TGEV-N; 4: PDCoV-N; 5: PoRV-VP7; 6: PRRSV; 7: CSFV; 8: PRV; 9: PCV2; 10: ddH_2O ; 11-14: PRRSV, CSFV, PRV and PCV2 positive control respectively.

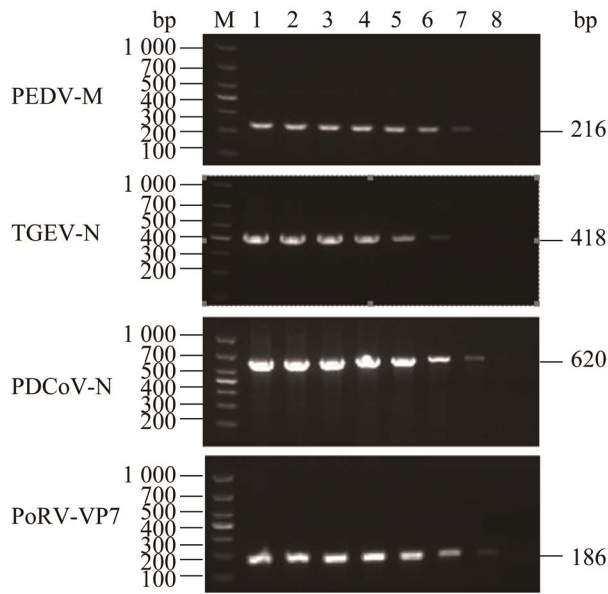


图 7 单重 RT-PCR 敏感性试验电泳图 M: DL1000 DNA Marker; 1-8: 重组质粒浓度分别为 10^8 - 10^1 copies/ μ L
Figure 7 Single-duplicate RT-PCR sensitivity test. M: DL1000 DNA Marker; 1-8: Recombinant plasmid concentrations of 10^8 - 10^1 copies/ μ L, respectively.

2.8 四重 RT-PCR 敏感性试验

分别将 10 倍比梯度稀释的 PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 4 个重组质粒进行同浓度梯度的等比例混合, 然后进行多重

RT-PCR 敏感性试验。结果如图 8 所示, PEDV-M、TGEV-N、PDCoV-N 和 PoRV-VP7 这 4 个重组质粒的最低检测下限分别为 1.75×10^2 、 1.50×10^3 、 1.60×10^2 copies/ μ L 和 1.60×10^2 copies/ μ L。

2.9 四重 RT-PCR 重复性试验

为验证该四重 RT-PCR 方法的重复性, 选取 10^8 、 10^6 和 10^4 copies/ μ L 3 个不同浓度的重组质粒作为模板, 其他条件不变, 分别进行 5 次重复试验。结果如图 9 所示, 5 次试验均可扩增出清晰均匀的条带, 表明该方法的稳定性、重复性均良好。

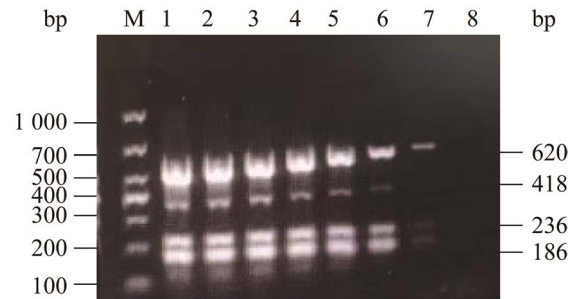


图 8 四重 RT-PCR 敏感性试验电泳图 M: DL1000 DNA Marker; 1-8: 重组质粒浓度分别为 10^8 - 10^1 copies/ μ L
Figure 8 Quadruple RT-PCR sensitivity test. M: DL1000 DNA Marker; 1-8: Recombinant plasmid concentrations of 10^8 - 10^1 copies/ μ L, respectively.

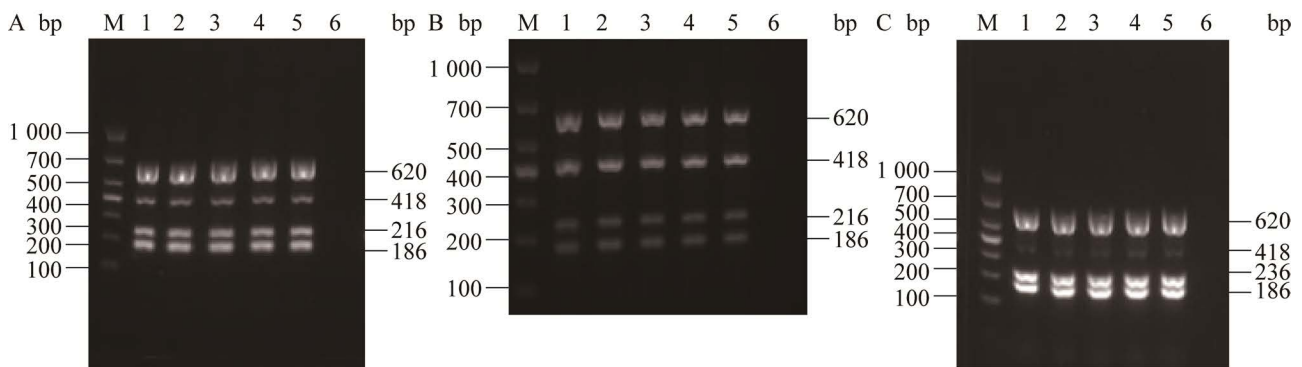


图 9 四重 RT-PCR 重复性试验电泳图 A: 10^8 copies/ μ L; B: 10^6 copies/ μ L; C: 10^4 copies/ μ L. M: DL1000 DNA Marker; 1-5: 相同条件下的 5 次重复试验; 6: 阴性对照

Figure 9 Quadruple RT-PCR reproducibility test. A: 10^8 copies/ μ L; B: 10^6 copies/ μ L; C: 10^4 copies/ μ L. M: DL1000 DNA Marker; 1-5: 5 replicate tests under the same conditions; 6: Control.

2.10 四重 RT-PCR 临床样品的检测

通过建立的四重 RT-PCR 方法对 2021–2022 年从山东各地送检的 52 份临床腹泻样本进行检测,结果显示,PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 分别为 19 份(37%)、3 份(6%)、5 份(10%) 和 13 份(25%),其中 PEDV 和 PoRV 混合感染 2 份(4%), PEDV 和 TGEV 混合感染 2 份(4%), PEDV 和 PDCoV 混合感染 1 份(2%)。随机挑选 5 个检测为阳性的样本进行测序鉴定,结果均为相应病毒基因片段。部分阳性样品检测结果见图 10。该四重 RT-PCR 检测方法与常规单重 RT-PCR 对

临床样品检测结果的符合率为 100% (表 3)。

3 讨论与结论

近年来,以 PED 为首的猪病毒性腹泻病呈全球流行趋势,给养猪业造成了巨大的经济损失^[5-6]。其中 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 是导致猪群病毒腹泻病最主要的 4 种病毒,因此,建立一种高效、灵敏和经济的检测方法对以上 4 种病毒病的鉴别诊断及防控具有重要意义。目前,已有较多的检测手段用于以上 4 种病毒病的诊断^[7-8],但这些方法都不可避免地存在本身的局限性。例

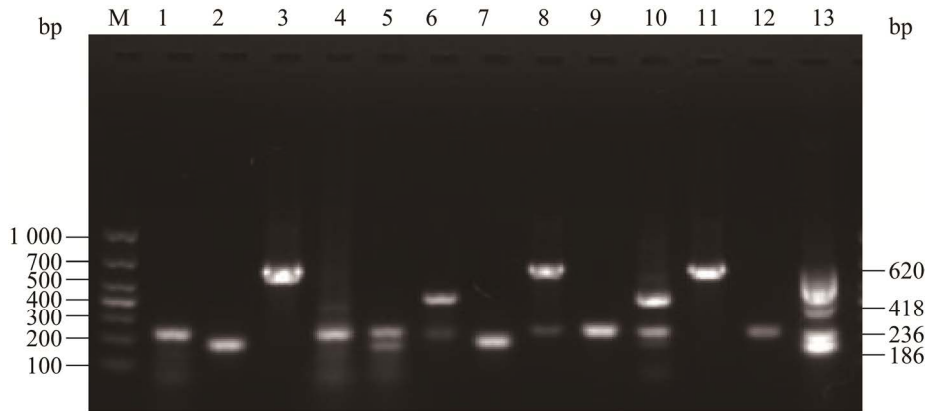


图 10 部分临床样本检测结果 M: DL1000 DNA Marker; 1–12: 临床样品(部分); 13: 4 种阳性质粒混合

Figure 10 Partial clinical sample detection results. M: DL1000 DNA Marker; 1–12: Clinical samples (partial); 13: Four positive plasmids mixed.

表 3 单重与四重 RT-PCR 方法的临床样品检测结果对比

Table 3 Comparison of clinical sample detection results between single and quadruple RT-PCR methods

病原 Pathogens	单重 RT-PCR Single RT-PCR			四重 RT-PCR Quadruple RT-PCR			符合率 Coincidence rate (%)
	样品数 Sample number	阳性数 Positive number	阳性率 Positive percentage (%)	样品数 Sample number	阳性数 Positive number	阳性率 Positive percentage (%)	
PEDV	52	19	37	52	19	37	100
TGEV	52	3	6	52	3	6	100
PDCoV	52	5	10	52	5	10	100
PoRV	52	13	25	52	13	25	100
PEDV+TGEV	52	2	4	52	2	4	100
PEDV+PoRV	52	2	4	52	2	4	100
PEDV+PDCoV	52	1	2	52	1	2	100

如, 单重 RT-PCR 同一个体系中只可单独检测一种特定病毒, 对于多种病毒的鉴别诊断不够高效; 免疫组化技术检测只可检测组织样本, 而且对于实验操作的要求较高; ELISA 技术步骤较烦琐、重复性较差等^[9-10]。因此, 对于可同时检测以上四种病毒并保证其良好的灵敏性、特异性和重复性的检测方法更是稀少。

本研究建立了一种基于 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 的四重 RT-PCR 检测方法, 该方法特异性强, 与猪群中一直以来长期存在的病毒, 如猪伪狂犬病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒及猪瘟病毒均无交叉反应性。最近较多的研究指出, 牛病毒性腹泻病毒(BVDV)在猪群中的感染率不断增加^[11-13]; 猪源 BVDV 的流行不但给养猪业造成了经济损失, 而且还加剧了猪瘟防控工作的困难^[14]。本研究的多重特异性试验中未涉及到对该病毒的检测, 所以该方法的特异性试验检测范围还需进一步优化补充。同时, 该方法的敏感性高, 对 PEDV、PDCoV 和 PoRV 的检测下限可高达 10^2 copies/ μ L。苗艳等^[15]建立的多重 RT-PCR 方法对 PEDV 和 PoRV 的检测下限均为 1.33×10^4 copies; 刘莹等^[16]建立的 PEDV 和 PDCoV 双重 RT-PCR 检测方法的检出下限分别为 3.63×10^4 、 3.27×10^3 copies/ μ L。相较于上述敏感性试验结果, 本研究建立的检测方法检测下限更低、敏感性更高。而且该四重方法对 4 种标准品的检测下限与单重敏感性试验检测结果均一致, 表明该四重方法引物设计的合理性强。此外, 该四重方法在不同时间段均进行了高、中、低 3 个标准品浓度的重复验证试验, 结果均一致, 表明该方法的重复性较好。

目前, 国内已有多个省份报道过 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV 4 种病毒存在的混合感染情况, 郭容利等^[17]通过建立的三重 RT-PCR 检

测方法, 对江苏省 154 份仔猪临床腹泻样品进行检测发现, PEDV、TGEV 和 PoRV 的阳性率分别为 53.2%、8.4%和 5.2%, 其中 PEDV+TGEV 混合感染率为 5.2%; PEDV+PoRV 混合感染率为 4.5%。李丽敏等^[18]报道, 通过建立的三重 RT-PCR 检测方法对河北省 31 份仔猪腹泻病料进行检测, PEDV、TGEV 和 PoRV 的阳性率分别为 61.29%、6.45%和 25.81%, 其中 PEDV+TGEV 的共感染率为 3.23%; PEDV+PoRV 的共感染率为 12.9%; PEDV+TGEV+PoRV 的共感染率为 3.23%。霍金耀等^[19]对华中地区送检的 190 份仔猪腹泻病料检测发现, PEDV、TGEV 和 PoRV 的阳性率分别为 62.11%、0.53%和 7.37%。任玉鹏等^[20]对来源于四川省 22 个猪场的 222 份临床腹泻样品进行检测, PEDV 阳性检出率为 52.2%, PDCoV 为 2.7%, TGEV 为 2.3%。Song 等^[21]运用建立的巢式 RT-PCR 方法对从江西省采集的 356 份临床腹泻样品进行检测, 结果发现, PDCoV 的阳性率为 33.71%, 与 PEDV 的共感染率为 19.66%。李炳晓等^[22]利用建立的 PEDV 和 PDCoV 双重 RT-PCR 方法对河南省部分地区猪群病毒性腹泻进行流行病学调查, 结果显示, PEDV 的阳性率达 51.9%, PDCoV 的阳性率为 35.06%。以上报道均存在不同程度的混合感染情况, 而且均以 PEDV 感染率高居首位。其较高的 PEDV 阳性率与本研究送检样品的检测结果相似, 可见, 山东省、江苏省、河北省、四川省、华中地区和河南省部分地区的 PEDV 感染现象普遍且阳性率在猪腹泻病毒病中占比较大。近年来, PEDV 变异株在持续的免疫压力下其基因组的变异速率加快^[23], 而这些地区 PEDV 临床检测样品的阳性率又有不断增长的趋势, 因此, 对相关地区生猪病毒性腹泻病的监测与防控还需进一步关注。

REFERENCES

- [1] Chae C, Kim O, Choi C, Min K, Cho WS, Kim J, Tai JH. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs[J]. *The Veterinary Record*, 2000, 147(21): 606-608
- [2] Zhang Q, Hu RM, Tang XB, Wu CL, He QG, Zhao ZQ, Chen HC, Wu B. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(8): 1631-1636
- [3] 孔维欢, 王晶晶, 万鹏程, 石国庆. 猪 PEDV 与 PDC_oV 二重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(11): 205-209
- Kong WH, Wang JJ, Wan PC, Shi GQ. Establishment of a duplex RT-PCR detection method for porcine PEDV and PDC_oV[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(11): 205-209 (in Chinese)
- [4] Ding GM, Fu YG, Li BY, Chen JN, Wang JL, Yin BS, Sha WL, Liu GL. Development of a multiplex RT-PCR for the detection of major diarrhoeal viruses in pig herds in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(2): 678-685
- [5] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175
- [6] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161-163
- [7] Diel DG, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes MHV, Christopher-Hennings J, Nelson EA. Porcine epidemic diarrhea virus: an overview of current virological and serological diagnostic methods[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 60-70
- [8] Farkas T, Singh A, Le Guyader FS, La Rosa G, Saif L, McNeal M. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of GI, GII and GIV noroviruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 223: 109-114
- [9] Zhang JQ. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 71-84
- [10] Kim O, Chae C. *In situ* hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets[J]. *Veterinary Pathology*, 2000, 37(1): 62-67
- [11] 邓宇, 孙春清, 张宏彪, 蔺涛, 张荣, 龙进学, 黄律, 曹三杰, 袁世山, 文心田, 等. 1 株猪源牛病毒性腹泻病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(3): 416-423
- Deng Y, Sun CQ, Zhang HB, Lin T, Zhang R, Long JX, Huang L, Cao SJ, Yuan SS, Wen XT, et al. Isolation and identification of a pig bovine viral diarrhea virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(3): 416-423 (in Chinese)
- [12] 吕建军. 猪感染牛病毒性腹泻病毒的诊断[J]. *畜牧与兽医*, 2014, 46(11): 109-111
- Lü JJ. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection in pigs[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 46(11): 109-111 (in Chinese)
- [13] 陶洁, 李本强, 程靖华, 马玉飞, 刘惠莉. 猪源牛病毒性腹泻病毒 1 型分离株的鉴定及培养特性研究[J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(12): 1555-1561
- Tao J, Li BQ, Cheng JH, Ma YF, Liu HL. Identification of bovine viral diarrhea virus type 1 isolate from pig origin and its characters on cellular culture[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(12): 1555-1561 (in Chinese)
- [14] 梁洪, 王怀禹, 粟元文, 魏玲. 猪源牛病毒性腹泻病毒与猪瘟病毒一步法双重 RT-PCR 鉴别检测方法的建立及应用[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(10): 25-29
- Liang H, Wang HY, Su YW, Wei L. Establishment and application of one-step double RT-PCR identification method for pig source bovine viral diarrhea virus and swine fever virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 57(10): 25-29 (in Chinese)
- [15] 苗艳, 陈亮, 朱庆贺, 李阳, 兰世捷, 徐馨, 李丹. PEDV、TGEV、PoRV 和 PKV 多重 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(3): 66-70
- Miao Y, Chen L, Zhu QH, Li Y, Lan SJ, Xu X, Li D. Establishment and application of a multiplex RT-PCR method for detecting PEDV, TGEV, PoRV and PKV[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(3): 66-70 (in Chinese)
- [16] 刘莹, 贾敬亮, 刘涛, 袁广富, 陈少杰, 王晶, 范京惠, 左玉柱. 猪 Delta 冠状病毒和猪流行性腹泻病毒双重 RT-PCR 诊断方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(2): 30-32, 35
- Liu Y, Jia JL, Liu T, Yuan GF, Chen SJ, Wang J, Fan JH, Zuo YZ. Establishment of a duplex reverse transcription-PCR for porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(2): 30-32, 35 (in Chinese)
- [17] 郭容利, 何孔旺, 倪艳秀, 茅爱华, 温立斌, 李彬, 王小敏, 俞正玉. PEDV、TGEV、PARV 多重 RT-PCR 检

- 测方法的建立及其应用[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 1065-1069
- Guo RL, He KW, Ni YX, Mao AH, Wen LB, Li B, Wang XM, Yu ZY. Establishment and clinical application of a multiplex reverse transcription-PCR for detection of porcine epidemic diarrhea virus, porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine group A rotavirus[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(5): 1065-1069 (in Chinese)
- [18] 李丽敏, 朱卫霞, 王晓波, 魏艳秋, 张鹤, 张义明, 宋勤叶. 猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪 A 型轮状病毒多重 RT-PCR 方法的建立及其应用[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(2): 216-220, 227
- Li LM, Zhu WX, Wang XB, Wei YQ, Zhang H, Zhang YM, Song QY. Establishment and application of a multiplex reverse transcription-PCR for detecting porcine epidemic diarrhea virus, porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine group A rotavirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(2): 216-220, 227 (in Chinese)
- [19] 霍金耀, 郑逢梅, 陈陆, 余秋颖, 常洪涛, 陈文定, 明星, 郑关民, 赵军, 王川庆. 猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒、A 群轮状病毒和嗜病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(12): 1792-1797
- Huo JY, Zheng FM, Chen L, Yu QY, Chang HT, Chen WD, Ming X, Zheng GM, Zhao J, Wang CQ. Establishment and clinical application of a multiplex reverse transcription-PCR for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, group A rotavirus, and porcine kobuvirus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(12): 1792-1797 (in Chinese)
- [20] 任玉鹏, 张斌, 汤承, 曹恭貌, 岳华. 同时检测 PEDV 和 TGEV 及 PDCoV 的多重 RT-PCR 方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(6): 756-762
- Ren YP, Zhang B, Tang C, Cao GM, Yue H. Development and application of a multiplex RT-PCR for detecting PEDV, TGEV and PDCoV[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(6): 756-762 (in Chinese)
- [21] Song D, Zhou X, Peng Q, Chen Y, Zhang F, Huang T, Zhang T, Li A, Huang D, Wu Q, et al. Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 575-580
- [22] 李炳晓, 丁庆文, 韦学雷, 郑兰兰, 魏战勇. 河南省部分地区腹泻仔猪流行性腹泻病毒和 δ 冠状病毒检测与分析[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(4): 17-21
- Li BX, Ding QW, Wei XL, Zheng LL, Wei ZY. Detection and analysis of PEDV and PDCoV infections in piglets with diarrhea in some areas of Henan province[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(4): 17-21 (in Chinese)
- [23] Su MJ, Li CQ, Qi SS, Yang D, Jiang N, Yin BS, Guo DH, Kong FZ, Yuan DW, Feng L, et al. A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(3): 1129-1140